

УДК 542.61:547.9:663.543

Н. В. Брушко, Е. В. Феськова, О. В. Стасевич

Белорусский государственный технологический университет

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЖИДКОСТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ВЫДЕЛЕНИЕ
ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА**

В данной работе изучено влияние изменений условий жидкостной экстракции на эффективность выделения биологически активной феруловой кислоты 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 этилацетатом, отделения органической фазы и ее концентрирования на роторном испарителе. Для снижения экономических затрат при выделении феруловой кислоты были апробированы способы гидролиза и экстракции с применением меньшего объема водного гидролизующего агента, а также меньшего количества этилацетата для извлечения феруловой кислоты. Количественную оценку содержания феруловой кислоты в получаемых экстрактах контролировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Таким образом, было выявлено, что наиболее эффективные и экономически целесообразные условия экстракции предусматривают частичную декантацию водной фазы после гидролиза и последующую экстракцию суспензии этилацетатом, при этом соотношение растительного сырья, водной фазы и этилацетата должно составлять 1 : 13,5 : 13,5. Данный способ экстракции позволяет снизить расход этилацетата и повысить содержание феруловой кислоты в выделяемой фракции до 8,92% (мас.) по сравнению с экстрактом, который получали в соответствии со способом, описанным в литературе.

Ключевые слова: феруловая кислота, свекловичный жом, жидкостная экстракция, щелочной гидролиз, кислотный гидролиз, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-детекция, способы выделения.

N. V. Brushko, A. Feskova, O. V. Stasevich

Belarusian State Technological University

**THE INFLUENCE OF LIQUID EXTRACION CONDITIONS
ON THE ISOLATION OF FERULIC ACID FROM SUGAR BEET PULP**

The influence of conditions of liquid extraction on the effectiveness of isolation of 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, ethyl acetate extraction of ferulic acid, separation of organic phase and its concentration at rotary evaporator. Towards to decrease the economical costs of isolation of ferulic acid several modes of hydrolysis and extraction have been performed. They have included the usage of less amounts of water hydrolysis agent and ethyl acetate for extraction of ferulic acid. The qualitative amount of ferulic acid in received extracts has been estimated by the method of high performance liquid chromatography. Therefore it has been found that the most effective and economical desirable conditions of extraction included the decantation of a half amount of water after the hydrolysis and following ethyl acetate extraction of received suspension. The proportion of plant material, water phase and ethyl acetate should be 1 : 13,5 : 13,5. This mode of extraction declines the amount of ethyl acetate and raises the content of ferulic acid in isolated fraction to 8,92% (mass.) in comparison with the extract received by the method of isolation which is performed at literature.

Key words: ferulic acid, sugar beet pulp, liquid extraction, alkaline hydrolysis, acid hydrolysis, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, mass-detection, the modes of isolation.

Введение. Феруловая кислота (ФК) является природным фенилпропановым соединением, обладающим широким спектром биологической активности: антиоксидантной, противовоспалительной и антимикробной. Благодаря вышеперечисленным свойствам феруловая кислота может быть использована в качестве основы при создании лекарственных, профилактических и косметических средств. Ранее нами бы-

ло показано, что феруловая кислота содержится в отходах переработки сахарной свеклы в концентрации 0,2% мас. [1]. В результате деятельности сахарных комбинатов в Республике Беларусь в период сезонной переработки сахарной свеклы образуется от 16 500 до 23 000 т/сут свежего свекловичного жома, который частично используется для производства гранулированного корма для скота, а частично хранится

в жомовых ямах и должен подлежать утилизации. Таким образом, альтернативным способом переработки свекловичного жома является выделение из него биологически активной феруловой кислоты.

Наиболее часто для извлечения биологически активных веществ из растительного сырья применяют экстракционные технологии с использованием жидкого растворителя. Эффективность экстракции твердого вещества жидкостью зависит прежде всего от его растворимости и скорости перехода из одной фазы в другую. Растворимость можно изменить, подбирая соответствующий растворитель, в который переходит преимущественно требуемое вещество. Эффективность процесса увеличивается также при применении избытка растворителя. Однако при разработке технологии выделения биологически активного вещества из растительного сырья в производственных условиях применение избытка растворителя не является рациональным с экономической точки зрения. Такой параметр, как количество используемого растворителя для экстракции, в основном и определяет себестоимость выделяемого вещества. Таким образом, при разработке технологии выделения биологически активных веществ из растительного сырья для снижения их себестоимости актуальным вопросом является подбор такого минимального количества растворителя для экстракции, который бы обеспечивал максимальный выход продукта.

Основная часть. Целью работы является изучение влияния количества растворителя для экстракции на выход феруловой кислоты при выделении из свекловичного жома и выявление оптимального значения данного параметра.

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

Были апробированы несколько способов выделения ФК из свекловичного жома. За основу был взят способ выделения феруловой кислоты из рисовых отрубей, представленный в литературе (базовый способ) [2].

Процесс выделения феруловой кислоты из мокрого свекловичного жома включал в себя следующие стадии:

- 1) высушивание растительного сырья при температуре, не превышающей 50°C;
- 2) измельчение сырья в электрической кофемолке;
- 3) проведение щелочного гидролиза растительного сырья в течение 24 ч (4 н NaOH);
- 4) проведение кислотного гидролиза полученной суспензии растительного сырья в течение 3 ч (конц. HCl, pH = 2);
- 5) нейтрализация полученной суспензии растительного сырья (NaOH, pH = 7);

б) экстракция феруловой кислоты из полученной суспензии растительного сырья этилацетатом в течение 24 ч;

7) отделение растительного сырья от жидкой фазы фильтрованием;

8) разделение органической фазы, содержащей феруловую кислоту, от воды;

9) упаривание органической фазы на роторном испарителе при пониженном давлении при температуре, не превышающей 50°C.

Как видно, перед экстракцией осуществляли стадии измельчения и гидролиза растительного сырья. Известно, что измельчение растительного материала значительно повышает эффективность экстракции за счет увеличения границы раздела фаз между твердым материалом и жидкостью. 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. Щелочная обработка по существу обеспечивает гидролитическое расщепление сложноэфирных связей, а кислотная – расщепление простых эфирных связей.

Экстракцию феруловой кислоты из гидролизованного сырья осуществляли этилацетатом. Этот растворитель хорошо растворяет феруловую кислоту и поэтому подходит для экстракции данного соединения. По описанной в литературе методике экстракцию этилацетатом осуществляют объемом, равным объему водной фазы, таким образом, расход этилацетата достаточно большой, и стоимость выделения, следовательно, высокая. С целью снижения объема растворителя было принято решение уменьшить объем добавляемой воды для гидролиза свекловичного жома. Для этого был осуществлен щелочной гидролиз при соотношении сухого сырья к водной щелочи 1 : 2; 1 : 7; 1 : 10. Однако применение малого объема гидролизующего агента приводило к набуханию растительного сырья, превращению его в вязкую аморфную массу, что препятствовало дальнейшему проведению кислотного гидролиза и экстракции этилацетатом. Поэтому было принято решение использовать соотношение сырья и гидролизующего водного раствора щелочи, как было описано в литературе (1 : 25). Прогидролизованная водная фаза до экстракции (Ф1), прогидролизованная водная фаза после экстракции (Ф2), а также этилацетатная фаза после проведения экстракции (Ф3) в соответствии с [2] были подвергнуты качественному анализу на содержание ФК и глюкозы (ГЛ) методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). ТСХ-анализ проводили на пластинах для ТСХ Kieselgel 60 F254 (Merck, США) в системах растворителей А: вода : пропанол-2 : 25%-ный водный

раствор аммиака (1 : 8 : 1) и Б: пропанол-2 : уксусная кислота : петролейный эфир : вода (9 : 6 : 3 : 1). Проявление пластин проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм, а также в парах йода. Идентификацию соединений осуществляли путем сравнения окраски пятна и показателя R_f в соответствующей элюирующей системе с окраской и показателем стандартных образцов ФК и ГЛ соответственно. Результаты ТСХ-анализа фракций представлены в табл. 1.

Таблица 1
Результаты ТСХ-анализа фракций

Анализируемая фракция	Элюирующая система	Обнаруживаемое вещество, R_f
Ф1	А	ФК не обнаружена
	Б	ГЛ, $R_f = 0,9$
Ф2	А	ФК не обнаружена
	Б	Глюкоза, $R_f = 0,9$
Ф3	А	ФК, $R_f = 0,9$
	Б	ГЛ не обнаружена

Как видно из таблицы, в результате ТСХ-анализа феруловая кислота была идентифицирована в этилацетатной фазе, а в водной фазе она не была обнаружена. В водной фазе до и после экстракции также было обнаружено присутствие глюкозы. Полученный результат хорошо объясняется плохой растворимостью феруловой кислоты в воде и хорошей в этилацетате. Таким образом, для того чтобы избавиться от сахаров, растворимых в воде, и уменьшить расход растворителя, была апробирована частичная и полная декантация водной фазы после гидролиза. Модификации базового способа представлены в табл. 2.

Количественный анализ полученных экстрактов проводили на хроматографе «Waters» с масс-спектрометрическим детектором на ко-

лонке с обращенно-фазным силикагелем С18 Symmetry 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 потока элюента 0,5 см³/мин.

Идентификацию ФК осуществляли по времени удерживания $t_R = 21,1$ мин, которое совпадало со временем удерживания стандартного образца феруловой кислоты (Sigma, США), а также по УФ и масс-спектру в области положительных ионов, в котором наблюдался сигнал с $m/z = 195,55$, соответствующий молекулярному иону $[M + H]^+$, то есть феруловой кислоте. Количественное определение ФК осуществляли методом абсолютной калибровки при помощи графика, построенного по стандартным растворам ФК с концентрациями 0, 150, 550, 750, 1000 мкг/см³. Уравнение прямой при этом имело вид $y = 2316,372x + 253022,2$, коэффициент корреляции (R^2) равнялся 0,951.

Результаты количественной оценки представлены в табл. 3.

Как видно из таблицы, базовый способ позволяет получить экстракт с наибольшим выходом. Однако максимальное содержание феруловой кислоты в экстракте достигалось использованием способа 2. Выделение феруловой кислоты по способам 1, 3 и 4, которые предусматривали максимальное удаление водной фазы и экстракцию этилацетатом феруловой кислоты из прогидролизованного сырья сразу и по истечении 24 ч не являлись эффективными, несмотря на то, что феруловая хорошо растворима в данном растворителе. Эффективность способа 2 и базового говорит о том, что максимальная экстракция феруловой кислоты этилацетатом (несмотря на ее низкую растворимость в воде) происходит при ее извлечении из водной суспензии прогидролизованного сырья.

Таблица 2

Условия проведения экстракции

Способ экстракции	Условия гидролиза	Соотношение сырья и щелочного гидролизующего агента	Соотношение сырье : водная фаза : этилацетат	Условия экстракции
Базовый	4н NaOH, в течение 24 ч, конц. HCl (pH < 2) в течение 3 ч, нейтрализация	1 : 25	1 : 25 : 25	Экстракция этилацетатом суспензии в течение 24 ч, отделение растительного сырья от жидкости фильтрованием, разделение фаз
1			1 : 2 : 25	Декантация водной фазы, экстракция мокрого гидролизованного сырья этилацетатом
2			1 : 13,5 : 13,5	Частичная декантация водной фазы, экстракция суспензии этилацетатом
3			1 : 1 : 25	Полная декантация водной фазы центрифугированием, экстракция мокрого гидролизованного сырья этилацетатом
4			1 : 2 : 25	Декантация водной фазы, экстракция сырья этилацетатом в течение 24 ч

Таблица 3
Количественные характеристики способов
экстракции феруловой кислоты

Способ экстракции	Масса сырья, г	Выход экстракта из сырья, %	Содержание ФК в экстракте, %
Базовый	1,7095	3,29	5,67
1	10,0000	1,03	3,60
2	2,0000	1,06	8,92
3	2,0000	1,18	4,23
4	2,0000	1,40	2,58

Применение способа 2 для экстракции, который предполагает частичный слив водной фазы после гидролиза, позволяет получить более чистый экстракт, так как с водной фазой частично удаляются сахара, сократить время на экстракцию, поскольку она проводится сразу, а не по истечении 24 ч, а также снизить расход растворителя для экстракции в 1,85 раза, что значительно удешевляет процесс выделения феруловой кислоты.

Заключение. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что наиболее эффективные и экономически целесообразные условия экстракции феруловой кислоты из свекловичного жома предусматривают частичную декантацию водной фазы после гидролиза и последующую экстракцию суспензии этилацетатом, при этом соотношение растительного сырья, водной фазы и этилацетата должно составлять 1 : 13,5 : 13,5. Данный способ экстракции позволяет снизить расход этилацетата и повысить содержание феруловой кислоты в выделяемой фракции до 8,92% (мас.) по сравнению с экстрактом, который получали в соответствии со способом, описанным в литературе. Полученные закономерности о влиянии объема растворителей на эффективность экстракции феруловой кислоты из свекловичного жома могут быть использованы сахарными комбинатами Республики Беларусь в качестве основы для разработки технологий альтернативной утилизации отходов переработки сахарной свеклы.

Литература

1. Шемет С. Н., Брушко Н. В., Стасевич О. В. Определение феруловой кислоты в сахарной свекле и продуктах ее переработки // Тезисы докладов 80-й научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов, Минск, 1–12 февраля 2016 г. Минск: БГТУ, 2016. С. 64.
2. Tilay A., Bule M., Kishenkumar J., Annature U. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: it's improved extraction and purification // *Agricultural and food chemistry*, 2008, no. 56, pp. 7644–7648.

References

1. Shemet S. N., Brushko N. V., Stasevich O. V. [Determination of ferulic acid in sugar beetroot and it pulp]. *Tezisy dokladov 80-y nauchno-tekhnicheskoy konferentsii professorsko-prepodavatel'skogo sostava, nauchnykh sotrudnikov i aspirantov* [Thesis of 80th scientific technical conference for higher-education teaching personnel, research scientist, PhD students]. Minsk, 2016, p. 64 (In Russian).
2. Tilay A., Bule M., Kishenkumar J., Annature U. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: it's improved extraction and purification. *Agricultural and food chemistry*, 2008, no. 56, pp. 7644–7648.

Информация об авторах

Брушко Николай Владимирович – магистрант кафедры физико-химических методов сертификации продукции. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: kostik029345@mail.ru

Феськова Елена Владимировна – кандидат технических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@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

Brushko Nikolai Vladimirovich – Master's degree student, the Department of Physical-Chemical Methods of Products Certification. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kostik029345@mail.ru

Feskova Alena – PhD (Engineering), Senior Researcher, the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: feskova@mail.ru

Stasevich Ol'ga Victorovna – 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 15.11.2016