

УДК 543.544

О. В. Стасевич, кандидат химических наук, доцент (БГТУ);
Е. С. Лихтарович, инженер (БГТУ); **С. Н. Шемет**, студент (БГТУ)

АНАЛИЗ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТЕНИЯХ, СОДЕРЖАЩИХ ФЕНИЛПРОПАНОИДЫ

В данной работе был осуществлен качественный и количественный анализ феруловой кислоты в растениях, произрастающих в Республике Беларусь. С помощью метода ВЭЖХ было определено, что наибольшее содержание феруловой кислоты присутствует в коже корнеплода свеклы (147,34 мг / 100 г сухого материала). Среди сортов свеклы белорусской селекции был выявлен сорт «Прыгажуня» с максимальным содержанием феруловой кислоты в коже корнеплода (391,96 мг / 100 г сухого материала), он может быть использован в качестве сырья для выделения феруловой кислоты в препаративных количествах.

In this work the qualitative and quantitative chromatographic analysis of ferulic acid in plants, cultivated in the Republic of Belarus have been carried out. The most amounts of ferulic acid have been found by HPLC method in beetroot peel (147.34 mg/100 g dry material). It have been found that the kind of beetroot “Prygazhunjа” contains the most amounts of ferulic acid, it could be used as raw material for isolation of ferulic acid in preparative amounts.

Введение. Интерес к фенилпропаноидам как к основе для создания препаратов, обладающих лечебным действием, непрерывно возрастает. В связи с этим изучение содержания растительных объектов с целью определения наиболее богатого источника фенилпропаноидов, произрастающих на территории Республики Беларусь, представляет важную задачу.

Одним из представителей простых фенилпропаноидов является феруловая кислота (ФК), 3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-пропеоновая кислота. Она является биодоступной и обладает рядом терапевтических свойств: противовоспалительными, антидиабетическими, противораковыми, гепатопротекторными, антиатеросклеротическими.

По данным исследователей указанные свойства обуславливаются в основном антиоксидантными свойствами, что хорошо видно из структуры соединения (рис. 1) [1].

Механизм антиоксидантного действия феруловой кислоты осуществляется через взаимодействие гидроксильной группы со свободными органическими радикалами или активными формами кислорода, образованием стабильного

феноксильного радикала и обрывом цепи путем образования комплексов со свободными радикалами, а также димеров феруловой кислоты (куркуминов). Необходимо отметить, что за счет стабилизации свободного радикала феруловая кислота не может инициировать цепь, а значит – проявлять прооксидантный эффект и с этой точки зрения имеет преимущества перед некоторыми традиционно известными антиоксидантами, например, аскорбиновой кислотой [2].

Феруловая кислота была обнаружена в ряде растений: рис (0,9%), пшеница (0,66%), ячмень (0,14%), citrusовых фруктах, овощах, ягодах. В отрубях кукурузы ее содержание достигает 3,1% в пересчете на сухой материал [1, 3].

Феруловая кислота в растениях на 70% присутствует в виде *транс*-изомера [1].

Основная часть. Цель данной работы – определение качественного и количественного содержания феруловой кислоты в растениях, произрастающих на территории Республики Беларусь, и выбор наиболее богатого сырьевого источника для дальнейшего ее выделения из растительного материала.

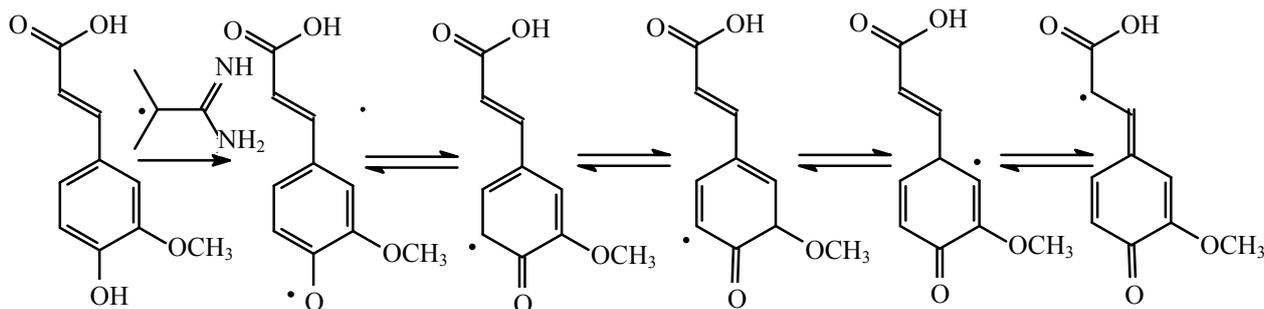


Рис. 1. Структурные формулы феруловой кислоты и резонансные формы ее феноксильного радикала

Для этого были проанализированы высушенные травы эхинацеи, ромашки, мяты, фиалки, крапивы (приобретены в аптеках г. Минска), семена льна сорта «Солнечный» (ЦБС НАНБ), семена кукурузы и фасоли, корнеплоды картофеля, свеклы, моркови сорта «Рига» (приобретены в розничной сети г. Минска), а также сорта свеклы белорусской селекции «Веста», «Гаспадыня», «Прыгажуня» урожая 2013 г., выращенные в РУП «Институт овощеводства».

Качественную и количественную оценку феруловой кислоты в указанных растениях производили методом тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии соответственно. Для этого осуществляли предварительное выделение этого вещества из растительных объектов. Высушенный материал (2 г) подвергали гидролизу и экстракции этилацетатом, затем отделяли экстракт от биомассы и концентрировали его при пониженном давлении и температуре не превышающей 60°C.

Перед осуществлением экстракции проводили щелочной гидролиз с применением 4 М раствора NaOH (50 мл) в течение 24 ч с последующим кислотным гидролизом (pH < 2, HCl). Комбинирование двух видов гидролиза обеспечивает полное высвобождение феруловой кислоты из соолигомерного состояния, в котором она присутствует в растении, связанная с полисахаридами, в основном арабинозой, и лигнинами (рис. 2).

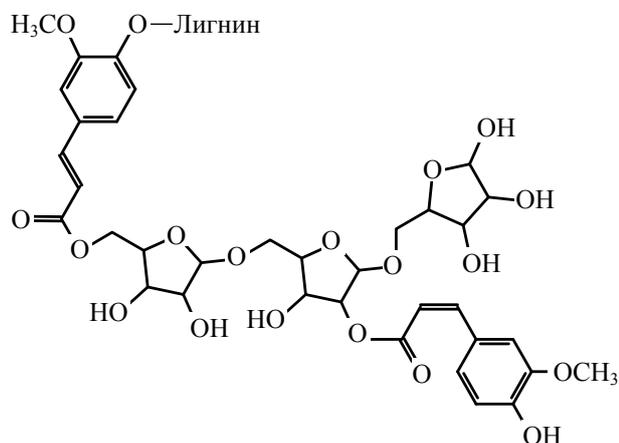


Рис. 2. Структура соолигомера феруловой кислоты и арабинозы

Щелочная обработка по существу обеспечивает гидролитическое расщепление сложноэфирных связей, а кислотная – расщепление простых эфирных связей [4].

Концентрированные экстракты растворяли и подвергали ТСХ анализу. Для этого был осуществлен подбор элюирующей системы. В качестве неподвижной фазы служили силикагелевые пластины Kieselgel 60 F254 (Merck, США). Детектирование веществ на пластинах осуще-

ствляли при облучении УФ-светом при 254 и 365 нм, а также в видимом свете после обработки парами йода и 2%-ным раствором FeCl₃ в метаноле. Идентификацию феруловой кислоты осуществляли путем сравнения окраски пятна и показателя R_f в соответствующей элюирующей системе с окраской и показателем стандартного образца феруловой кислоты (Sigma, США). Результаты подбора элюирующей системы и R_f значения для феруловой кислоты в различных условиях представлены в табл. 1.

Таблица 1

Значения R_f для феруловой кислоты в различных элюирующих системах

Соотношение растворителей, % об.	R_f	Окраска пятна при УФ-облучении
А. Этилацетат : уксусная кислота : вода (3 : 1 : 1)	0,95	Синяя
Б. Толуол : уксусная кислота : вода (8 : 2 : 1)	0,36	Сине-фиолетовая
В. Толуол : этилацетат : муравьиная кислота : вода (10 : 100 : 100 : 10)	0,80	Сине-фиолетовая
Г. Вода – пропанол-2 – 25%-ный водный раствор аммиака (1 : 8 : 1)	0,5	Ярко голубовато-фиолетовая

Как видно из табл. 1, в системах А, В происходило забрасывание вещества к линии фронта, а в системе Б – феруловая кислота поднималась незначительно от линии старта. Как указано в источнике [5], разрешающая способность системы растворителей максимальна в области, где $R_f = 0,5$ и уменьшается как в сторону старта, так и в сторону фронта. В связи с этим для проведения хроматографического разделения данной смеси веществ следует пользоваться такой системой растворителей, в которой зона интересующего компонента располагалась бы вблизи линии с $R_f = 0,5$. Таким образом, оптимальной системой для проведения ТСХ анализа экстрактов, содержащих феруловую кислоту, являлась смесь Г.

В результате ТСХ анализа было выявлено, что в травах ромашки, крапивы, мяты, фиалки, эхинацеи и в семенах льна, фасоли феруловая кислота обнаруживается в следовых количествах.

Экстракты семян кукурузы, корнеплодов моркови, картофеля и свеклы, где обнаруживалось явное присутствие феруловой кислоты, подвергали ВЭЖХ анализу на хроматографе Shimadzu с УФ-детектором при длине волны 320 нм. В качестве неподвижной фазы использовали колонку с силикагелем (5 мкм), связанным с октадецилсиланом, Symmetry C18 (250×4,6 мм).

Элюирование осуществляли смесью ацетонитрила и бидистиллированной воды (20 : 80), подкисленной муравьиной кислотой до pH = 2,45, в изократическом режиме при комнатной температуре со скоростью потока элюента 0,5 мл/мин [6].

Идентификацию феруловой кислоты на хроматограмме экстрактов осуществляли по времени удержания феруловой кислоты, которое совпадало со временем удержания стандартного образца и составляло 21,88 мин (рис. 2). Количественное определение соединения в экстрактах осуществляли методом калибровочного графика, построенного по стандартным растворам феруловой кислоты ($y = 123\,814x + 12\,670 + 782$, $R^2 = 0,92$).

Содержание феруловой кислоты в экстрактах анализируемых растений представлено в табл. 2.

Как видно, наибольшее количество феруловой кислоты содержится в свекле, при этом содержание в кожуре корнеплода превышает содержание в мякоти почти в 3 раза.

Эти данные хорошо согласуются с результатами работы [9], где исследовалось общее количество фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту (GAE). По данным источника [9] наименьшее количество фенольных соединений содержалось в надземной части свеклы (4,2 мг/г сухого материала), в мякоти корнеплода содер-

жание составляло 11,4 мг/г сухого материала, а наибольшее количество фенольных соединений присутствовало в кожуре корнеплодов свеклы (15,5 мг/г сухого материала).

Таблица 2

Результаты количественного определения феруловой кислоты в анализируемых растениях

Растительный материал	Содержание, мг /100 г сухого материала	Содержание ФК по литературным данным
Семена кукурузы	48,79	3,1% мас. в расчете на сухой материал [3]
Корнеплод моркови	43,18	1,5 мг / 100 г сухого материала [7]
Корнеплод картофеля (кожура)	8,36	0,6 мг / 100 г влажного материала [8]
Корнеплод свеклы	50,16	25 мг / 100 г сухого материала [7]; 9,9 мг / 100 г влажного материала [8]; 0,8% мас. в расчете на сухой материал [1]
Корнеплод свеклы (кожура)	147,34	

Такое распределение фенольных соединений, в том числе феруловой кислоты, в различных органах растения может быть связано с физиологической защитной функцией вещества для растения, так как феруловая кислота обладает антимикробным действием.

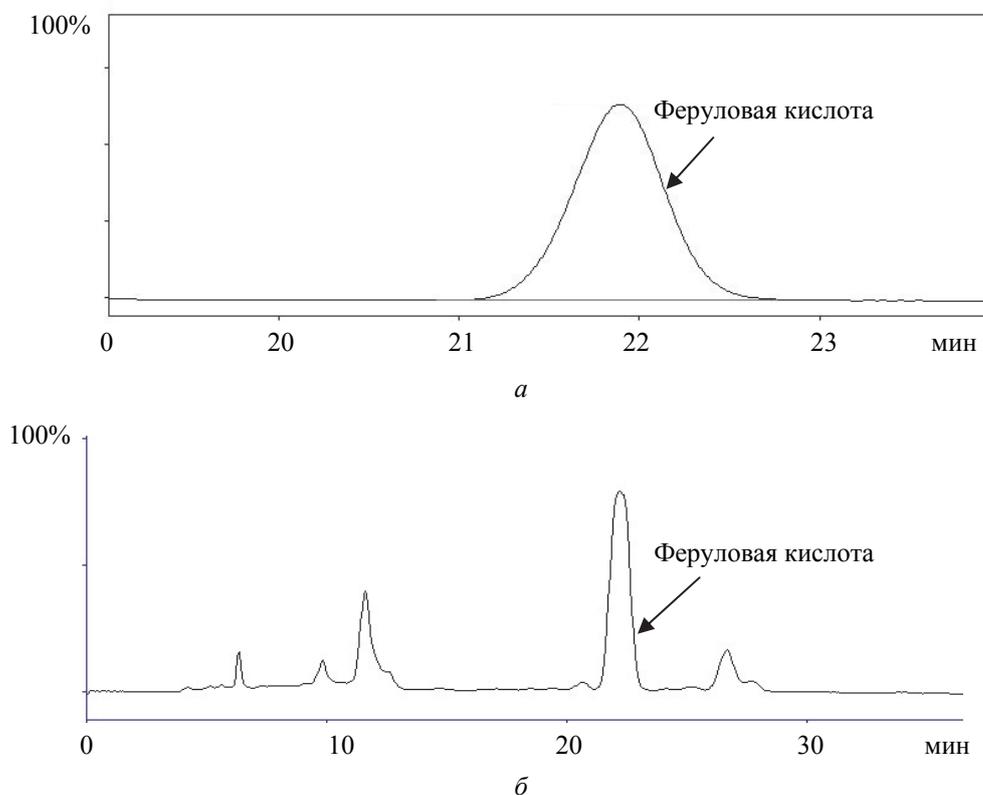


Рис. 3. Типичная ВЭЖХ хроматограмма стандартного образца феруловой кислоты (Sigma, США) (а) и экстракта (б)

Разногласие с литературными данными по содержанию феруловой кислоты может быть объяснено различием сортов растений, условиями культивирования, разнообразием в представлении данных по содержанию (в пересчете на сухой или влажный материал), а также тем, что в некоторых случаях в качестве объектов для анализа выступали не полностью органы растений (семена, корнеплод) – а их отдельные части (отруби, кожура корнеплода).

В связи с полученными данными было проанализировано количественное содержание феруловой кислоты в кожуре свеклы сортов белорусской селекции, результаты определения представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты определения феруловой кислоты в кожуре свеклы сортов белорусской селекции

Наименование сорта	Содержание ФК, мг / 100 г сухого материала
Веста	374,88
Гаспадыня	335,00
Прыгажуня	391,96

Как видно из табл. 3, максимальное содержание феруловой кислоты присутствует в сорте «Прыгажуня», поэтому его можно использовать в качестве исходного сырья для выделения феруловой кислоты и создания на ее основе лекарственных средств.

Заключение. Таким образом, был осуществлен подбор оптимальных условий для проведения качественного ТСХ анализа, а также количественное определение феруловой кислоты в объектах, произрастающих в Республике Беларусь, методом ВЭЖХ. Определено, что оптимальным сырьем для выделения феруловой кислоты является кожура корнеплода свеклы. Среди сортов белорусской селекции наиболее богатым феруловой кислотой является сорт «Прыгажуня», именно он может быть использован для выделения феруловой кислоты в препа-

ративных количествах для дальнейшего создания на ее основе лекарственных препаратов.

Литература

1. Mathew S., Abraham T. E. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2004. Vol. 24, No. 2/3. P. 59–83.

2. Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid // *Free Radical Biology & Medicine*. 1992. Vol. 13. P. 435–448.

3. Saulnier L., Vigouroux L., Thibault J. F. Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran // *Carbohydr. Res.* 1995. Vol. 272. P. 241–253.

4. Днепровский А. С., Темникова Т. И. Теоретические основы органической химии: учеб. пособие для вузов. Л.: Химия, 1979. 525 с.

5. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир, 1980. Ч. 2. 621 с.

6. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: it's improved extraction and purification / A. Tilay [a. o.] // *Agricultural and food chemistry*. 2008. No. 56. P. 7644–7648.

7. Mattila P., Hellstrom J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007. No. 20. P. 152–160.

8. Heimann W., Herrmann K., Feucht G. Presence of hydroxycinnamic acids in vegetables. II. Concentration of hydroxycinnamic acids in various vegetables // *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und – Forschung*. 1971. Vol. 145. S. 20–26.

9. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds / T. S. Kujala [a. o.] // *J. Agric. Food Chem.* 2000. Vol. 48. P. 5338–5342.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (договор № Б13-112).

Поступила 24.02.2014