

УДК 66.061.3; 282.29

## ВЫДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ ИЗ ЛИШАЙНИКА *HYROGYMNINGIA PHYSODES*

© О.С. Бровка<sup>1</sup>, А.А. Слобода<sup>1</sup>, Д.В. Жильцов<sup>1\*</sup>, Т.А. Бойцова<sup>1</sup>, М.А. Пустынная<sup>1</sup>, А.Д. Ивахнов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова УрО РАН, пр. Никольский, 20, Архангельск, 163020 (Россия), e-mail: dnorton.usa@gmail.com

<sup>2</sup> Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 (Россия)

Проведен сравнительный анализ эффективности извлечения фенольных соединений (низкомолекулярные фенолы, флавоноиды, атранорин) из таллома лишайника вида *Hyrogymnia physodes* с применением различных экстракционных методов: мацерация, исчерпывающая экстракция в аппарате Сокслета, экстракция под действием СВЧ-поля и сверхкритическая флюидная экстракция. Установлено, что при экстракции в аппарате Сокслета в ряду исследуемых экстрагентов (этанол, ацетон, хлороформ, вода) этанол позволяет извлечь наибольшее количество низкомолекулярных фенолов и флавоноидов из таллома лишайника: до 8.4% от абсолютно сухой массы лишайника, при этом наибольшая степень извлечения атранорина достигается при экстракции ацетоном: до 4.1% от абсолютно сухой массы лишайника. Метод мацерации 96% этанолом позволяет извлечь до 3.8% фенольных соединений от абсолютно сухой массы лишайника, при этом установлено, что оптимальная продолжительность процесса для выделения низкомолекулярных фенолов и атранорина составляет 60 мин, а для флавоноидов – 120 мин. Показано, что применение СВЧ-обработки при мацерации 96% этанолом не приводит к увеличению выхода фенольных соединений, который соизмерим с таковым при мацерации без дополнительной обработки. Установлено, что при сверхкритической флюидной экстракции отмечается высокая избирательность к группе соединений фенольной природы: их содержание в экстракте достигает 90.8% от общего выхода сухих веществ, однако их выход лишь незначительно увеличивается (до 8.9% от абсолютно сухой массы лишайника) в сравнении с экстракцией в аппарате Сокслета.

*Ключевые слова:* *Hyrogymnia physodes*, вещества фенольной природы, СВЧ-экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция.

*Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства экономического развития, промышленности и науки Архангельской области (проект № 123050500035-0 «Разработка эффективных способов извлечения биологически активных веществ фенольной природы из лишайника *Hyrogymnia physodes*») с использованием оборудования ЦКП Арктика (САФУ) и ЦКП КТ РФ-Арктика (ФИЦКИА УрО РАН).*

### Введение

В последние годы во всем мире наблюдается устойчивый интерес к продуктам, получаемым из возобновляемого сырья, как альтернативе продукции промышленного органического синтеза. Он обусловлен рядом причин, одной из которых является невозможность синтеза многих сложных по составу природных

---

Бровка Ольга Степановна – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: brovko-olga@rambler.ru

Слобода Анатолий Анатольевич – младший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: sloboda.iepn@yandex.ru

Жильцов Дмитрий Владимирович – младший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: dnorton.usa@gmail.com

Окончание на С. 156.

соединений, содержащихся в биомассе. Получаемые из растительной биомассы уникальные препараты обладают высокой биологической активностью. Ценными компонентами различных видов растений в первую очередь являются вещества фенольной природы (фенольные соединения – ФС), которые представляют собой группу вторичных метаболитов. Перспективными источниками ФС, среди которых следует отметить лишайниковые

\* Автор, с которым следует вести переписку.

кислоты (ЛК), флавоноиды (ФВ) и низкомолекулярные фенолы (НФ), могут служить эпифитные лишайники *Hypogymnia physodes*, которые широко распространены в лесах на территории России. Эти лишайники преимущественно встречаются на стволах и ветвях хвойных (сосна, ель) и лиственных пород деревьев (березы, осина), а также на валежнике. Заготовка лишайников в качестве сырья для дальнейшего получения экстрактов, обогащенных биологически активными веществами (БАВ), может рассматриваться как дополнительное использование недревесных лесных ресурсов.

По данным [1], в лишайнике *H. physodes* содержатся следующие ЛК: атранорин (АТ), хлоратранорин, физодовая, физодоловая, 3-гидроксифизиодовая, 2-О-метилфизиодовая и протоцетраровая кислоты. Согласно современным исследованиям, одним из основных вторичных метаболитов в талломе этого лишайника является АТ [2, 3]. Присутствие АТ в разных видах лишайников придает особую привлекательность этому соединению, обладающему широким спектром биологической активности [3]. В работах [4–6] показана высокая антибактериальная активность АТ против ряда грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger sp.*, *Fusarium solani*. Установлено также, что АТ проявляет антиоксидантную, противогрибковую, противовирусную, антипротозойную, фитозащитную активности [3, 7, 8]. Исследования по выделению ЛК из слоевищ лишайников различных видов многочисленны, но в основном касаются выделения наиболее распространенного и хорошо изученного фенольного метаболита лишайников – усниновой кислоты [9–13]. Работы, посвященные выделению АТ из лишайникового сырья, встречаются лишь единично [3].

Помимо лишайниковых кислот ФС лишайника *H. physodes*, как и любого представителя растительного мира, представлены НФ и ФВ. Эти соединения, благодаря особенностям своего строения, обуславливают антиоксидантную активность растительных экстрактов, оказывают на организм человека противовоспалительное, антигистаминное, противоотечное и противораковое действие, стабилизируют клеточные мембраны, тормозят процессы старения, положительно влияют на функцию сердечно-сосудистой системы [14–16].

Таким образом, БАВ фенольной природы, содержащиеся в талломе лишайника *H. physodes*, перспективны для применения в биомедицине и фармакологии.

Классическими методами выделения БАВ из растительного сырья являются экстракционные с применением органических растворителей: бензол, ацетон, гексан, этанол, петролейный эфир, хлороформ или их смеси. К ним относятся мацерация (настаивание), перколяция (непрерывная фильтрация экстрагента сквозь слой сырья), реперколяция [11, 15]. Также применяются различные физические способы воздействия на сырье с целью интенсификации экстракционного процесса: использование техники сверхвысокочастотного излучения (СВЧ) [11, 16], воздействие ультразвука [17] и др. В особую группу следует выделить методы экстракции с применением в качестве экстрагентов растворителей в суб- и сверхкритическом состоянии [9, 11–13]. Данные методы позволяют выделять продукты экстракции из растительного сырья, не приводя к их деструкции и максимально сохраняя биологическую ценность всех компонентов [10–13, 18].

Цель данной работы – сравнительный анализ эффективности применения различных методов экстракции для извлечения соединений фенольной природы из таллома лишайника вида *H. physodes*.

### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выбран эпифитный лишайник *H. physodes* (L.) Nyl., широко распространенный полиморфный вид листоватых лишайников. Исследуемые образцы лишайника отобраны на территории смешанного леса вне зоны антропогенного и техногенного воздействия на Большом Соловецком острове (архипелаг Соловецкий, Архангельская область). Талломы лишайника *H. physodes* розетковидные с беспорядочно расположенными, тесно сближенными или налегающими друг на друга лопастями, которые

в центре плотно прижаты к субстрату [19] (рис. 1).

Перед проведением экстракции талломы лишайника *H. physodes* отделяли от частичек коры и высушивали на воздухе без воздействия прямого солнечного света. Высушенные образцы лишайника размалывали на лабораторной мельнице VLM (*Вилитек*, Россия) и хранили в плотных бумажных пакетах в темноте при комнатной температуре.

Бойцова Татьяна Александровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: tboitsova@yandex.ru

Пустынная Мария Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: mpustynnaa@gmail.com

Ивахнов Артем Дмитриевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров и ЦКП НО «Арктика» (САФУ), e-mail: ivahnov-tema@yandex.ru

Для исследования использовали фракцию размером 2.0–5.0 мм, составляющую 80% от размолотого образца. Влажность ( $8.1 \pm 0.2\%$ ) и зольность ( $5.5 \pm 0.1\%$ ) образца, определяли по стандартным методикам [20, 21].

Экстракцию БАВ из лишайника *H. physodes* проводили следующими методами:

– в аппарате Сокслета (перколяция) различными растворителями: ацетон, этанол 96%, хлороформ (все растворители марки ХЧ), дистиллированная вода;

– мацерация этанолом концентрацией 30, 40, 70 и 96% при продолжительности экстракции 30, 60 и 120 мин, модуль экстракции 1 : 10;

– экстракция 96% этанолом под воздействием СВЧ-поля при удельной мощности поля 350 Вт/ч, модуле экстракции 1 : 15 и продолжительности обработки от 5 до 20 мин, условия процесса выбраны согласно [11];

– сверхкритическая флюидная экстракция (СКФЭ) диоксидом углерода на установке SFE 5000 (Waters, США). Навеску сырья (~30 г) помещали в автоклав и разогревали до 80 °С. После установления температуры выполняли экстракцию при скорости потока диоксида углерода 22.5 г/мин с добавлением в качестве соразтворителя этанола (2.5 г/мин) при давлении 400 атм. и продолжительности процесса 180 мин. Условия экстракционного процесса исследовались ранее в работах [11–13].

Содержание сухих веществ (СВ) в экстрактах определяли гравиметрическим методом [22]. В состав сухих веществ экстракта входят НФ, ФВ, АТ и другие компоненты (рис. 2–5).

Содержание НФ в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом с реактивом Фолина-Дениса, позволяющем получать очень близкие и статистически достоверные значения, как и в методе с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [23, 24]. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 730 нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). В качестве стандарта использовали галловую кислоту (Sigma-Aldrich, США).

Содержание ФВ в экстрактах определяли фотоколориметрическим методом, основанном на реакции комплексообразования ФВ с солями металлов [25]. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 370 нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). В качестве стандарта использовали дигидрокверцетин (Sigma-Aldrich, США).

Количественное содержание АТ в экстрактах проводили методом ВЭЖХ на приборе LCMS – 2020 (Shimadzu, Япония). Условия хроматографирования: подвижная фаза – 0.5% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил в объемном соотношении 30:70; колонка RestekUltraC18 100 мм × 3 мм, размер зерна неподвижной фазы – 3 мкм, скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы – 5 мкл. В качестве стандарта выступал образец атранорина (Sigma-Aldrich, США).

Выход СВ, НФ, ФВ и АТ выражали в % от абсолютно сухой массы (% от а.с.м.) лишайника.

Антирадикальную активность (АРА) экстрактов оценивали по методике [26] с применением катион-радикала АВТС. Для построения калибровочного графика использовали тролокс (Sigma – Aldrich, США).

Все аналитические измерения были выполнены в трех повторностях. Результаты экспериментов представлены в виде средней арифметической величины и ее абсолютной ошибки. Для установления статистической взаимосвязи между параметрами использовали t-критерий Стьюдента при доверительном уровне  $P_i=5\%$ .

### Результаты и их обсуждение

*Влияние природы растворителя на эффективность извлечения ФС при экстракции в аппарате Сокслета.* Выбор растворителей при экстракции в аппарате Сокслета был обусловлен их различной полярностью и способностью экстрагировать вещества различной природы. По диэлектрической проницаемости ( $\epsilon$ ) применяемые нами растворители можно расположить в ряд по увеличению их полярности: хлороформ ( $\epsilon=4.81$ ) < ацетон ( $\epsilon=20.9$ ) < этанол ( $\epsilon=25.1$ ) < вода ( $\epsilon=80.4$ ) [27].

Показано, что наибольший выход СВ (14.5–14.9% от а.с.м. лишайника), вне зависимости от полярности применяемого растворителя, наблюдается в этаноловых, ацетоновых и хлороформных экстрактах, а минимальное содержание СВ отмечено в водном экстракте (3.5% от а.с.м. лишайника) (рис. 2А).



Рис. 1. Внешний вид лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.

Обнаружено, что наилучшую экстрагирующую способность по отношению к ФС в ряду изучаемых растворителей проявляет этиловый спирт. Выход ФС (НФ, ФВ и АТ) при экстракции этанолом составляет 9.8% от а.с.м. лишайника, что составляет 66.2% от общего выхода СВ (рис. 2Б). Ацетон и хлороформ позволяют извлечь ФС 7.5 и 5.8% от а.с.м. лишайника, что составляет 51.6 и 38.7% от общего выхода СВ, соответственно (рис. 2Б). В ряду исследуемых экстрагентов наибольшую экстрагирующую способность по отношению к АТ проявляет ацетон, извлекающий до 4.1% АТ от а.с.м. лишайника.

Многие лишайниковые кислоты плохо растворимы в воде, но все-таки могут в незначительном количестве переходить в водный раствор. Так, согласно работе [28], было установлено, что растворимость атранорина в воде составляет около 5 мг/л, однако при применении метода ВЭЖХ не удалось обнаружить атранорин в водном экстракте, хотя нижняя граница его определения данным методом составляла 0.1 мг/л.

Помимо положительных сторон метода экстракции в аппарате Сокслета (простота оборудования, полнота извлечения экстрактивных веществ) стоит отметить и его недостатки, а именно значительная продолжительность процесса (6 ч), большой расход растворителя и невозможность анализа нескольких проб одновременно в одном экстракторе.

Таким образом, методом экстракции в аппарате Сокслета с применением в качестве экстрагентов этанола и ацетона возможно получить из лишайника экстракты с высоким содержанием ФС (7.5–9.8% от а.с.м. лишайника). Данные растворители обеспечивают экстракцию как гидрофильных, так и липофильных веществ.

*Влияние состава растворителя и продолжительности процесса мацерации на эффективность извлечения ФС.* Как показали эксперименты, проведенные в аппарате Сокслета, для извлечения ФС из *H. physodes* целесообразно применять в качестве экстрагента этанол. Кроме того, этанол широко применяется в медицинской практике для получения настоек, экстрактов и т.п. Изменение доли этанола в водно-спиртовых смесях дает возможность получать экстракты с различным количественным составом извлекаемых ФС. Результаты экспериментов, показывающие влияние концентрации этанола на выход ФС, представлены на рисунке 3А.

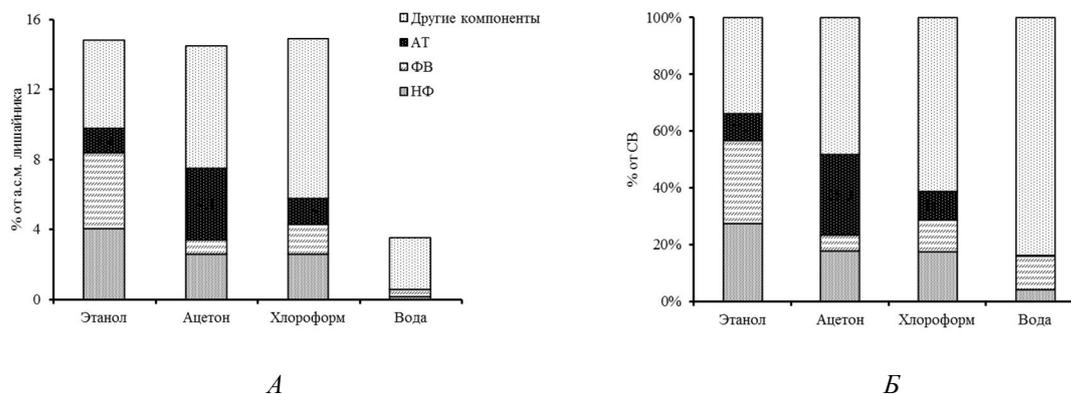


Рис. 2. Выход НФ, ФВ и АТ в зависимости: от вида экстрагента при экстракции в аппарате Сокслета (А); доля (%) НФ, ФВ и АТ в экстракте от выхода СВ (Б)

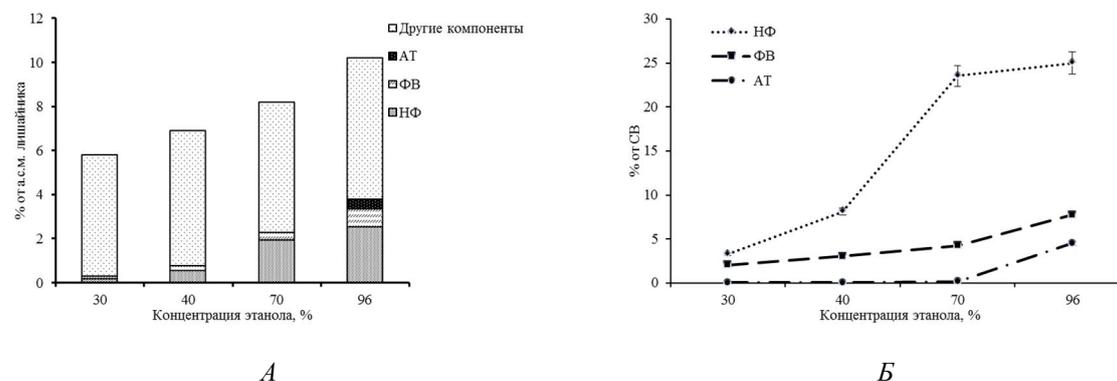


Рис. 3. Выход НФ, ФВ, АТ в зависимости от концентрации экстрагента (этанол) (А); доля (%) НФ, ФВ и АТ в экстракте от выхода СВ (Б)

Показано, что наименьший выход ФС (6.2% от общего выхода СВ) наблюдается при экстракции 30% этанолом (рис. 3Б), так как при низкой концентрации этилового спирта в смеси уменьшается экстрагирующая способность растворителя. Увеличение концентрации этанола с 30 до 96% приводит к повышению эффективности извлечения ФС: выход ФВ, НФ и АТ возрастает в 6.6, 13.4 и 219 раза соответственно (рис. 3А).

Влияние продолжительности процесса на эффективность извлечения ФС из талломов лишайника при мацерации 96% этанолом отражено на рисунке 4.

Показано, что наибольший выход НФ и АТ наблюдается при продолжительности экстракции 60 мин: 2.93 и 1.0% от а.с.м. лишайника, соответственно, дальнейшее увеличение продолжительности процесса не приводит к повышению выхода этих веществ (рис. 4А). Суммарная доля НФ и АТ от выхода СВ с увеличением продолжительности процесса экстракции с 30 до 120 мин возрастает незначительно с 27.3 до 29.1% (рис. 4Б). Однако для ФВ отмечается трехкратное возрастание выхода (с 0.3 до 0.9% от а.с.м. лишайника) при увеличении продолжительности экстракции с 30 до 120 мин, что соответствует 7.7% от выхода СВ (рис. 4Б). Таким образом, результаты исследований показали, что для наиболее эффективного извлечения НФ и АТ из таллома лишайника *H. physodes* мацерацию 96%-ным этанолом рекомендуется проводить в течение 60 мин, а для ФВ – 120 мин.

*Влияние продолжительности СВЧ-экстракции на эффективность извлечения ФС.* В настоящее время особое внимание уделяется изучению различных физико-химических воздействий на растительное сырье, предназначенное для получения экстрактов различного состава. С этой точки зрения исследуется возможность применения ультразвуковых волн, электромагнитного излучения разных частотных диапазонов. Показано, что одним из основных преимуществ СВЧ-экстракции растительных материалов перед традиционными способами экстрагирования (перколяция, мацерация) является значительное сокращение продолжительности процесса, как правило, от нескольких секунд до 15–20 мин вместо 3–4 ч [11, 16, 29].

Влияние продолжительности СВЧ-экстракции таллома лишайника на выход ФС представлено на рисунке 5. При обработке растительного сырья СВЧ излучением достигается большая скорость нагрева и достаточная равномерность излучения, что позволяет увеличить эффективность извлечения целевых биологически активных компонентов без их деструкции. Показано, что при двадцатиминутной СВЧ-обработке выход ФС возрастает в 1.3 раза по сравнению с пятиминутной обработкой. При мацерации 96% этанолом выход ФС составил 3.8% от а.с.м. лишайника (рис. 3А) как и при СВЧ экстракции при продолжительности 20 мин – 3.7% от а.с.м. лишайника (рис. 5А). Таким образом, СВЧ-экстракция не позволяет увеличить выход ФС в сравнении с методом мацерации, однако позволяет интенсифицировать процесс, так как аналогичный выход ФС получен при значительно меньшей продолжительности процесса (20 мин против 120 мин).

Суммарная доля НФ и АТ от выхода СВ возрастает с 17.9 до 22.7% при увеличении продолжительности СВЧ-обработки с 5 до 20 мин. Однако для ФВ отмечается экстремальная зависимость их доли в экстракте от продолжительности обработки: максимальная доля ФВ от выхода СВ (10.2%) отмечается при 10-минутной обработке (рис. 5Б).

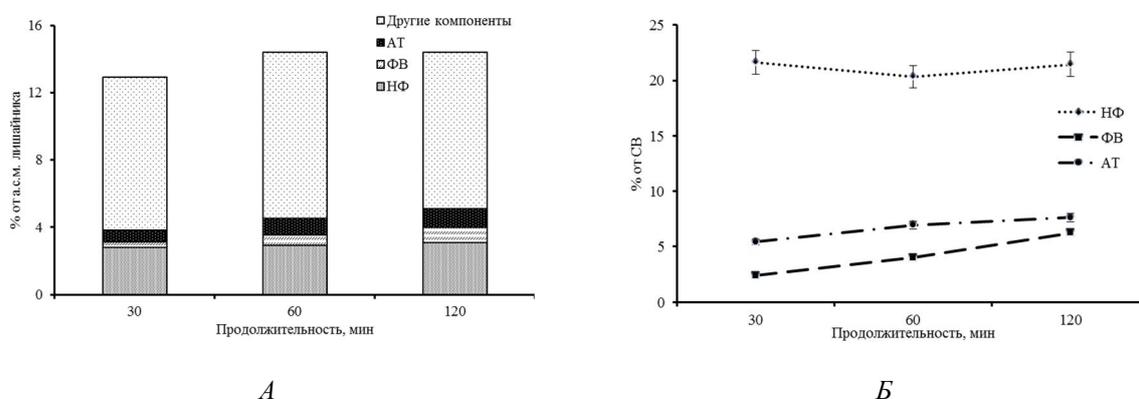


Рис. 4. Выход НФ, ФВ и АТ в зависимости от продолжительности процесса (мацерация этанолом) (А); доля (%) НФ, ФВ и АТ в экстракте от выхода СВ (Б)

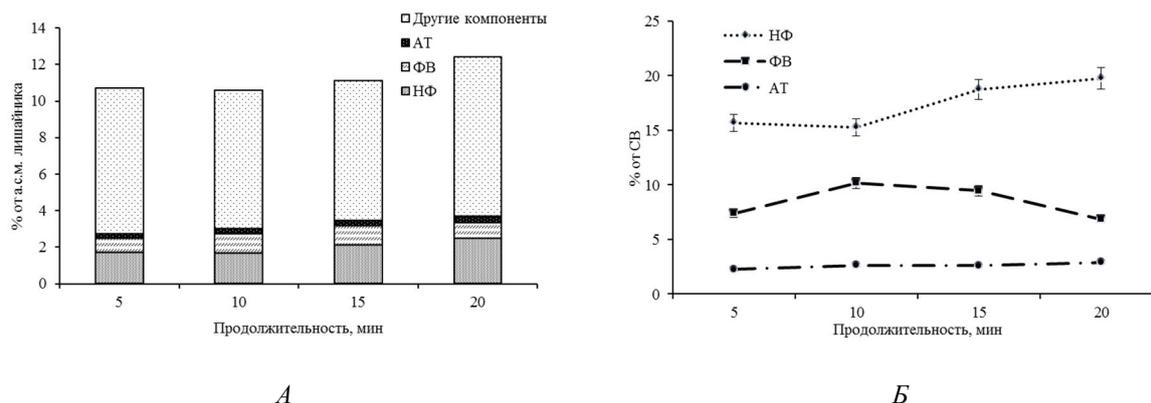


Рис. 5. Выход HF, ФВ и АТ в зависимости от продолжительности СВЧ-экстракции (А); доля (%) HF, ФВ и АТ в экстракте от выхода СВ (Б)

*Применение СКФЭ для извлечения ФС из лишайника.* СКФЭ находит все большее применение в химической промышленности, так как при использовании этого метода отпадает необходимость очистки БАВ от следов растворителей, что существенно упрощает технологический процесс и положительно сказывается на применении подобных экстрактов, например, в фармацевтической промышленности. Так, метод СКФЭ позволяет выделять усниновую кислоту из лишайников без применения органических растворителей, и при этом усниновая кислота выделяется в твердом виде [30]. При применении СКФЭ диоксидом углерода (со-растворитель – этанол) таллома лишайника *H. physodes* выход HF, ФВ и АТ в экстракте составил 4.4, 1.0 и 3.5% от а.с.м. лишайника, соответственно, что суммарно составляет 90.8% от общего количества СВ.

Таким образом, метод СКФЭ сравним по эффективности извлечения с методом экстракции органическими растворителями в аппарате Сокслета (ацетон, этанол) при очень высокой избирательности по отношению к веществам фенольной природы.

*Антирадикальная активность экстрактов лишайника, полученных разными методами экстракции.* Для экстрактов, полученных различными методами, определена АРА, так как в работах [2, 6–8] была показана высокая биологическая активность вторичных метаболитов, выделенных из лишайника *H. physodes*. Результаты представлены в таблице.

Исчерпывающая экстракция в аппарате Сокслета различными органическими растворителями (ацетон, этанол, хлороформ) позволяет получить экстракты с высокими значениями АРА (300–335 мкмоль тролокса-экв/г) за счет высокого содержания в них ФС (рис. 2А). При СКФЭ, мацерации и СВЧ-экстракции получены экстракты, величина АРА для которых в 3 раза меньше: 107–121 мкмоль тролокса-экв/г, однако продолжительность экстракции при реализации этих методов существенно ниже (в 3–18 раз) (табл.). Таким образом, величина АРА экстрактов в значительной степени определяется содержанием в них ФС.

В ранее проведенных авторами исследованиях [31] для экстрактов, полученных из биомассы плодового тела дереворазрушающего гриба *F. fomentarius*, также была выявлена линейная зависимость между содержанием ФС и АРА с высоким коэффициентом детерминации (0.8994).

АРА экстрактов лишайника *H. physodes*, полученных разными методами экстракции

Метод экстракции	Условия экстракции (экстрагент, продолжительность)	АРА, мкмоль тролокса-экв / г
Мацерация	96% этанол, 120 мин	128±6
Исчерпывающая экстракция в аппарате Сокслета	Вода, 360 мин	75±4
	Ацетон, 360 мин	300±15
	96% этанол, 360 мин	332±16
	Хлороформ, 360 мин	335±17
СВЧ-экстракция	96% этанол, 20 мин	121±5
СКФЭ	CO <sub>2</sub> (флюид) + этанол (со-растворитель), 120 мин	107±5

### Выводы

Показано, что при экстракции в аппарате Сокслета наибольшей экстрагирующей способностью в ряду исследуемых растворителей по отношению к веществам фенольной природы обладают этанол и ацетон: они извлекают из таллома лишайника *H. physodes* НФ, ФВ и АТ до 66, 52 и 39% от общего выхода СВ, соответственно.

Установлено, что при мацерации наименьшая степень извлечения НФ, ФВ и АТ наблюдается при использовании в качестве экстрагента 30% этанола. При увеличении концентрации этанола до 96% общий выход ФС достигает 27.2% от СВ, что обусловлено повышением растворимости фенольных веществ в экстрагенте. Выявлено, что наибольший выход НФ и АТ при мацерации с 96% этанолом наблюдается при продолжительности процесса 60 мин (2.93 и 1.00% от а.с.м. лишайника соответственно), тогда как для ФВ отмечается трехкратное возрастание выхода (с 0.3 до 0.9% от а.с.м. лишайника) при увеличении продолжительности экстракции с 30 до 120 мин, таким образом, доля ФВ в экстракте достигает 7.7% от выхода СВ.

Выход фенольных веществ при СВЧ-экстракции и СКФЭ талломов лишайника изменяется незначительно в сравнении с традиционными методами экстракции (мацерация и экстракция в аппарате Сокслета). Отметим также, что при СКФЭ полученный экстракт содержит более 90.8% соединений фенольной природы от общего выхода СВ, что в дальнейшем дает возможность получения высокоочищенных препаратов природных антиоксидантов.

Экстракты, полученные исчерпывающей экстракцией в аппарате Сокслета, обладают высокими значениями АРА (300–335 мкмоль тролокса-экв /г) в независимости от применяемого органического растворителя (этанол, ацетон, хлороформ). При экстракции с применением СВЧ-обработки и СКФЭ значения АРА получаемых экстрактов почти в 3 раза ниже (121 и 107 мкмоль тролокса-экв /г соответственно) по сравнению с исчерпывающей экстракцией в аппарате Сокслета.

### Список литературы

1. Molnar K., Farkas E. Depsides and depsidones in populations of the lichen *Hypogymnia physodes* and its genetic diversity // *Annales Botanici Fennici*. 2011. Vol. 48. Pp. 473–482. DOI: 10.5735/085.048.0605.
2. Храменкова О.М. Лишайники *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Cladonia arbuscula* и *Xanthoria parietina* как источники веществ с антибактериальной активностью // Бюллетень Брянского отделения РБО. 2017. Т. 1. №9. С. 50–58.
3. Studzinska-Sroka E., Galanty A., Bylka W. Atranorin – an interesting lichen secondary metabolite // *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 17. Pp. 1633–1645. DOI: 10.2174/1389557517666170425105727.
4. Yılmaz M., Tay T., Kıvanç M., Türk H., Türk A.O. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent // *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2005. Vol. 60. Pp. 35–38. DOI: 10.1515/znc-2005-1-207.
5. Kosanić M., Ranković B., Stanojković T. Investigation of selected Serbian lichens for antioxidant, antimicrobial and anticancer properties // *Journal of Animal & Plant Sciences*. 2013. Vol. 23. Pp. 1628–1633.
6. Pavlovic V. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes // *Food Chem. Toxicol.* 2012. Vol. 51. Pp. 160–164. DOI: 10.1016/j.fct.2012.04.043.
7. Stojanović G., Stojanović I., Stankov-Jovanović V., Mitić V. Reducing power and radical scavenging activity of four *Parmeliaceae species* // *Central European Journal of Biology*. 2010. Vol. 5. Pp. 808–813. DOI: 10.2478/s11535-010-0090-5.
8. Stojanović I.Z., Stanković M., Jovanović O., Petrović G., Smelcerović A., Stojanović G.S. Effect of *Hypogymnia physodes* extracts and their depsidones on micronucleus distribution in human lymphocytes // *Natural Product Communications*. 2013. Vol. 8. Pp. 109–112. DOI: 10.1177/1934578X1300800125.
9. Соколов Д.Н., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. Усниновая кислота: получение, строение, свойства и химические превращения // *Успехи химии*. 2012. Т. 81. №8. С. 747–768.
10. Bonny S., Hitti E., Boustie J., Bernard A., Tomasi S. Optimization of a microwave-assisted extraction of secondary metabolites from crustose lichens with quantitative spectrophotodensitometry analysis // *J. Chromatogr. A*. 2009. Vol. 6. Pp. 7651–7656. DOI: 10.1016/j.chroma. 2009.09.009.
11. Бровко О.С., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А. Ивахнов А.Д., Боголицын К.Г., Вальчук Н.А. Сравнительный анализ традиционных и современных методов экстракции усниновой кислоты из лишайникового сырья // *Фундаментальные исследования*. 2015. №11. С. 659–663.
12. Brovko O.S., Ivakhnov A.D., Palamarchuk I.A., Boitsova T.A. Supercritical fluid extraction of usnic acid from lichen of *Cladonia* Genus // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2017. Vol. 11, no. 8. Pp. 1306–1311.
13. Бойцова Т.А., Бровко О.С., Ивахнов А.Д. и др. Оптимизация процесса СКФ-экстракции усниновой кислоты из лишайника *Usnea subfloridana* // *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика*. 2019. Т. 14. №4. С. 9–18. DOI: 10.34984/SCFTP.2019.14.4.002.

14. Packer L., Sies H. Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome. New York, 2008. 344 p.
15. Макарова Н.В., Валиулина Д.Ф., Азаров О.И., Кузнецов А.А. Сравнительные исследования содержания фенольных соединений, флавоноидов и антиоксидантной активности яблок разных сортов // Химия растительного сырья. 2018. №2. С. 115–122. DOI: 10.14258/jcrpm.2018022205.
16. Коптелова Е.Н., Кутакова Н.А., Третьяков С.И. Извлечение экстрактивных веществ и бетулина из бересты при воздействии СВЧ-поля // Химия растительного сырья. 2013. №4. С. 159–164. DOI: 10.14258/jcrpm.1304159.
17. Зибарева Л.Н., Филоненко Е.С. Влияние ультразвукового воздействия на экстракцию биологически активных соединений растений семейства *CARYOPHYLLACEAE* // Химия растительного сырья. 2018. №2. С. 145–151. DOI: 10.14258/jcrpm.2018023703.
18. Пичугин А.А., Тарасов В.В. Суперкритическая экстракция и перспективы создания новых бессточных процессов // Успехи химии. 1991. Т. 60. №11. С. 1249–1254. DOI: 1070/RC1991v060n11ABEN001142.
19. Андреев М.П., Гимельбрант Д.Е. Флора лишайников России. Биология, экология, разнообразие, распространение и методы изучения лишайников. М.; СПб., 2014. 392 с.
20. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1991. 320 с.
21. ГОСТ 16483.7-71. Древесина. Методы определения влажности. М., 2006. 4 с.
22. ГОСТ 22760-77. Молочные продукты. Гравиметрический метод определения жира. М., 2009. 6 с.
23. Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина-Дениса и реактивом Фолина-Чокальтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья. 2021. №2. С. 291–299. DOI: 10.14258/jcrpm.2021028250.
24. Waterman P.G., Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. London, 1994. 238 p.
25. Коруткин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музыкакина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск, 2007. 232 с.
26. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // Free Radical Biology and Medicine. 1999. Vol. 26. Pp. 1231–1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
27. Никольский Б.П. Справочник химика. Т. 4. Аналитическая химия. Спектральный анализ. Показатели преломления. М., 1967. 919 с.
28. Iskandar I.K., Syers J.K. Solubility of lichen compounds in water: pedogenetic implications // Lichenologist. 1971. Vol. 5. Pp. 45–50. DOI: 10.1017/S0024282971000082.
29. Бадюгина А.И., Третьяков С.И., Кутакова Н.А., Коптелова Е.Н. Извлечение биологически активных веществ из луба березовой коры // Химия растительного сырья. 2015. №2. С. 135–140. DOI: 10.14258/jcrpm.201502541.
30. Патент №2582978 (РФ). Способ получения твердого экстракта обогащенного усниновой кислотой рода *Cladonia* / О.С. Бровко, А.Д. Ивахнов, И.А. Паламарчук, Т.А. Бойцова, К.Г. Боголицын // БИ. 2016. №12.
31. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Бойцова Т.А., Жильцов Д.В. Суб- и сверхкритическая экстракция этанолом плодового тела гриба *Fomes fomentarius* // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2021. Т. 16. №2. С. 3–15. DOI: 10.34984/SCFTP.2021.16.2.002.

Поступила в редакцию 5 апреля 2023 г.

После переработки 17 апреля 2023 г.

Принята к публикации 21 апреля 2023 г.

**Для цитирования:** Бровко О.С., Слобода А.А., Жильцов Д.В., Бойцова Т.А., Пустынная М.А., Ивахнов А.Д. Выделение биологически активных веществ фенольной природы из лишайника *Hypogymnia physodes* // Химия растительного сырья. 2023. №4. С. 155–164. DOI: 10.14258/jcrpm.20230412826.

Brovko O.S.<sup>1</sup>, Sloboda A.A.<sup>1</sup>, Zhil'tsov D.V.<sup>1\*</sup>, Boytsova T.A.<sup>1</sup>, Pustynnaya M.A.<sup>1</sup>, Ivakhnov A.D.<sup>1,2</sup> ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF PHENOLIC NATURE FROM THE LICHEN *HYPOGYMNIA PHYSODES*

<sup>1</sup> Federal Research Center for Integrated Study of the Arctic named after. Academician N.P. Laverov RAS, pr. Nikolsky, 20, Arkhangelsk, 163012 (Russia), e-mail: dnorton.usa@gmail.com

<sup>2</sup> Northern (Arctic) Federal University named after. M.V. Lomonosova, nab. Severnaya Dviny, 17, Arkhangelsk, 163002 (Russia)

A comparative analysis of the efficiency of extraction of phenolic compounds (low molecular weight phenols, flavonoids, atranorin) from the lichen thallus of the species *Hypogymnia physodes* using various extraction methods was carried out: maceration, exhaustive extraction in a Soxhlet apparatus, extraction under the action of a microwave field, and supercritical fluid extraction. It has been established that during extraction in the Soxhlet apparatus, among the studied extractants (ethanol, acetone, chloroform, water), ethanol extracting the largest amount of low molecular weight phenols and flavonoids from the lichen thallus: up to 8.4% of the absolutely dry weight of the lichen, while the highest degree of extraction atranorine is achieved by extraction with acetone: up to 4.1% of the absolutely dry weight of the lichen. The method of maceration with 96% ethanol makes it possible to extract up to 3.8% of phenolic compounds from the absolutely dry mass of lichen, while it was found that the optimal duration of the process for the isolation of low molecular weight phenols and atranorine is 60 minutes, and for flavonoids - 120 minutes. It has been shown that the use of microwave treatment during maceration with 96% ethanol does not lead to an increase in the yield of phenolic compounds, which is commensurate with that during maceration without additional treatment. It has been established that during supercritical fluid extraction, there is a high selectivity to the group of compounds of a phenolic nature: their content in the extract reaches 90.8% of the total yield of dry substances, but their yield only slightly increases (up to 8.9% of the absolutely dry mass of lichen) in compared with Soxhlet extraction.

**Keywords:** *Hypogymnia physodes*, phenolic substances, microwave extraction, supercritical fluid extraction.

### References

1. Molnar K., Farkas E. *Annales Botanici Fennici*, 2011, vol. 48, pp. 473–482. DOI: 10.5735/085.048.0605.
2. Khranchenkova O.M. *Byulleten' Bryanskogo otdeleniya RBO*, 2017, vol. 1, no. 9, pp. 50–58. (in Russ.).
3. Studzinska-Sroka E., Galanty A., Bylka W. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 17, pp. 1633–1645. DOI: 10.2174/1389557517666170425105727.
4. Yılmaz M., Tay T., Kıvanç M., Türk H., Türk A.O. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2005, vol. 60, pp. 35–38. DOI: 10.1515/znc-2005-1-207.
5. Kosanić M., Ranković B., Stanojković T. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2013, vol. 23, pp. 1628–1633.
6. Pavlovic V. *Food Chem. Toxicol.*, 2012, vol. 51, pp. 160–164. DOI: 10.1016/j.fct.2012.04.043.
7. Stojanović G., Stojanović I., Stankov-Jovanović V., Mitić V. *Central European Journal of Biology*, 2010, vol. 5, pp. 808–813. DOI: 10.2478/s11535-010-0090-5.
8. Stojanović I.Z., Stanković M., Jovanović O., Petrović G., Smelcerović A., Stojanović G.S. *Natural Product Communications*, 2013, vol. 8, pp. 109–112. DOI: 10.1177/1934578X1300800125.
9. Sokolov D.N., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F. *Uspekhi khimii*, 2012, vol. 81, no. 8, pp. 747–768. (in Russ.).
10. Bonny S., Hitti E., Boustie J., Bernard A., Tomasi S. *J. Chromatogr. A*, 2009, vol. 6, pp. 7651–7656. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.009.
11. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Boytsova T.A., Ivakhnov A.D., Bogolitsyn K.G., Val'chuk N.A. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2015, no. 11, pp. 659–663. (in Russ.).
12. Brovko O.S., Ivakhnov A.D., Palamarchuk I.A., Boytsova T.A. *Russian Journal of Physical Chemistry. B.*, 2017, vol. 11, no. 8, pp. 1306–1311.
13. Boytsova T.A., Brovko O.S., Ivakhnov A.D. i dr. *Sverkhkriticheskiye Flyuidy: Teoriya i Praktika*, 2019, vol. 14, no. 4, pp. 9–18. DOI: 10.34984/SCFTP.2019.14.4.002. (in Russ.).
14. Packer L., Sies H. *Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome*. New York, 2008, 344 p.
15. Makarova N.V., Valiulina D.F., Azarov O.I., Kuznetsov A.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 2, pp. 115–122. DOI: 10.14258/jcprm.2018022205. (in Russ.).
16. Koptelova Ye.N., Kutakova N.A., Tret'yakov S.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2013, no. 4, pp. 159–164. DOI: 10.14258/jcprm.1304159. (in Russ.).
17. Zibareva L.N., Filonenko Ye.S. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 2, pp. 145–151. DOI: 10.14258/jcprm.2018023703. (in Russ.).
18. Pichugin A.A., Tarasov V.V. *Uspekhi khimii*, 1991, vol. 60, no. 11, pp. 1249–1254. DOI: 1070/RC1991v060n11ABEH001142. (in Russ.).
19. Andreyev M.P., Gimel'brant D.Ye. *Flora lishaynikov Rossii. Biologiya, ekologiya, raznoobraziye, rasprostraneniye i metody izucheniya lishaynikov*. [Lichen flora of Russia. Biology, ecology, diversity, distribution and methods of studying lichens]. Moscow; St. Petersburg, 2014, 392 p. (in Russ.).
20. Obolenskaya A.V., Yel'nitskaya Z.P., Leonovich A.A. *Laboratornyye raboty po khimii drevesiny i tsellyulozy*. [Laboratory work on the chemistry of wood and cellulose]. Moscow, 1991, 320 p. (in Russ.).
21. *GOST 16483.7-71. Drevesina. Metody opredeleniya vlazhnosti*. [GOST 16483.7-71. Wood. Methods for determining humidity]. Moscow, 2006, 4 p. (in Russ.).

\* Corresponding author.

22. GOST 22760-77. *Molochnyye produkty. Gravimetricheskii metod opredeleniya zhira*. [GOST 22760-77. Dairy products. Gravimetric method for determining fat]. Moscow, 2009, 6 p. (in Russ.).
23. Nikolayeva T.N., Lapshin P.V., Zagorskina N.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021, no. 2, pp. 291–299. DOI: 10.14258/jcprm.2021028250. (in Russ.).
24. Waterman P.G., Mole S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. London, 1994, 238 p.
25. Korul'kin D.Yu., Abilov Zh.A., Muzykchikina R.A., Tolstikov G.A. *Prirodnyye flavonoidy*. [Natural flavonoids]. Novosibirsk, 2007, 232 p. (in Russ.).
26. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, pp. 1231–1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
27. Nikol'skiy B.P. *Spravochnik khimika. T. 4. Analiticheskaya khimiya. Spektral'nyy analiz. Pokazateli prelomleniya*. [Chemist's Handbook. T. 4. Analytical chemistry. Spectral analysis. Refractive indexes]. Moscow, 1967, 919 p. (in Russ.).
28. Iskandar I.K., Syers J.K. *Lichenologist*, 1971, vol. 5, pp. 45–50. DOI: 10.1017/S0024282971000082.
29. Badogina A.I., Tret'yakov S.I., Kutakova N.A., Koptelova Ye.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2015, no. 2, pp. 135–140. DOI: 10.14258/jcprm.201502541. (in Russ.).
30. Patent 2582978 (RU). 2016. (in Russ.).
31. Brovko O.S., Ivakhnov A.D., Boytsova T.A., Zhil'tsov D.V. *Sverkhkriticheskiye Flyuidy: Teoriya i Praktika*, 2021, vol. 16, no. 2, pp. 3–15. DOI: 10.34984/SCFTP.2021.16.2.002. (in Russ.).

*Received April 5, 2023*

*Revised April 17, 2023*

*Accepted April 21, 2023*

**For citing:** Brovko O.S., Sloboda A.A., Zhil'tsov D.V., Boytsova T.A., Pustynnaya M.A., Ivakhnov A.D. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 4, pp. 155–164. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230412826.