

УДК 54.06:665.12:551.464.797.9:547.979.731:665.351.3

## ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, КАРОТИНОИДОВ И ХЛОРОФИЛЛОВ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *PADINA PAVONIA*

Х.М.Канаан, Е.В.Криворучко\*, Г.Халаф\*\*, М.Муртада, А.Яссин

Ливанский университет

\* Национальный фармацевтический университет,  
61002, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53. E-mail: gnosy@ukrfakharkov.ua

\*\* Центр океанографии, Ливан

*Ключевые слова: Padina pavonia; липофильный экстракт; жирные кислоты; каротиноиды; хлорофиллы*

**Методом исчерпывающей экстракции хлороформом в аппарате Сокслета получен и исследован липофильный экстракт из слоевищ бурой водоросли *Padina pavonia*. Определены количественное содержание жирных кислот, каротиноидов и хлорофиллов, а также некоторые химические числовые показатели липофильного экстракта из *Padina pavonia*.**

### **CHEMICAL ANALYSIS OF FATTY ACIDS, CAROTENOIDS AND CHLOROPHYLLS FROM BROWN ALGAE *PADINA PAVONIA***

**H.M.Kanaan, Ye.V.Krivoruchko, G.Khalaf, M.Murtada, A.Yassine**

***Lipophilic extract from *Padina pavonia* is obtained by method of depleting extraction by chloroform in the vehicle of the Soxhlet. The quantitative contents of fatty acids, carotenoids and chlorophylls, and also chemical numeric indexes of a lipophilic extract from *Padina pavonia* have been determined.***

### **ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЖИРНИХ КИСЛОТ, КАРОТИНОЇДІВ І ХЛОРОФІЛІВ БУРОЇ ВОДОРОСТІ *PADINA PAVONIA***

**Х.М.Канаан, О.В.Криворучко, Г.Халаф, М.Муртада, А.Яссін**

***Методом вичерпної екстракції хлороформом у апараті Сокслета отриманий і досліджений ліпофільний екстракт із сланів бурої водорості *Padina pavonia*. Визначені кількісний вміст жирних кислот, каротиноїдів і хлорофілів, а також деякі хімічні числові показники ліпофільного екстракту з *Padina pavonia*.***

В последние годы в научной литературе можно встретить много публикаций, касающихся изучения морских водорослей. Этот интерес обусловлен прежде всего значительным содержанием в них биологически активных веществ (БАВ), широким спектром фармакологической активности и большим запасом сырья в Мировом океане. Водоросли (Algae) — это древнейшая фотосинтезирующая группа низших растений, содержащая около 30000 видов, причем человеком используется только около 200 видов. Ежегодная продукция водорослей только в Европе составляет 5,4 млн т на сумму 4,9 млрд долларов США. 56% их продукции приходится на бурые водоросли, 24,9% — на красные, 0,3% — на зеленые и 18,8% — на представителей других систематических отделов. К отделу бурых водорослей (Phaeophyta) относятся многочисленные, преимущественно макроскопические водоросли, общим внешним признаком которых служит желтовато-бурая окраска их слоевищ, вызванная наличием у них большого количества желтых и бурых пигментов. Хлоропласты клеток бурых водорослей содержат хлорофиллы а

и с, β- и ε-каротин, ксантофиллы: фукоксантин, виолаксантин, антраксантин, зеаксантин и др. Бурые водоросли — исключительно многоклеточные растения, в настоящее время известно около 240 родов и 1500 видов этого отдела. Наиболее изучены представители родов Ламинария, Фукус, Цистозейра, Аскофиллум, Агарум, Саргассум и др. Из бурых водорослей получают йод, маннит, соли альгиновой кислоты, производят липидно-пигментные концентраты, спиртовые и другие экстракты [1-5].

Авторами проводятся фармакогностические исследования слоевищ бурых морских водорослей фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.) семейства фукусовых (Fucaceae) и падины павлиньей (*Padina pavonia* (L.) Gaill.) семейства диктиотовых (Dictyotaceae) [6-8]. Падина павлинья — кустистый однолетник высотой до 20 см с веерообразным (напоминает хвост павлина, отсюда и видовое название), бахромчатым по краю, плоским с несколькими вертикальными разрывами слоевищем, которое внизу суживается и переходит в небольшой стебелек, прикрепляющийся с помо-

щью дисковидной подошвы к камням. На поверхности слоевища четко видны многочисленные полуконцентрические палево-бурые волосистые полосы. Внутри слоевище образовано 3-4 слоями бесцветных клеток, окруженных снаружи одним рядом мелких интенсивно окрашенных клеток. Верхний край слоевища закручен внутрь и несет один ряд активно делящихся клеток. На талломе, особенно с нижней стороны, часто откладывается известь в виде беловатого налета. Распространена падина павлинья у берегов Южной Европы и у атлантических берегов Центральной Америки. В верхней сублиторали Черного моря она плотно прирастает к скальным поверхностям, одевая их в необычные струящиеся драпировки. Падина обитает только на естественных субстратах и никогда не переселяется на близ расположенные искусственные вертикальные поверхности — бетонные плиты и железные конструкции молов. В районе Карадага на глубине 0,5 м продуктивность падины павлиньей составляет 828,5 г/м<sup>2</sup>. В штормовых выбросах она представлена в минимальном количестве и не подлежит промышленному использованию. В Средиземном море возможны промышленные заготовки сырья [2, 9, 10].

Слоевища падины павлиньей содержат различные группы БАВ: полисахариды, липиды, полифенолы, пигменты, макро- и микроэлементы, ферменты [9-15]. Целью нашей работы было выделение из сырья липофильного экстракта, изучение его некоторых химических числовых показателей, определение количественного содержания жирных кислот, каротиноидов и хлорофиллов. Из литературных источников известно, что в составе липидов бурых водорослей преобладают триглицериды жирных кислот — от 50 до 72,5%. Основную массу их составляют полиненасыщенные кислоты C<sub>18</sub> и C<sub>20</sub> ω-3 и ω-6 типа. ω-3 полиненасыщенные жирные кислоты рыбьего жира и других морепродуктов тормозят канцерогенез, опухолевый рост и метастазирование, способны нормализовать липидный обмен и вызывать антиатеросклеротический эффект, обладают гепатопротекторной активностью. Недостаток в пище ненасыщенных высших жирных кислот вызывает снижение иммунитета, поражения кожи, изменения митохондрий печени и др. Водорослевые стеринны можно использовать для получения витамина Д, в качестве эмульсионных основ. Фукостерин и саргостерол существенно снижают повышенную концентрацию холестерина в плазме крови экспериментальных животных [1, 3, 11, 16, 17].

В результате хроматографического анализа в слоевищах падины павлиньей было обнаружено 14 пигментов: хлорофилл c<sub>1</sub>, хлорофилл c<sub>2</sub>, фукоксантин, виолаксантин, флавоксантин, фукоксантол, антраксантин, 9-цис-неоксантин, диатоксантин, зеаксантин, хлорофилл a, хлорофилл a, β-каротин и феофитин a [12]. Хлорофилл — пигмент растений, с помощью которого осуществляется про-

цесс фотосинтеза. Известны общетонизирующие и биостимулирующие свойства хлорофилла. Его производные стимулируют регенерацию тканей, обладают противовоспалительной, противовирусной, бактерицидной, противовоспалительной, ранозаживляющей, антиоксидантной активностью. Каротиноиды регулируют процессы обмена веществ, проявляют эпителизирующее, противовоспалительное, анальгезирующее, иммуномодулирующее и канцеропротекторное действие. Сырье, содержащее каротиноиды, назначают при гипо- и авитаминозе А, для лечения заболеваний глаз, кожи, верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта.

В процессе исследования биологических свойств падины павлиньей было обнаружено, что ее поверхность покрыта специальной пленкой, представляющей собой вещество, близкое по составу к глюкозаминогликанам. Такая структура сравнима со структурой поверхностного слоя кожи человека. Механизм действия этой водоросли состоит в том, что она распознается фибробластами кожи человека, и те увеличивают синтез глюкозаминогликанов, важнейшим из которых является гиалуроновая кислота. Чем их больше, тем кожа плотнее и лучше защищена от свободных радикалов и окружающей среды. Поэтому косметические продукты с содержанием экстрактов *Padina pavonia* могут считаться высокоэффективными средствами, препятствующими процессу старения кожи [18, 19]. Косметические фирмы LANCOME, Oriflame, Albam Muller, Lierac, “Счастье жизни” и другие выпускают такие средства.

Для получения липофильного экстракта нами в июле 2007 года в прибрежной полосе Средиземного моря возле г. Тир (Ливан) были заготовлены слоевища падины павлиньей. Высушенное и измельченное сырье исчерпывающе экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета и упаривали до полного удаления экстрагента. Выход липофильных веществ составил 2,7%. Полученный липофильный экстракт представляет собой однородную темно-зеленую массу со специфическим запахом; практически нерастворим в воде, легко растворим в спирто-эфирной смеси (1:1), умеренно растворим в гексане, ацетоне, хлороформе. Нами определены некоторые химические числовые показатели липофильного экстракта. Так, кислотное число составляет 2,4, число омыления — 204,7, эфирное число — 202,3.

Так как значительную часть растительного липофильного экстракта составляют жирные кислоты, было проведено их количественное определение. Как видно из результатов исследования (табл., рис. 1), в экстракте слоевищ падины павлиньей определено 11 жирных кислот: 4 насыщенные (миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, арахидиновая) и 7 ненасыщенных (пальмитолеиновая и ее изомер, олеиновая, вакценовая, линолевая, γ-линоленовая, эйкозадиеновая), из них преобла-

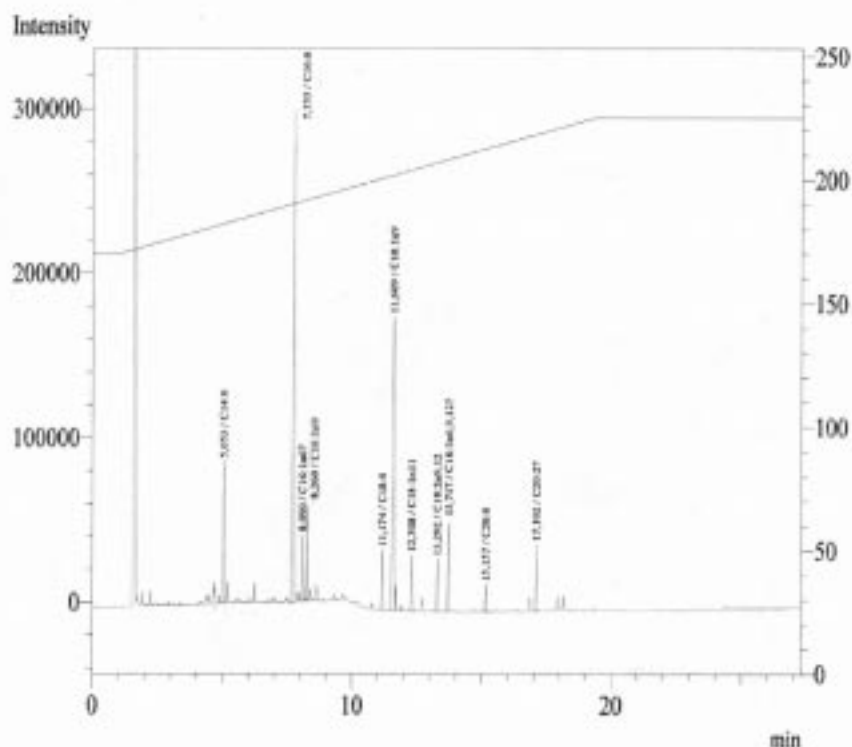


Рис. 1. Хроматограмма жирнокислотного состава липофильного экстракта слоевищ *Padina pavonia*.

дают пальмитиновая (39,47%) и олеиновая (23,98%) кислоты. В наименьшем количестве содержится арахидовая кислота (1,68%). Незаменимыми являются линолевая и линоленовая кислоты.

Дальнейшее исследование химического состава липофильного экстракта падины павлиньей проводили под руководством к. хим. н., ст. научн. сотр. НИИ химии Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина А.Д.Рошала методом трехмерной сканирующей спектрофлуориметрии (рис. 2). Данный метод позволяет сделать выводы о качественном составе исследуемого

объекта. Так, для него характерны пики в областях  $\lambda_{exc}=250-310$  нм и  $\lambda_{em}=350-380$  нм, которые предположительно можно отнести к излучению простых ароматических соединений и некоторых липидов. Серия пиков в области возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{exc}$ ) от 280 до 700 нм и излучение ( $\lambda_{em}$ ) от 660 до 730 нм — характерна для хлорофиллов. В спектре также наблюдается группа пиков в области  $\lambda_{exc}=320-400$  нм и  $\lambda_{em}=450-500$  нм, что возможно для излучения агликонов флавоноидов.

На рис. 3 приведен спектр поглощения суммы каротиноидов в липофильном экстракте падины в видимой части спектра. В результате исследования установлено, что содержание каротиноидов в липофильном экстракте падины в пересчете на  $\beta$ -каротин составляет 420,42 мг/г, содержание хлорофиллов — 435,71 мг/г.

#### Экспериментальная часть

Химические числовые показатели липофильного экстракта (кислотное число, число омыления, эфирное число) определяли по фармакопейной методике [20].

Для количественного определения жирных кислот [6, 21] 0,05 г липофильного экстракта падины помещали в колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 0,5 мл эфира, 5 мл метанола, 0,5 мл ацетилхлорида и перемешивали. Колбу с полученной смесью присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 65-70°C в течение 20 мин. Затем раствор выпаривали в токе инертного газа до остаточного объема

#### Таблица

Жирнокислотный состав липофильного экстракта слоевищ *Padina pavonia*

Название жирной кислоты	Общая формула	Содержание, % от суммы
Миристиновая	C <sub>14:0</sub>	6,21
Пальмитиновая	C <sub>16:0</sub>	39,47
Пальмитолеиновая (изомер)	C <sub>16:1</sub> <sup>6</sup>	3,65
Пальмитолеиновая	C <sub>16:1</sub> <sup>9</sup>	4,71
Стеариновая	C <sub>18:0</sub>	3,74
Олеиновая	C <sub>18:1</sub> <sup>9</sup>	23,98
Вакценовая	C <sub>18:1</sub> <sup>11</sup>	3,31
Линолевая	C <sub>18:2</sub> <sup>9,12</sup>	3,23
$\gamma$ -Линоленовая	C <sub>18:3</sub> <sup>6,9,12</sup>	5,61
Арахидовая	C <sub>20:0</sub>	1,68
Эйкозодиеновая	C <sub>20:2</sub>	4,41

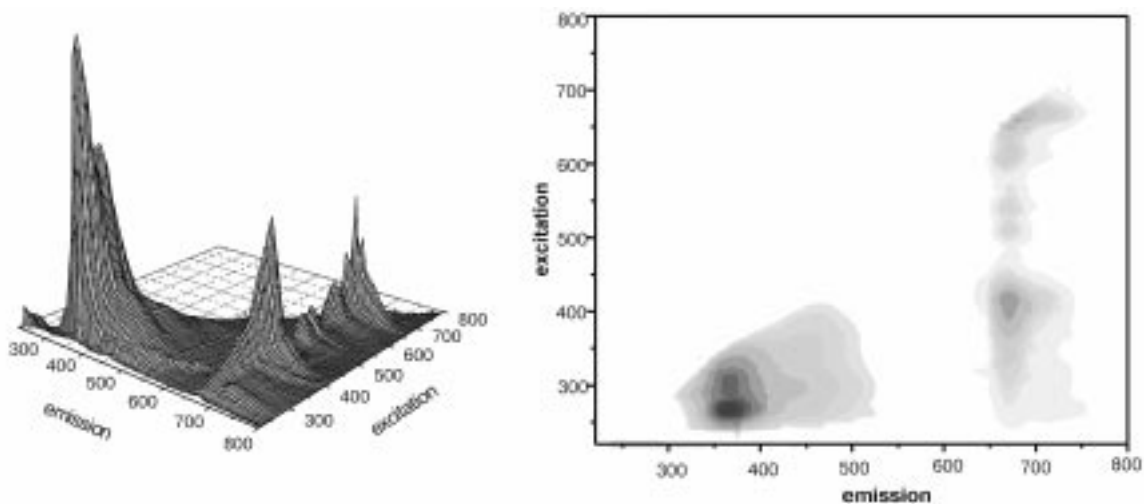


Рис. 2. Трехмерный спектр флуоресценции липофильного экстракта слоевищ *Padina pavonia* и его проекция на плоскость { $\lambda_{exc}$ ,  $\lambda_{em}$ }.

около 0,5 мл, охлаждали до комнатной температуры, прибавляли 2 мл циклогексана, 1 мл воды, взбалтывали в течение 1 мин и выдерживали до полного разделения слоев. Верхний циклогексановый слой отделяли и фильтровали через 0,2 г натрия сульфата безводного. Полученный раствор метиловых эфиров жирных кислот хроматографировали на хроматографе Shimadzu GC-14B в следующих условиях:

- колонка капиллярная кварцевая размером 0,32 мм x 60 м с неподвижной фазой 50% цианопропилметилсилоксан, толщина слоя — 0,25 мкм;
- температуру колонки программировали: температуру 175°C выдерживали в течение 2 мин, затем повышали ее со скоростью 3° C/мин до 225°C и выдерживали в течение 15 мин;
- температура испарителя — 240°C;
- температура пламенно-ионизационного детектора — 250°C;

- скорость газа-носителя (водорода) — 1,0 мл/мин; деление потока 1: 70.

Содержание жирной кислоты в образцах в процентах от суммарного содержания жирных кислот вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_i \cdot 100}{\sum S_i},$$

где:  $S_i$  — среднее значение площади пика метилового эфира жирной кислоты, вычисленное из хроматограмм испытываемого раствора;  $\sum S_i$  — среднее значение суммарной площади пиков метиловых эфиров жирных кислот, вычисленное из хроматограмм испытываемого раствора.

Метод трехмерной сканирующей спектродиффузиометрии (3DF-спектроскопии) используют для анализа смесей, которые содержат флуоресцирующие компоненты. 3DF-спектры в виде “поверхности”, которая характеризуется функцией  $I=f(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ , регистрировали в УФ и видимом

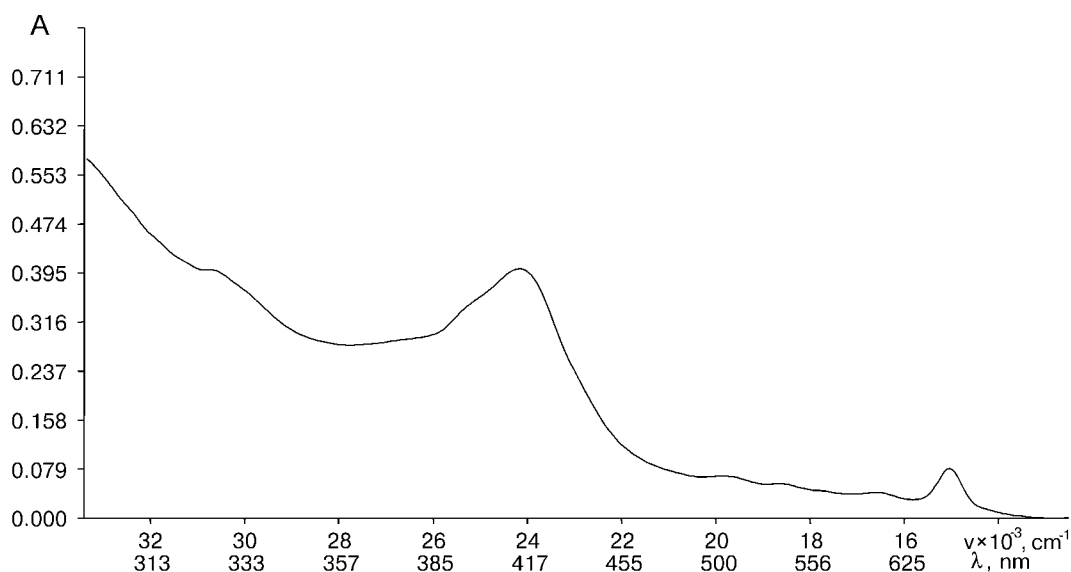


Рис. 3. Спектр поглощения суммы каротиноидов в липофильном экстракте слоевищ *Padina pavonia*.

диапазонах с помощью спектрофлуориметра Hitachi F4010. Измерения проводили в диапазонах возбуждения ( $\lambda_{exc}$ ) и излучения ( $\lambda_{em}$ ) от 220 до 800 нм с шагом сканирования 10 нм. Дальнейшую обработку записей с построением трехмерных графиков проводили с помощью программного пакета Spectra Data Lab, разработанного в НИИ химии ХНУ [22, 23].

Определение количественного содержания каротиноидов и хлорофиллов в липофильном экстракте проводили на спектрофотометре Hitachi U3210 по известным методикам [22].

#### Выводы

1. Из слоевищ падины павлиньей методом испаряющей экстракции хлороформом в аппа-

рате Сокслета получен липофильный экстракт, выход которого составил 2,7%.

2. Установлены некоторые химические числовые показатели липофильного экстракта: кислотное число — 2,4, число омыления — 204,7, эфирное число — 202,3.

3. Проведено исследование жирнокислотного состава липофильного экстракта падины павлиньей. Преобладают в экстракте пальмитиновая (39,47%) и олеиновая (23,98%) кислоты.

4. Определено количественное содержание каротиноидов и хлорофиллов в липофильном экстракте падины павлиньей. Оно составляет 420,42 мг/г и 435,71 мг/г соответственно.

5. Полученные экспериментальные данные будут использованы для дальнейшей стандартизации сырья.

#### Литература

1. Аразашвили А.И. Биологически активные вещества и другие природные соединения морских водорослей. — Тбилиси: Мицниереба, 1980. — 336 с.
2. Водоросли, лишайники и мохообразные СССР / Отв. ред. М.В. Горленко. — М.: Мысль, 1978. — 365 с.
3. Гурин И.С., Ажгихин И.С. Биологически активные вещества гидробионтов — источник новых лекарств и препаратов. — М.: Наука, 1981. — 186 с.
4. Озерова В.М. Водоросли: здоровье из морских глубин. — С.Пб.: ИГ "Весь", 2005. — 64 с.
5. Marine bioprocess engineering. Proceedings of International Symposium. — Noordwijkerhout, Netherlands, 1998. — 84 p.
6. Канаан Х.М., Криворучко О.В., Маклауф Х.Я. // Вісник фармації. — 2003. — №4 (36). — С. 60-63.
7. Канаан Н., Криворучко Е.В., Makhlof H. et al. // Arab J. of Pharmac. Sci. — 2005. — Vol. 2, №10. — P. 21-28.
8. Канаан Н.М., Криворучко О.В., Makhlof H.Y., Yassine A. // Arab J. of Pharmac. Sci. — 2004. — Vol. 2, №9. — P. 85-92.
9. Пименова М.Е., Шелепова О.В., Костенко Н.С. и др. // Растит. ресурсы. — 2004. — Т. 40, №1. — С. 3-17.
10. Campanella L., Conti M.E., Cubadda F., Sucapane C. // Environ. Pollut. — 2001. — Vol. 111, №1. — P. 117-126.
11. Mohammad I. Wahbeh. // Aquaculture. — 1997. — Vol. 159, №1-2. — P. 101-109.
12. Hegazi M.M., Perez-Ruzafa A., Almela L., Candela M.-E. // J. Chromatogr. — 1998. — Vol. 829. — P. 153-159.
13. Fouad A., Abdel-Fattah, Edrees M. // Phytochemistry. — 1977. — Vol. 16, №7. — P. 939-941.
14. Magdel-Din Hussein M., Abdel-Aziz A., Mohamed Salem H. // Phytochemistry. — 1980. — Vol. 19, №10. — P. 2131-2132.
15. Parveen A., Viqar S. // Res. Zool. Surv. Pakistan. — 2002. — №14. — P. 1-4.
16. De Vries C.E., Van Norden C.J. // Anticancer Res. — 1992. — Vol. 12. — P. 1513-1522.
17. Ktari L., Guyot M. // J. Appl. Phycol. — 1999. — Vol. 11, №6. — P. 511-513.
18. Симонова Л., Пашук Л. // Les Nouvelles Esthetiques. — 2001. — №4.
19. Pat. WO/2007/085946 / Grimaud J.-A.
20. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Х.: ПІРЕГ, 2001. — 556 с.
21. Демьяненко В.Г., Бодри Хамам Салих, Зинченко А.А. // Фармаком. — 2004. — №2. — С. 1-6.
22. Параніч В.А., Дорошенко А.О., Рошаль О.Д. та ін. // Фармац. журн. — 2000. — №5. — С. 86-90.
23. Кисличенко В.С., Рошаль О.Д., Болоховець Г.С. // ЖОФХ. — 2004. — Т. 2, вып. 3 (7). — С. 58-61.

Надійшла до редакції 27.03.2008 р.