УДК 543.63:581.141/.142

Шемет С.Н., Брушко Н.В., Стасевич О.В.

РАЗРАБОТКА ПРОЕКТА ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТА ВЫДЕЛЕНИЯ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КОЖУРЫ КОРНЕПЛОДОВ СВЕКЛЫ

Белорусский государственный технологический университет, Минск

С увеличением масштабов и силы негативного воздействия промышленных и техногенных факторов на окружающую среду и здоровье человека становится все более актуальной проблема поиска биологически активных природных соединений, предотвращающих целый ряд заболеваний. Ассортимент фармацевтических предприятий концерна «Белбиофарм» включает 482 наименования лекарственных средств, из которых 129 (26 %) производится на основе отечественных фармацевтических субстанций. Остальные 74 % производят с использованием импортных аналогов. С целью расширения ассортимента производства лекарственных препаратов на основе отечественных фармацевтических субстанций в Республике Беларусь была разработана Государственная программа по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарственных и диагностических средств на 2010–2014 гг. [1]. Таким образом, исходя из всего вышесказанного, поиск собственных ресурсов для производства фармацевтических субстанций представляется особенно актуальным.

На сегодняшний день значительный интерес с точки зрения биологической активности вызывает феруловая кислота, содержащаяся в некоторых растениях, произрастающих в Республике Беларусь. Она проявляет мощную антиоксидантную активность, выраженный антибактериальный и противовирусный эффект, а также обладает противоопухолевыми и кардиопротекторными свойствами, таким образом, на ее основе возможно создание лекарственных средств и профилактических препаратов. В ранее проведенных исследованиях феруловая кислота была обнаружена в наибольших количествах в кожуре корнеплодов свеклы [2].

Цель данной работы — подбор оптимальных условий выделения феруловой кислоты из кожуры корнеплодов свеклы и последующая разработка лабораторного регламента.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования выступала свекла сорта белорусской селекции «Веста» с содержанием в ней феруловой кислоты 374,88 мг /100 г сухого материала урожая 2013 г., выращенная в РУП «Институт овощеводства». В работе использовали стандарт феруловой кислоты (Sigma, США). Получение феруловой кислоты из кожуры корнеплодов свеклы включало в себя ее экстракционное выделение и последующую очистку с помощью гель-хроматографии.

Экстракционное выделение феруловой кислоты. Сушка измельченного сырья проводилась в сушильном шкафу при температуре 40 °С в течение 12 часов.

Высушенный измельченный материал (2 г) подвергали гидролизу обработкой 4М раствором NaOH (50 см3) в течение 24 ч при комнатной температуре с последующим кислотным (pH < 2, HCl) гидролизом в течение 3 ч, центрифугировали, подщелачивали до pH = 3–4. Экстрагирование ФК из надосадочной жидкости осуществляли этилацетатом (однократно, 40 $см^3$).

Все образцы упаривали при пониженном давлении и температуре, не превышающей 60 °С.

Разделение экстракта феруловой кислоты с помощью гель-хроматографии. Для разделения компонентов экстракта, полученного из кожуры корнеплодов свеклы, использовался сорбент Sephadex-LH20. В качестве элюирующих систем применяли 50 % водный раствор этанола.

Высушенный экстракт растворяли в 2 $см^3$ водного раствора 50 % этанола и вносили в предварительно уравновешенную соответствующим растворителем колонку. Разделенные фракции анализировались на фотоколориметре при длине волны 320 нм, в результате чего строился профиль элюции разделения. Фракции, соответствующие пикам на профиле элюции анализировались методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагелевых пластинах для Kiselgel 60 F254 (Merck, США) в системе растворителей: вода: пропанол-2 : аммиак (1 : 8 : 1) [2].

Количественный анализ фракций проводили на хроматомасс-спектрометре «Waters» с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. Использовали колонку с обращенно-фазовым силикагелем C18 Symmerty (250×4,6 мм). Элюирование осуществляли смесью ацетонитрила и бидистиллированной воды (20:80), подкисленной муравьиной кислотой до pH = 2,45 в изократическом режиме со скоростью протока элюента 0,5 $см^3$/мин.

Результаты и обсуждение результатов исследования.

Схема выделения феруловой кислоты из кожуры корнеплодов свеклы включает следующие стадии: измельчение и сушка растительного материала; щелочной гидролиз растительного материала с последующим кислотным; экстракция смеси полярным органическим растворителем; упаривание экстракта; препаративное хроматографическое разделение экстракта.

Для выделения природных соединений чаще всего используют экстракцию, в данном исследовании для получения экстракта применяли этилацетат. Гидролиз растительного материала необходим для выделения феруловой кислоты, так как она присутствует в кожуре корнеплодов свеклы в связанном олигомерном состоянии с лигнином и полисахаридами. Проведение щелочного гидролиза растительного материала перед экстракцией обеспечивает разрушение сложноэфирных связей, а проведение кислотного – простых эфирных связей. Для разделения экстракта, содержащего феруловую кислоту, было апробировано использование в качестве неподвижной фазы декстрановый гель Sephadex-LH20, а в качестве подвижной фазы 50% водный этанол. Качественную идентификацию феруловой кислоты осуществляли методом ТСХ по показателю R_f=0,5, который совпадал со значением показателя стандартного образца феруловой кислоты. Было выявлено, что обогащенные

феруловой кислотой фракции выходят из препаративной колонки при объеме подаваемого элюента 50–60 $см^3$. Количественное определение феруловой кислоты осуществляли с помощью хромато-масс-спектрометра методом калибровочного графика, построенного по стандартным растворам ФК с концентрациями 150, 200, 250 $мкг/см^3$. Уравнение прямой при этом: $y = 479732{,}87x - 58838710$ ($R^2 = 0{,}992$). Идентификацию на хроматограмме осуществляли по времени удержания феруловой кислоты 23,75 мин, которое совпадало со временем удержания стандартного образца.

Представленный способ выделения феруловой кислоты позволяет получать следующие количественные характеристики процесса получения феруловой кислоты из кожуры корнеплодов свеклы.

По итогам эксперимента были рассчитаны следующие количественные характеристики процесса выделения:

– выход обогащенной ФК фракции по отношению к введенному в колонку экстракту (выход хроматографирования), который составил 18,34 %;

– выход ФК по отношению к ее общему содержанию в образце, который составил 22,82 %;

– чистота полученной обогащенной фракции ФК, которая составила 17,79 %.

Представленный способ послужил основанием для разработки проекта лабораторного регламента выделения феруловой кислоты из кожуры корнеплода свеклы.

Лабораторный регламент является технологическим документом, которым завершаются научные исследования в лабораторных условиях при разработке технологии производства нового вида продукции или нового технологического метода производства серийно выпускаемой продукции. По лабораторному регламенту осуществляется наработка экспериментальных партий (образцов) продукции различного назначения для исследовательских испытаний.

Лабораторный технологический регламент является основой для разработки опытно-промышленного регламента и составления исходных данных на проектирование опытно-промышленной установки, контрольно-измерительного испытательного оборудования.

Разработанный проект лабораторного регламента выделения феруловой кислоты включает в себя следующие разделы: характеристика конечной продукции (описание физических свойств феруловой кислоты, ее структурная формула, методика определения подлинности, условия хранения), химическая схема производства (схема гидролиза сложноэфирных и простых эфирных связей, посредством которых феруловая кислота связана с полисахаридами и лигнином) технологическая схема производства (включает стадии подготовки оборудования и посуды, подготовки сырья и вспомогательных материалов, получения экстракта, подготовки экстракта к разделению, проведения препаративной хроматографии, упаривания фракций и упаковки готовой фармацевтической субстанции), аппаратурная схема производства

(представлены экспликация и спецификация оборудования), характеристика сырья, материалов и полупродуктов, изложение технологического процесса, материальный баланс производства, переработка и обезвреживание отходов производства, контроль производства и управление технологическим процессом, охрана труда и техника безопасности, охрана окружающей среды.

На основе анализа литературы и проведения экспериментальной работы был разработан способ выделения и подобраны оптимальные условия очистки феруловой кислоты из кожуры корнеплодов свеклы. Разработанный способ выделения ФК включает в себя стадии щелочного гидролиза растительного материала с последующим кислотным гидролизом, экстракции этилацетатом и хроматографического разделения полученного экстракта на сорбенте Sephadex-LH20. Данный способ позволяет получать обогащенную фракцию феруловой кислоты с чистотой 17,79 % и выходом 22,82 % по отношению к сухому материалу. Результатом проделанной работы стал проект лабораторного регламента на выделение феруловой кислоты из кожуры корнеплодов свеклы.

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

Литературные источники

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 02.12.2009 № 1566 "О Государственной программе по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарственных и диагностических средств в Республике Беларусь на 2010 - 2014 годы и на период до 2020 года": [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://belarus.news-city.info/docs/large-document-by/minsk-right16584/online-document9.htm

2. Шемет, С.Н., Стасевич, О.В., Лихтарович, Е.С. // Труды БГТУ. – 2014. – № 4: Химия, технология орган. в-в и биотехнология.

Shemet S.N., Brushko N.V., Stasevich O.V.

DEVELOPMENT OF PROJECT OF LABORATORY REGLAMENT ON THE ISOLATION OF FERULIC ACID FROM BEET ROOTS SKIN

Belarusian State Technological University, Minsk

Summary

The method of isolation of ferulic acid from beet roots skin is presented in the article. This method includes extraction release of this compound from hydrolized before plant material by ethylacetate and chromatographic purification on the Sephadex-LH20 gel by using of 50 % water ethanol as mobile phase. Presented method of isolation of ferulic acid from beet roots skin allows to obtaine fraction enriched by ferulic acid with 17,79 % cleanliness and 22,82 % output in relation to the dry material. Based on findings the laboratory reglament on the isolation of ferulic acid from beet roots skin was formed.