

УДК 661.12

ПОЛИФЕНОЛЫ АРКТИЧЕСКИХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ: ВЫДЕЛЕНИЕ, ПОЛИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ

© *К.Г. Боголицын^{1*}, А.С. Дружинина¹, Д.В. Овчинников¹, А.Э. Паршина¹, Е.В. Шульгина¹, П.Н. Турова², А.Н. Ставрианиди²*

¹ *Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Набережная Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 (Россия), e-mail: k.bogolitsin@narfu.ru*

² *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, ул. Ленинские горы, 1, Москва, 119991 (Россия)*

Арктические бурые водоросли вида *Fucus vesiculosus* характеризуются высоким содержанием полифенольных соединений – флоротаннинов, проявляющих высокую биологическую активность. Целью настоящего исследования является разработка методологии выделения и анализ биологически активных полифенольных соединений из арктических бурых водорослей. Предлагаемая схема выделения полифенолов из бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus* основана на принципах «зеленой химии» и проводится путем последовательной разборки биомассы растительного объекта с выделением сопутствующих компонентов (липидно-пигментный комплекс, полисахариды, маннит) и максимальным выходом фракции полифенолов. В результате экспериментальной работы определены оптимальные параметры проведения каждой стадии предлагаемой схемы и проведена постадийная оценка ее эффективности. Извлекаемая фракция полифенолов содержит до 67% полифенолов относительно их содержания в исходной биомассе, причем доля полифенолов во фракции составляет до 83%. Исследование фракции флоротаннинов показало, что ее антиоксидантная активность значима и составила 553±24 (мг аскорбиновой кислоты/г экстракта). Полимолекулярный состав целевой фракции исследовали методом эксклюзионной гель-фильтрационной хроматографии, с помощью которой было показано наличие нескольких групп компонентов – низкомолекулярных и высокомолекулярных флоротаннинов с массами в диапазоне от тысячи до сотни тысяч дальтон. Полученные данные методами хромато-масс-спектрометрии и МАЛДИ масс-спектрометрии позволяют судить о наличии в полифенольной фракции низкомолекулярных флоротаннинов с массами от 250 до 1638 Да, являющимися близкими аналогами по структуре.

Ключевые слова: бурые водоросли, полифенолы, флоротаннины, извлечение, хроматография, масс-спектрометрия.

Научно-исследовательская работа выполнена в рамках проектной части государственного задания Министерства образования и науки РФ в сфере научной деятельности № 4.3273.2017/ПЧ.

Введение

Арктические бурые водоросли являются уникальным по составу сырьем для получения целого ряда веществ, обладающих широким спектром потребительских свойств. Их состав характеризуется содержанием минеральных веществ, пигментов, липидов, полифенолов, белков, аминокислот, целлюлозы, альгиновых кислот, маннита, ламинарана и фукоидана [1, 2]. Препараты, получаемые на основе данных компонентов, проявляют пробиотические, иммуномодулирующие, противовоспалительные, антисептические, сорбирующие и другие свойства [3, 4].

Боголицын Константин Григорьевич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой, e-mail: k.bogolitsin@narfu.ru

Дружинина Анна Сергеевна – аспирант, e-mail: annadruzhinina27@yandex.ru

Овчинников Денис Владимирович – инженер, e-mail: ovchinniko-deni@yandex.ru

Паршина Анастасия Эдуардовна – аспирант, e-mail: parshanastasiya@yandex.ru

Одной из наиболее значительных групп соединений, определяющих фармакологическое значение арктических бурых водорослей, являются полифенолы, а именно полимеры флороглюцина – флоротаннины, содержание которых в биомассе варьируется в зависимости от вида бурых водорослей и места их произрастания и может достигать до

Окончание на С. 66.

* Автор, с которым следует вести переписку.

20% от а.с.м. (абсолютно сухая масса) [5–7]. Так, в работе [2] авторы показали высокое содержание полифенолов в водорослях вида *Fucus vesiculosus* (15.4–18.6% а.с.м.) и *Ascophyllum nodosum* (14.6–14.8% а.с.м.), произрастающих в Белом и Баренцевом морях. Флоротаннины представляют собой весьма разнородную группу молекул, различаясь структурой и степенью полимеризации [8, 9], что значительно осложняет определение индивидуальных полифенольных соединений.

Полифенолы бурых водорослей обладают разнообразной биологической активностью [10–13], включая антиоксидантные свойства, проявляющиеся в защите организмов от повреждения активными формами кислорода [14–17]. Но, несмотря на это, используемые технологии переработки водорослей направлены преимущественно на извлечение их полисахаридной составляющей.

В настоящее время проведены обширные исследования флоротаннинов, однако актуальными остаются задачи эффективного выделения данных соединений из биомассы бурых водорослей в соответствии с принципами «зеленой химии» и дальнейшей характеристики полифенольных компонентов. В соответствии с этим целью настоящего исследования является разработка методологии выделения и анализ биологически активных полифенольных соединений из арктических бурых водорослей.

Экспериментальная часть

Объект исследования. В качестве материала для проведения экспериментов были использованы бурые водоросли вида *Fucus vesiculosus*, отобранные в ходе научно-исследовательских экспедиций «Арктический плавучий университет» в летний период 2015 и 2017 гг. в прибрежной зоне острова Большой Соловецкий акватории Белого моря. Пробы высушивались до достижения воздушно-сухого состояния при температуре 30 ± 1 °С, образцы не объединялись. После измельчения отбиралась фракция 0.1–1.0 мм.

Определение сухих веществ в экстрактах. Выход сухих веществ определяли гравиметрическим методом после упаривания экстракта при 105 °С.

Определение содержания липидов. Экстракция липидов осуществлялась по методике Блайя и Дайера [16]. Метод заключается в экстракции водорослей водно-спиртовой смесью и дальнейшем переходе липидов из экстракта в слой хлороформа.

Определение содержания пигментов. Анализ пигментов осуществлялся на ВЭЖХ системе LC-30 «Nexera» с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором. Условия анализа: неподвижная фаза – Phenomenex Luna C18 (250×4.6 мм, 5 мкм), элюент – 80% ацетонитрил – 20% изопропанол (50 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$), скорость потока – 1 мл/мин, температура – 35 °С, объем ввода – 20 мкл.

Определение содержания минеральных веществ. Определение осуществлялось гравиметрическим методом после сжигания и прокаливания образца при 650 °С до постоянной массы.

Определение ионного состава экстрактов. Определение выполнялось с использованием ВЭЖХ-системы LC-20 «Prominence» (Shimadzu, Япония). Разделение анионов проводили на колонке STAR-ION A300 (4.6×100 мм), в качестве элюента использовался водный раствор, содержащий 1.7 ммоль/л NaHCO_3 и 1.8 ммоль/л Na_2CO_3 . Разделение катионов проводили с использованием колонки Shodex IC YS-50 (4.6×125 мм) и 4 мМ водного раствора метансульфоновой кислоты в качестве элюента.

Определение содержания альгиновой кислоты. Метод заключается в экстракции альгиновой кислоты раствором щелочи с последующим подкислением раствора для осаждения альгинатов. Осадок промывался, высушивался и взвешивался [18].

Определение общего содержания белка и аминокислот. Общее содержание белка и аминокислот определялось при измерении азота на элементном анализаторе EuroEA – 3000. Условия определения: CHNS-конфигурация, высокотемпературное сжигание пробы в присутствии кислорода с последующим газохроматографическим разделением и детектированием продуктов сгорания при помощи высокочувствительного катарометрического детектора. Коэффициент пересчета общего азота в белок и аминокислоты равен 5.4 [19].

Шульгина Елена Валериевна – кандидат технических наук, заведующий лабораторией,
e-mail: e.shulgina@narfu.ru

Турова Полина Николаевна – аспирант,
e-mail: turova.polina@gmail.com

Ставрианиди Андрей Николаевич – кандидат химических наук, научный сотрудник,
e-mail: stavrianidi.andrey@gmail.com

Определение содержания легкогидролизуемых полисахаридов (ЛГП). Метод основан на гидролизе ЛГП 6 М раствором соляной кислоты и последующем определении редуцирующих веществ с использованием реактива Фелинга [20].

Определение содержания маннита. Метод основан на водной экстракции маннита с последующим образованием его комплексного соединения с сернокислой медью и фотометрическим определением его количества по оптической плотности в сравнении с холостой пробой [21].

Определение суммарного содержания полифенолов. Определение осуществлялось колориметрическим методом с применением реактива Фолина-Чокалтео [22]. В качестве стандарта использовали флороглюцин.

Изучение полимолекулярного состава методом эксклюзионной хроматографии. Определение молекулярно-массового распределения проводили с использованием ВЭЖХ системы Стайер (Россия), оснащенной фотометрическим детектором. Разделение проводили на двух последовательно соединенных колонках Phenogel, 300×7.8 мм, диаметр зерна сорбента 10 мкм (Phenomenex, США). В качестве элюента использовали диметилформамид, содержащий 0.1 М LiBr и 1% уксусной кислоты. Скорость потока элюента – 0.4 мл/мин, температура термостата – 60 °С, объем ввода – 100 мкл, аналитическая длина волны – 275 нм, концентрация анализируемых растворов – 1 мг/дм³. Градуировку системы проводили по стандартным образцам полистиролов (PSS, Германия) со среднемассовыми молекулярными массами 115 кДа, 42.3 кДа, 18.2 кДа, 9.0 кДа, 6.5 кДа, 2.8 кДа и 940 Да. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью программы Мультихром 1.5 (Амперсанд, Россия).

Исследование экстрактов методом масс-спектрометрии МАЛДИ. Анализ образцов осуществляли с использованием времяпролетного масс-спектрометра Axima Resonance (Shimadzu Biotech, Великобритания). В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту с чистотой более 99% (Sigma Aldrich, Германия). Масс-спектры записывали в режиме регистрации положительных ионов с применением рефлектрона в диапазоне масс 700–4000 Да. В качестве источника излучения использовали азотный УФ-лазер с длиной волны 337 нм. Калибровку проводили с использованием стандартной калибровочной смеси пептидов (Bruker, Германия).

Хромато-масс-спектрометрический анализ полифенолов. Для исследования компонентного состава полифенольной фракции использовался жидкостный хроматограф Dionex Ultimate 3000 (Thermo, США) с диодно-матричным детектором DAD-3000(RS) и гибридным тройным квадрупольным масс-анализатором 3200 QTrap (ABSciex, Канада).

Условия разделения: неподвижная фаза – Acclaim RSLC 120 C18 (2.1×150 мм, 2.2 мкм), подвижная фаза А – 0.1% раствор муравьиной кислоты, подвижная фаза В – ацетонитрил. Программа градиента: 0–2 мин – 10% В, 9–17 мин – 95% В, 17–21 мин – 10% В. Скорость потока – 0.4 мл/мин, температура термостата – 35 °С, объем ввода – 10 мкл.

Условия детектирования: тип ионизации – электрораспыление, отрицательный режим, напряжение источника 5.5 кВ, температура – 350 °С, давление газа-испарителя – 40, давление газа-осушителя – 45, входной потенциал – 10 В, потенциал декластеризации – 40 В, потенциал в ячейке соударений – 5 В, время сканирования – 500 мс. Сканирование осуществлялось в диапазоне 100–1300 m/z.

Определение антиоксидантной активности экстрактов. Определение проводили спектрофотометрическим методом, оценивая степень обесцвечивания раствора дифенилпикрилгидразида (ДФПГ). Для этого 2 мл 0.3 мМ раствора ДФПГ в этаноле смешивали с 2 мл экстракта полифенолов с концентрацией 0.01 мг/мл и измеряли снижение оптической плотности растворов при длине волны 515 нм. В качестве стандарта использовали аскорбиновую кислоту, построив калибровочную зависимость. Результаты определения выражали в мг аскорбиновой кислоты/г экстракта.

Обсуждение результатов

При разработке схемы выделения полифенолов из бурых водорослей необходимо учитывать, что при экстракции данных соединений в раствор переходят и другие компоненты водорослей (белки, полисахариды), которые в экстракте могут находиться как в свободном, так и в связанном в комплексы с полифенолами виде [23, 24]. При анализе литературных данных и полученных экспериментальных результатов по компонентному составу арктических бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus* (табл. 1) можно сделать вывод, что для разработки схемы селективного выделения полифенольной фракции необходимо проведение последовательной разборки биомассы растительного объекта с выделением сопутствующих компонентов и максимальным выходом целевой фракции полифенолов.

Таблица 1. Компонентный состав арктических бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus*

Компонент	Содержание, % от а.с.м.	Компонент	Содержание, % от а.с.м.
Полифенолы	6.6–9.7	ЛПП	14–21
Липиды	3.5–4.1	Маннит	6.2–7.8
Пигменты	0.1–0.2	Белки и аминокислоты	6.6–9.9
Минеральные вещества	24–26	Альгиновые кислоты	23–28

Для этого предложена многостадийная схема обработки арктических бурых водорослей (рис. 1), основанная на принципах «зеленой химии» и учитывающая протолитические свойства и функциональную природу компонентов.

На первом этапе схемы проводят отделение липидно-пигментного комплекса из сырья путем экстракции сухих водорослей хлороформом. Далее обезжиренные водоросли – остаток I экстрагируют водой при 60 °С (три стадии по 1 ч с гидромодулем 1 : 20) для максимального извлечения полифенолов. Полученный водный экстракт I центрифугировали при скорости 9509 g в течение 15 мин, концентрировали на роторном испарителе (температура до 60 °С) до объема, равного $m \times 20$, где m – масса абсолютно сухих исходных бурых водорослей, г. Полученный водный экстракт I кроме полифенолов содержит в себе минеральные соли, полисахариды, маннит и аминокислоты. Для удаления минеральной составляющей водный экстракт I последовательно обрабатывают катионитом марки КУ-2-8 (Вектон, Россия) и анионитом марки АВ-17-8 (Вектон, Россия) при соотношении ионообменник : водный раствор I 1 : 25 в течение 15 мин. В очищенный от солей водный экстракт II добавляли 96%об этиловый спирт в соотношении раствор : этанол 1 : 3. Через два часа выпавший осадок полисахаридов (ламинаран и фукоидан) отделяют от раствора методом центрифугирования с образованием водно-спиртового экстракта I и осадка полисахаридов. Далее полученный водно-спиртовой экстракт I термостатируют при -15 °С в течение двух суток для осаждения маннита из раствора. Охлажденный раствор центрифугировали с получением водно-спиртового экстракта II и осадка маннита. Водно-спиртовой II экстракт концентрируют в роторном испарителе для удаления этанола с образованием водного экстракта III, который разбавляют в 2 раза и подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH 2. Подкисленный водный экстракт III 4-хкратно экстрагируют смесью этилацетат : бутанол в соотношении 4 : 1 при объемном соотношении водный экстракт III : органический растворитель 5 : 2. Выделенная органическая фракция представляет собой экстракт фракции полифенолов. Далее экстракт полифенолов концентрируют и лиофильно высушивают.

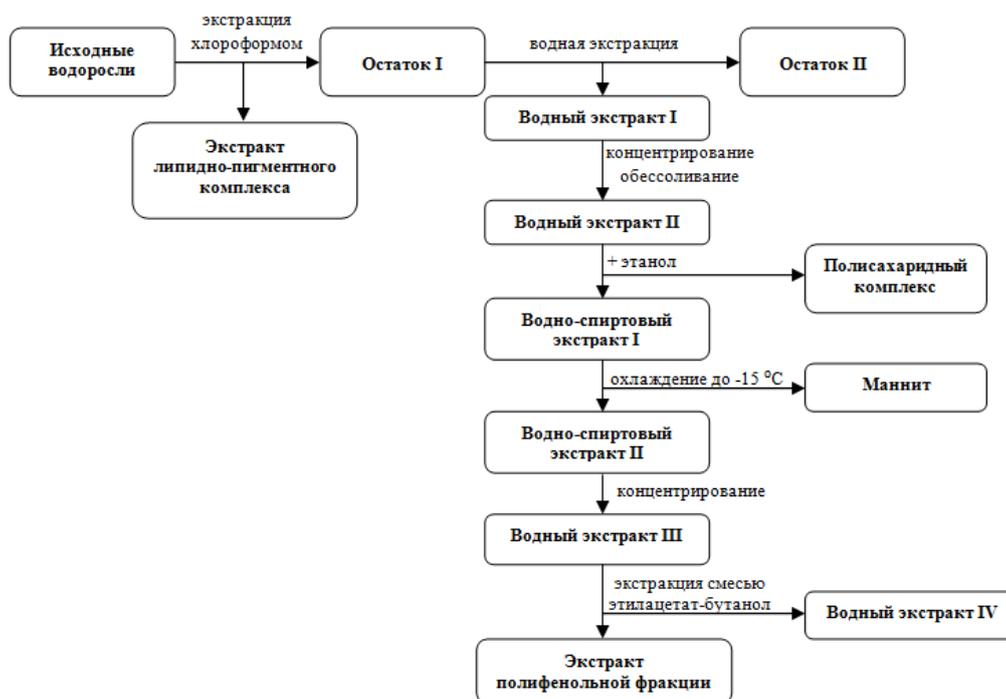


Рис. 1. Схема комплексной переработки бурых водорослей

В результате экспериментальной работы определены оптимальные параметры проведения каждой стадии предлагаемой схемы выделения полифенолов из бурых водорослей и проведена постадийная оценка ее эффективности (табл. 2 и 3).

Анализ эффективности (табл. 2) показал, что на первой стадии практически полностью извлекаются липиды (68–74%) и пигменты (90–100%), при этом полифенолы остаются в водорослевом остатке I. При водной экстракции остатка I в водный экстракт I переходит до 100% полифенолов, содержащихся в исходных водорослях, а также экстрагируются все остальные водорастворимые компоненты бурых водорослей: аминокислоты, растворимые в воде белки, полисахариды, маннит и минеральные вещества. Остаток II представляет собой комплекс из альгиновой кислоты, целлюлозной составляющей, водонерастворимых белков и минералов. Использование ионообменных смол для очистки водного экстракта I (содержание минеральных веществ 44–64%) позволяет удалить большую часть солей, в результате образуется водный экстракт II, с содержанием минеральных веществ 14–20%. При осаждении полисахаридов из водного экстракта II происходит снижение их содержания с 41–56% до 12–21% в водно-спиртовом экстракте I. Водно-спиртовый экстракт I содержит 74–95% маннита и дальнейшее его осаждение позволяет снизить содержание данного компонента до 21–26% в водно-спиртовом экстракте II. На стадии жидкость-жидкостной экстракции полифенолов из водного экстракта III в экстракт полифенольной фракции переходит 58–67% полифенолов, содержащихся в исходном сырье. В водном экстракте IV остается 24–30% полифенолов. Также стоит отметить, что остаточные количества сопутствующих компонентов водного экстракта III после жидкость-жидкостной экстракции остаются, в основном, в водном экстракте IV.

Из таблицы с компонентным составом экстрактов/остатков/фракций (табл. 3) видно, что на каждой стадии очистки экстрактов доля полифенолов в экстракте увеличивается, а сам экстракт полифенольной фракции содержит в своем составе 73–83% полифенолов.

По литературным данным, полифенолы бурых водорослей обладают высокой антиоксидантной активностью. Исследование экстракта полифенольной фракции показало, что его антиоксидантная активность значима и составила 553 ± 24 (мг аскорбиновой кислоты/г экстракта).

Полимолекулярный состав выделенных экстрактов исследовали методом эксклюзионной гель-фильтрационной хроматографии, полученные хроматограммы представлены на рисунке 2.

Наблюдается полимодальное распределение, которое может свидетельствовать о наличии нескольких групп компонентов – низкомолекулярных и высокомолекулярных флоротаннинов с массами в диапазоне от тысячи до сотни тысяч дальтон. В сравнении с водным экстрактом III распределение масс в экстракте полифенольной фракции более однородно и среднемассовая молекулярная масса составляет около сорока тысяч дальтон. При жидкость-жидкостной экстракции водного экстракта III в водный экстракт IV переходят относительно низкомолекулярные компоненты со средней молекулярной массой шесть-семь тысяч дальтон.

Таблица 2. Оценка эффективности выделения веществ из арктических бурых водорослей вида *F. vesiculosus*

Компонент	Содержание компонентов в экстрактах/фракциях/остатках, %*									
	Экстракт ли- пидно-пиг- ментного ком- плекса	Водный экс- тракт I	Остаток II	Водный экс- тракт II	Водно-спир- товый экс- тракт I	Полисахарид- ный комплекс	Водный экс- тракт III	Маннит	Экстракт по- лифенольной фракции	Водный экс- тракт IV
Полифенолы	1–2	92–100	–	91–100	89–100	–	88–98	–	58–67	24–30
Липиды	68–74	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Пигменты	90–100	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Белки и ами- нокислоты	–	17–25	66–86	14–21	13–20	2–3	13–18	1–2	1–2	10–12
ЛГП	–	41–57	41–61	41–56	12–21	31–40	11–17	1–2	1–2	9–14
Альгиновые кислоты	–	–	91–100	–	–	–	–	–	–	–
Маннит	–	83–100	4–8	80–100	74–95	8–11	21–26	49–62	1–3	19–28
Минераль- ные веще- ства	–	44–64	38–46	14–20	14–20	–	14–20	–	0–1	–

* – относительно содержания в исходном абсолютно сухом сырье.

Таблица 3. Компонентный состав экстрактов/остатков/фракций, извлеченных по схеме выделения полифенолов из бурых водорослей вида *F. vesiculosus*

Компонент	Доля компонентов в сухом экстракте/осадке/фракции, % от а.с.м.									
	Экстракт липидно-пигментного комплекса	Водный экстракт I	Остаток II	Водный экстракт II	Водно-спиртовой экстракт I	Полисахаридный комплекс	Водный экстракт III	Маннит	Экстракт полифенольной фракции	Водный экстракт IV
Полифенолы	2–3	18–24	–	24–31	27–37	–	31–41	–	73–83	16–22
Липиды	88–93	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Пигменты	3–7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Белки и аминокислоты	–	4–6	8–12	4–6	4–7	2–3	5–7	2–3	2–3	6–10
ЛГП	–	17–30	13–15	22–40	7–18	75–97	8–16	4–9	2–4	14–23
Альгиновые кислоты	–	–	37–44	–	–	–	–	–	–	–
Маннит	–	15–20	0–1	19–26	19–29	7–10	7–9	79–100	2–3	13–15
Минеральные вещества	–	30–43	15–18	11–18	13–21	–	15–23	–	1–3	–

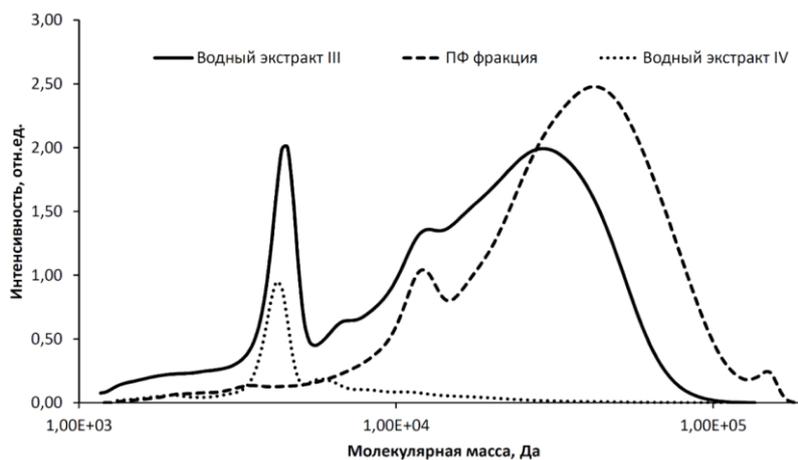


Рис. 2. Молекулярно-массовое распределение выделенных экстрактов

Для более тонкого изучения состава выделенных экстрактов была использована МАЛДИ масс-спектрометрия, способная работать с соединениями массой до нескольких тысяч дальтон, полученные спектры представлены на рисунке 3.

В соответствии с представленными данными для водного экстракта III обнаружены ионы $[M+H]^+$ в диапазоне масс от 853 до 2150 Да, различающиеся на 162 Да. Поскольку в соответствии с таблицей 3 водный экстракт III содержит значительное количество маннита, то такое чередование масс может объясняться гликозилированием содержащихся в экстракте полифенолов, то есть наличием молекул моносахаридов, химически связанных с флоротаннинами. Для полифенольной фракции обнаружено наличие флоротаннинов в диапазоне масс 893–1638 Да, причем наблюдается разница между сигналами, составляющая 124 Да, что соответствует молекуле флороглюцина. Отсутствие интенсивных сигналов в водном экстракте IV предположительно объясняется наличием флоротаннинов, возможно, связанных в комплексы с белками и не поддающихся анализу методом МАЛДИ-масс-спектрометрии.

Помимо этого, полифенольная фракция была проанализирована методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии, что позволило обнаружить в образце ряд соединений, предположительно отвечающих по значению m/z молекулярного иона полифенольным компонентам. Результаты MS^2 -анализа в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов приведены в таблице 4.

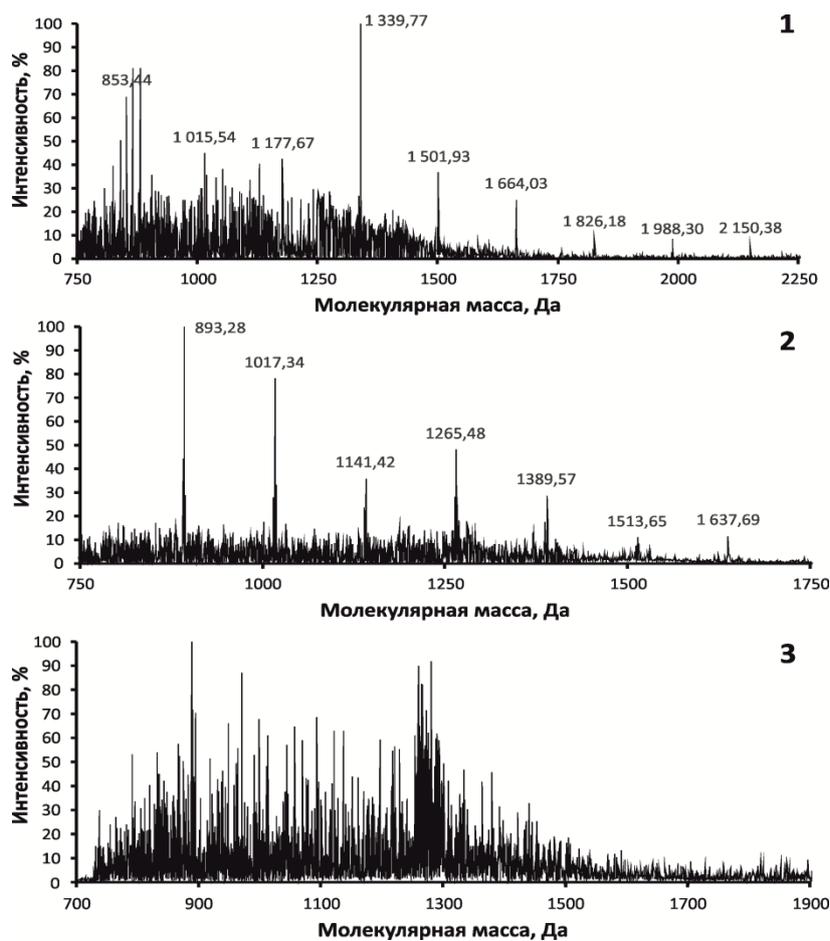


Рис. 3. МАЛДИ масс-спектры экстрактов (1 – водный экстракт III, 2 – экстракт полифенольной фракции, 3 – водный экстракт IV)

Таблица 4. Компонентный состав полифенольной фракции

Компонент	Молекулярный ион $[M-H]^-$	Фрагментные ионы
Димер – H ₂ O	231	183, 133
Димер	249	184, 177, 108
Тример – H ₂ O	355	337, 311, 296, 287, 281, 269, 267, 252, 243, 241, 239, 230, 227, 225, 209, 201, 199, 195, 185, 172, 171, 169, 165, 158, 153, 142, 133, 131
Тример	373	355, 230, 219, 215, 205, 201, 189, 181, 163, 161, 149, 141, 139, 136, 123, 119, 111
Тетрамер – H ₂ O	479	461, 247, 264, 231, 230, 215, 175, 163, 149
Тетрамер	497	353, 339, 325, 313, 309, 285, 267, 242, 239, 229, 219, 214, 205, 175, 165, 149, 139, 125, 123, 111
Пентамер – H ₂ O	603	585, 339, 245, 230, 217, 205
Пентамер	621	603, 559, 541, 517, 477, 459, 451, 363, 351, 331, 289, 247, 243, 205, 192, 165, 159, 149, 137
Гексамер – H ₂ O	727	709, 691, 665, 623, 567, 561, 455, 437, 393, 325, 309, 289, 271, 243, 165, 148, 139
Гексамер	745	727, 709, 683, 641, 585, 579, 519, 501, 455, 437, 411, 289, 271, 247, 203, 165, 149, 139, 121, 111
Гептамер – H ₂ O	851	833, 789, 691, 685, 561, 542, 517, 455, 421, 411, 395, 352, 349, 289, 271, 245, 229, 165, 139
Гептамер	869	851, 833, 708, 703, 682, 579, 568, 553, 455, 437, 417, 413, 349, 289, 269, 247, 243, 165, 149, 139, 125

Из таблицы 4 можно заметить, что для разных молекулярных пиков наблюдаются совпадающие фрагменты, а следовательно, обнаруженные соединения являются близкими аналогами по структуре. Образование молекулярных ионов для обнаруженных соединений может быть представлено в виде схемы (рис. 4).

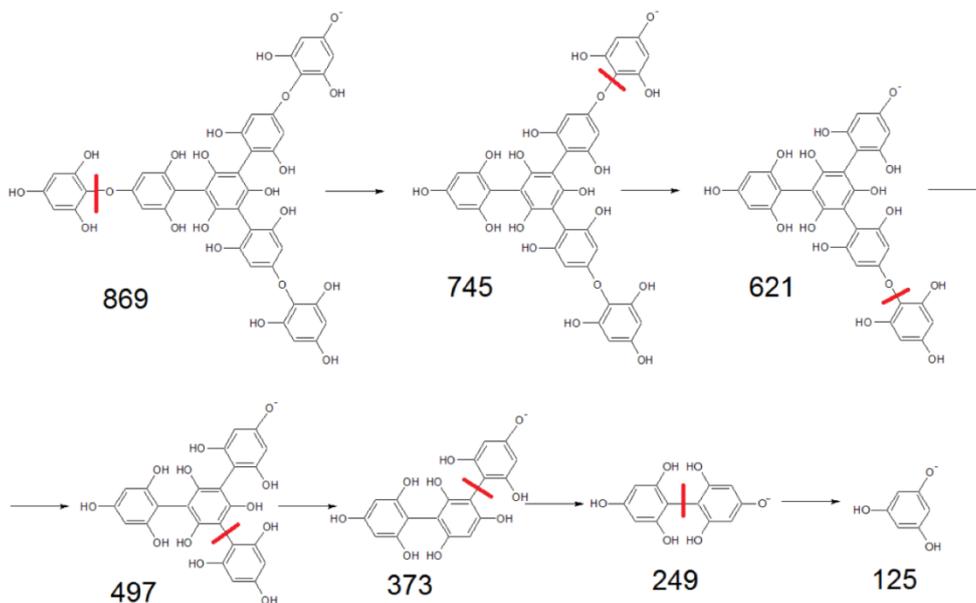


Рис. 4. Схема взаимосвязи сигналов молекулярных ионов обнаруженных полифенольных компонентов [25]

Таким образом, полученные данные позволяют судить о наличии в полифенольной фракции низкомолекулярных флоротаннинов с массами от 250 до 852 Да (данные хромато-масс-спектрометрии) и с массами от 870 до 1638 Да (данные МАЛДИ масс-спектрометрии).

Выводы

Предложена комплексная схема выделения полифенолов и сопутствующих компонентов (липидно-пигментный комплекс, полисахариды, маннит) из биомассы бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus*, основанная на принципах «зеленой химии» с использованием как классических методов экстракции (экстракция органическими растворителями), так и современных ее разновидностей. Показана эффективность данной схемы, в результате которой извлекается до 67% полифенолов, содержащихся в исходной биомассе, причем доля полифенолов во фракции составляет до 83%.

В полифенольной фракции методами масс-спектрометрии установлено наличие низкомолекулярных флоротаннинов в диапазоне масс от 250 Да (димеры) до 1614 Да (13 структурных единиц). Кроме того, выявлены высокомолекулярные полифенолы, молекулярная масса которых достигает сотен тысяч дальтон, что подтверждается данными эксклюзионной хроматографии.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова, уникальный идентификатор RFMEF159417X0013.

Список литературы

1. Боголицын К.Г., Каплицин П.А., Добродеева Л.К., Дружинина А.С., Овчинников Д.В., Паршина А.Э., Шульгина Е.В. Энтеросорбционные свойства клетчатки арктических бурых водорослей // Журнал прикладной химии. 2017. Т. 90, вып. 11. С. 1513–1519.
2. Клиндух М.П., Облучинская Е.Д. Сравнительное исследование химического состава бурых водорослей *Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum* // Вестник МГТУ. 2013. Т. 16, вып. 3. С. 466–471.
3. Добродеева Л.К., Добродеев К.Г. Иммуномодуляторы растительного и водорослевого происхождения. Архангельск, 2008. 294 с.
4. Облучинская Е.Д. Методологические подходы к разработке биопрепаратов на основе фукусовых водорослей // Вестник Кольского научного центра РАН. 2015. №2. С. 78–81.
5. Ragan M.A., Glombitza K.W. Phlorotannins, brown algal polyphenols // In Progress in Phycological Research. 1986. Vol. 4. Pp. 129–241.
6. Van Alstyne K.L. A comparison of three methods for quantifying brown algal polyphenolic compounds // Journal of Chemical Ecology. 1995. Vol. 21. Pp. 45–58. DOI: 10.1007/BF02033661.

7. Ragan M.A., Jensen A. Quantitative studies on brown algal phenols. II Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 1978. Vol. 34. N3. Pp. 245–258. DOI: 10.1016/S0022-0981(78)80006-9.
8. Heffernan N., Brunton P., Fitz Gerald R.J., Smyth T.J. Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of macroalgae-derived phlorotannins // Marine Drugs. 2015. Vol. 13. Pp. 509–528. DOI: 10.3390/md13010509.
9. Vo T.S., Ngo D.H., Kim S.K. Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics // Process Biochemistry. 2012. Vol. 47. N3. Pp. 386–394. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.12.014.
10. Ryu Y.B., Jeong H.J., Yoon S.Y., Park J.Y., Kim Y.M., Park S.J., Rho M.C., Kim S.J., Lee W.S. Influenza virus neuraminidase inhibitory activity of phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia cava* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59. N12. Pp. 6467–6473. DOI: 10.1021/jf2007248.
11. Zenthoefer M., Geisen U., Hofmann-Peiker K., Fuhrmann M., Kerber J., Kirchhofer R., Hennig S., Peipp M., Geyer R., Piker L., Kalthoff H. Isolation of polyphenols with anticancer activity from the Baltic Sea brown seaweed *Fucus vesiculosus* using bioassay-guided fractionation // Journal of Applied Phycology. 2017. Vol. 29. N4. Pp. 2021–2037. DOI: 10.1007/s10811-017-1080-z.
12. Artan M., Li Y., Karadeniz F., Lee S.H., Kim M.M., Kim S.K. Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6,6'-bieckol, from *Ecklonia cava* // Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2008. Vol. 16. N17. Pp. 7921–7926. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.07.078.
13. Sugiura Y., Matsuda K., Yamada Y., Nishikawa M., Shioya K., Katsuzaki H., Imai K., Amano H. Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2006. Vol. 70. N11. Pp. 2807–2811. DOI: 10.1271/bbb.60417.
14. Hermund D.B., Yesiltas B., Honold P., Jónsdóttir R., Kristinsson H.G., Jacobsen C. Characterisation and antioxidant evaluation of Icelandic *F. vesiculosus* extracts in vitro and in fish-oil-enriched milk and mayonnaise // Journal of Functional Foods. 2015. Vol. 19. Pp. 828–841. DOI: 10.1016/j.jff.2015.02.020.
15. Fairhead V.A., Amsler C.D., McClintock J.B., Baker B.J. Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D. menziesii*) from the Western Antarctic Peninsula // Polar Biology. 2005. Vol. 28. N9. Pp. 680–686. DOI: 10.1007/s00300-005-0735-4.
16. Shibata T., Ishimaru K., Kawaguchi S., Yoshikawa H., Hama Y. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese *Laminariaceae* // Journal of Applied Phycology. 2008. Vol. 20. N5. Pp. 705–711. DOI: 10.1007/s10811-007-9254-8.
17. Nakamura T., Nagayama K., Uchida K., Tanaka R. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from brown alga *Eisenia bicyclis* // Fisheries Science. 1996. Vol. 62. N5. Pp. 923–926. DOI: 10.2331/fishsci.62.923.
18. Подкорытова А.В., Кадникова И.А. Качество, безопасность и методы анализа продуктов из гидробионтов. Руководство по современным методам исследований морских водорослей, трав и продуктов их переработки. М., 2009. Вып. 3. 108 с.
19. Lourenco S.O., Barbarino E., De-Paula J.C., Da S.P., Lanfer Marquez L.O. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds // Phycological Research. 2002. Vol. 50. N3. Pp. 233–241. DOI: 10.1046/j.1440-1835.2002.00278.x.
20. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учебное пособие для вузов. М., 1991. 320 с.
21. ГОСТ 26185-84. Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа. М., 2010. 34 с.
22. Wang T., Jonsdottir R., Liu H., Gu L., Kristinsson H.G., Raghavan S., Olafsdottir G. Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. Vol. 60. N23. Pp. 5874–5883. DOI: 10.1021/jf3003653.
23. Hagerman A.E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves // Journal of Chemical Ecology. 1988. Vol. 14. Pp. 453–461. DOI: 10.1007/BF01013897.
24. Wissam Z., Bashour Ghada B., Wassim A., Warid K. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012. Vol. 4. N3. Pp. 675–682.
25. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1959. Vol. 37. Pp. 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.

Поступила в редакцию 4 февраля 2019 г.

После переработки 6 мая 2019 г.

Принята к публикации 27 мая 2019 г.

Для цитирования: Боголицын К.Г., Дружинина А.С., Овчинников Д.В., Паршина А.Э., Шульгина Е.В., Турова П.Н., Ставрианиди А.Н. Полифенолы арктических бурых водорослей: выделение, полимолекулярный состав // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 65–75. DOI: 10.14258/jcrpm.2019045135.

Bogolitsyn K.G.^{1*}, Druzhinina A.S.¹, Ovchinnikov D.V.¹, Parshina A.E.¹, Shulgina E.V.¹, Turova P.N.², Stavrianidi A.N.²
 POLYPHENOLS OF ARCTIC BROWN ALGAE: EXTRACTION, POLYMOLECULAR COMPOSITION

¹ Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, nab. Severnoy Dviny, 17, Arkhangel'sk, 163002 (Russia), e-mail: k.bogolitsyn@narfu.ru

² Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991 (Russia)

Arctic brown algae of the species *Fucus vesiculosus* are characterized by a high content of polyphenolic compounds - phlorotannins, exhibiting high biological activity. The aim of this study is to develop a methodology for the isolation and analysis of biologically active polyphenolic compounds from arctic brown algae. The proposed scheme for the isolation of polyphenols from *Fucus vesiculosus* brown algae is based on the principles of "green chemistry" and is carried out by sequential disassembly of the biomass of the plant object with the release of associated components (lipid-pigment complex, polysaccharides, mannitol) and maximum yield of polyphenol fraction. As a result of the experimental work, the optimal parameters for carrying out each stage of the proposed scheme were determined and a stepwise assessment of its effectiveness was carried out. The extractable fraction of polyphenols contains up to 67% of polyphenols relative to their content in the initial biomass, and the proportion of polyphenols in the fraction is up to 83%. A study of the phlorotannins fraction showed that its antioxidant activity is meaningful and it was 553±24 (mg of ascorbic acid/g extract). The polymolecular composition of the target fraction was investigated by the method of exclusion gel filtration chromatography, which showed the polymodal distribution, indicating the presence of several groups of components - low molecular weight and high molecular weight phlorotannins with masses ranging from thousands to hundreds of thousands of Daltons. The data obtained using chromatography-mass spectrometry and MALDI mass spectrometry make it possible to identify the presence of low molecular weight phlorotannins in the polyphenol fraction with masses from 250 to 1638 Da, which are close analogues in structure.

Keywords: brown algae, polyphenols, phlorotannins, extraction, chromatography, mass spectrometry.

References

1. Bogolitsyn K.G., Kaplitsin P.A., Dobrodeyeva L.K., Druzhinina A.S., Ovchinnikov D.V., Parshina A.E., Shulgina Ye.V. *Zhurnal prikladnoy khimii*, 2017, vol. 90, no. 11, pp. 1513–1519. (in Russ.).
2. Klindukh M.P., Obluchinskaya E.D. *Vestnik MGTU*, 2013, vol. 16, no. 3, pp. 466–471. (in Russ.).
3. Dobrodeyeva L.K., Dobrodeyev K.G. *Immunomodulatory rastitel'nogo i vodoroslevogo proiskhozhdeniya*. [Immuno-modulators of plant and algal origin]. Arkhangel'sk, 2008, 294 p. (in Russ.).
4. Obluchinskaya Ye.D. *Vestnik Kol'skogo nauchnogo tsentra RAN*, 2015, no. 2, pp. 78–81. (in Russ.).
5. Ragan M.A., Glombitza K.W. *In Progress in Phycological Research*, 1986, vol. 4, pp. 129–241.
6. Van Alstyne K.L. *Journal of Chemical Ecology*, 1995, vol. 21, pp. 45–58, DOI: 10.1007/BF02033661.
7. Ragan M.A., Jensen A. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1978, vol. 34, no. 3, pp. 245–258, DOI: 10.1016/S0022-0981(78)80006-9.
8. Heffernan N., Brunton P., Fitz Gerald R.J., Smyth T.J. *Marine Drugs*, 2015, vol. 13, pp. 509–528, DOI: 10.3390/md13010509.
9. Vo T.S., Ngo D.H., Kim S.K. *Process Biochemistry*, 2012, vol. 47, no. 3, pp. 386–394, DOI: 10.1016/j.procbio.2011.12.014.
10. Ryu Y.B., Jeong H.J., Yoon S.Y., Park J.Y., Kim Y.M., Park S.J., Rho M.C., Kim S.J., Lee W.S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 12, pp. 6467–6473, DOI: 10.1021/jf2007248.
11. Zenthoefer M., Geisen U., Hofmann-Peiker K., Fuhrmann M., Kerber J., Kirchofer R., Hennig S., Peipp M., Geyer R., Piker L., Kalthoff H. *Journal of Applied Phycology*, 2017, vol. 29, no. 4, pp. 2021–2037, DOI: 10.1007/s10811-017-1080-z.
12. Artan M., Li Y., Karadeniz F., Lee S.H., Kim M.M., Kim S.K. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 16, no. 17, pp. 7921–7926, DOI: 10.1016/j.bmc.2008.07.078.
13. Sugiura Y., Matsuda K., Yamada Y., Nishikawa M., Shioya K., Katsuzaki H., Imai K., Amano H. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, vol. 70, no. 11, pp. 2807–2811, DOI: 10.1271/bbb.60417.
14. Hermund D.B., Yesiltas B., Honold P., Jónsdóttir R., Kristinsson H.G., Jacobsen C. *Journal of Functional Foods*, 2015, vol. 19, pp. 828–841, DOI: 10.1016/j.jff.2015.02.020.
15. Fairhead V.A., Amsler C.D., McClintock J.B., Baker B.J. *Polar Biology*, 2005, vol. 28, no. 9, pp. 680–686, DOI: 10.1007/s00300-005-0735-4.
16. Shibata T., Ishimaru K., Kawaguchi S., Yoshikawa H., Hama Y. *Journal of Applied Phycology*, 2008, vol. 20, no. 5, pp. 705–711, DOI: 10.1007/s10811-007-9254-8.
17. Nakamura T., Nagayama K., Uchida K., Tanaka R. *Fisheries Science*, 1996, vol. 62, no. 5, pp. 923–926, DOI: 10.2331/fishsci.62.923.
18. Podkorytova A.V., Kadnikova I.A. *Kachestvo, bezopasnost' i metody analiza produktov iz gidrobiontov. Rukovodstvo po sovremennym metodam issledovaniy morskikh vodorosley, trav i produktov ikh pererabotki*. [Quality, safety and analysis methods of products from aquatic organisms. Guide to modern research methods for algae, herbs and their processed products]. Moscow, 2009, vol. 3, 108 p. (in Russ.).
19. Lourenco S.O., Barbarino E., De-Paula J.C., Da S.P., Lanfer Marquez L.O. *Phycological Research*, 2002, vol. 50, no. 3, pp. 233–241, DOI: 10.1046/j.1440-1835.2002.00278.x.

* Corresponding author.

20. Obolenskaya A.V., Yel'nitskaya Z.P., Leonovich A.A. *Laboratornyye raboty po khimii drevesiny i tsellyulozy: uchebnoye posobiye dlya vuzov*. [Laboratory work on the chemistry of wood and cellulose: a textbook for universities]. Moscow, 1991, 320 p. (in Russ.).
21. GOST 26185-84. *Vodorosli morskkiye, travy morskkiye i produkty ikh pererabotki. Metody analiza*. [GOST 26185-84. Seaweeds, marine herbs and their processed products. Methods of analysis]. Moscow, 2010. 34 p. (in Russ.).
22. Wang T., Jonsdottir R., Liu H., Gu L., Kristinsson H.G., Raghavan S., Olafsdottir G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, vol. 60, no. 23, pp. 5874–5883, DOI: 10.1021/jf3003653.
23. Hagerman A.E. *Journal of Chemical Ecology*, 1988, vol. 14, pp. 453–461, DOI: 10.1007/BF01013897.
24. Wissam Z., Bashour Ghada B., Wassim A., Warid K. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, vol. 4, no. 3, pp. 675–682.
25. Bligh E.G., Dyer W.J. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, vol. 37, pp. 911–917, DOI: 10.1139/o59-099.

Received February 4, 2019

Revised May 6, 2019

Accepted May 27, 2019

For citing: Bogolitsin K.G., Druzhinina A.S., Ovchinnikov D.V., Parshina A.E., Shulgina E.V., Turova P.N., Stavrianidi A.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 65–75. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019045153.

