

*На правах рукописи*

**Тхан Тайк**

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНАЯ  
АКТИВНОСТЬ КАРОТИНОИДОВ И ХЛОРОФИЛЛОВ ИЗ МОРСКИХ  
ВОДОРΟΣЛЕЙ**

специальность 02.00.04 – Физическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

**Москва - 2017 г**

Диссертационная работа выполнена на кафедре химии высоких энергий и радиозэкологии в Российском химико-технологическом университете имени Д.И. Менделеева.

**Научный руководитель:** доктор химических наук, профессор  
**Ревина Александра Анатольевна**  
ведущий научный сотрудник кафедры химии  
высоких энергий и радиозэкологии  
РХТУ имени Д.И. Менделеева

**Официальные оппоненты:** доктор химических наук, профессор  
**Ольга Тарасовна Касаикина**  
заведующая лабораторией жидкофазного  
окисления Института химической физики РАН  
им. Н.Н. Семенова

доктор химических наук, профессор  
**Сырбу Светлана Александровна**  
заведующая кафедрой неорганической и  
аналитической химии Ивановского  
государственного университета

**Ведущая организация:** Институт биохимической физики РАН  
им. Н.М. Эмануэля

Защита состоится 20 февраля 2018 года в 16 ч 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.204.11 в РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева и на сайте <http://diss.muctr.ru/author/214/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета Д 212.204.11,  
к.х.н., доцент



Н.М. Мурашова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы:** Для широкого использования биологически активных соединений из морских водорослей и других морепродуктов нужны высокотехнологичные методы их извлечения с оптимальным содержанием. Эффективное извлечение определенных пигментов и химических соединений из морекультур требует разработки способов и определению условий, что может быть реализовано лишь при использовании физико-химических подходов. Необходимость и целесообразность использования современных физико-химических методов для изучения свойств и функциональной активности биологически активных веществ, выделенных из природного сырья, очевидны и поддерживается многими учеными нашей страны и ведущими учеными мира. На основе результатов физико-химических исследований решаются проблемы сохранения сырья и вопросов стабильности биологически активных веществ из водорослей и других морских организмов.

В настоящее время в нашей стране и в мировой практике широко применяется обработка сырья из морекультур и фармпрепаратов при использовании внешнего воздействия ионизирующего излучения. Использование метода радиационной обработки сырья и препаратов требует обязательного применения современных физико-химических методов измерения энергии, поглощенной образцами, и определения радиационной стабильности выделенных биологически активных соединений из облученных образцов. Из-за отсутствия импульсных методов внешнего воздействия ионизирующего излучения и скоростной регистрации промежуточных короткоживущих частиц, образующихся в момент радиолиза, исследования превращений различных соединений проводят путём регистрации в пострadiационный период спектров оптического поглощения экстрактов из облученного сырья водорослей или облученных растворов индивидуальных химических соединений. Используя спектрофотометрические результаты регистрации изменений спектров оптического поглощения биологически активных соединений, после внешнего воздействия ионизирующего излучения в зависимости от выбранных параметров и условий эксперимента делается заключение о механизме окислительно-восстановительных реакций с участием компонентов водорослей.

Для изучения стабильности и реакционной способности индивидуальных химических соединений проводится преварительное их выделение из экстрактов водорослей, очистка от примесей методом тонкослойной хроматографии и определение изменений их оптических свойств за счёт участия в модельных окислительно-восстановительных реакциях.

Результаты фундаментальных исследований и теоретические представления о механизме радиационно-химических процессов генерации и превращений активных короткоживущих частиц в водных и водно-органических растворах, таких, как  $e^-_{\text{гидр}}$  ( $e^-_{\text{сольв}}$ ), H, OH радикалы, супероксид-анион  $O_2^{\cdot-}$ , и данных по константам реакций их взаимодействия с субстратом [А. К. Пикаев, 1986 г.], позволяют проводить радиационно-химическое моделирование окислительно-восстановительных реакций. Для установления механизма сложных процессов в растворах экстрактов водорослей при заданных условиях эксперимента с участием биологически активных соединений необходимо использовать различные современные физико-химические методы.

**Целью работы** является установление механизма окислительно-восстановительных реакций в химических превращениях хлорофилловых и каротиноидных фракций из экстрактов макроводорослей *Jemo*, *Jenit* и микроводорослей *Cylindrotheka Closterium*, в том числе при воздействия ионизирующего излучения.

**Задачи исследования:**

- получить спиртовые и ацетоновые экстракты БАС из культивируемых макроводорослей *Laminaria Japonica Jemo*, *Jenit* и микроводорослей *Cylindrotheka Closterium*;
- исследовать спектры оптического поглощения *каротиноидной* и *хлорофилловой* фракций в спиртовых и водно-спиртовых, ацетоновых и водно-ацетоновых экстрактах и их изменения в зависимости от времени хранения;
- на основании результатов сравнения спектров оптического поглощения спиртовых экстрактов из водорослей, облученных в сухом виде, и спектров экстрактов из необлученных образцов, определить условия стерилизации культивируемых водорослей.
- провести физико-химическими методами исследование механизма окислительно-восстановительных реакций каротиноидных и хлорофилловых фракций в составе спиртовых и ацетоновых экстрактов водорослей в зависимости от дозы облучения: в присутствии и в отсутствие кислорода (насыщение Ag или  $N_2O$ ).
- исследовать редокс - превращения каротиноида фукоксантина, выделенного методом ТСХ из микроводорослей *Cylindrotheka Closterium*, при разных условиях гамма-облучения  $^{60}Co$ .
- провести сравнения спектральных характеристик поглощения и люминесценции спиртовых растворов каротиноидных фракций, выделенных из экстрактов водорослей *Jemo* и *Jenit*, с оптическими свойствами спиртовых растворов монокристаллического фукоксантина.

### **Научная новизна работы:**

- ✓ определены методом UV-VIS спектрофотометрии оптические характеристики поглощения каротиноидных и хлорофилловых фракций в экстрактах водорослей и эффективность экстракции в различных растворителях;
- ✓ обнаружены концентрационные эффекты при разбавлении экстрактов, которые проявляются в нелинейной зависимости интенсивности оптического поглощения от коэффициента разбавления;
- ✓ впервые для культивированных водорослей использован метод радиационно-химического моделирования редокс реакций в водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактах, что позволило выяснить влияние природы, различных условий радиолитиза на антиокислительные свойства и протекторную активность каротиноидных и хлорофилловых фракций;
- ✓ впервые исследована радиационная чувствительность экстрактов водорослей *Cylindrotheka Closterium*, *Laminaria Japonica Jemo* и *Jenit* из облученных образцов в сухом виде для определения условий радиационной стерилизации;
- ✓ впервые с помощью метода радиационно-химического моделирования реакций фукоксантина (*Cylindrotheka*) с промежуточными частицами радиолитиза растворителя в *аэробных* условиях дано объяснение аномально высокой стабильности пигмента за счёт его частичной регенерации при участии молекулярного кислорода.

### **Практическая значимость** работы состоит в том, что:

1. Впервые в составе биологически активных соединений морских бурых водорослей (*Laminaria Japonica*, Мьянмы) обнаружены ценные биологические компоненты, каротиноиды, обладающие высокими антиокислительными свойствами, для использования в фармакопии.
2. Полученные результаты физико-химических исследований макро- и микроводорослей могут быть использованы для решения ряда прикладных задач в области химии растительного сырья, биотехнологии морекультуры, фитотерапии, радиобиологии - прогнозирования антиокислительной активности, протекторных свойств экстрактов и фармпрепаратов и совершенствования технологичных методов сохранения сырья.
3. Анализ результатов проведенных исследований химических превращений каротиноидной и хлорофилловой фракций в различных экстрактах водорослей *Laminaria japonica Jemo* (D) и *Jenit* (M) и *Cylindrotheca Closterium* при воздействии ионизирующего излучения показали возможность *управления* окислительно-восстановительными реакциями в этих системах за счёт внешнего воздействия, условий облучения, разных растворителей *при использовании* разных методов сохранения сухого сырья и препаратов из водорослей.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

- Способы выделения ценных биологически активных соединений - каротиноида фукоксантина и хлорофиллов из разных видов бурых макроводорослей *Jemo* (D) и *Jenit* (M), культивируемых в естественных водоёмах с пресной водой, и из бурых микроводорослей *Cylindrotheca Closterium*, выращенной в режиме накопительного культивирования в морской воде при использовании модифицированной питательной среды.
- Результаты спектрофотометрических исследований спиртовых экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* и макроводорослей *Laminaria Japonica*, облученных в сухом виде при дозах ~ 15÷22 кГр, показали высокую радиационную стабильность и подтвердили возможность применения радиационной стерилизации культивируемых водорослей.
- На основании результатов люминесцентного анализа каротиноидов выделенных методом ТСХ из экстрактов водорослей *Jenit* и *Jemo* (Мьянма), сделан вывод о том, что каротиноиды из этих водорослей по своим физико-химическим свойствам и активности близки фукоксантину из (*Cylindrotheca Closterium*) с аномально высокими антиокислительными свойствами.

**Апробация работы:** Основные результаты работы представлены на следующих конференциях: на Международной конференции посвященной 85-летию Вилар (Москва - 23-24 апреля 2014 г); на конференции «Успехи в химии и химической технологии» (Москва-РХТУ-2014); на 2-й международной научно-практической конференции «Сопроводительная фитотерапия в онкологии» (Москва-23 мая 2015 г); на IV Международной конференции «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела». 21 сентября – 25 сентября 2015 г. Туапсе.

**Публикации:** по теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК.

**Личный вклад автора** состоит в непосредственном участии в постановке основных задач исследования, в обосновании и выборе объектов, в проведении экспериментов, в интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций.

**Структура и объём работы:** Диссертационная работа изложена на 151 страницах, включая 27 страниц приложений, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), четырех глав экспериментальной части, выводов, списка литературы - 150. Работа содержит 49 рисунков и 28 таблиц.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации и сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы.

**Глава I. Литературный обзор.** Анализ литературных данных отражает современное состояние работ, посвященных проблемам извлечения ценных биологически активных соединений из морекультур. Вопросы биологии морских водорослей их сохранения, методы культивирования и физико-химические подходы к интенсивному использованию морских водорослей выделены в приложения 1, 2 и 3. Показана необходимость использования теоретических *физико-химических подходов и экспериментальных методов* к проблемам биотехнологии морекультур, сохранения и полного извлечения из них природных биологически активных соединений (БАС) для медицинских препаратов и фоточувствительных композитов. Рассмотрена перспектива использования *физико-химических методов* определения радиационной стабильности сухого сырья водорослей, биологически активных соединений из образцов и изучения механизма редокс реакций и антиокислительной активности компонентов экстрактов водорослей. Глава завершается обоснованием актуальности, цели и задач диссертационной работы.

## **Глава II. Экспериментальная часть.**

**В разделах 2.1 и 2.2** представлены исходные материалы: бурые морские водоросли (*Laminaria Japonica*), (Государство Мьянма): *Jenit* (M) и *Jemo* (D) и диатомовые *Cylindrotheca Closterium* (*C.Closterium*) (ИнБЮМ, РАН г. Севастополь), их квалификация и методы получения экстрактов из морских водорослей.

**В разделе 2.3** описаны методики получения экстрактов из сухого сырья водорослей и методы определения эффективности экстракции в различных растворителях, физико-химические методы UV-VIS спектрофотометрии для измерения спектров люминесценции и оптического поглощения (ОП), метод тонкослойной хроматографии, ТСХ.

Приготовление экстрактов: к 10 г сухих водорослей добавляли 200 мл растворителя: спирт, ацетон или 50% водные растворы (вода дистиллированная) этанола и ацетона (марки «хч»). Растворы выдерживали при  $T \sim 22 \div 25$  С в течение 10 дней, что достаточно для полного экстрагирования каротиноидов и хлорофиллов. После фильтрации экстрактов измеряли спектры оптического поглощения растворов.

Для измерения спектров использовали спектрофотометр (СФ-2000), 3310 и флюориметр Hitachi-7000, кварцевые кюветы с  $l=1$  см. Раствором сравнения был соответствующий растворитель,  $T \sim 22^\circ\text{C}$ . Особое внимание было уделено изучению влияния разбавления растворов экстрактов на их оптические свойства и эффективность экстракции БАС, что связано с правильным выбором концентрации облучаемых растворов при определении радиационной стабильности, пигменты в которых не должны находиться в агрегированной форме.

Для облучения экстрактов водорослей (дозы от 0.2 кГр до 22 кГр) использовали  $\gamma$ - $^{60}\text{Co}$ - установку при мощности дозы  $0,08 \div 0,11$  Гр/с, определенной методом ферросульфатной дозиметрии. Облучение сухих образцов проводилось потоком

ускоренных электронов при дозе 15÷22 кГр и мощности дозы, равной 3 кГр/с (ускоритель УЭЛВ-10-10-Т-1; д.х.н., зав. сектором Ю. С. Павлов, ИФХЭ РАН).

С целью моделирования *редокс* - реакций в растворах экстрактов водорослей при воздействии излучения использовали предварительное насыщение газами (He, N<sub>2</sub>O и O<sub>2</sub>) с последующим герметизированием образцов. Облучение экстрактов водорослей проводили при T ~22°C.

Выделение экстрактов водорослей *Jenit*, *Jemo* и *C.Closterium* методом ТСХ и измерение спектров поглощения выделенных фракций было проведено в НИИБЮМ по методике вед.н.с., к.х.н. Нехорошева М. В. при его участии и аспиранта Железновой С. Н. Образец экстрактов водорослей (10 мл) центрифугировали при 3000 об/мин. Из полученной массы фукоксантин (Фк) экстрагировали спиртом и наносили на хроматографические пластинки со слоем силикагеля 0,5 мм в системе ацетон-гексан (3:7). Спиртовую фракцию с Фк экстрагировали и центрифугировали. Концентрацию Фк (мг\*г<sup>-1</sup>) определяли по величине оптической плотности при λ = 450 нм с пересчетом на сухую массу микроводоросли по формуле:

$$\Phi_{\text{К}} = \frac{10 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot D_{450}}{E \cdot V_3 \cdot B_{(\text{г})}}$$

где, V<sub>1</sub> - объём элюата с пластины, мл; V<sub>2</sub> - объём экстракта (мл) из навески сухой биомассы В(г), V<sub>3</sub> - объём аликвоты, нанесенной на пластину, мл; D<sub>450</sub> - оптическая плотность при λ = 450 нм; E = 1280 - удельной коэффициент экстинкции Фк в этаноле (оптическая плотность 1% - раствора при λ нм и длине оптического пути l = 1 см), 10 - содержание каротиноида в 1 мл 1 % раствора в спирте в мг.

### Главе III. Экспериментальные результаты и их обсуждение.

#### Раздел 3.1.1. Спектры оптического поглощения органических и водно-органических экстрактов водорослей *Jenit-M* и *Jemo-D*.

С целью увеличения эффективности экстракции ценных веществ из водорослей проводили подбор растворителей и выбор условий экстракции. Спектры ОП ацетоновых растворов водорослей *Jenit-M* -а) и *Jemo-D* -б) даны на рис. 1 -а), 1 -б), включая спектры в спиртовых растворах - на вставках. Полосы поглощения в диапазоне 400 нм - 450 нм относятся к поглощению каротиноидной (Car-), а в области 600 нм - 700 нм - хлорофилловой (Chl-) - фракции.

Представленные результаты (Рис. 1 -а и -в) показывают, что экстракция в 100% растворах спирта и ацетона обоих водорослей происходит почти с одинаковой интенсивностью. Наблюдаемое различие в спектрах поглощения показывает, что экстракция из водорослей *Jenit-M*, особенно каротиноидов, происходит несколько интенсивнее, чем из водорослей *Jemo-D*. Более того, интенсивность поглощения и каротиноидных (λ~450 нм), и хлорофилловых (λ~665 нм) фракций выше в водно-ацетоновых экстрактах. Полученные результаты свидетельствуют, что *эффективность экстракции* БАС зависит от *природы* водорослей и растворителя,

выбранного для экстракции. Для использования выделяемых пигментов в технических целях лучше использовать водно-ацетоновые растворы.

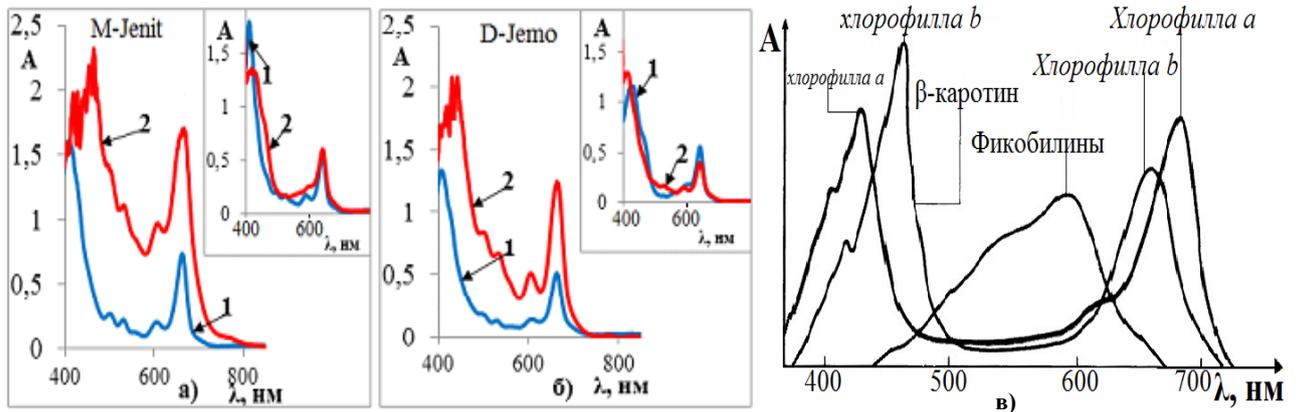
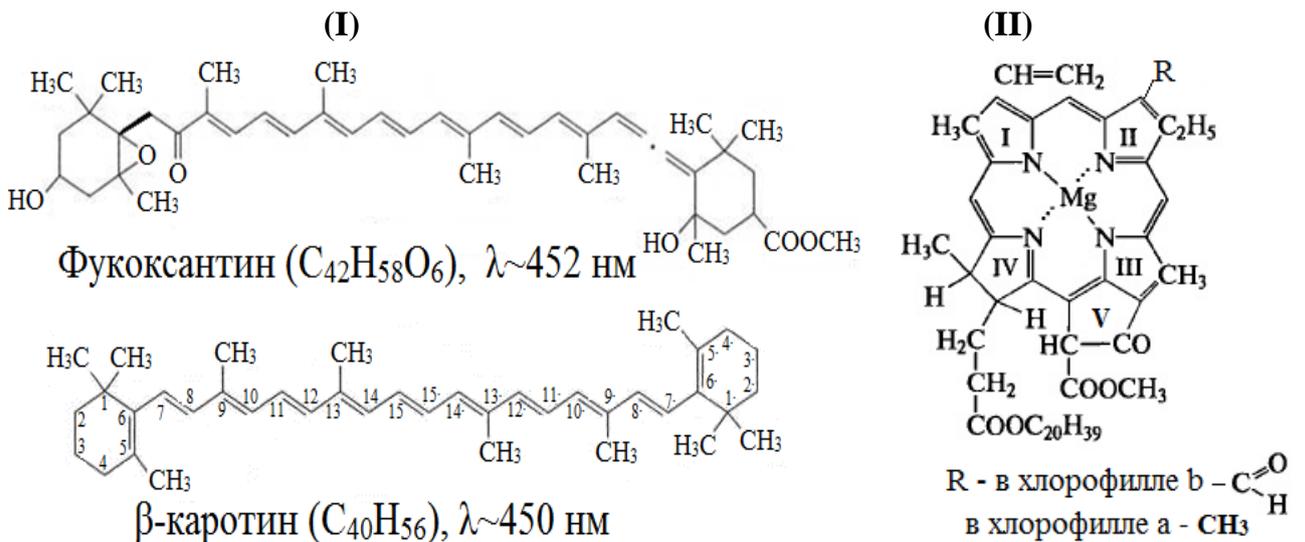


Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов *Jenit-M* -а) и *Jemo-D* -б): в ацетоновых и этанольных растворах (100 %) -1, и водно-ацетоновых и водно-этанольных (50%) растворах -2; спектры спиртовых -1 и водно-спиртовых растворов -2 - на вставках а) и б); спектры оптического поглощения каротиноидных (Car - ) и хлорофилловых (Chl - ) фракций -в).

Ниже представлены структурные формулы каротиноидов - (I) и хлорофиллов - (II).



### Раздел 3.1.2 Влияние разбавления на спектральные характеристики спиртовых и ацетоновых экстрактов водорослей.

Изменение спектров оптического поглощения (ОП) спиртовых и ацетоновых экстрактов только *Jenit* (M) после разбавления растворителем представлены на рис. 2 -а и 2 -б; результаты по *Jemo* (D) – в таблице, а по *S. Closterium* - в диссертации.

В таблице 1 представлены результаты изменения интенсивности ОП каротиноидных и хлорофилловых фракций и для водорослей и *Jenit-M*, и *Jemo-D*. Показано, что изменение интенсивности ОП Car- фракции (I) и Chl- (II) и для спиртовых, и ацетоновых растворов водорослей не следует прямой зависимости от коэффициента разбавления растворов, n. На основании этих результатов спектрофотометрические исследования влияния воздействия ионизирующего излучения проводилось только на разбавленных экстрактах водоросли. Результаты

по разбавлению, полностью представленные в диссертации, позволили сделать вывод о том, что и даже в 50 % -экстрактах водорослей ещё содержатся некоторые компоненты в агрегированном состоянии.

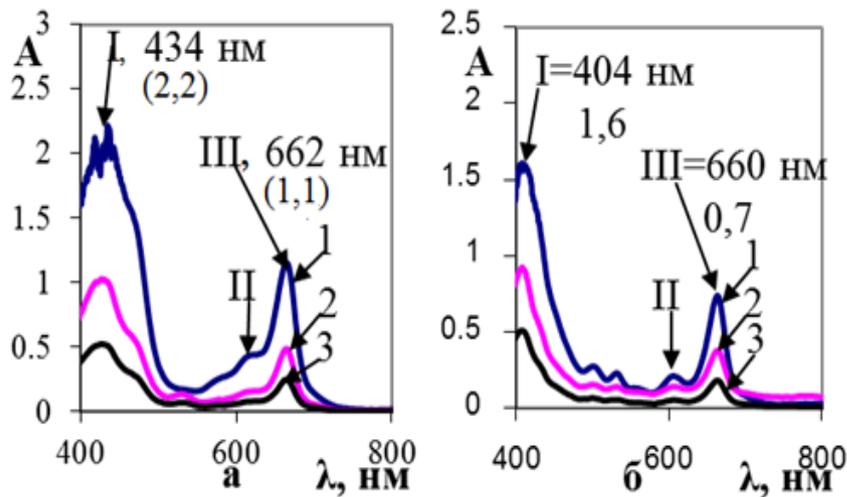


Рис. 2. Спектры ОП 100% спиртовых -а) и 100% ацетоновых экстрактов -б), М-І; исходные - 1, при разбавлении в 3 раза - 2, в 6 раз - 3

Табл. 1. Спектральные характеристики оптического поглощения спиртовых и ацетоновых экстрактов М - І и D - І при разбавлении растворителем в n раз

Спиртовые М-І				Ацетоновые М-І			
$\lambda$ , нм /ОП	І	ІІ	ІІІ	$\lambda$ , нм /ОП	І	ІІ	ІІІ
Исходный	~420 2,2	~617 0,4	~662 1,1	Исходный	~414 1,5	~605 0,18	~660 0,70
n=3	1,0 (0,7)	0,3 (0,13)	0,5 (0,34)	n=3	0,6 (0,5)	0,13 (0,06)	0,30 (0,23)
n=6	0,5 (0,35)	0,08 (0,1)	0,20 (0,2)	n=6	0,3 (0,25)	0,04 (0,03)	0,14 (0,12)
Спиртовые D - І				Ацетоновые D - І			
$\lambda$ , нм /ОП	І	ІІ	ІІІ	$\lambda$ , нм /ОП	І	ІІ	ІІІ
Исходный	~405 1,60	~610 0,21	~660 0,70	Исходный	~404 1,3	~602 0,13	~660 0,50
n=3	0,8 (0,53)	0,04 (,07)	0,27 (0,23)	n=3	0,5 (0,43)	0,02 (0,04)	0,18 (0,17)
n=6	0,4 (0,26)	0,03 (0,03)	0,13 (0,12)	n=6	0,27 (0,21)	0,01 (0,02)	0,10 (0,08)

\*в скобках указана оптическая плотность экстракта, разбавленного в n раз.

**Раздел 3.3** Влияние облучения водорослей *Laminaria japonica* и *C. Closterium* в сухом виде на процесс экстракции природных соединений. Спектры ОП этанольных и водно-этанольных растворов водорослей *Jenit* (М-І и М-ІІ) и *Jemo* (D-І и D-ІІ) до и после облучения ускоренными электронами представлены на рис. 3 -а) и -б).

При сравнении облученных образцов спиртовых экстрактов водорослей *Jemo*-D и *Jenit*-M следует обратить внимание на высокую радиационную стабильность флавоноидов и кислот (поглощение при  $\lambda_{\max} \sim 200\text{nm}$  и  $\lambda_{\max} \sim 290\text{nm}$ ) и Car-фракций (поглощение от 380 нм до 450 нм). В изменениях ОП Chl - фракций при этих же дозах и условиях экстрагирования обнаруживается зависимость эффективности их экстрагирования от природы растворителей. При экстракции облученных

водорослей *Jemo-D-I* оптическая плотность Chl - фракции *увеличилась* на ~15 %, в то время как в водно-этанольном экстракте D-II зарегистрировано уменьшение ОП и содержания хлорофиллов - на ~50 %. Важно отметить, что Car- фракция из облученных водно-спиртовых экстрактов водорослей *Jenit-M*, по сравнению с *Jemo-D*, извлекается с большей эффективностью, чем из необлученных образцов.

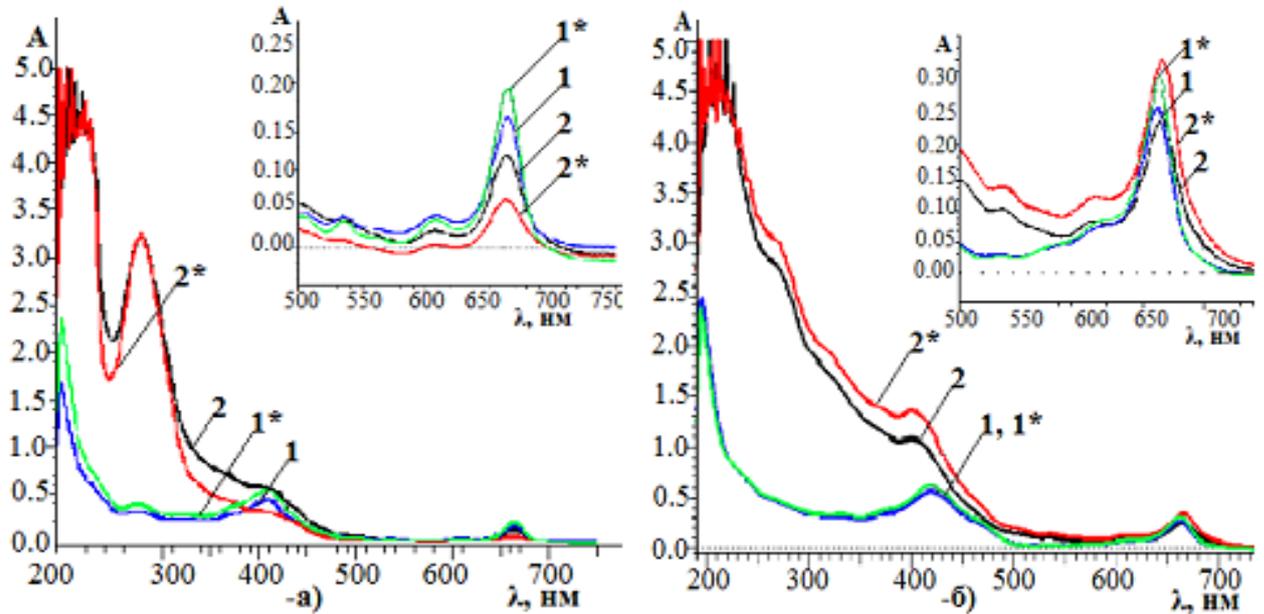


Рис. 3. Спектры оптического поглощения этанольных (1) и водно-этанольных экстрактов (2) для *Jemo* -а) и для *Jenit* -б); до облучения – 1 и 2, после облучения – 1\* и 2\*, доза ~18 кГр. На вставках изменения спектров Chl - фракций D (~ 580÷700 нм) а), Chl - фракций M -б)

На рис. 4 представлены спектры ОП этанольных растворов экстрактов из сухой биомассы *C. Closterium* и после облучения ускоренными электронами (доза 22 кГр) при более высокой мощности дозы (3 кГр/с). Стабильность каротиноидов (~ 89 %) в облученных образцах микроводорослей *C. Closterium* подтверждает возможность использования ионизирующего излучения при сохранении такого важного природного соединения фукоксантина.

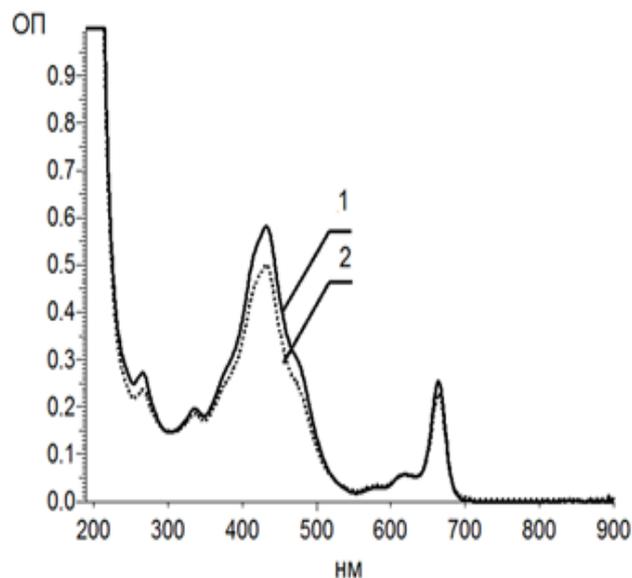
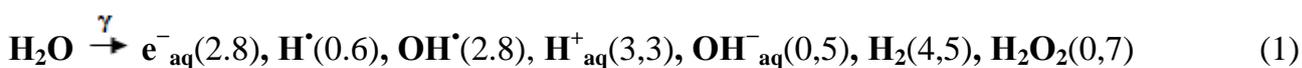


Рис. 4. Спектры ОП этанольных растворов экстрактов из сухой биомассы *C. Closterium* - 1, и образцов после облучения (доза 22 кГр) - 2

Результаты сравнения изменений спектров ОП экстрактов после воздействия ионизирующего излучения на различные виды водорослей в сухом виде позволили сделать вывод о необходимом проведении предварительного исследования радиационно-химических превращений БАС из конкретных видов водорослей для определения допустимых доз стерилизации сухого сырья.

**В разделе 3.4** обсуждаются результаты физико-химических методов моделирования окислительно-восстановительных реакций биологически активных компонентов в растворах водно-органических экстрактов водорослей.

За счёт изменения условий облучения: анаэробных, в присутствии  $O_2$  или  $N_2O$  при радиолизе воды и водно-спиртовых растворов *в анаэробных условиях* образуются различные активные промежуточные частицы [32, 36, 79], ответственные за химические превращения БАС, которые регистрируются спектрофотометрически:



где,  $e^-_{aq}$  и  $H$  - уникальные восстановители ( $E_0 = -2.9$  эВ и  $-2,3$  эВ),  $HO^\bullet$  - самый сильный окислитель ( $E_0 = 2.32$  эВ при pH 7).

В присутствии спирта образуются радикалы,  $R_1^\bullet$ , среди них  $CH_3CH^\bullet OH$  за счёт реакции (2) с высоким восстановительным потенциалом,  $E_0 = -1.4$  эВ.



При насыщении спиртовых и ацетоновых растворов  $N_2O$  происходит дополнительное образование радикалов  $OH^\bullet$  за счёт реакции (3):



При радиолизе ацетоновых и водно-ацетоновых растворов *в анаэробных условиях* так же как и в спиртовых растворах образуются  $e^-_{aq}$ ,  $e^-_{solv}$  и радикалы  $R_1^\bullet$  с разными окислительными и восстановительными свойствами. В присутствии  $O_2$  промежуточные частицы при взаимодействии с  $O_2$  образуют супероксид анион-радикалы и перекисные радикалы, согласно (4) и (5):



На рис. 5. представлены спектры ОП исходных 50% водно-этанольных экстрактов М-II (*Jenit*) и после облучения в присутствии  $O_2$  (а), в анаэробных условиях после насыщения Ar (б) и после насыщения  $N_2O$  (в), (Данные по *Jemo D-II* - в диссертации). На вставках – ОП хлорофиллов (V). Изменения ОП Car- и Chl-фракций в результате редокс-превращений водорослей М-II и D-II даны в таблице 2.

При насыщении (Ar) аргоном водно-спиртовых растворов М-II (*Jenit*)(рис. 5 -б) зарегистрировано существенное снижение содержания БАС, особенно хлорофиллов. В присутствии  $O_2$  (рис. 5-а) за счёт реакции взаимодействия молекул кислорода с промежуточными продуктами радиолиза БАВ, происходит частичная регенерация исходных соединений, наиболее ярко это выражено у каротиноидов.

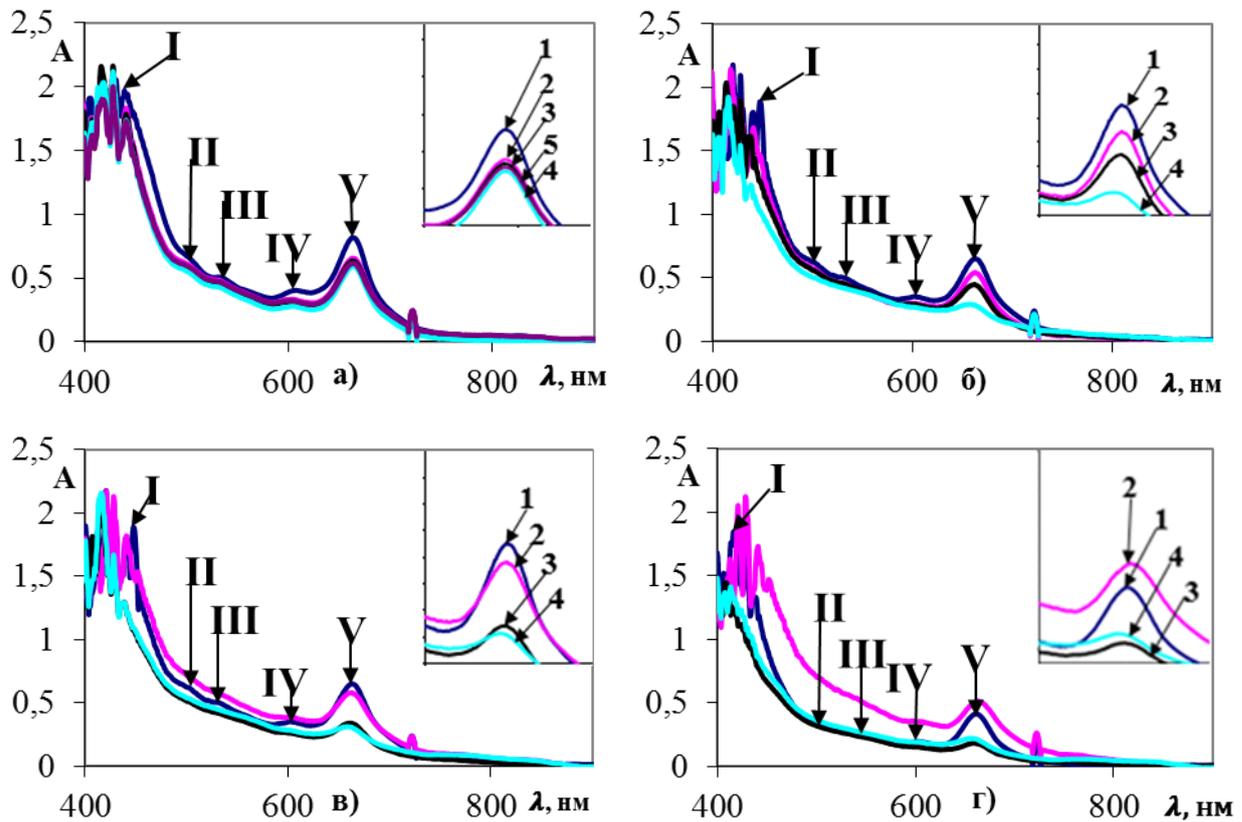


Рис. 5. Спектры ОП водно-этанольных экстрактов в присутствии  $O_2$  М-II (*Jenit*), -а), Ar -б),  $N_2O$  -в) и  $N_2O$  (для *Jemo*) -г). На вставках фрагменты спектров (~600-700 нм) исходных образцов - 1, облуч., кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; на рис -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5  
Табл. 2. Спектральные характеристики оптического поглощения (ОП) водно-спиртовых экстрактов М-II и D-II при разных условиях облучения

Jenit M-II, ОП*при $\lambda(i)$ , нм									
$O_2$			Ar			$N_2O$			
D, кГр	I ~420	IV ~610	V ~670	I ~420	IV ~610	V ~670	I ~420	IV ~620	V ~670
0	2,02	0,39	0,76	2,02	0,39	0,76	2,02	0,39	0,76
0,28	2,01	0,31	0,61	1,93	0,28	0,51	1,90	0,36	0,54
0,56	2,01	0,29	0,60	1,93	0,27	0,41	1,70	0,24	0,30
0,84	2,02	0,26	0,55	-	-	-	-	-	-
1,1	1,90	0,30	0,57	1,50	0,24	0,26	1,60	0,23	0,27
G, %	6,0	23	25	25	38	65	20,7	41	64
Jemo D-II, ОП*при $\lambda(i)$ , нм									
$O_2$			Ar			$N_2O$			
D, кГр	I ~420	IV ~620	V ~660	I ~420	IV ~620	V ~660	I ~420	I ~620	V ~670
0	1,83	0,15	0,45	1,83	0,15	0,45	1,83	0,15	0,45
0,28	1,70	0,21	0,44	1,45	0,15	0,29	1,42	0,33	0,50
0,56	1,70	0,21	0,44	1,40	0,17	0,28	1,18	0,14	0,16
0,84	1,52	0,17	0,37	-	-	-	-	-	-
1,1	1,60	0,21	0,40	1,20	0,15	0,25	1,20	0,18	0,19
*G, %	12,5	+ 40	11	34	0	44	34	+20	+57

\*G, % - радиационный выход превращения пигментов

С целью увеличения концентрации окислительных частиц радиолиза радикалов  $\text{OH}$ , растворы экстрактов перед облучением насыщали  $\text{N}_2\text{O}$ , в результате которого наблюдается *некоторое* повышение ОП, отвечающее за дополнительное образование продуктов *окисления*. Важно отметить, что это повышение  $G$ , % (радиационный выход превращения пигментов) продуктов окисления зависит от *вида водорослей* и природы растворителя (рис. 5, сравнить -в и -г).

**Раздел 3.5** Изменение спектров ОП *водно-ацетоновых* экстрактов М-II (*Jenit*), насыщенных газами, после облучения представлены на рис. 6 (для *Jemo* D-II данные представлены в *диссертации* - в табл. 3.7).

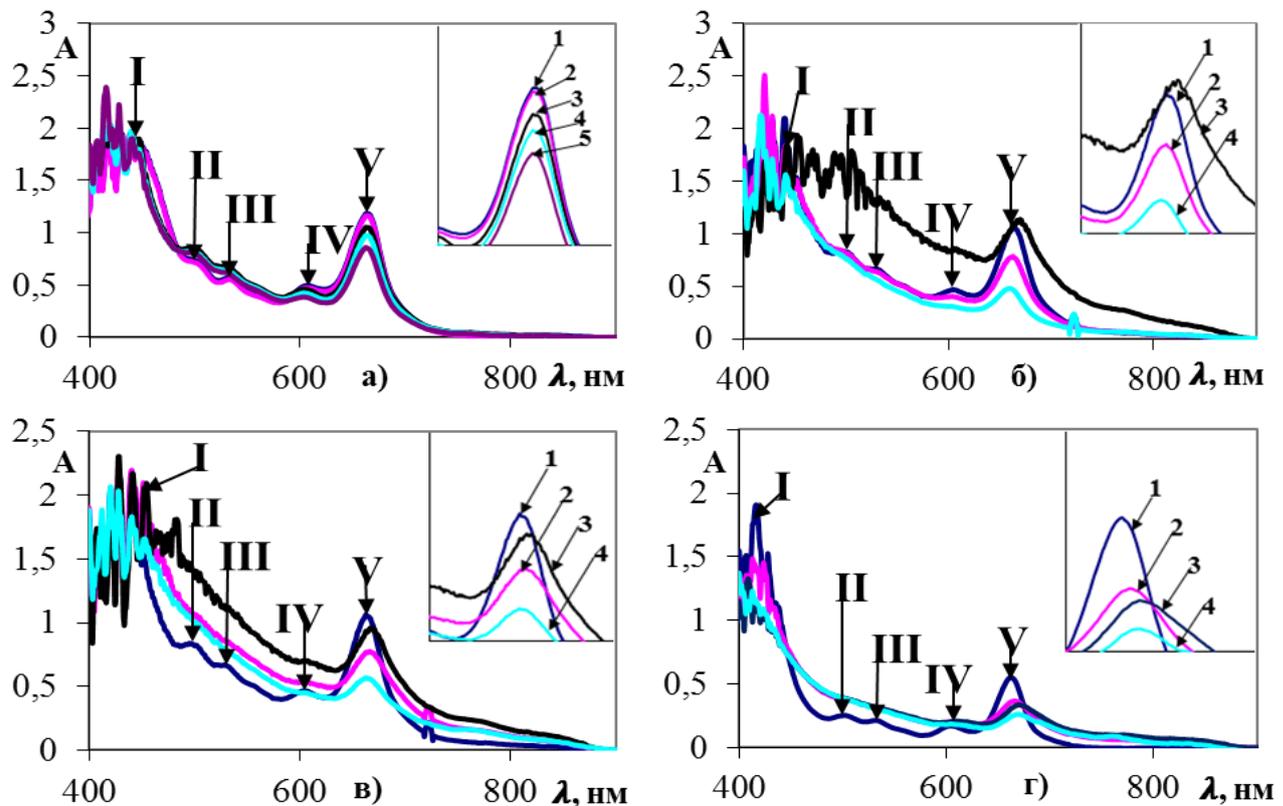


Рис. 6. Спектры ОП 50 % водно-ацетоновых экстрактов в присутствии  $\text{O}_2$  М-II (*Jenit*), -а);  $\text{Ar}$  -б),  $\text{N}_2\text{O}$  -в). Для сравнения приведен спектр -г) для (*Jemo*)  $\text{N}_2\text{O}$ . На вставках для хлорофиллов (V): исходные образцы - 1, облучение при дозе, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; для рис. -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5

Облучение (0,56 кГр) *водно-ацетоновых* растворов *Jenit*, насыщенных ( $\text{Ar}$ ) (рис. 6 -б), в отличие от *водно-спиртовых* растворов (рис. 5 -б), приводит к увеличению содержания продуктов радиолиза. Облучение в присутствии  $\text{O}_2$  (рис. 6 -а) приводит к снижению содержания БАС, но *без регенерации*. В отличие от *Jemo*, в растворах водорослей *Jenit*, насыщенных  $\text{N}_2\text{O}$  (рис. 6 -в), наблюдается увеличение интенсивности полос поглощения, которое можно объяснить образованием новых продуктов окисления. Как показано, выход этих продуктов *зависит от вида водорослей*.

### Раздел 3.5.3 Влияние условий облучения на спектры водно-этанольных и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca closterium*

Изменение спектров ОП водно-этанольных экстрактов (50 %) *C. Closterium*, исходных, и после облучения в присутствии  $O_2$  (а),  $Ar$  (б) и  $N_2O$  (в), представлены на рис. 7. Данные по спектральным характеристикам - в диссертации (таблица 3.10); для водно-ацетоновых растворов - в диссертации (таблица 3.11).

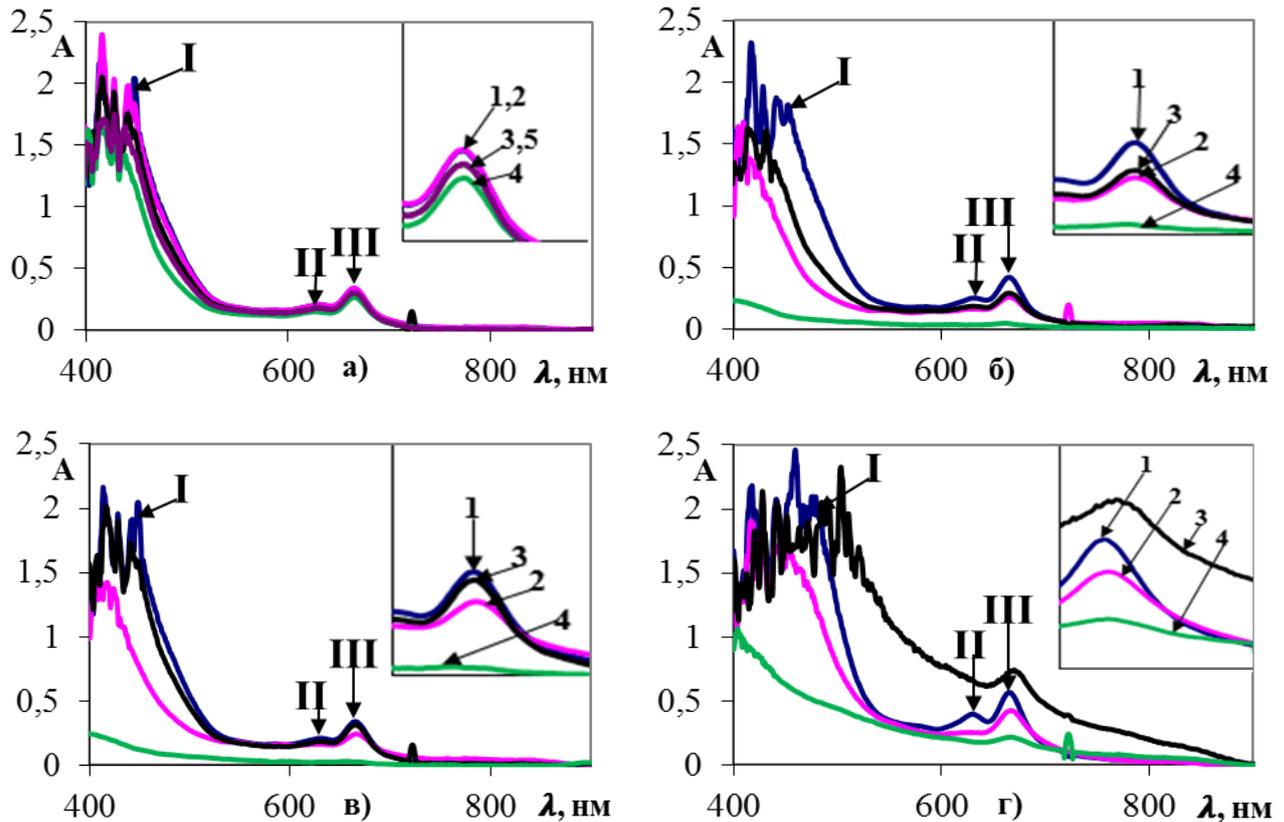


Рис. 7. Изменение спектров ОП водно-спиртовых экстрактов (50%) *C. Closterium* в присутствии  $O_2$  после облучения: -а),  $Ar$  -б) и  $N_2O$  -в), и для сравнения водно-ацетоновых экстрактов, насыщенных  $N_2O$  -г). На вставках: спектры исходных образцов - 1, облученных при дозе, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; для рис -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5

Анализ результатов (рис. 7 -б) показывает, что при насыщении  $Ar$  водно-спиртовых растворов *C. Closterium*,  $N_2O$  наблюдается интенсивное снижение ОП за счёт разложения пигментов с выходам  $G \sim 90$  %. В случае облучения экстрактов *C. Closterium* в аэробных условиях (рис. 7 -а) зарегистрирована высокая стабильность Car- и Chl- фракций, которая сохраняется и после облучения. Образованием лабильных оксокомплексов пигментов, которые для каротиноидов регистрируются спектрофотометрически, объясняют их антиокислительные свойства и возможную регенерацию после облучения. Наблюдаемый сложный характер изменений спектров оптического поглощения за счёт превращений промежуточных продуктов в пострadiaционный период в растворах водорослей М-II и D-II обсуждается в диссертации (раздел 3.6), для растворов *C. Closterium* - в разделе 4.2.3.

В главе IV приведены результаты исследования физико-химических свойств отдельных фракций из водорослей *Jenit*-M и *Jemo*-D, выделенных впервые методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в ИБЮМ РАН им А.О. Ковалевского. На основании полученных данных сделано важное заключение о содержании в этих водорослях активных каротиноидов, включая Фк. Спектры ОП спиртовых растворов выделенных фракций водорослей *Jenit* и *Jemo* с ТСХ-пластинок, даны на рис. 8.

Спектры оптического поглощения спиртовых растворов фракций каротиноидов (рис. 8 -в), выделенных с ТСХ-пластинок: 1) и 2) водорослей – *Jenit*, 3) и 4) – *Jemo* показаны на рис. 8 -б) и для сравнения на рис. 8 -а) представлена яркая полоса Фк - 5) для микроводорослей *C.Closterium*.

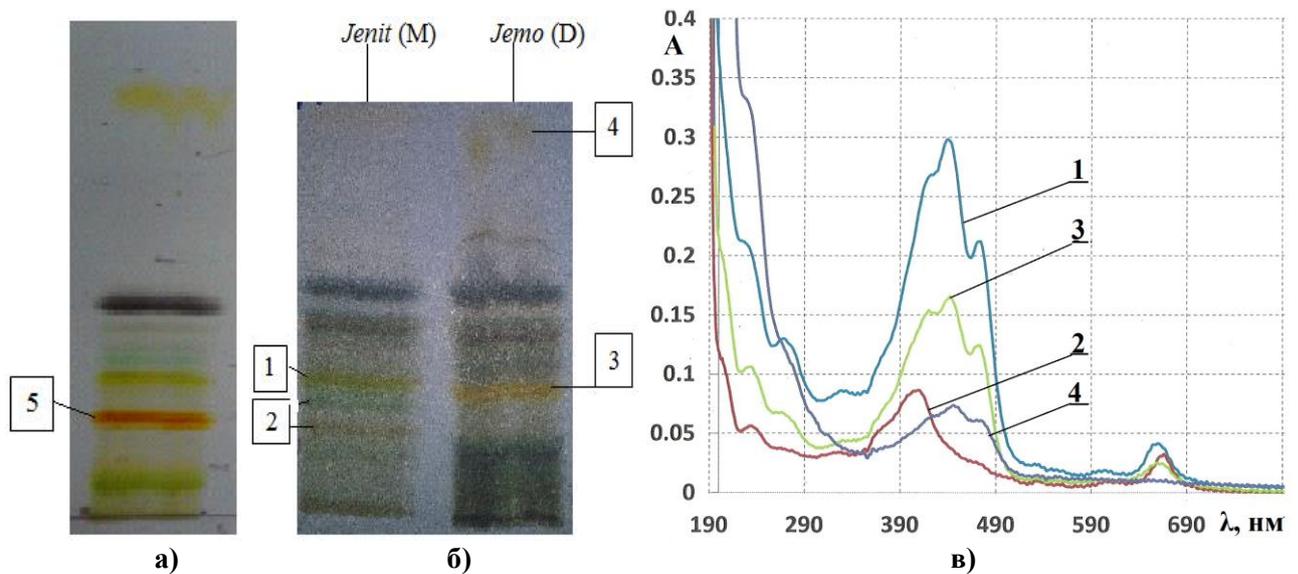


Рис. 8. Фотография пластинок с фракциями водорослей *C.Closterium* -а), -*Jenit* и -*Jemo* -б). Спектры ОП спиртовых растворов выделенных фракций с ТСХ-пластинок водорослей -*Jenit* (1, 2) и -*Jemo* (3, 4) -в)

На основании сравнения оптических характеристик Car-фракций, выделенных ТСХ методом из макроводорослей *Jenit* и *Jemo* (рис. 8 -б), с характеристиками растворов кристаллического Фк (*Cystoseira*) на рис. 8 -а можно сделать вывод, что спектры ОП этих фракций и спектры люминесценции совпадают с характеристиками каротиноида-фукоксантина.

Полоса поглощения 4 ( $\lambda_{\text{макс.}} 450 \text{ нм}$ , рис. 8 -в), соответствующая ТСХ-фракции 4 водорослей *Jemo* (Рис. 8 -б), как и поглощение Фк лежит в той же области спектра, но меньшей интенсивности. При этом, следует обратить внимание на интенсивную полосу поглощения ТСХ фракции 4 в УФ-области, которой нет у Фк. Дополнительно проведенные измерения люминесценции этой фракции также подтвердили вывод о том, что эта фракция принадлежит «неидентифицированному» пигменту (обсуждение в диссертации). Таким образом, культивируемые бурые водоросли (Мьянма) *Jenit* и *Jemo* являются источниками ценных культур водорослей, содержащих каротиноиды с антиокислительными свойствами, близкими фукоксантину, выделенному из микроводорослей *C.Closterium*.

**Раздел 4.2.6** Стабильность водно-спиртовых растворов монокристаллического фукоксантина при разных условиях  $\gamma$ -облучения, выделенного методом ТСХ из *C.Closterium*. Влияние дозы облучения на изменение спектров ОП водно-спиртовых растворов Фк, насыщенных различными газами, представлены на рис. 9 и в табл. 3.

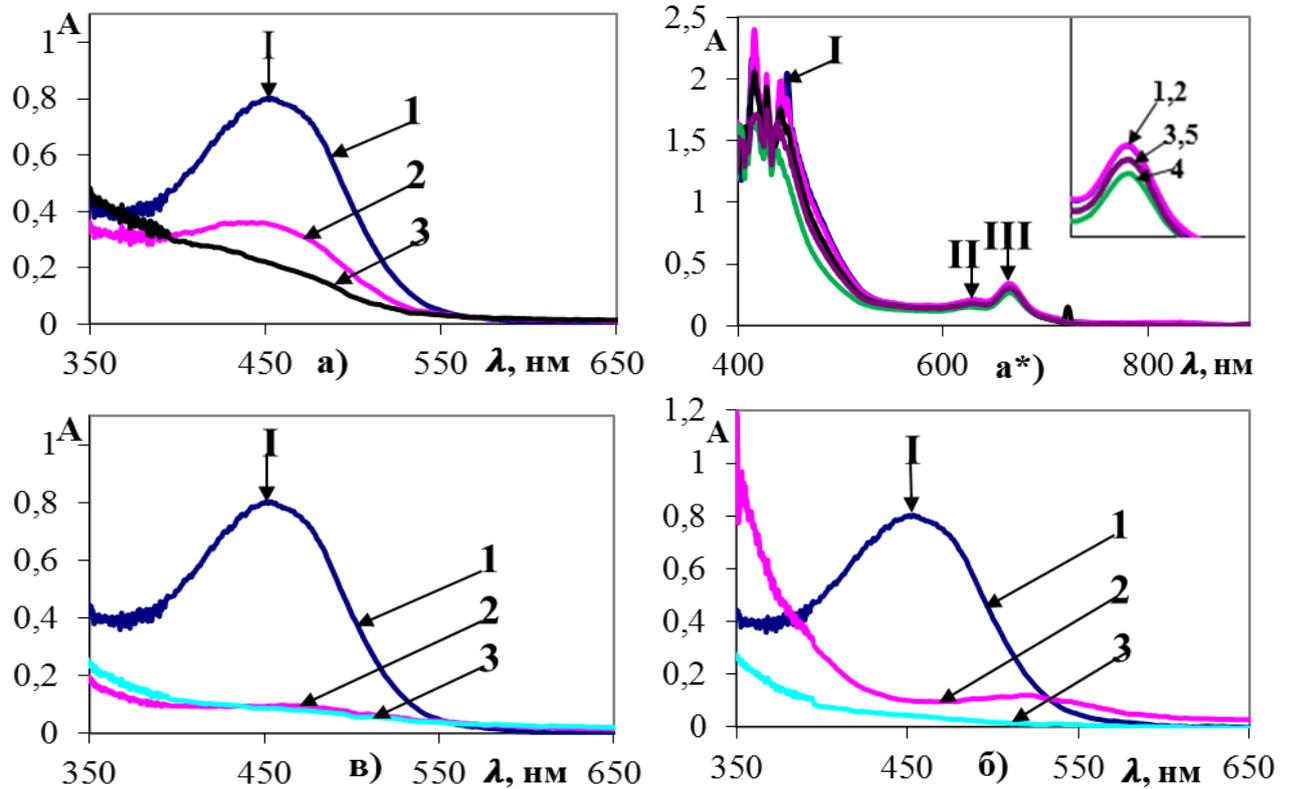


Рис. 9. Спектры оптического поглощения 50% водно-спиртового экстракта Фк в присутствии  $O_2$  -а) и а\*),  $Ar$  -б),  $N_2O$  -в): исходные образцы - 1, после облучения D, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3. Для сравнения приведен спектр рис. 7 - а\*)

Табл. 3. Изменение оптической плотности водно-спиртовых растворов Фк в зависимости от дозы облучения и природы насыщающего газа

Доза, кГр	Изменение ОП при $\lambda(I) = 452$ нм		
	$O_2$	$Ar$	$N_2O$
0	0,8	0,8	0,8
0,28	0,35 (56 %)	0,10 (88 %)	0,08 (90 %)
0,56	0,22 (73 %)	0,04 (95 %)	0,08 (90 %)

\* Изменение ОП, %, представлено в скобках

На основании значений выходов разложения кристаллического Фк в водно-спиртовых растворах (табл. 3) можно сделать вывод о более низкой стабильности каротиноида в виде индивидуального соединения по сравнению с Фк в составе каротиноидной фракции в экстракте *C.Closterium* (сравнение рис. 7 -а и рис. 9 -а).

Показано, что химические превращения Фк в водно-спиртовых растворах зависит от дозы облучения, природы насыщающего газа, вида водорослей и срока их хранения в сухом виде. Установлено, что стабильность фукоксантина (*C.Closterium*) в аэробных условиях выше, чем анаэробных за счёт регенерации пигмента, особенно в

пострадиационный период. Этот же эффект был обнаружен при изучении редокс превращений пигментов методом импульсного радиолита макрофита *Cystoseira* и методом стационарного радиолита макроводорослей *Jemo* и *Jenit*.

### Выводы

1. Методом спектрофотометрии показано, что эффективность экстракции активных соединений каротиноидной и хлорофилловой фракций из макроводорослей *Laminaria Japonica Jenit*, *Jemo* и микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* зависит от вида и природы водорослей, состава растворителей и от времени хранения в виде сухой биомассы, при этом хлорофилл в *Cylindrotheca Closterium* сохраняется лучше, чем в макроводорослях *Laminaria Japonica Jenit* и *Jemo*.

2. На основании спектрофотометрических исследований влияния разбавления экстрактов морских водорослей на оптические характеристики растворов экстрактов сделан вывод, что часть каротиноидов за счет межмолекулярных взаимодействий находится в агрегированном состоянии. В результате химических реакций в концентрированных растворах агрегаты могут разрушаться, что приведет к увеличению содержания индивидуальных молекул каротиноидов.

3. Методом спектрофотометрии показано, что соединения, извлекаемые в спиртовые экстракты из микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* и макроводорослей *Laminaria Japonica*, имеют высокую устойчивость к облучению при дозах до 20 кГр.

4. Для объяснения механизма редокс реакций каротиноидов и хлорофиллов в экстрактах водорослей использованы результаты радиационно-химического моделирования реакций пигментов в зависимости от природы насыщающего газа (He, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O) в растворах с участием промежуточных частиц с разными редокс потенциалами.

5. Установлено, что в экстрактах водорослей, насыщенных закисью азота, при радиолите усиливаются окислительные процессы с дополнительным образованием радикалов OH с высоким окислительным потенциалом. Водно-спиртовые и водно-ацетоновые экстракты каротиноидов в присутствии O<sub>2</sub> более устойчивы к облучению, ввиду присутствия каротиноидов в виде оксокомплексов с частичным переносом заряда, чем экстракты, насыщенные гелием или закисью азота.

6. Показано, что зависимость деструкции хлорофилловой фракции водорослей *Jemo-D* в водно-ацетоновых растворах, насыщенных гелием или закисью азота, имеет сложный колебательный характер при дозах < 0.3 кГр.

7. Впервые методом тонкослойной хроматографии из экстрактов макроводорослей водорослей *Jenit* и *Jemo* (Мьянма) выделен каротиноид, который по спектрам оптического поглощения и результатам люминесцентного анализа соответствует фукоксантину.

8. Обнаружено, что в водно-спиртовом растворе монокристаллический фукоксантин, выделенный методом тонкослойной хроматографии из микроводорослей *Cylindrotheca Closterium*, обладает меньшей радиационной стабильностью, чем фракция фукоксантина ( $\lambda=450-540$  нм) из водно-спиртового экстракта водорослей.

**Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:**

**Статьи в журналах, которые включены в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК:**

1. Тхан Тайк. Оптические свойства и радиационная стабильность экстрактов морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimannet Lewin / А. А. Ревина, Р. Г. Геворгиз, С. С. Лозинина, С. Н. Железнова, Тхан Тайк, Ю. С. Павлов, М. В. Нехорошев, В. И. Рябушко // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 2, С. 173-182.
2. Тхан Тайк. Сравнение радиационной стабильности хлорофилловых фракций в спиртовых и ацетоновых экстрактах водорослей *Laminaria Japonica* (Мьянмы) / Тхан Тайк, А. А. Ревина, С. С. Лозинина, Э. П. Магомедбеков // Химия растительного сырья. 2016. Т. 16. № 4, С. 89-96.

**Публикации в других научных изданиях:**

1. Тхан Тайк. Биологически активные экстракты из бурых водорослей *laminaria japonica* и их радиационная стабильность / Тхан Тайк, А. А. Ревина, С. С. Лозинина, Э. П. Магомедбеков // Сборник научных трудов Всерос. конференции «От растения к препарату: традиции и современность», посвященной 95-летию со дня рождения проф. А. И. Шретера, 23-24 апреля 2014 г, ГНУ ВИЛАР, Москва, С. 277-281.
2. Тхан Тайк. Оптические свойства ацетоновых экстрактов из бурых водорослей *laminaria japonica* и их радиационная стабильность / Тхан Тайк, А. А. Ревина, С. С. Лозинина, Э. П. Магомедбеков // Успехи в химии и химической технологии. 2014. Т. 28. № 6 (155). С. 98-100.
3. Тхан Тайк. Биологически активные экстракты из бурых водорослей *LAMINARIA JAPONICA* и их радиационная стабильность / А. А. Ревина, Тхан Тайк, С. С. Лозинина, Э. П. Магомедбеков // Материалы 2-й международной научно-практической конференции «Сопроводительная фитотерапия в онкологии», 23 мая 2015 г. М., С. 145-146.
4. Тхан Тайк. Оптические свойства биологически активных соединений из макро- и микроводорослей / С. С. Лозинина, Тхан Тайк, С. Н. Железнова, Д. В. Чекмарь, Р. Г. Геворгиз, М. В. Нехорошев, А. А. Ревина // Сборник тезисов IV Международной конференции «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела». 21 сентября – 25 сентября 2015 г. Туапсе. С. 106.