

*На правах рукописи*



**Дружинина Анна Сергеевна**

**ФЛОРОТАННИНЫ  
АРКТИЧЕСКИХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ**

05.21.03 – технология и оборудование химической переработки  
биомассы дерева, химия древесины

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Архангельск – 2019

Работа выполнена на кафедре теоретической и прикладной химии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель: Доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации **Боголицын Константин Григорьевич**

Официальные оппоненты: **Рощин Виктор Иванович**, доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет имени С.М. Кирова», заведующий кафедрой технологии лесохимических продуктов, химии древесины и физической химии

**Паренаго Ольга Олеговна**, кандидат химических наук, ФГБУН «Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова Российской академии наук», старший научный сотрудник

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (г. Москва)

Защита состоится 5 декабря 2019 года в 10 ч 00 мин на заседании диссертационного совета Д 212.08.02 по химическим наукам при ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 163002, г. Архангельск, Набережная Северной Двины, 17, ауд. 1220.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) Федеральный университет имени М.В. Ломоносова» и на сайте [www.narfu.ru](http://www.narfu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук

Т.Э. Скребец

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** 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.

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 20 % от а.с.м. Флоротаннины различаются по строению и степени полимеризации, что обуславливает разнообразие биологической активности данных соединений, к которой относят антиоксидантные свойства, гепатопротекторную, противоаллергенную, противоопухолевую, противовоспалительную, антибактериальную и антидиабетическую активности.

Несмотря на проведенные обширные исследования в области флоротаннинов, актуальными остаются задачи эффективного выделения данных соединений из биомассы бурых водорослей, идентификации индивидуальных компонентов, характеристики свойств и выявления зависимостей биологической активности от полимолекулярных свойств флоротаннинов. Решение этих задач позволит использовать полифенолы арктических бурых водорослей в качестве препарата фармацевтического назначения.

Работа выполнена при поддержке: Госзадания Минобрнауки РФ на 2014-2016 гг (проект 4.1288.2014), Госзадания Минобрнауки РФ на 2017-2019 гг (проект 4.3273.2017). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

### **Цель работы:**

Получение новых биологически активных соединений из арктических бурых водорослей путем разработки методологии выделения, анализа и оценки эффективности применения полифенольного комплекса как антиоксиданта фармакологического назначения.

Для выполнения намеченной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Отбор, анализ и характеристика проб промысловых видов арктических бурых водорослей различных районов Белого и Баренцева морей;

2. Разработка комплексной схемы выделения флоротаннинов из биомассы бурых водорослей; характеристика группового и индивидуального состава полифенольной фракции арктических бурых водорослей;

3. Получение новых данных о взаимосвязи полимолекулярных и антиоксидантных свойств фракций полифенолов;

4. Оценка биологической активности выделяемых фракций полифенолов арктических бурых водорослей.

#### **Научная новизна:**

Установлена взаимосвязь антиоксидантной активности и полимолекулярных свойств водорослевых полифенольных компонентов. Наибольшая активность (641 – 940 мг аскорбиновой кислоты на 1 г экстракта) проявляется для фракций, характеризующихся молекулярными массами в диапазоне 8-18 кДа. Дальнейшее увеличение молекулярной массы флоротаннинов приводит к тенденции снижения активности образцов.

Методом хромато-масс-спектрометрии выявлено, что наибольший вклад в антиоксидантную и биологическую активности фракций вносят гексамеры, гептамеры и октамеры полифенолов.

#### **Практическая значимость:**

Разработана и запатентована схема выделения флоротаннинов из бурых водорослей, отвечающая принципам “зеленой химии”, основанная на подборе растворителей в соответствии с химической природой и свойствами выделяемых компонентов.

Выделены и охарактеризованы биологически активные полифенольные фракции арктических бурых водорослей. Показана возможность использования данных фракций в качестве фармсубстанций, обладающих антиоксидантными и бактериостатическими свойствами.

#### **На защиту выносятся следующие положения:**

1. Разработка новой методологии разделения биомассы бурых водорослей для последовательного выделения фракции флоротаннинов;

2. Характеристика полимолекулярного состава фракции флоротаннинов бурых водорослей;

3. Исследование взаимосвязи полимолекулярных свойств и антиоксидантной активности фракций флоротаннинов;

4. Характеристика биологической активности полифенольных фракций арктических бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus*.

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на 17 Международных и Всероссийских конференциях, а именно, на VI Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров» (Архангельск, 22–25 июня 2015 г), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 26-30 сентября 2016 г), Международном

молодежном научном форуме «Ломоносов-2016» (Москва, 11-15 апреля 2016 г), VII Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров» (Архангельск, 3-6 июля 2017 г), VII Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 24–28 апреля 2017 г), X Всероссийском симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 14–19 мая, 2018 г), 15-ой Европейской конференции по вопросам лигноцеллюлозы и целлюлозы (Авейро, Португалия, 26–29 июня 2018 г), V Всероссийском симпозиуме с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 7–13 октября 2018 г), Международной научно-технической конференции «Химия и химическая технология переработки растительного сырья» (Минск, 10-12 октября 2018 г), XII конкурсе проектов молодых ученых в рамках Международной выставки химической промышленности и науки «Химия-2018» (Москва, 29 октября – 1 ноября 2018 г), Международной конференции "Биомониторинг в Арктике» (Архангельск, 26-27 ноября 2018 г), Международной конференции по прикладной физике, энергетике и материаловедению (Индия, Секундерабад, 5-6 декабря 2018 г), Международной конференции «Материаловедение будущего: исследования, разработки, научная подготовка» (Нижний Новгород, 12-15 февраля 2019 г), 4-ом Международном конгрессе по биоматериалам и биосенсорам (Турция, Фетхие, 12-18 мая 2019 г), XI Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды с международным участием «Экоаналитика-2019» (Пермь, 27 мая – 1 июня 2019 г), VIII Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров» (Архангельск, 1-5 июля 2019 г), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 9-13 сентября 2019 г).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ, в том числе, 2 статьи в журналах, включенных в международные базы данных Web of Science и Scopus.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 120 страницах машинописного текста, содержит 27 рисунков и 31 таблицу, в списке цитируемой литературы 171 источник.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы, представленном в **первой главе**, рассмотрены морские водоросли как возобновляемый природный ресурс, приведен компонентный химический состав наиболее представительных видов арктических бурых водорослей. Показано, что содержание полифенольных соединений в биомассе варьируется в широких пределах и зависит не только от вида водорослей и сезона отбора, но и от условий произрастания.

Рассмотрены классические и современные методы выделения флоротаннинов из бурых водорослей и экстрактов. Показано, что задача эффективного использования флоротаннинов заключается в разработке комплексных схем разделения биомассы и селективного выделения целевого продукта на основе принципов «зеленой» химии. Вместе с тем, флоротаннины различаются по строению и степени полимеризации, что обуславливает разнообразие биологической активности данных соединений, к которой относят антиоксидантные свойства, противоопухолевую, противовоспалительную, антибактериальную и другие виды активности, которые обуславливают перспективность практического применения флоротаннинов в качестве лечебных и профилактических средств в пищевой, косметической и фармакологической отраслях. Показано, что современные методы идентификации, количественного определения и структурного анализа флоротаннинов основаны на применении методов спектроскопии ядерно-магнитного резонанса и хромато-масс-спектрометрии с использованием различных приемов ионизации.

На основе анализа литературных данных сформулирована цель исследования, заключающаяся в получении новых биологически активных соединений из арктических бурых водорослей путем разработки методологии выделения, анализа и оценки эффективности применения полифенольного комплекса как антиоксиданта фармакологического назначения.

Во **второй главе** приведен перечень и характеристика оборудования, материалов и реагентов, использованных при выполнении экспериментальной работы.

Анализ химического состава бурых водорослей и продуктов их переработки проводили с использованием методик ГОСТ, УФ-спектроскопии, титриметрических и хроматографических методов анализа, а так же с помощью метода элементного анализа.

Суммарное содержание полифенольной фракции определяли спектрофотометрическим методом с применением реактива Фолина-Чокалтео. Разделение полифенольной фракции по молекулярным массам проводили методом гель-фильтрации на сорбенте Сефадекс LH-20. Для изучения молекулярно-массового распределения использовали метод гель-проникающей хроматографии. Исследование индивидуального состава полифенольной фракции проводили методами эксклюзионной хроматографии, масс-спектрометрии МАЛДИ, хромато-масс-спектрометрии и флуоресцентной спектроскопии. Определение антиоксидантной активности образцов проводили спектрофотометрическим методом, оценивая степень обесцвечивания раствора ДФПГ. Исследование бактериостатической и фунгистатической активностей полифенольных фракций проводили с помощью посева микроорганизмов и дрожжеподобных грибов по поверхности питательной среды чашки Петри. Фагоцитарную активность полифенолов определяли с помощью тест-набора химической компании «Реакомплекс».

Объектом исследований послужили 46 образцов 4 видов бурых водорослей (2 вида ламинариевых (*Saccharina latissima* и *Laminaria digitata*) и 2 - фукусовых (*Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum*)), отобранных в акваториях Белого и Баренцева морей в ходе экспедиции «Арктический плавучий университет» в 2012-2017 годах на борту научно-исследовательского судна «Профессор Молчанов». Карта отбора проб водорослей представлена на рисунке 1.

В третьей главе выполнен сопоставительный анализ содержания полифенолов в арктических бурых водорослях западного сегмента Арктики.



Рисунок 1 – Карта отбора проб бурых водорослей

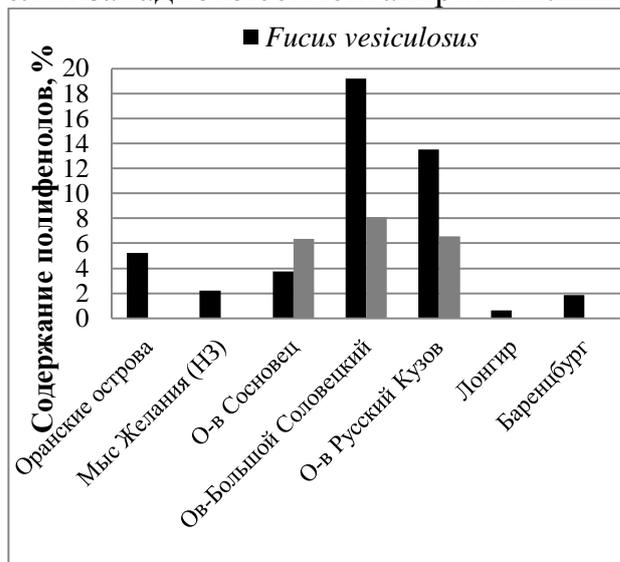


Рисунок 2 – Содержание полифенолов в фукусовых водорослях

Установлено, что содержание полифенолов в водорослях вида *L. digitata* и *S. latissima* мало и достигает не более 0,5 %масс. Наиболее ценным видом из арктических промысловых бурых водорослей, для получения полифенольной фракции, является *F. vesiculosus*, отобранный в Белом море в акватории о. Бол. Соловецкий и о. Русский Кузов (рисунок 2). Содержание полифенолов в данных пробах водорослей варьируется в пределах от 6,6 до 19,2 %масс, что, вероятно, связано с особенностями климатических условий данного района Белого моря. Поэтому для разработки схемы выделения полифенолов из бурых водорослей отбирали пробы водорослей вида *F. vesiculosus* в районе Соловецких островов.

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	ЛПГ	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

полифенольной фракции (рисунок 3), последовательной разборки биомассы

На основании анализа литературных данных и экспериментально определенного компонентного состава арктических бурых водорослей (таблица 1) предложена комплексная схема селективного выделения основанная на проведении водорослей с выделением

сопутствующих компонентов и максимальным выходом целевой фракции полифенолов.

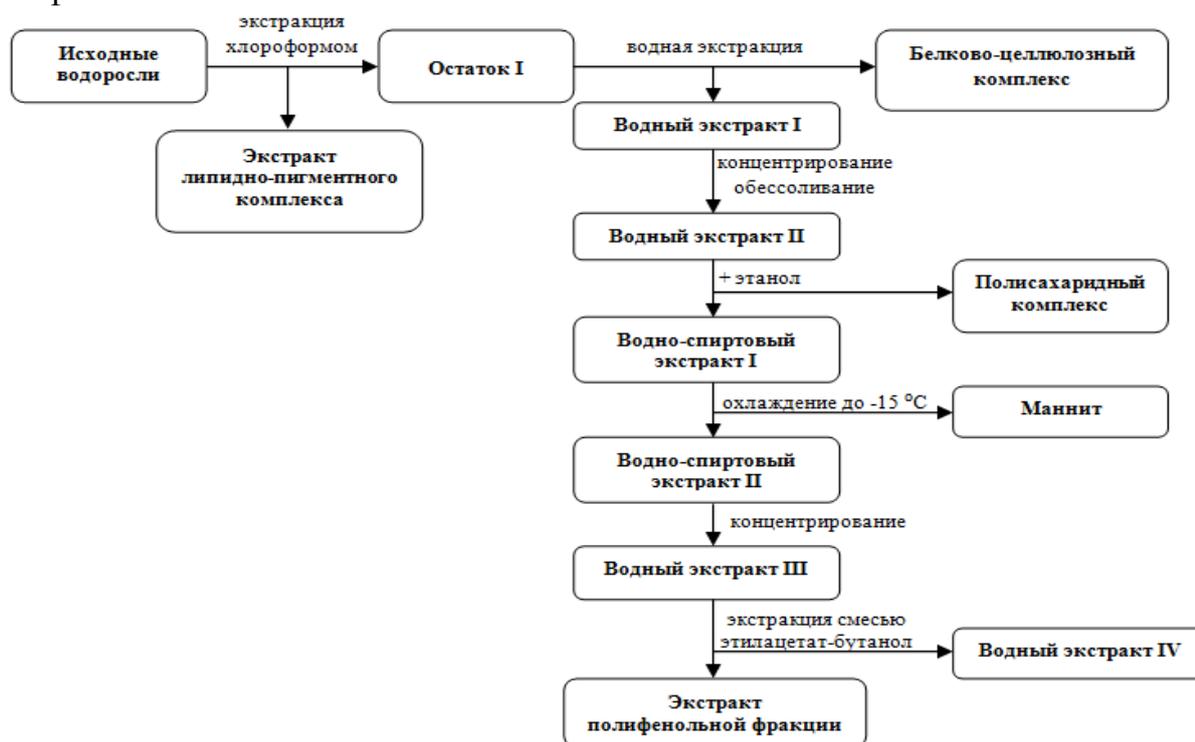


Рисунок 3 – Схема выделения полифенольных соединений из бурых водорослей

На первом этапе схемы проводят отделение липидно-пигментного комплекса путем экстракции сухих водорослей хлороформом. Далее обезжиренные водоросли – остаток I, экстрагируют водой при 60 °С для максимального извлечения полифенолов. Полученный водный экстракт I кроме полифенолов содержит в себе минеральные соли, полисахариды, маннит и аминокислоты. Для удаления минеральной составляющей водный экстракт I обрабатывают катионитом и анионитом. В очищенный от солей водный экстракт II добавляют этиловый спирт в соотношении раствор : этанол 1:3, выпавший осадок полисахаридов отделяют от раствора с образованием водно-спиртового экстракта I и осадка полисахаридов. Далее полученный водно-спиртовой экстракт I термостатируют при -15 °С для осаждения маннита из раствора, охлажденный раствор центрифугируют 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 подкисляют соляной кислотой до рН 2. Подкисленный водный экстракт III экстрагируют смесью этилацетат : бутанол в соотношении 4:1. Выделенная органическая фракция представляет собой экстракт фракции полифенолов. Далее экстракт полифенолов концентрируют и лиофильно высушивают.

Используя экспериментально определенные оптимальные параметры отработана схема выделения полифенолов и проведена постадийная оценка ее эффективности (таблицы 2 и 3), которая показала, что извлекается до 74%

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

Компонент	Содержание компонентов, % относительно содержания в исходном сырье									
	Экстракт липидно-пигментного комплекса	Водный экстракт I	Белково-целлюлозный комплекс	Водный экстракт II	Водно-спиртовый экстракт I	Полисахаридный комплекс	Водно-спиртовый экстракт II (Водный экстракт III)	Маннит	Экстракт полифенольной фракции	Водный экстракт IV
Полифенолы	1,0-1,5	92-100	-	91-100	89-100	-	88-98	-	58-67	24-30
Липиды	68-74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Пигменты	90-100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Белки и аминокислоты	-	17-25	66-86	14-21	13-20	2,0-3,0	13-18	1,0-1,5	1,3-2,4	10-12
Полисахариды	-	41-57	41-61	41-56	12-21	31-40	11-17	1,2-1,8	1,0-1,4	9-14
Альгиновые кислоты	-	-	91-100	-	-	-	-	-	-	-
Маннит	-	83-100	3,9-7,7	80-100	74-95	7,7-11,0	21-26	49-62	1,3-3,1	19-28
Минерал. в-ва	-	44-64	38-46	14-20	14-20	-	14-20	-	0,08-0,90	-

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

Компонент	Доля компонентов в сухом экстракте/осадке/фракции, % отн									
	Экстракт липидно-пигментного комплекса	Водный экстракт I	Белково-целлюлозный комплекс	Водный экстракт II	Водно-спиртовый экстракт I	Полисахаридный комплекс	Водно-спиртовый экстракт II (Водный экстракт III)	Маннит	Экстракт полифенольной фракции	Водный экстракт IV
Полифенолы	2,2-3,3	18-24	-	24-31	27-37	-	31-41	-	73-83	16-22
Липиды	88-93	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Пигменты	2,5-7,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Белки и аминокислоты	-	3,6-5,8	8-12	3,9-6,2	4,4-6,8	2,2-2,8	4,6-7,2	2,2-3,2	1,5-3,0	6,1-9,9
Полисахариды	-	17-30	13-15	22-40	7-18	75-97	7,6-16,0	4,1-8,5	1,8-3,6	14-23
Альгиновые кислоты	-	-	37-44	-	-	-	-	-	-	-
Маннит	-	15-20	0,4-0,9	19-26	19-29	7,2-9,7	7,1-8,9	79-100	1,6-2,3	13-15
Минерал. в-ва	-	30-43	15-18	11-18	13-21	-	15-23	-	0,5-3,2	-
ИТОГО	93-100	84-100	73-90	80-100	70-100	84-100	65-96	85-100	78-95	49-70

липидов, до 100% пигментов, до 90% полисахаридов, до 62% маннита и до 67% полифенолов (таблица 2). При исследовании компонентного состава выделяемых фракций можно сделать вывод, что на каждой стадии очистки экстрактов доля полифенолов увеличивается, а сама полифенольная фракция содержит в своем составе около 80 % полифенолов (таблица 3). В полифенольной фракции остаются остаточные количества других компонентов, которые, предположительно, химически связаны с полифенолами.

В четвертой главе проведено исследование состава, структуры и свойств выделенной полифенольной фракции бурых водорослей.

Для исследования состава полифенолов определяли молекулярно-массовое распределение для водного экстракта III, полифенольной фракции и в водного экстракта IV (рисунок 4). В сравнении с водным экстрактом III молекулярно-массовое распределение для полифенольной фракции более однородно и среднемассовая молекулярная масса составляет 41,9 кДа. В водном экстракте IV наблюдаются относительно низкомолекулярные компоненты.

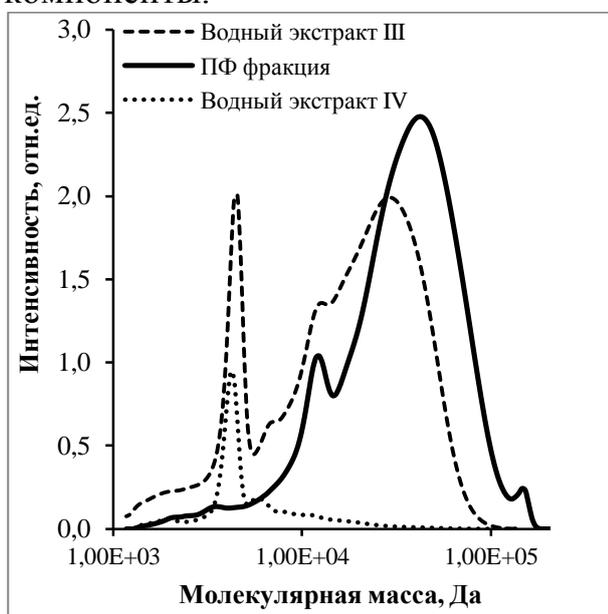


Рисунок 4 – Молекулярно-массовое распределение выделенных экстрактов

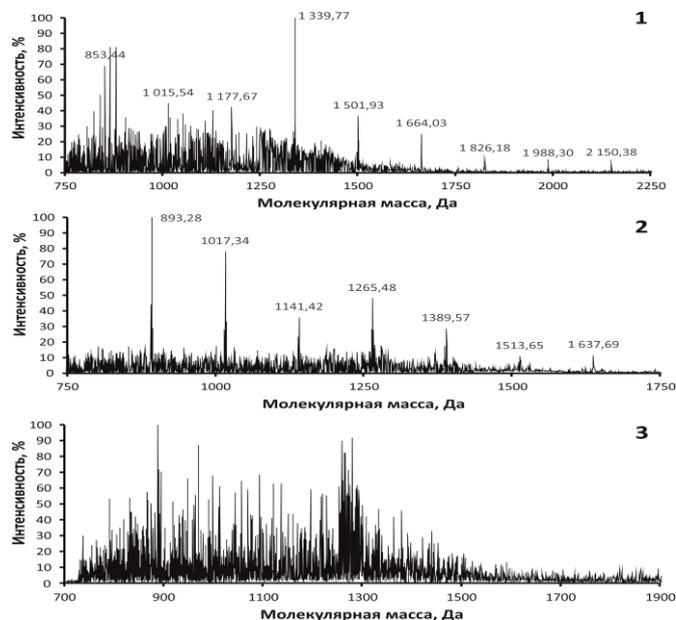


Рисунок 5 – МАЛДИ масс-спектры экстрактов (1 - водный экстракт III, 2 – полифенольная фракция, 3 – водный экстракт IV)

Методом МАЛДИ масс-спектрометрии изучен индивидуальный состав водного экстракта III, полифенольной фракции и водного экстракта IV (рисунок 5). В полифенольной фракции обнаружено наличие флоротаннинов в диапазоне масс 893 – 1638 Да, причем наблюдаемая разница между сигналами в 124 Да, что соответствует молекуле флороглюцина. Для водного экстракта III обнаружены ионы  $[M+H]^+$  в диапазоне масс от 853 до 2150 Да, различающиеся на 162 Да, что может объясняться гликозилированием полифенолов.

Для уточнения индивидуального состава полифенольная фракция была проанализирована методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Результаты МС2-анализа приведены в таблице 4. Из представленных данных можно заметить, что для разных компонентов наблюдаются совпадающие

фрагменты, а, следовательно, обнаруженные соединения являются близкими аналогами по структуре. Полученные данные позволяют судить о наличии в полифенольной фракции низкомолекулярных флоротаннинов, по структуре от димеров до гептамеров. Образование молекулярных ионов для обнаруженных соединений может быть показано в виде схемы, представленной на рисунке 6.

Таблица 4 - Компонентный состав полифенольной фракции.

Компонент	Молекулярный ион [M-H] <sup>-</sup>	Фрагментные ионы, Да
Димер – H <sub>2</sub> O	231	183, 133
Димер	249	184, 177, 108
Тример – H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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

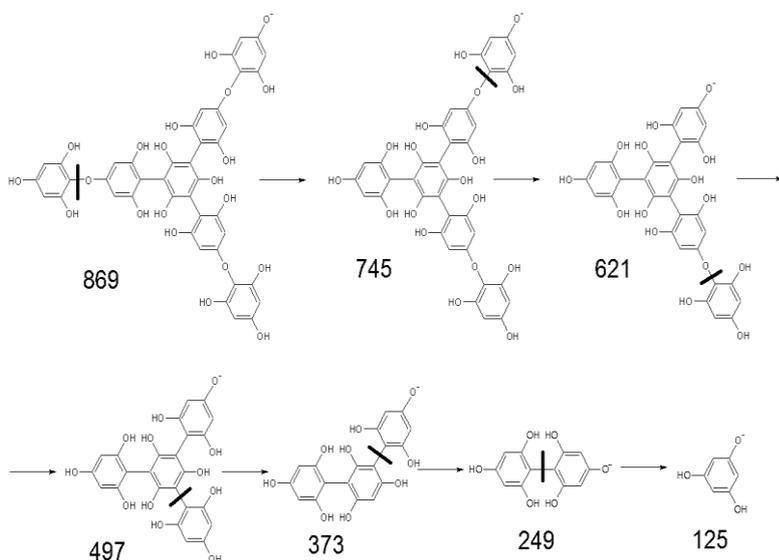


Рисунок 6 – Схема взаимосвязи сигналов молекулярных ионов обнаруженных полифенольных компонентов

бинарных растворов этанол:ацетон (таблица 5).

С целью выявления взаимосвязи функциональной природы, полимолекулярных свойств и антиоксидантной активности флоротаннинов было проведено разделение полифенольной фракции по молекулярным массам на подфракции с использованием геля Сефадекс LH-20.

Фракционирование проводили с использованием двадцати одного элюента: бинарных растворов этанол:вода, этанола и

Таблица 5 – Характеристика Сефадекс-подфракций

Фракция / ЛН-подфракция	Элюент <sup>1</sup>	Выход ПФ <sup>2</sup> , %масс	Содержание ПФ, г ФГЭ/100г экстракта	Mw <sup>3</sup> , кДа	АОА, мг аскорб.к-ты/ г экстракта
ПФ фракция	-	-	74,2±2,3	42±4	493±24
LH-1	э/в (1:1,5)	38,7±2,4	59,2±3,1	87±9	354±18
LH-2	э/в (1:1,3)	4,8±0,4	78,6±3,4	7±1	492±27
LH-3	э/в (1:1)	4,1±0,3	94,3±2,1	9±1	641±30
LH-4	э/в (1,5:1)	3,5±0,4	98,2±1,7	10±1	693±37
LH-5	э/в (2:1)	2,3±0,2	96,0±2,7	10±1	728±32
LH-6	э/в (2,5:1)	2,4±0,3	96,8±2,0	8±1	789±41
LH-7	э/в (3:1)	1,8±0,3	94,2±1,5	13±1	736±28
LH-8	э/в (3,5:1)	1,5±0,2	99,0±0,9	9±1	829±45
LH-9	э/в (4:1)	1,1±0,1	98,9±1,0	11±1	940±51
LH-10	э/в (5:1)	0,9±0,2	97,4±2,5	18±2	862±39
LH-11	э/в (7:1)	0,5±0,1	95,8±2,1	18±2	827±23
LH-12	э	0,3±0,1	93,2±2,7	13±1	712±34
LH-13	э/а (7:1)	1,1±0,2	96,2±3,3	18±2	665±38
LH-14	э/а (5:1)	2,0±0,3	94,3±2,2	28±3	608±29
LH-15	э/а (4:1)	1,3±0,1	95,9±1,9	31±3	612±18
LH-16	э/а (3,5:1)	2,1±0,3	98,0±1,8	25±3	587±25
LH-17	э/а (3:1)	1,1±0,2	99,2±0,8	36±4	602±31
LH-18	э/а (2,5:1)	0,8±0,1	97,6±2,1	41±4	564±32
LH-19	э/а (2:1)	0,9±0,2	94,5±1,3	43±4	531±24
LH-20	э/а (1,5:1)	1,5±0,2	96,6±2,8	48±5	549±38
LH-21	э/а (1:1)	4,6±0,6	95,1±3,2	49±5	502±25

<sup>1</sup> э – этанол; в – вода; а – ацетон; <sup>2</sup> выход рассчитан в процентах от содержания полифенолов во фракции, взятой для фракционирования; <sup>3</sup>среднемассовая молекулярная масса

Выделенные подфракции LH-3...LH-21 характеризуются содержанием полифенолов на уровне 93 – 99 г ФГЭ/100 г экстракта, и, следовательно, данные подфракции являются представительными (таблица 4).

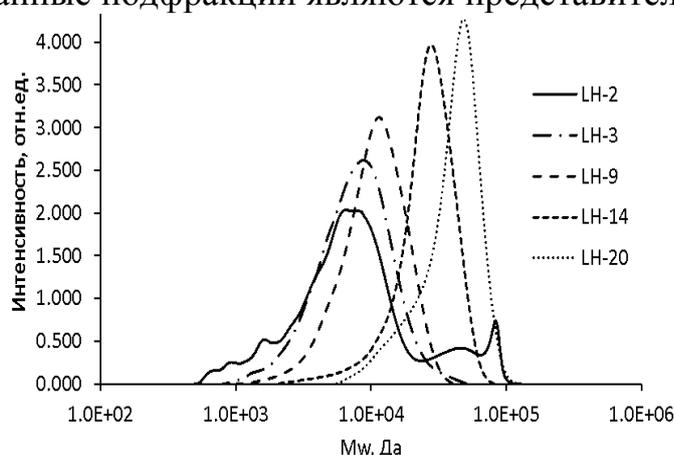


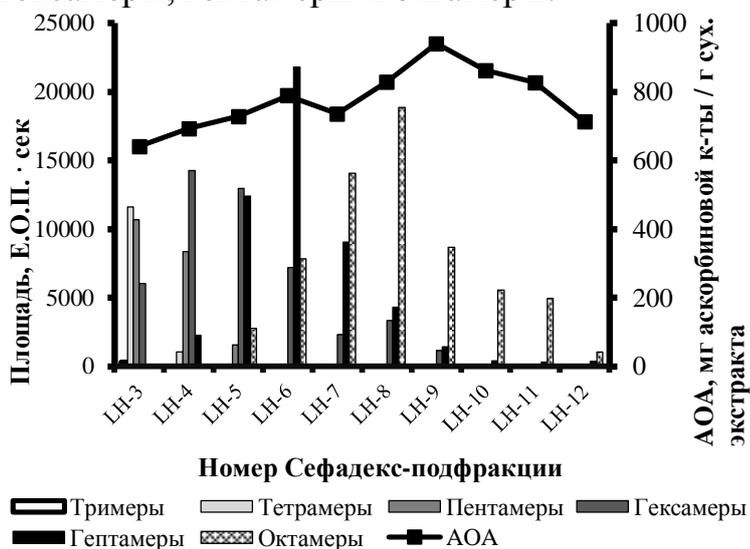
Рисунок 7 – Молекулярно-массовое распределение Сефадекс-подфракций

Полученные подфракции были охарактеризованы методами эксклюзионной хроматографии. Хроматограммы, отображающие молекулярно-массовое распределение подфракций с LH-3 по LH-21, представляют собой унимодальное распределение и характеризуются достаточной однородностью (рисунок 6). При этом стоит отметить незначительное изменение молекулярной массы Сефадекс-

подфракций при использовании водно-спиртовых растворителей, и её резкий рост с увеличением доли ацетона в элюенте (таблица 4, рисунок 7).

Изменение антиоксидантной активности водно-спиртовых подфракций может быть обусловлено вкладом менее полимеризованных флоротаннинов. Для проверки данного предположения был определен индивидуальный состав сефадекс-подфракций методом ВЭЖХ-МС. В исследуемых образцах обнаружен

ряд полифенольных соединений в диапазоне масс от тримеров до октамеров, различающихся на 124 Да массы, что соответствует молекуле флороглюцина (рисунок 8). Относительное содержание данных соединений в подфракциях ЛН-1 – ЛН-12 достигает 23 %. Из представленных данных видно, что наблюдается тенденция к увеличению молекулярной массы олигомеров флоротаннинов при увеличении элюирующей силы используемого растворителя. Можно сделать вывод, что, по всей видимости, наибольший вклад в антиоксидантную активность полифенольной фракции вносят гексамеры, гептамеры и октамеры.



Стоит отметить, что во фракциях, полученных с использованием смесей ацетона и этанола, содержание олигомерных компонентов незначительно, вероятно, компонентный состав данных фракций представлен более высокомолекулярными соединениями, идентификация и определение которых методами масс-спектропии затруднительна.

Рисунок 8 – Зависимость антиоксидантной активности от компонентного состава подфракций

Результаты ВЭЖХ-МС анализа подтверждаются

данными полученными методом флуоресцентной спектроскопии исследуемых подфракций. В спектрах подфракций с ЛН-3 по ЛН-10 наблюдается два максимума флуоресценции, что характеризует одновременное присутствие низко- и высокомолекулярных соединений; в то время как для подфракций, выделенных с помощью бинарного растворителя этанол/ацетон, характерен только один ярко-выраженный максимум в более длинноволновой области (рисунок 9).

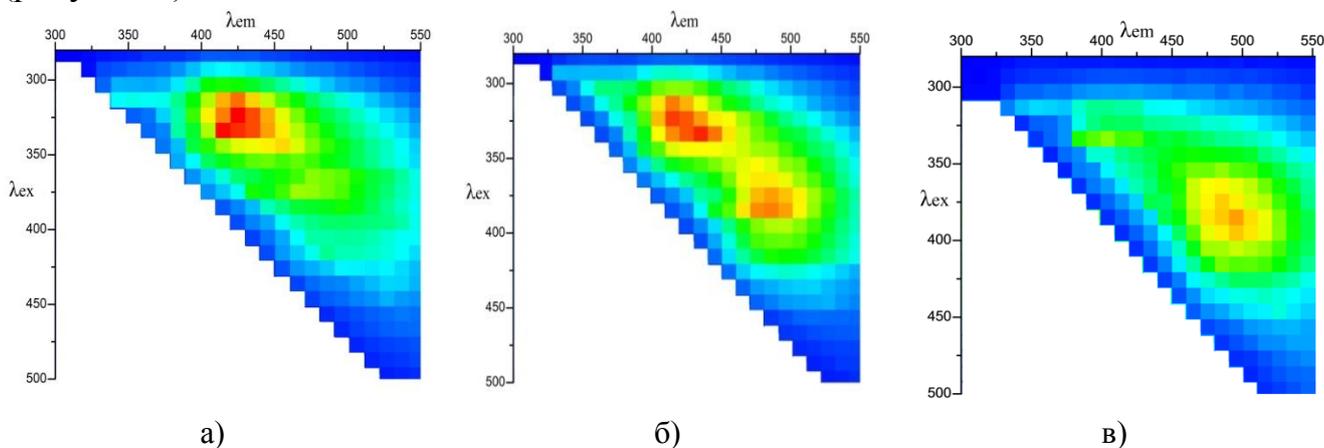


Рисунок 9 – 2D спектры флуоресценции фракций: а) полифенольная фракция; б) подфракция ЛН-3; в) подфракция ЛН-17

При проверке гипотезы зависимости антиоксидантной активности флоротаннинов от молекулярной массы установлено, что подфракции со средними молекулярными массами от 8 до 18 кДа, элюируемые системой растворителей этанол : вода, характеризуются антиоксидантной активностью в диапазоне 641-940 мг аскорбиновой кислоты / г экстракта (рисунок 10). Для более высокомолекулярных подфракций полифенолов со средними молекулярными массами от 18 до 49 кДа, полученных элюированием с ацетоном, антиоксидантная активность меньше, в данном диапазоне молекулярных масс наблюдается явная тенденция к уменьшению антиоксидантной активности с ростом молекулярной массы полифенолов.

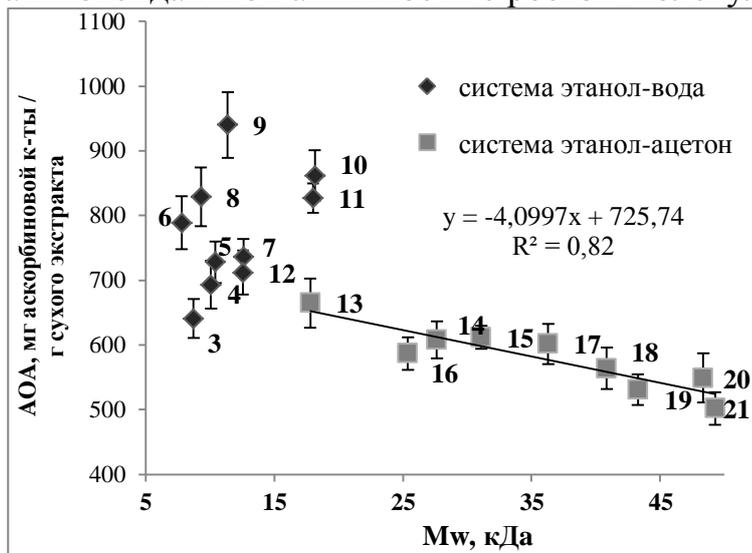


Рисунок 10 – Зависимость антиоксидантной активности от молекулярной массы флоротаннинов

Этот эффект связан, вероятно, с взаимным экранированием восстанавливающих центров флоротаннинов и уменьшением их доступности за счет конформационных изменений макромолекул, вызванных образованием внутри и межмолекулярных водородных связей.

Проведенные исследования биологической активности фракций полифенолов бурых водорослей вида *Fucus*

*vesiculosus* позволили выявить бактериостатические, фунгицистатические и иммуномодулирующие свойства полученных препаратов (таблица 6). Полифенольные фракции с диапазоном средних молекулярных масс 10-28 кДа проявляют значимую бактериостатическую активность (эффект действует до 85 % культур бактерий) и более активно подавляют рост грамположительных бактерий, чем грамотрицательных. Менее эффективно происходит подавление роста дрожжеподобных грибов. Фракции с диапазоном средних молекулярных масс 10-28 кДа в среднем обладают выраженным фунгистатическим действием по сравнению с другими образцами (эффект достигает максимума 35 %). Исследования фагоцитарной активности нейтрофилов крови человека в присутствии полифенольных фракций показали, что полифенолы не подавляют фагоцитарную активность нейтрофилов, и, следовательно, не проявляют цитотоксичности, что говорит об отсутствии иммунодепрессивного действия.

Таблица 6 – Биологическая активность фракций полифенолов бурых водорослей

	<b>Среднемассовая молекулярная масса фракции полифенолов, кДа</b>									
	9±1	10±1	10±1	15±2	28±3	31±3	29±3	42±4	48±5	49±5
	<b>Антиоксидантная активность фракции полифенолов, мг аскорбиновой кислоты/ г экстракта</b>									
	614±30	707±35	775±38	905±46	608±29	612±18	592±27	547±28	549±38	502±25
<b>Штаммы бактерий</b>	<b>Бактериостатический эффект полифенольных подфракций (% от 20 испытываемых культур)</b>									
<i>Ps. aeruginosa</i>	5	5	25	65	55	5	20	5	0	0
<i>Kl. pneumoniae</i>	5	15	45	45	35	10	20	20	10	0
<i>St. aureus</i>	5	10	59	50	45	10	5	5	5	5
<i>Str. pneumoniae</i>	25	25	80	85	75	20	15	15	10	5
% средний	10,0±0,6	15,0±0,7	52,3±1,1	61,3±1,2	52,5±1,9	11,3±1,2	15,0±0,5	11,3±0,6	6,3±0,9	2,5±0,8
% средний для Грам+	15,0±0,5	12,5±0,8	69,5±1,3	67,5±1,5	60,0±1,9	15,0±0,9	10,0±0,6	10,0±0,5	5,0±0,7	5,0±0,7
% средний для Грам-	5,0±0,5	10,0±0,6	32,5±0,5	55,0±0,8	45,0±1,2	7,5±0,9	20,0±0,9	12,5±0,6	7,5±0,9	0,0±0,0
<b>Штаммы грибов</b>	<b>Фунгистатический эффект полифенольных подфракций (% от 20 испытываемых культур)</b>									
<i>C. albicans</i>	10	10	15	35	25	5	10	5	5	5
<i>C. krusei</i>	15	10	15	20	25	15	0	5	5	5
% средний	12,5±0,6	10,0±0,5	15,0±0,7	27,5±0,6	25,0±0,5	10,0±0,5	5,0±0,3	5,0±0,3	5,0±0,3	5,0±0,3
	<b>Фагоцитарная активность нейтрофилов крови человека (%) in vitro в присутствии полифенольных подфракций</b>									
Контроль	52,3±1,2	49,4±1,6	51,3±1,2	53,7±1,4	46,8±0,9	52,2±1,5	52,6±0,9	51,4±1,0	57,5±1,3	49,4±1,6
Опыт	55,4±0,8	59,3±1,3	52,5±1,3	55,6±0,9	55,4±1,3	52,8±0,8	58,6±0,9	57,2±1,3	58,6±1,2	59,3±1,3

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что наиболее ценным видом из арктических промысловых бурых водорослей, для получения полифенольной фракции, является *F. vesiculosus*, отобранный в Белом море в акватории о. Бол. Соловецкий и о. Русский Кузов: содержание полифенолов 6,6 – 19,2 %масс.

2. Разработана и запатентована схема выделения полифенолов из бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus*, основанная на принципах «зеленой» химии. Извлекаемая фракция содержит до 67 %отн полифенолов относительно их содержания в исходной биомассе, причем доля полифенолов во фракции составляет до 83 %.

3. Методом хроматографии и масс-спектрометрии изучены полимолекулярные и компонентные составы выделенных фракций полифенолов. Установлено, что состав полифенольной фракции характеризуется наличием низкомолекулярных компонентов с массой в диапазоне от 374 до 994 Да и высокомолекулярных соединений с массами 8-49 кДа. Низкомолекулярная фракция представлена олигомерными соединениями, содержащими от 3 до 8 структурных единиц флороглюцина.

4. Установлена взаимосвязь антиоксидантной активности и молекулярной массы водорослевых полифенольных компонентов. Наибольшая активность (641 – 940 мг аскорбиновой кислоты на 1 г экстракта) проявляется в диапазоне средних молекулярных масс 8-18 кДа, дальнейшее увеличение данного показателя приводит к тенденции снижения активности, что, вероятно, связано с взаимным экранированием восстанавливающих центров флоротаннинов за счет конформационных изменений макромолекул, вызванных образованием внутри и межмолекулярных водородных связей. В соответствии с данными хромато-масс-спектрометрии доля низкомолекулярных соединений в наиболее активных фракциях полифенолов достигает 23,0 %.

5. Показана эффективность применения полифенольных фракций арктических бурых водорослей в качестве нового биологически активного препарата, проявляющего бактериостатическое действие: бактериостатические эффекты флоротаннинов распространяются на 45–85 % бактериальных культур. Выявлено, что флоротаннины не подавляют фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов крови человека и, следовательно, не обладают иммунодепрессивным действием.

**Основные результаты работы изложены в следующих публикациях**

**Статьи:**

1. Боголицын К.Г., Дружинина А.С., Овчинников Д.В., Каплицин П.А., Шульгина Е.В., Паршина А.Э. Полифенолы бурых водорослей // Химия растительного сырья. – 2018. - №3- С. 5-21.

2. Bogolitsyn K., **Druzhinina A.**, Kaplitsin P., Ovchinnikov D., Parshina A., Kuznetsova M. Relationship between radical scavenging activity and polymolecular properties of brown algae polyphenols // Chemical Papers. – 2019. – Vol. 73, № 10 – P. 2377-2385. (Scopus Q2, Web of Science Q4. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00760-7>, дата on-line публикации 21 июня 2019 г.)

#### **Патенты:**

3. Патент РФ № 2676271 «Способ комплексной переработки бурых водорослей» / Боголицын К.Г., Каплицин П.А., **Дружинина А.С.**, Овчинников Д.В., Шульгина Е.В., Паршина А.Э.; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова», заявл. № 2018109052 от 14.03.2018, опубл. 27.12.2018, Бюл. № 36.

#### **Материалы конференции и тезисы докладов:**

4. Боголицын К.Г., **Амосова А.С.**, Овчинников Д.В., Каплицин П.А. Полифенолы арктических бурых водорослей // Физикохимия растительных полимеров: материалы VI Международной конференции – Архангельск: САФУ, 2015. – С. 28 – 32.

5. **Дружинина А.С.**, Боголицын К.Г., Овчинников Д.В., Каплицин П.А., Шульгина Е.В., Паршина А.Э. Полифенолы арктических бурых водорослей // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тезисы докладов, в 5 т., т. 4. – Екатеринбург: Уральское отделение Российской академии наук, 2016. – С. 512.

6. Каплицин П.А., **Дружинина А.С.**, Овчинников Д.В. Характеристика биологически активных веществ арктических бурых водорослей // ЛОМОНОСОВ-2016: материалы Международного молодежного научного форума. – М.: МАКС Пресс, 2016.

7. **Дружинина А.С.**, Боголицын К.Г., Овчинников Д.В., Каплицин П.А., Паршина А.Э. Выделение и фракционирование полифенолов бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus* // Физикохимия растительных полимеров: материалы VII Международной конференции. – Архангельск: САФУ, 2017. – С. 74-78.

8. Боголицын К.Г., Каплицин П.А., **Дружинина А.С.**, Овчинников Д.В., Паршина А.Э. Комплексная безотходная схема разделения биомассы бурых арктических водорослей // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VII Всероссийской конференции. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2017. – С. 17-19.

9. **Дружинина А.С.**, Боголицын К.Г., Овчинников Д.В., Каплицин П.А., Паршина А.Э., Шульгина Е.В. Фенольные соединения арктических бурых водорослей // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы X Всероссийского симпозиума. – М.: ИФР РАН, 2018. – С. 264 – 269.

10. Bogolitsyn K.G., **Druzhinina A.S.**, Kaplitsin P.A., Ovchinnikov D.V., Shulgina E.V., Parshina A.E. Structure and properties of phlorotannins from brown

algae *Fucus vesiculosus* // 15th European Workshop on Lignocellulose and Pulp: proceedings for poster presentation: материалы Международной конференции. – Авейро, Португалия, 2018 – Р. 319-322.

11. **Дружинина А.С.**, Боголицын К.Г., Овчинников Д.В., Каплицин П.А., Пиковской И.И., Ставрианиди А.Н., Шпигун О.А. Селективное выделение флоротаннинов в схеме разделения и концентрирования биомассы бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus* // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием. – Краснодар, 2018. – С. 245.

12. Боголицын К.Г., **Дружинина А.С.**, Каплицин П.А., Овчинников Д.В., Паршина А.Э., Шульгина Е.В. Взаимосвязь антиоксидантной активности и полимолекулярных свойств полифенолов арктических бурых водорослей // Химия и химическая технология переработки растительного сырья: материалы докладов Международной научно-технической конференции. – Минск: БГТУ, 2018. – С. 275-262.

13. **Дружинина А.С.**, Боголицын К.Г., Каплицин П.А., Овчинников Д.В., Паршина А.Э. Комплексная схема выделения полифенолов из бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus* // Химия-2018: тезисы докладов XII конкурса проектов молодых ученых в рамках Международной выставки химической промышленности и науки. – Москва, 2018. – 72 с.

14. **Druzhinina A.S.**, Bogolitsyn K.G., Ovchinnikov D.V., Parshina A.E., Kaplitsin P.A. Biological activity of polyphenolic fraction of arctic brown algae *Fucus vesiculosus* // Биомониторинг в Арктике: материалы Международной конференции – Архангельск: САФУ, 2018 – С. 46–48.

15. Bogolitsyn K.G., Kaplitsin P.A., **Druzhinina A.S.**, Ovchinnikov D.V., Shulgina E.V., Parshina A.E. The fundamental cycle "structure - functional nature - properties" of phlorotannins from Arctic brown algae // International Conference on Applied Physics, Power and Material science: материалы Международной конференции. – Секундерабад, Индия: IOP Publishing, 2019 - 1172 p.

16. Bogolitsyn K.G., **Druzhinina A.S.**, Kaplitsin P.A., Ovchinnikov D.V., Parshina A.E. Relationship of antioxidant activity and polymolecular properties of polyphenols from the arctic brown algae // Materials science of the future: research, development, scientific training: материалы Международной конференции. - Нижний Новгород: Yurist Publisher, 2019. – С. 18.

17. Bogolitsyn K.G., **Druzhinina A.S.**, Kaplitsin P.A., Ovchinnikov D.V., Parshina A.E. Biological activity of phlorotannins from arctic brown algae *Fucus vesiculosus* // 4th International Congress on Biomaterials & Biosensors: материалы Международной конференции. – Фетхие, Турция: 2019. – С. 124-125.

18. К.Г. Боголицын, **А.С. Дружинина**, А.Э. Паршина, Д.В. Овчинников. Эколого-аналитические исследования арктических сред // Экоаналитика-2019: тезисы XI Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды с международным участием. – Пермь: Perm University Press, 2019. – 32-33.

19. **Дружинина А.С.**, Боголицын К.Г., Овчинников Д.В., Паршина А.Э. Взаимосвязь биологической активности и полимолекулярных свойств флоротаннинов Арктических бурых водорослей вида FUCUS VESICULOSUS // Физикохимия растительных полимеров: материалы IV Международной конференции. – Архангельск: САФУ, 2019. – С.186 - 190.

20. Bogolitsyn K.G., **Druzhinina A.S.**, Parshina A.E., Ovchinnikov D.V. Arctic brown algae – a source of new pharms substances // XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тезисы международного съезда. – Санкт-Петербург, 2019. – Р. 113.

*Автор выражает большую благодарность коллективу кафедры теоретической и прикладной химии САФУ, коллективу Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» САФУ, а так же профессору Добродеевой Лилии Константиновне за помощь в проведении исследований.*

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с указанием фамилии, имени, отчества, почтового адреса, адреса электронной почты, наименования организации, должности лица, составившего отзыв, подписанные и заверенные печатью, просим направлять по адресу: 163002, г. Архангельск, Набережная Северной Двины, 17, диссертационный совет Д 212.008.02.