УДК 542.61:547.9:663.543

В. А. Лось, О. В. Стасевич
Белорусский государственный технологический университет

ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

В данной работе была изучена эффективность жидкостной экстракции 50%-ным водным этанолом с применением ультразвуковой обработки, микроволновой энергии, мацерации при комнатной температуре и при нагревании биологически активной феруловой кислоты (ФК) из отходов переработки сахарной свеклы. Процесс выделения феруловой кислоты включал в себя стадии высушивания, измельчения свекловичного жома, его щелочного и последующего кислотного гидролиза, нейтрализации, экстракции феруловой кислоты 50%-ным водным этанолом, концентрирования экстракта на роторном испарителе. Качественную и количественную оценку ФК в полученных экстрактах осуществляли методами тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии. На основании полученных данных было выявлено, что экстракция ФК из свекловичного жома 50%-ным водным этанолом при использовании микроволновой энергии мощностью 100 Вт наиболее эффективна и дает возможность получать экстракт с содержанием ФК 0,21 мас. % в пересчете на сухой жмых. Способы экстракции мацерацией при комнатной температуре и на водяной бане дают также удовлетворительные результаты (0,19 мас. %), сопоставимые с результатами экстракции этилацетатом, и могут быть использованы при разработке технологии выделения феруловой кислоты из свекловичного жома, так как более просты в исполнении в промышленном масштабе и будут иметь меньшую себестоимость.

Ключевые слова: феруловая кислота, свекловичный жом, жидкостная экстракция, гидролиз, этанол, мацерация, микроволновое воздействие, ультразвуковая обработка, высокоэффективная жидкостная хроматография, способы выделения.

V. A. Los’, O. V. Stasevich
Belarusian State Technological University

THE ISOLATION OF WATER-ETHANOLIC EXTRACTS OF FERULIC ACID FROM SUGAR BEET PULP

The effectiveness of liquid extraction by 50% water ethanol using maceration method with or without heating, microwave action, ultrasound treatment of the biologically active ferulic acid from sugar beet pulp has been studied in this work. The process of isolation of ferulic acid included the stages of drying, grinding of sugar beet pulp, its alkaline and following acid hydrolysis, neutralization, 50% water ethanol extraction of ferulic acid and its concentration at rotary evaporator. The qualitative and quantitative amount of ferulic acid has been estimated by the methods of thin-layer (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) in the received extracts. As a result, it was found that the microwave extraction with energy 100 W of ferulic acid from beetroot pulp with 50% water ethanol was the most effective. This mode of extraction gives 0.21 wt. % content of ferulic acid in received samples. The maceration extractions with or without heating give as well satisfying results (0.19 wt. %) and could be used as scientific base in working out of technology of isolation of ferulic acid from sugar beet pulp, because they are more simple in the industry application and cheaper than microwave one.

Key words: ferulic acid, sugar beet pulp, liquid extraction, hydrolysis, ethanol, maceration, microwave action, ultrasound treatment, high performance liquid chromatography, the modes of isolation.

Введение. В современном мире при производстве продукции актуальным является использование вторичного сырья. Данный подход решает две огромные задачи: экономия средств путем использования дешевого сырья и улучшение экологического состояния окружающей среды.

Выделение биологически активных соединений из растительного материала с целью дальнейшего создания на их основе лекарственных препаратов является актуальным вопросом для современной фармацевтической и косметической промышленности. Этот путь производства позволяет избежать сложностей, возникающих при синтезе индивидуальных веществ, при этом лекарственные средства растительного происхождения имеют ряд преимуществ перед синтетическими аналогами при воздействии на организм [1].

Феруловая кислота (ФК) является природным фенилпропановым соединением, обладающим

широким спектром биологической активности: антиоксидантной, противоопухолевой и антимикробной [2]. Благодаря вышеперечисленным свойствам феруловая кислота может быть использована в качестве основы при создании лекарственных, профилактических и косметических средств.

Ранее нами было показано, что феруловая кислота содержится в свекловичном жоме в концентрации 0,2 мас. %, и таким образом его можно использовать в качестве сырья для выделения данного соединения. При этом для извлечения феруловой кислоты в качестве растворителя использовали этилацетат, что значительно повышало себестоимость выделяемого вещества. В данной работе в качестве экстрагента был выбран водный этанол из-за его низкой, в сравнении с этилацетатом, стоимости и хорошей растворяющей способности фенилпропановых соединений. Более того, водно-этанольные экстракты будут иметь меньшую себестоимость и будут хорошо растворимы в пропиленгликоле и бутиленгликоле, которые широко используют в косметической промышленности в качестве растворителей [3].

Основная часть. Цель работы – изучение эффективности выделения феруловой кислоты из отходов переработки сахарной свеклы различными методами экстракции с применением 50%-ного водного этанола в качестве экстрагента.

Объектом исследования являлись образцы свекловичного жома, предоставленные ОАО «Городейский сахарный комбинат».

Экспериментальная работа осуществлялась в несколько стадий:

1) высушивание растительного сырья при температуре, не превышающей 50°С;

2) разделение сырья на пять проб массой 2 г;

3) проведение щелочного гидролиза растительного сырья в течение 24 ч (4 н. NaOH);

4) нейтрализация полученной суспензии растительного сырья (NaOH, pH = 7) и проведение кислотного гидролиза полученной суспензии растительного сырья на протяжении 3 ч ($HCl_{конц}$, pH = 2);

5) нейтрализация полученной суспензии растительного сырья (NaOH, pH = 7);

6) экстракция феруловой кислоты из полученной суспензии;

7) отделение жидкой фазы от твердых частиц суспензии фильтрованием;

8) упаривание жидкой фазы на роторном испарителе при пониженном давлении и при температуре, не превышающей 50°С.

Как видно, перед экстракцией осуществляли стадии измельчения и гидролиза растительного сырья. Как известно, измельчение растительного материала значительно повышает эффективность экстракции за счет увеличения границы раздела фаз между твердым материалом и жидкостью. Феруловая кислота в растительном сырье связана ковалентно с арабинозой и лигнином. Комбинирование двух видов гидролиза создает условия для полного высвобождения феруловой кислоты из связанного состояния: щелочная обработка по существу обеспечивает гидролитическое расщепление сложноэфирных связей, а кислотная – расщепление простых эфирных связей.

Выделение феруловой кислоты из отходов переработки сахарной свеклы различными методами экстракции осуществлялось с применением 50%-ного водного этанола в качестве экстрагента. Для проведения экстракции феруловой кислоты к объему полученной после гидролиза водной суспензии добавляли равный объем этанола, что и привело к получению экстрагирующей смеси нужного состава – вода : этанол (1 : 1). Далее пробы были подвергнуты пяти разным способам экстракции: методом мацерации, экстрагированием при нагревании на водяной бане, под действием ультразвука, а также выделением при помощи микроволновой энергии 100 и 300 Вт.

Мацерация проводилась в течение 22,5 ч при комнатной температуре. Представляет собой простейший в исполнении и техническом оснащении способ экстракции, когда твердую фазу размешивают с растворителем и отфильтровывают. Мацерация проводилась в защищенном от света месте.

Экстракцию под действием ультразвука осуществляли в ультразвуковой бане UM-4 (Unitra-Unima, Olsztyn, Польша, частота 25 кГц) на протяжении 1 ч при комнатной температуре. Применение ультразвука отличается существенными преимуществами по сравнению с традиционными технологиями обработки сырья. В частности, он обеспечивает более глубокое проникновение растворителя в материал с клеточной структурой, уменьшает продолжительность обработки, обеспечивает более высокий выход продукта и воспроизводимость, снижает расход растворителя, увеличивает скорость процесса, позволяет экстрагировать термолабильные вещества. Оборудование не требует больших затрат на обслуживание, для обработки расходуется меньше энергии; в итоге процесс становится более экологичным и экономически обоснованным [4].

Экстракцию на водяной бане проводили в течение 1 ч при температуре 50°С (дигерирование). Дигерирование отличается от мацерации лишь тем, что экстракция осуществляется при

нагревании. Установлено, что при повышении температуры выход экстрактивных веществ увеличивается [5].

Также была апробирована экстракция с применением микроволновой обработки в сверхвысокочастотном поле, которое позволяет в 10–15 раз сократить продолжительность процесса по сравнению с традиционными методами экстракции. Использование микроволновой энергии дает возможность снизить расход экстрагента, а также сократить продолжительность процесса за счет быстрого нагрева, разрыхления клеточных стенок растительного сырья и, соответственно, увеличения доступности компонентов экстрагируемого материала растворителю [6]. Выход биологически активных соединений значительно снижается при продолжительном времени проведения микроволнового воздействия из-за процессов каталитической деструкции, имеющих место в растительном материале. Наиболее оптимальным способом микроволновой обработки является метод кратковременного микроволнового воздействия, так как феруловая кислота достаточно термостабильна в этих условиях [7].

Экстракцию осуществляли в микроволновой печи Sumsung ME731KR (Sumsung Electonics Co., Ltd, Корея) при воздействии микроволновой энергии мощностью 300 Вт, что соответствует температуре смеси 60°С, на протяжении 5 мин, а также при воздействии микроволновой энергии мощностью 100 Вт, что соответствует температуре смеси 40°С, в течение 10 мин [8].

Для качественной оценки содержания феруловой кислоты в полученных экстрактах использовали метод ТСХ.

ТСХ-анализ проводили на пластинах для ТСХ Kiselgel 60 F254 (Merck, США) в системе растворителей – вода : пропанол-2 : 25%-ный водный раствор аммиака (1 : 8 : 1). Проявление пластин выполняли в УФ-свете при длине волны 254 нм. Идентификацию феруловой кислоты осуществляли по показателю R_f, который соответствовал показателю R_f стандартного образца феруловой кислоты (Sigma, США) и был равен 0,5. Качественная оценка методом ТСХ показала наличие феруловой кислоты во всех образцах, полученных по пяти исследуемым способам выделения.

Количественную оценку феруловой кислоты в образцах методом ВЭЖХ осуществляли на хромато-масс-спектрометре, оснащенном диодно-матричным и масс-детектором. В качестве неподвижной фазы выступал обращенно-фазный силикагель С18 (колонка Symmerty 250 × 4,6 мм). Элюирование проводили смесью ацетонитрила и бидистиллированной воды (20 : 80), подкисленной муравьиной кислотой до pH = 2,45, в изократическом режиме со скоростью потока элюента 0,5 см^3/мин. Регистрацию хроматограмм осуществляли при 240 и 322 нм.

Идентификацию феруловой кислоты проводили по времени удерживания t_R = 22,3 мин, которое совпадало со временем удерживания стандартного образца феруловой кислоты. Также идентификацию феруловой кислоты в экстрактах осуществляли по УФ- и масс-спектру. УФ-спектр феруловой кислоты включал три максимума поглощения, соответствующих К- и В-полосам поглощения метокси- и гидроксизамещенного бензольного кольца: интенсивную полосу в коротковолновой части спектра (235,81 нм), полосу средней интенсивности, имеющую вид плеча (296 нм), и полосу в длинноволновой части спектра (321,81 нм).

В масс-спектре в области положительных ионов наблюдался сигнал с m/z = 195,55, соответствующий молекулярному иону феруловой кислоты $[M + H]^+$.

Количественное определение феруловой кислоты в экстрактах осуществляли методом калибровочного графика, построенного по стандартным растворам феруловой кислоты с концентрациями 0, 148, 528, 756 и 1016 мкг/см^3. Уравнение прямой при этом имело следующий вид: $y = 209\,306 \cdot x + 2 \cdot 10^7$, коэффициент корреляции (R^2) равнялся 0,9786. Были получены результаты количественного определения феруловой кислоты в пересчете на массу сухого свекловичного жома, представленные в таблице.

Количественные характеристики способов экстракции феруловой кислоты из свекловичного жома

Метод экстракции	Количество ФК по калибровочному графику, мкг/мл	Содержание ФК в сухом жоме, %
Мацерация	599,84	0,19
Ультразвуковая баня	44,72	0,01
Водяная баня	603,65	0,19
Микроволновая энергия мощностью 100 Вт	668,66	0,21
Микроволновая энергия мощностью 300 Вт	59,73	0,02

Как видно из таблицы, экстракция при воздействии микроволновой энергии мощностью 100 Вт позволяет получать экстракт с наибольшим

содержанием в нем феруловой кислоты в пересчете на сухой жом. Наименьшее содержание феруловой кислоты достигалось при использовании ультразвуковой бани и микроволновой энергии мощностью 300 Вт, что, возможно, связано с ее разрушением под действием этих условий. Остальные способы выделения дают возможность также получать экстракт с тем же содержанием, что и при экстракции этилацетатом.

Заключение. Таким образом, было выявлено, что экстракция феруловой кислоты из свекловичного жома 50%-ным водным этанолом при использовании микроволновой энергии мощностью 100 Вт наиболее эффективна и дает возможность получать экстракт с содержанием феруловой кислоты 0,21 мас. % в пересчете на сухой жом.

Способы экстракции мацерацией и на водяной бане дают также удовлетворительные результаты, сопоставимые с результатами экстракции этилацетатом, и могут быть использованы при разработке технологии выделения феруловой кислоты из свекловичного жома. Водно-этанольные экстракты будут иметь меньшую себестоимость и будут хорошо растворимы в пропиленгликоле и бутиленгликоле, которые широко используют в косметической промышленности в качестве растворителей.

Литература

1. Ngo L. T., Okogun J. I., Folk W. R. 21st Century Natural Product Research and Drug Development and Traditional Medicines // Nat. Prod. Rep. 2013. Vol. 30, no. 4. P. 584–592.

2. Srinivasan M., Adluri R. Sudheer, Menon V. Ferulic acid: therapeutic potential throught its antioxidant property // The Journal of Clinic Biochemistry Nutrition. 2007. Vol. 40. P. 92–100.

3. Сравнительный анализ жидкостной и сверхкритической флюидной экстракции феруловой кислоты из свекловичного жома / Н. В. Брушко [и др.] // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2018. № 1. С. 31–34.

4. Думитраш П. Г., Болога М. К., Шемякова Т. Д. Ультразвуковая экстракция биологически активных соединений из семян томатов // Электронная обработка материалов. 2016. № 52. С. 47–52.

5. Ширшова Т. И. Экстракция как метод выделения биологически активных соединений: краткий обзор // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. 2002. № 57. С. 41−42.

6. Comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designes / A. Egizabal [et al.] // Analyst. 1998. Vol. 123, no. 8. P. 1679–1684.

7. Zang W., Xu S. Microwave-assisted extraction of secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed hull // J. Sci. Food Agric. 2007. Vol. 87, no. 8. P. 1455–1462.

8. Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of dlackthorn flowers / V. Lovrić [et al.] // Food Technol. Biotechnol. 2017. Vol. 55, no. 2. P. 243–250.

References

1. Ngo L. T., Okogun J. I., Folk W. R. 21st Century Natural Product Research and Drug Development and Traditional Medicines. *Nat. Prod. Rep.*, 2013, vol. 30, no. 4, pp. 584–592.

2. Srinivasan M., Adluri R. Sudheer, Menon V. Ferulic acid: therapeutic potential throught its antioxidant property. *The Journal of Clinic Biochemistry Nutrition*, 2007, vol. 40, pp. 92–100.

3. Brushko N. V., Los' V. A., Kutuzov M. N., Stasevich O. V. The comparative analysis of liquid and supercritical fluid extraction of ferulic acid from sugar beet pulp. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series 2, Chemical engineering, biotechnologies, geoecology, 2018, no. 1, pp. 31–34 (In Russian).

4. Dumitrash P. G., Bologa M. K., Shemyakova T. D. Ultrasound extraction of biological active compounds from tomato seeds. *Elektronnaya obrabotka materialov* [Electonic treatment of materials], 2016, no. 52, pp. 47–52 (In Russian).

5. Shirshova T. I. Extraction as a method of isolation of biological active compounds: short review. *Vestnik Instituta biologii Komi NTs UrO RAN* [Bulletin of Institute of biology Komi SC UrD RAS], 2002, no. 57, pp. 41−42 (In Russian).

6. Egizabal A., Zuloaga O., Etxebarria N., Fernández L. A., Madariaga J. M. Comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designes. *Analyst*, 1998, vol. 123, no. 8, pp. 1679–1684.

7. Zang W., Xu S. Microwave-assisted extraction of secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed hull. *J. Sci. Food Agric*, 2007, vol. 87, no. 8, pp. 1455–1462.

8. Lovrić V., Putnik P., Kovačević D. B., Jukić M., Dragović-Uzelac V. Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of dlackthorn flowers. *Food Technol. Biotechnol*, 2017, vol. 55, no. 2, pp. 243–250.

Информация об авторах

Лось Вадим Анатольевич – студент. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: los.vadim2018@mail.ru

Стасевич Ольга Викторовна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры физико-химических методов сертификации продукции. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: stasevich@belstu.by

Information about the authors

Los' Vadim Anatol'yevich – student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: los.vadim2018@mail.ru

Stasevich Ol'ga Viktorovna – PhD (Chemistry), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Physical-Chemical Methods of Products Certification. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: stasevich@belstu.by

Поступила 12.11.2018