

УДК 582.26–119:615.322

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ЭКСТРАКТА БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *THALASSIOPHYLLUM CLATHRUS* (POSTELS & RUPRECHT, 1840) И ИХ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2021 г. Е. П. Караулова^{1,*}, Н. М. Аминина¹, Т. И. Вишневская¹, Е. В. Якуш¹

¹Тихоокеанский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ТИНРО»), Владивосток 690091, Россия

*e-mail: karaulova2002@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.01.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к публикации 23.10.2020 г.

Методом жидкость-жидкостной экстракции с использованием растворителей возрастающей полярности из бурой водоросли *Thalassiophyllum clathrus* (Postels & Ruprecht, 1840) выделены отдельные фракции полифенолов и исследована их антиоксидантная активность. Экстракт, полученный с использованием этилацетата, характеризовался максимальным содержанием полифенолов 581.2 ± 8.4 мг/г в эквиваленте галловой кислоты и максимальной антиоксидантной активностью [22.0 ± 0.1 мкг/мл в единицах ЕС₅₀ (DPPH) и 5.84 ± 1.64 мкмоль/г в эквиваленте Тролокса]. Шесть очищенных фракций полифенолов были получены из этилацетатного экстракта методом эксклюзионной препаративной хроматографии с сохранением антиоксидантной активности. Подобраны условия разделения очищенных фракций полифенолов с использованием обращенно-фазовой хроматографии: рН элюирующего буфера 2.0–3.0, градиент вода-ацетонитрил с добавлением муравьиной кислоты, температура 25°C, скорость потока 1 мл/мин. Показано, что в экстракте *T. clathrus* присутствуют полифенольные соединения трех групп: фенолоксикислоты (галловая кислота), гидроксикоричные кислоты (кофейная кислота и ее производное хлорогеновая кислота) и флавонолы (кемпферол, кверцетин).

Ключевые слова: *Thalassiophyllum clathrus*, полифенолы, антиоксидантная активность, высокоэффективная жидкостная хроматография

DOI: 10.31857/S0134347521020042

Бурые водоросли дальневосточных морей проявляют антиоксидантную, гепатопротекторную, противовирусную, противоопухолевую и другие типы биологической активности, наличие которой связано с полифенольными соединениями (Спрыгин и др., 2012; Аминина и др., 2017; Облучинская, 2018). Установлена положительная корреляция между содержанием полифенолов в кусковых водорослях и их антиоксидантной активностью (Imbs et al., 2015). Показана взаимосвязь антиоксидантной активности и молекулярной массы полифенольных компонентов арктических бурых водорослей (Bogolitsyn et al., 2019). Однако корреляция антиоксидантной активности со структурой полифенольных соединений бурых водорослей исследована недостаточно.

Затруднения, возникающие при анализе полифенолов водорослей, вызваны существованием большого количества природных производных этих соединений и многообразием их окисленных форм. Фенольные и полифенольные соединения морских водорослей могут быть разделены на три основные группы: простые производные бензола (фенолы, фенолоксикислоты), ацилированные фенолы (гидроксикоричные кислоты) и

гетероциклические ароматические соединения (стильбены, катехины, антоцианидины, флавононолы, флавоны, флавонолы). Состав полифенолов бурых водорослей отличается наличием флоротаннинов – производных флороглюцинола (1,3,5-гидроксибензола) (Аминина и др., 2017, 2020; Имбс, Звягинцева, 2018). Поскольку полифенолы бурых водорослей состоят из олиго- и полимеров, простая количественная оценка общего содержания полифенолов в их экстрактах недостаточна для описания свойств этих метаболитов (Koivikko et al., 2008). Разделение и фракционирование полифенолов с использованием хроматографических методов представляет собой эффективный способ обнаружения и количественного определения фенольных соединений (Koivikko et al., 2007; Rajauria, 2018).

Различия в спектральных характеристиках позволяют проводить предварительную идентификацию флавоноидных структур, а также идентифицировать отдельные компоненты полифенольной природы. Кроме этого, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) может быть использована для разделения, идентификации и количественного определения наи-

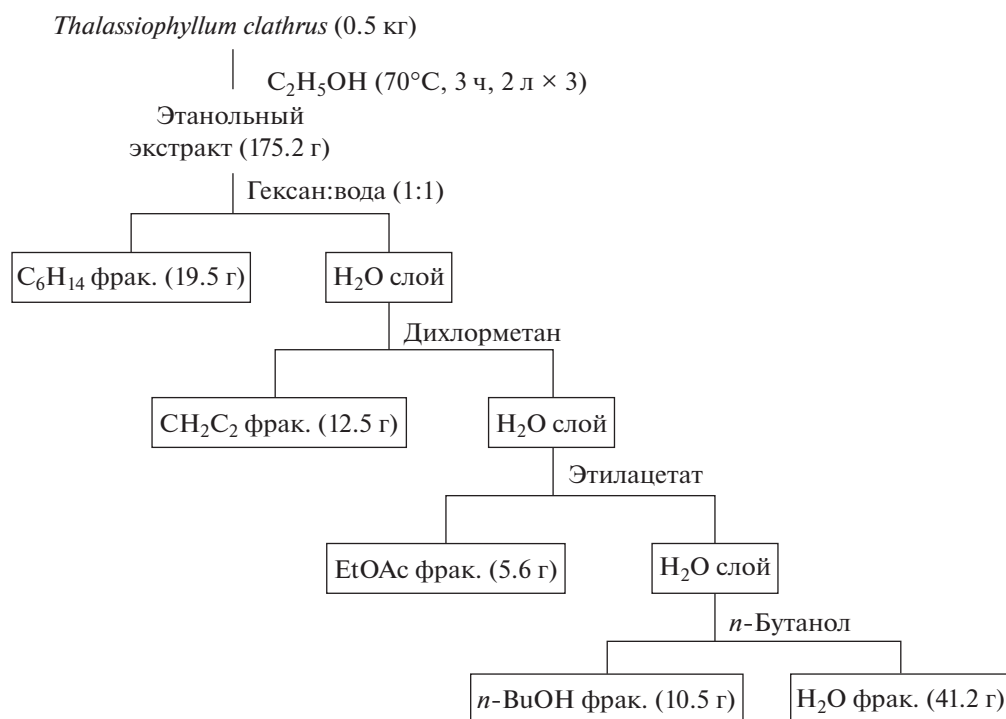


Рис. 1. Схема последовательной экстракции полифенолов из *Thalassiophyllum clathrus*.

более характерных фенольных соединений, присутствующих в бурых водорослях.

Ранее было установлено, что в водно-этанольном экстракте *Thalassiophyllum clathrus* (Postels & Ruprecht, 1840) концентрация полифенолов значительно выше, чем в экстрактах других видов бурых водорослей (Аминина и др., 2020). Цели данной работы – выделить отдельные фракции полифенолов бурой водоросли *T. clathrus* из первоначального этанольного экстракта, а также исследовать их состав и антиоксидантную активность хроматографически и спектрофотометрическими методами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы бурой водоросли *Thalassiophyllum clathrus* были собраны в третьей декаде августа в Авачинском заливе на выходе из Авачинской бухты в районе мыса Маячный на глубине 6 м (восточное побережье п-ва Камчатка). Для исследований брали пластины целиком; образцы сушили на воздухе, измельчали, запаковывали и хранили при температуре -18°C . Для экстракции полифенолов образцы воздушно-сухой водоросли измельчали на программируемой шаровой мельнице WiseStir (модель BML-2, Республика Корея) со скоростью вращения до 600 об/мин. Остаточная влага в водоросли составляла 5.1%.

Экстракцию и фракционирование полифенолов проводили в соответствии с ранее предложенным методом (Kim et al., 2009) с учетом рекомендаций других авторов (Lee et al., 2012; Lim et al., 2019). В работе использовали аналитически чистые рас-

творители (HPLC, $\geq 97.0\%$). Образец массой 500 г помещали в термостойкую колбу, в которую добавляли 2 л этанола, нагретого до 70°C . Колбу выдерживали при периодическом встряхивании и комнатной температуре в течение 3 ч. Экстракцию повторяли трижды. Объединенный спиртовый экстракт концентрировали упариванием на ротаторном вакуумном испарителе при температуре 40°C до постоянной массы. Этанольный экстракт последовательно экстрагировали смесью гексан : вода (1 : 1), дихлорметаном, этилацетатом и бутанолом в соотношении 1 : 1 (w : w). Схема фракционирования и масса каждой фракции приведены на рис. 1.

Для выделения отдельных фракций полифенолов использовали ступенчатую экстракцию растворителями разной полярности (рис. 1). Из 500 г высушенного образца *T. clathrus* было получено 175.2 г спиртового экстракта, который подвергали дальнейшему фракционному разделению с использованием гексана, дихлорметана, этилацетата и бутанола. Во всех полученных экстрактах определяли общее содержание полифенолов и антиоксидантную активность.

Этилацетатный экстракт растворяли в метаноле и фракционировали на колонке Sephadex LH-20 (Merck, 50×2.5 см) метанолом, последовательно собирая фракции. Качественный состав фракций оценивали с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ) и объединяли фракции сходного состава (всего было получено 11 фракций). Фракции Ф5, Ф6 и Ф7, имевшие характерную для полифенолов абсорбцию в УФ свете, подвергали

повторному разделению на колонке Sephadex LH-20 (Merck, 50 × 1 см) с метанолом в качестве подвижной фазы. Для анализа качественного состава полифенолов было отобрано шесть фракций: Ф5.1, Ф5.2, Ф6.1, Ф6.2, Ф7.1 и Ф7.2.

ТСХ проводили на стеклянных пластинах (LuxPlate Silica gel 60 F 254, Merck). В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформ : этанол : уксусная кислота : вода в соотношении 50 : 25 : 3 : 4. Пятна на хроматограммах визуализировали в УФ свете при 254 и 365 нм.

Общее содержание полифенолов определяли в соответствии с модифицированным методом Фолина—Чекольте (Koivikko et al., 2005), используя галловую кислоту (Sigma—Aldrich) в качестве стандарта, и выражали в миллиграммах галловой кислоты на 1 г экстракта.

Антиоксидантную активность (АОА) растворов определяли с использованием 2,2-дифенил-1-пикригидразила (DPPH) (Molynеux, 2004). АОА выражали в единицах эффективной концентрации (EC_{50}), равных количеству исследуемого экстракта, снижающего интенсивность окраски DPPH на 50%. Чем ниже EC_{50} , тем выше антиоксидантные свойства экстракта. Антиоксидантную активность EC_{50} образцов сопоставляли с EC_{50} аскорбиновой кислоты, которую определяли по реакции с DPPH в одинаковых условиях.

Антиоксидантную активность в единицах Тролокса определяли с помощью метода Ре с соавторами (Re et al., 1999) с использованием диаммониевой соли 2,2-азино-бис-3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS). АОА выражали в микромолях Тролокса на 1 г исследуемого экстракта.

Спектры полифенольных фракций *T. clathrus* в видимой области УФ-излучения снимали на планшетном спектрофотометре Polarstar Omega (BMG Labtech GmbH, Германия).

Качественный состав полифенолов исследовали на высокоэффективном жидкостном хроматографе Shimadzu Liquid Chromatograph (Japan), оснащенном двумя насосами LC-10AD, автосемплером SIL-10AC и диодноматричным детектором SPD-M20A. В качестве неподвижной фазы использовали колонку Discovery C18, 5 мкм, 25 см × 4.6 мм (Supelco Analytical, Sigma). Для разделения использовали градиент растворителей А (вода, 0.1% муравьиная кислота) и В (ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота). Профиль элюирования подвижной фазы: 0–5 мин, 100% А; 5–60 мин, 70% А; 60–70 мин, 70–40% А; 70–80 мин, 40% А; 80–90 мин, 40–100% А. Полифенольные компоненты детектировали при 254, 280 и 365 нм (поток 1 мл/мин, температура 25°C, объем пробы 25 мкл). В качестве стандартных растворов использовали галловую, хлорогеновую и кофейную кислоты, а также рутин, кверцетин, апигенин и кемпферол (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).

Измерения проводили трижды, данные анализировали с помощью программного обеспечения

Statistica 7. Коэффициент корреляции рассчитывали по методу Пирсона. Результаты выражали в виде среднего значения со стандартным отклонением. Значения с 95% доверительным интервалом ($P < 0.05$) считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общее количество полифенолов бурой водоросли *Thalassiophyllum clathrus* изменялось от 56.1 мг/г в гексановом экстракте до 581.2 мг/г в экстракте, полученном с использованием этилацетата (табл. 1). АОА экстракта, полученного с использованием этилацетата, составляла 22.0 ± 0.1 мкг/мл в единицах EC_{50} DPPH и 5.84 ± 1.64 мкмоль/г в эквиваленте Тролокса, что соответствует максимальной АОА среди исследованных фракций. Экстракт, полученный с использованием дихлорметана, содержал 324.2 ± 2.6 мг/г полифенолов, но показывал низкую АОА (39.5 ± 0.4 мкг/мл в единицах EC_{50} и 0.82 ± 0.11 мкмоль/г в эквиваленте Тролокса).

Экстракт, полученный с помощью этилацетата, использовали для дальнейшей очистки с применением препаративной колоночной хроматографии. Состав каждой фракции оценивали методом ТСХ, объединяя фракции сходного состава. Были получены шесть фракций полифенолов (Ф5.1, Ф5.2, Ф6.1, Ф6.2, Ф7.1, Ф7.2), поглощающих при 254 и 365 нм.

Все очищенные фракции полифенолов, выделенные из этилацетатного экстракта, проявляли антиоксидантную активность (рис. 2). Максимальной АОА 3.02 ± 0.5 мкг/мл (DPPH) характеризовалась фракция Ф7.1, что выше АОА аскорбиновой кислоты ($EC_{50} = 4.50 \pm 0.02$ мкг/мл). В эквивалентах Тролокса активность также была максимальной и составляла 6.3 ± 0.5 мкмоль/г. Антиоксидантная активность, сопоставимая с таковой аскорбиновой кислоты, была обнаружена для фракций Ф5.2 ($EC_{50} = 5.9 \pm 0.6$ мкг/мл), Ф6.1 ($EC_{50} = 5.6 \pm 0.4$ мкг/мл) и Ф6.2 ($EC_{50} = 5.2 \pm 0.5$ мкг/мл).

При анализе фракций методом ТСХ было отмечено шесть зон с бурой, коричневой и желто-коричневой окраской, времена удерживания (R_t) которых составляли 2.4 см (Ф7.1), 3.0 см (Ф7.2), 3.3 см (Ф6.2, Ф7.1), 3.7 см (Ф7.2), 4.0 см (Ф5.2, Ф6.1, Ф6.2, Ф7.1) и 4.4 см (Ф5.1, Ф5.2, Ф6.1, Ф6.2) при визуализации в УФ свете при 254 нм. При визуализации в УФ свете при 365 нм было отмечено три зоны с ярко-синим окрашиванием и временем удерживания 3.0 см (Ф7.1), 3.3 см (Ф5.1, Ф6.1) и 5.8 см (Ф5.1, Ф5.2); одна зона с ярким сине-зеленым окрашиванием и временем удерживания 6.5 см (Ф5.1), а также пять зон с темно-синим окрашиванием и временем удерживания 2.4 см (Ф7.1), 3.3 см (Ф6.2), 4.0 см (Ф5.2, Ф6.1, Ф6.2, Ф7.1), 4.4 см (Ф5.1, Ф5.2), 6.2 см (Ф5.2, Ф6.2, Ф7.1).

УФ спектры исследованных фракций Ф5.1, Ф6.2, Ф7.1 и Ф7.2 (рис. 3) имели четко выраженные максимумы УФ поглощения. Для фракции

Таблица 1. Антиоксидантная активность (DPPH, ABTS) и содержание полифенолов в экстрактах бурой водоросли *Thalassiophyllum clathrus*

Экстрагент	DPPH, EC ₅₀ , мкг/мл	ABTS, мкмоль/г; в эквивалентах Тролокса	Общее содержание полифенолов в экстракте (мг/г) в эквиваленте галловой кислоты
Гексан	46.3 ± 0.5	0.95 ± 0.05	56.1 ± 5.1
Дихлорметан	39.5 ± 0.4	0.82 ± 0.11	324.2 ± 2.6
Этилацетат	22.0 ± 0.1	5.84 ± 1.64	581.2 ± 8.4
<i>n</i> -Бутанол	26.5 ± 0.8	2.81 ± 0.34	247.7 ± 5.1
Дист. вода	>500	Н/о	52.9 ± 6.1
Аскорбиновая кислота	4.5 ± 0.02	—	—

Примечание. Н/о – активность не обнаружена.

Ф5.1 отмечены два максимума при 266 и 372 нм и небольшое плечо в диапазоне 300 нм. Фракция Ф6.2 имела два максимума при 270 и 370 нм и плечо при 295 нм. Фракция Ф7.1 характеризовалась тремя максимумами при 254, 295 и 375 нм, а фракция Ф7.2 – одним четким максимумом при 274 нм и небольшим плечом при 328 нм. Спектры фракций Ф5.2 и Ф6.1 (на рис. 3 не приведены) имели два максимума УФ поглощения в диапазоне 250–280 и 350–370 нм с величиной оптической плотности 0.3–0.4 единицы.

Для анализа состава полифенольных фракций *T. clathrus* использовали метод ВЭЖХ в градиен-

том режиме элюирования. Соединения идентифицировали путем сравнения времен удерживания с таковыми стандартных полифенолов (табл. 2).

Исследуемые полифенольные фракции *T. clathrus* с применением ВЭЖХ анализировали при трех длинах волн: 254, 280 и 365 нм. Хроматограммы компонентов, полученные при 254 и 280 нм, были практически идентичны, различия наблюдались лишь в интенсивности отдельных пиков. Для фракций Ф5.1, Ф5.2, Ф6.1 и Ф6.2 (рис. 4а, 4б, 4в, 4г) наиболее информативными были хроматограммы, полученные при 254 нм, на которых можно выделить от одного до четырех основных

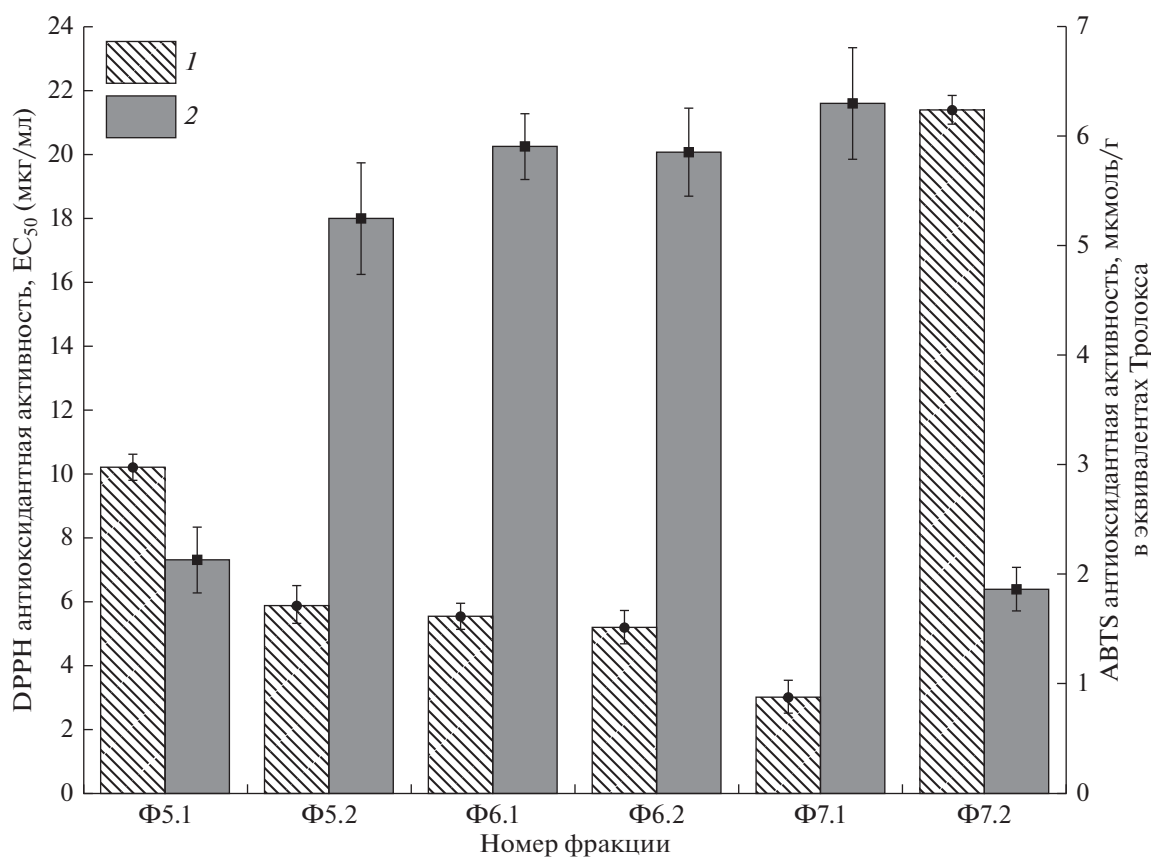


Рис. 2. Антиоксидантная активность отдельных фракций экстракта *Thalassiophyllum clathrus*. 1 – DPPH антиоксидантная активность, 2 – ABTS антиоксидантная активность.

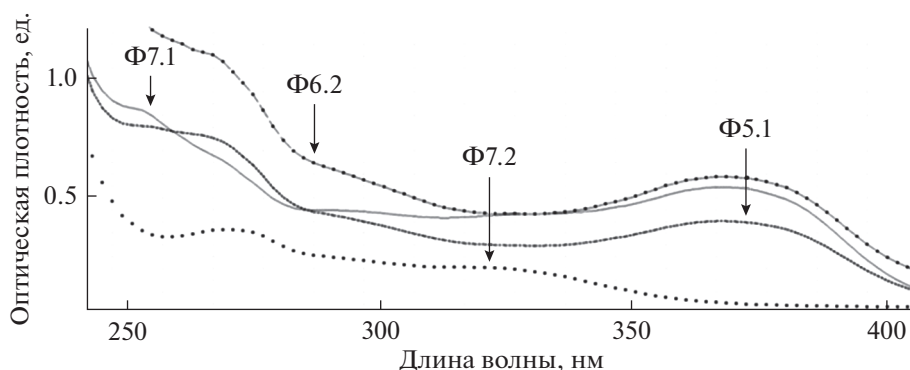


Рис. 3. УФ спектры отдельных фракций экстракта *Thalassiophyllum clathrus*.

пиков с временами удерживания 9.2 ± 0.2 мин (Ф5.1, Ф5.2), 18.9 ± 0.5 мин (Ф5.2, Ф6.1, Ф6.2) и 24.5 ± 0.1 мин (Ф6.2). Анализ хроматограмм при $\lambda = 365$ нм для этих фракций показал наличие только минорных компонентов с низкой интенсивностью светопоглощения. Для фракции Ф7.1 при длине волны 254 нм (рис. 5а) идентифицировались 5 пиков, время удерживания которых составляло 17.1 ± 0.2 , 23.5 ± 0.4 , 27.9 ± 0.4 , 30.7 ± 0.4 и 35.2 ± 0.8 мин. Для фракции Ф7.1 при 365 нм (рис. 5б) определялись один основной пик со временем удерживания 35.2 ± 0.5 мин и один минорный пик со временем удерживания 27.9 ± 0.1 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе состава полифенолов первичной является предварительная очистка экстракта от сопутствующих веществ (белки, пигменты и др.), которые могут переходить в полифенольную фракцию при экстракции (Боголицын и др., 2019). Использование растворителей возрастающей полярности дает возможность выделить отдельные соединения или группу веществ из спиртового экстракта исследуемого образца (Palomino et al., 1996). Среди полученных нами экстрактов (гексан, дихлорметан, этилацетат, бутанол и вода) самый высокий выход экстрагируемых веществ (8.2%) отмечен у водной фракции *Thalassiophyllum clathrus*. Это обусловлено тем, что в водном экстракте концентрируются соли, полисахариды и другие водорастворимые компоненты. Высокий процент выхода при экстракции гексаном и дихлорметаном (соответственно 3.9 и 2.5%) связан с выделением пигментов, жирных кислот и стеролов. Количественный выход компонентов, экстрагируемых этилацетатом и бутанолом, был достаточно низким – 1.1% для этилацетата и 2.1% для бутанола. Максимальное количество полифенолов экстрагировалось этилацетатом (581.2 ± 8.4 мг/г), что согласуется с данными других исследователей (Liu, Gu, 2012; Wei et al., 2016).

Между содержанием полифенолов и антиоксидантной активностью была установлена корреляционная связь с коэффициентами корреляции

0.79 (DPPH) и 0.83 (ABTS). В экстракте, полученном с применением этилацетата, была определена максимальная антиоксидантная активность, соответствующая максимальному содержанию полифенолов (табл. 1). Активность фракции, полученной с использованием дихлорметана, была в 1.5 раза ниже, чем АОА бутанольного экстракта в единицах EC_{50} DPPH, и в 3.5 раза ниже в единицах Тролокса. При этом содержание полифенолов в экстракте, полученном с использованием дихлорметана, было в 1.3 раза выше, чем в экстракте, полученном с использованием бутанола. Можно предположить, что фракция полифенолов, выделенная при экстракции бутанолом, характеризуется более высокой антиоксидантной активностью в пересчете на 1 мг полифенолов; вероятно, это связано с составом и структурой отдельных полифенольных компонентов. Возможно, именно структурные особенности данных полифенолов являются наиболее важными в формировании их окислительно-восстановительной способности. К такому выводу пришли и другие авторы, исследовавшие корреляцию между флавоноидами, продуктами окисления флавоноидов и окислительным стрессом (Williams et al., 2004; Öztürk et al., 2007). Некоторые авторы сообщают о корреляции АОА с общим содержанием полифенолов (Oomah et al., 2011; Xia et al., 2014), при этом отмечают, что активность зависела как от состава использованного экстрагента, так и от типа фенольного соединения (Vasco et al., 2008). Показа-

Таблица 2. Времена удерживания (Rt) некоторых стандартных полифенолов при ВЭЖХ анализе с использованием диодно-матричного детектора

Стандартное вещество	Rt, мин
Галловая кислота	9.752
Хлорогеновая кислота	18.953
Кофейная кислота	28.458
Рутин	45.821
Кверцетин	56.302
Апигенин	76.458
Кемпферол	77.851

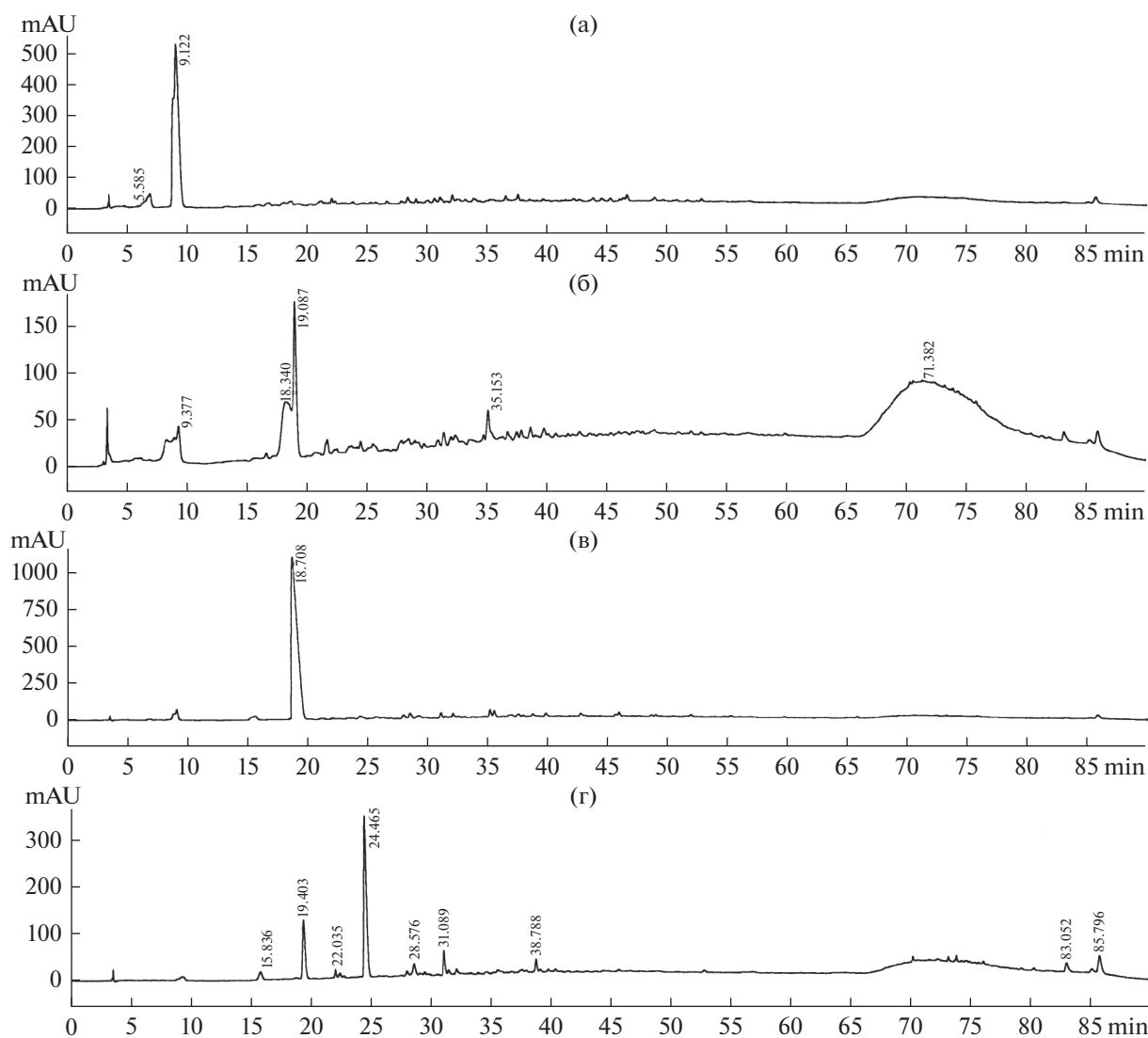


Рис. 4. Распределение отдельных фракций экстракта *Thalassiphyllum clathrus* по результатам ВЭЖХ при длине волны 254 нм. Фракции: а – Ф5.1; б – Ф5.2; в – Ф6.1; г – Ф6.2.

на связь между молекулярной массой и антиоксидантной активностью полифенольных компонентов бурых водорослей (Bogolitsyn et al., 2019). Отсутствие полной корреляции между АОА и содержанием полифенолов можно объяснить также тем, что фенольные соединения не являются единственным источником антиоксидантных веществ в образцах (Облучинская, 2018). Подтверждением того, что антиоксидантная активность зависит от структуры и состава полифенолов, служат и различия в АОА отдельных фракций полифенолов (рис. 2).

Предварительные выводы о составе полифенолов *T. clathrus* можно сделать из анализа результатов ТСХ. Пятна флавоноидов на хроматограммах, как правило, не окрашены или очень слабо окрашены, поэтому недостаточно хорошо просматриваются в видимой области спектра, но хорошо визуализируются в УФ свете. Флавоны,

флаваноны и гликозиды демонстрируют зоны желто-коричневого окрашивания в УФ свете при 254 нм. Фенольные кислоты характеризуются ярко-синим окрашиванием в УФ свете при 365 нм (Wagner, Bladt, 1996). Сравнение времени удерживания компонентов и стандартных полифенолов на ТСХ пластинах (табл. 3) показало, что в полученных фракциях Ф5.1, Ф5.2, Ф6.1 и Ф6.2 содержались фенольные кислоты, в частности, галловая кислота ($R_t = 4.4$) и кофейная кислота ($R_t = 5.8$). Наличие кофейной кислоты или ее производных, характеризующихся ярко-синей окраской при визуализации при 365 нм, отмечено в образцах Ф5.1, Ф5.2, Ф6.1 и Ф7.1. Зоны адсорбции с темно-синей окраской и временем удерживания, сходным с таковым кверцетина и кемпферола ($R_t = 6.2-6.4$), отмечены для фракций Ф5.1, Ф5.2, Ф6.2 и Ф7.1.

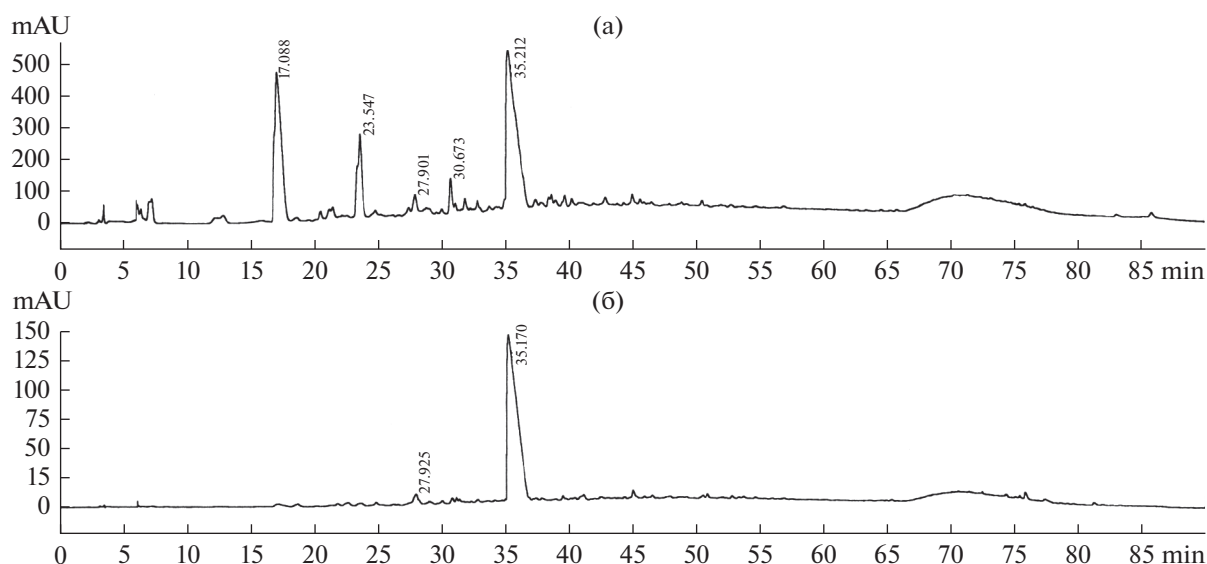


Рис. 5. Распределение фракции экстракта *Thalassiphyllum clathrus* (Ф7.1) по результатам ВЭЖХ при длинах волн 245 (а) и 365 нм (б).

Используя УФ-спектрофотометрию растворов исследованных полифенолов, можно выявить их определенные структурные особенности. Как правило, УФ спектр полифенолов характеризуется двумя максимумами поглощения, положение и интенсивность которых зависят от структурных различий. Приведенные на рис. 3 УФ спектры отдельных фракций экстракта *T. clathrus* имеют две основные зоны интенсивного поглощения: 250–270 и 370 нм. Для фракций Ф5.1, Ф6.2 и Ф7.1 интенсивность в области 370 нм ниже интенсивности при 250–270 нм, что характерно для флавоноловых агликонов (кверцетин, кемпферол) (Escarpa, González, 2000). Увеличение интенсивности поглощения в области 270 нм может быть связано с присутствием галловой кислоты (Ф5.1, Ф7.1). УФ спектр фракции Ф7.2 содержит две главные полосы при 240–270 и 310 нм, что характерно для веществ кумариновой природы (Гужва, 2012).

При изучении сложных природных объектов с использованием хроматографического метода разделения важной стадией является идентификация разделяемых компонентов. Поскольку ис-

следуемые полифенолы имеют широкий диапазон полярности, для их анализа используют градиентный режим элюирования с уменьшением полярности (Rajauria, 2018; Боголицын и др., 2019). Еще одним определяющим фактором, влияющим на разделение веществ фенольной природы, является величина рН подвижной фазы. Нестабильность сорбента колонки при рН ниже 2.0, с одной стороны, и диссоциация фенолкарбоновых и коричных кислот при рН выше 3.0, с другой стороны, ограничивают выбор рН элюирующего буфера диапазоном от 2.0 до 3.0. Для хроматографического разделения стандартных полифенолов и идентификации исследуемых фракций экстракта *T. clathrus* использовали элюенты: А – вода, В – ацетонитрил, с добавлением муравьиной кислоты до рН 3.0. Данные условия были оптимальными для хроматографического разделения и детектирования как стандартных смесей полифенолов, так и исследованных экстрактов. Выбор длин волн 254, 280 и 365 нм обусловлен тем, что они являются характерными для определения производных бензола, фе-

Таблица 3. Времена удерживания (Rt) некоторых стандартных полифенолов по результатам ТСХ

Стандартное вещество	Тип полифенольного соединения	Rt, см
Рутин	Гетероциклические ароматические соединения, флавонолы	0.40 ± 0.02
Хлорогеновая кислота	Ацилированные фенолы, гидроксикоричные кислоты	1.38 ± 0.02
Эллаговая кислота	Ароматические соединения, содержащие два и более неконденсированных ароматических кольца; бифенилы	1.73 ± 0.06
Апигенин	Гетероциклические ароматические соединения, флавоны	2.12 ± 0.02
Галловая кислота	Простые производные бензола, фенолосикислоты	4.40 ± 0.04
Кофейная кислота	Ацилированные фенолы, гидроксикоричные кислоты	5.80 ± 0.04
Кверцетин	Гетероциклические ароматические соединения, флавонолы	6.21 ± 0.05
Кемпферол	Гетероциклические ароматические соединения, флавонолы	6.42 ± 0.02

нольных кислот и альдегидов (Andlauer et al., 1999; Rodríguez-Delgado et al., 2001).

Как видно на рис. 4а, фракция Ф5.1 содержит один компонент, время удерживания которого совпадает со временем удерживания стандарта галловой кислоты при 254 и 280 нм. Наличие галловой кислоты в этой фракции подтверждено данными УФ спектра и ТСХ анализа. Хроматограмма фракции Ф5.2 характеризуется двумя пиками при 254 и 280 нм, время удерживания составляет соответственно 9.4 и 18–19 мин. Сопоставляя данные ВЭЖХ анализа, УФ спектра и ТСХ анализа, можно предположить, что фенольные кислоты являются основным компонентом этой фракции, причем доминирует хлорогеновая кислота или ее производные. Отмечен также минорный пик со временем удерживания 28 мин, что соответствует времени удерживания кофейной кислоты. Наличие кофейной кислоты подтверждается и характерным ярко-синим окрашиванием на ТСХ в зоне адсорбции стандарта кофейной кислоты. Следует отметить появление широкого пика для фракции Ф5.2 в диапазоне 65–89 мин, образованного перекрывающимися веществами с близкими временами удерживания, что может быть связано с увеличением числа изомеров близкой полярности (Adamson et al., 1999; Lazarus et al., 1999). Время удерживания этого пика характерно для апигенина и кемпферола. Фракция Ф6.1, вероятно, содержит хлорогеновую кислоту, время удерживания которой совпадает со стандартом. Фракция Ф6.2 характеризуется семью пиками при хроматографическом разделении с детектированием при двух длинах волн: 254 и 280 нм. Время удерживания двух пиков совпадает с таким фенольных кислот: хлорогеновой (19 мин) и кофейной (28 мин). Фракция Ф7.1 при 254 нм характеризуется пятью основными пиками, из которых можно выделить два пика; время удерживания первого пика близко к таковому хлорогеновой кислоты (17 мин), а время удерживания второго близко к таковому кофейной кислоты (27 мин). При длине волны 280 нм повышается интенсивность пиков на 12-й и 21-й минутах удерживания, что подтверждает наличие фенол кислот и гидроксикоричных кислот во фракции Ф7.1.

В результате комбинации трех аналитических методов исследования можно сделать вывод, что в экстракте *T. clathrus* присутствуют полифенольные соединения следующих групп: фенолокислоты (галловая кислота), гидроксикоричные кислоты (кофейная кислота и ее производное хлорогеновая кислота) и флавонолы (кемпферол, кверцетин). Высокая антиоксидантная активность фракций Ф6.2 и Ф7.1, вероятно, обусловлена присутствием флавонолов (кверцетина и кемпферола). ВЭЖХ полифенолов отдельных фракций экстракта *T. clathrus* позволила получить ценную информацию для дальнейшего исследования состава и структуры полифенолов, присутствующих в данной водоросли. Метод экстрак-

ции и разделения фракций полифенолов из бурых водорослей в дальнейшем может быть успешно применен для масс-спектрометрического метода идентификации полифенольных компонентов. Кроме этого, полученные результаты могут быть использованы при выборе схемы получения биологически активных концентратов полифенолов для практического применения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аминина Н.М., Вишневская Т.И., Караулова Е.П., Якуш Е.В. Содержание полифенолов и антиоксидантная активность экстрактов из некоторых видов морских водорослей // Изв. ТИНРО. 2017. Т. 189. С. 184–191.
- Аминина Н.М., Вишневская Т.И., Караулова Е.П. и др. Перспективы использования промысловых и потенциально промысловых бурых водорослей дальневосточных морей в качестве источника полифенолов // Биол. моря. 2020. Т. 46. № 1. С. 37–44.
- Боголицын К.Г., Дружинина А.С., Овчинников Д.В. и др. Полифенолы арктических бурых водорослей: выделение, полимолекулярный состав // Химия раст. сырья. 2019. № 4. С. 65–75.
- Гужва Н.Н. Содержание и состав полифенолов, кумаринов астрагала серпоплодного, произрастающего в Пятигорском флористическом районе // Науч. ведомости БелГУ. 2012. № 22 (141). С. 27–34.
- Имбс Т.И., Звягинцева Т.Н. Флоротаннины – полифенольные метаболиты бурых водорослей // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 4. С. 217–227.
- Облучинская Е.Д. Антиоксидантные комплексные экстракты из фукусовых водорослей Баренцева моря // Вестн. МГТУ. 2018. Т. 21. № 3. С. 395–401.
- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Морские водоросли – перспективный источник полифенольных антиоксидантов и комплексов эссенциальных фосфолипидов // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2012. Т. 14. № 1(9). С. 2299–2302.
- Adamson G.E., Lazarus S.A., Mitchell A.E. et al. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. P. 4184–4188.
- Andlauer W., Martena M.J., Fürst P. Determination of selected phytochemicals by reversed-phase high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection // J. Chromatogr. A. 1999. V. 849. P. 341–348.
- Bogolitsyn K., Druzhinina A., Kaplitsin P. et al. Relationship between radical scavenging activity and polymolecular properties of brown algae polyphenols // Chem. Pap. 2019. V. 73. P. 2377–2385.
- Escarpa A., González M.C. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to

- determine the phenolic compounds from different sources // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 897. P. 161–170.
- Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N. Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods // *J. Appl. Phycol.* 2015. V. 27. № 1. P. 545–553.
- Kim A.-R., Shin T.-S., Lee M.-S. et al. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. P. 3483–3489.
- Koivikko R., Eränen J.K., Loponen J., Jormalainen V. Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification // *J. Chem. Ecol.* 2008. V. 34. № 1. P. 57–64.
- Koivikko R., Loponen J., Honkanen T., Jormalainen V. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions // *J. Chem. Ecol.* 2005. V. 31. № 1. P. 195–212.
- Koivikko R., Loponen J., Pihlaja K., Jormalainen V. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus* // *Phytochem. Anal.* 2007. V. 18. № 4. P. 326–332.
- Lazarus S.A., Adamson G.E., Hammerstone J.F., Shmitz H.H. High performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages // *J. Agric. Food Chem.* 1999. V. 47. P. 3693–3701.
- Lee M.-S., Shin T., Utsuki T. et al. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and hepatoprotective properties in tacrine-treated HepG2 cells // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. № 21. P. 5340–5349.
- Lim S., Choi A.-H., Kwon M. et al. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum ser-ratifolium* and its major antioxidant components // *Food Chem.* 2019. V. 278. P. 178–184.
- Liu H., Gu L. Phlorotannins from brown algae (*Fucus vesiculosus*) inhibited the formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyls // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. № 5. P. 1326–1334.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity // *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 2004. V. 26. № 2. P. 211–219.
- Oomah B.D., Caspar F., Malcolmson L.J., Bellido A.-S. Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls // *Food Res. Int.* 2011. V. 44. P. 436–441.
- Öztürk M., Aydoğmuş-Öztürk F., Duru M.E., Topçu G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant // *Food Chem.* 2007. V. 103. P. 623–630.
- Palomino O.M., Gomez-Serranillos P., Carretero E., Villar A. High-performance liquid chromatography of flavonoids from *Sideritis* species // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 731. P. 103–108.
- Rajauria G. Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. V. 148. P. 230–237.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radical Biol. Med.* 1999. V. 26. P. 1231–1237.
- Rodríguez-Delgado M.A., Malovaná S., Pérez J.P. et al. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 912. P. 249–257.
- Vasco C., Ruales J., Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador // *Food Chem.* 2008. V. 111. P. 816–823.
- Wagner H., Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer. 1996. 359 p.
- Wei R., Lee M.-S., Lee B. et al. Isolation and identification of anti-inflammatory compounds from ethyl acetate fraction of *Ecklonia stolonifera* and their anti-inflammatory action // *J. Appl. Phycol.* 2016. V. 28. P. 3535–3545.
- Williams R.J., Spencer J.P.E., Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? // *Free Radical Biol. Med.* 2004. V. 36. № 7. P. 838–849.
- Xia X., Cao J., Zheng Y. et al. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China // *Ind. Crops Prod.* 2014. V. 58. P. 91–98.

A Study of Polyphenol Fractions in an Extract from the Brown Alga *Thalassiophyllum clathrus* (Postels & Ruprecht, 1840) and Their Antioxidant Activity

E. P. Karaulova^a, N. M. Aminina^a, T. I. Vishnevskaya^a, and E. V. Yakush^a

^aPacific Branch, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (TINRO), Vladivostok 690091, Russia

A number of polyphenol fractions were extracted from the brown alga *Thalassiophyllum clathrus* by the method of liquid–liquid extraction using solvents of increasing polarity, and their antioxidant activity was studied. The extract obtained with ethyl acetate was characterized by a maximum polyphenol content of 581.2 ± 8.4 mg/g equivalent to gallic acid and a maximum antioxidant activity (22.0 ± 0.1 µg/mL in EC₅₀ units (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and 5.84 ± 1.64 µmol/g equivalent to Trolox). Six purified polyphenol fractions were isolated from the ethyl acetate extract by preparative size-exclusion chromatography, with the antioxidant activity preserved. The conditions for separation of the purified polyphenol fractions through reverse phase chromatography were selected as follows: pH of elution buffer, 2.0–3.0; the water–acetonitrile gradient supplemented with formic acid; temperature, 25°C; flow rate, 1 mL/min. It has been shown that the extract from *T. clathrus* contains polyphenolic compounds of the following groups: phenolic (gallic acid), hydroxycinnamic acids (caffeic acid and its derivative, chlorogenic acid), and flavonols (kaempferol and quercetin).

Keywords: *Thalassiophyllum clathrus*, polyphenols, isolation, high-performance liquid chromatography