

УДК 542.61:547.9:663.543

Н. В. Брушко¹, В. А. Лось¹, М. Н. Кутузов², О. В. Стасевич¹
¹Белорусский государственный технологический университет
²Череповецкий государственный университет (Российская Федерация)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖИДКОСТНОЙ И СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

В данной работе осуществлен сравнительный анализ эффективности жидкостной экстракции биологически активной феруловой кислоты из отходов переработки сахарной свеклы и выделения ее с помощью сверхкритической флюидной экстракции. Общий процесс выделения феруловой кислоты включал в себя стадии высушивания, измельчения свекловичного жома, его щелочного и последующего кислотного гидролиза, нейтрализации, экстракции, концентрирования на ротаторном испарителе. При проведении жидкостной экстракции соотношение растительного сырья, водной фазы и этилацетата составляло 1 : 13,5 : 13,5. Сверхкритическую флюидную экстракцию проводили диоксидом углерода с добавлением 0,5% водного раствора этанола в качестве соразтворителя при температуре 47°C и давлении 165–350 атм. Качественную и количественную оценку содержания феруловой кислоты в получаемых экстрактах контролировали методом тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии соответственно. В результате было выявлено, что сверхкритическая флюидная экстракция является более селективной в сравнении с жидкостной и позволяет получать экстракт с чистотой 10,025 мас. %, что выше, чем при использовании жидкостной экстракции 8,92 мас. %. Однако сверхкритическая флюидная экстракция феруловой кислоты из свекловичного жома обеспечивает ее выход в 66,5 раза ниже выхода экстракта, полученного традиционным жидкостным способом извлечения, и поэтому является неэффективной.

Ключевые слова: феруловая кислота, свекловичный жом, жидкостная экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция, гидролиз, углекислый газ, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-детекция, способы выделения.

N. V. Brushko¹, V. A. Los¹, M. N. Kutuzov², O. V. Stasevich¹
¹Belarusian State Technological University
²Cherepovets State University (Russian Federation)

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF LIQUID AND SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF FERULIC ACID FROM SUGAR BEET PULP

The effectiveness of liquid extraction of biologically active ferulic acid from sugar beet pulp in comparison with supercritical fluid extraction has been studied in this work. The general process of isolation of ferulic acid included the stages of drying, grinding of sugar beet pulp, its alkaline and following acid hydrolysis, neutralization, extraction of ferulic acid and its concentration at rotary evaporator. The proportion of plant material, water phase and ethyl acetate has been 1 : 13.5 : 13.5. Supercritical fluid extraction has been held by carbon dioxide with addition of 0.5% water ethanol at temperature 47°C and pressure 165–350 atm. The qualitative and quantitative amount of ferulic acid has been estimated by the methods of thin-layer and high performance liquid chromatography in the received extracts. As a result, supercritical fluid extraction is more selective than liquid mode of extraction because it gives the purity of received fraction 10.025 wt %. In comparison, the liquid extraction gives only purity 8.92 wt %. Though, the supercritical fluid extraction gives the yield of ferulic acid less than liquid extraction in 66,5 times, that is why it is not effective.

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

Введение. Фенилпропаноиды – это природные соединения, содержащие в своей структуре одну или более фенилпропановых единицы, которые обладают широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантной и противоопухолевой. Фенилпропаноиды подразделяются на простые (коричные кислоты

и спирты) и сложные (лигнаны, флаволигнаны), в основном эти соединения содержатся в растительном сырье (лекарственные травы, зерновые культуры, овощи, отходы переработки сельскохозяйственного сырья). Особый интерес представляет собой феруловая кислота (ФК), ранее нами было показано, что она содержится

в отходах переработки сахарной свеклы в концентрации 0,2 мас. % [1].

Таким образом, выделение данного биологически активного вещества (БАВ) из свекловичного жома является актуальной задачей, так как на ее основе возможно создание профилактических и косметических средств, такой способ является альтернативным вариантом переработки свекловичного жома.

Наиболее часто для извлечения БАВ из растений применяют экстракционные технологии с использованием жидкого растворителя. Особый интерес для выделения БАВ представляет собой сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ), которая осуществляется, как правило, диоксидом углерода в сверхкритическом (в виде флюида) состоянии с или без добавления растворителя, увеличивающего полярность экстрагирующего флюида. Такой тип экстракции дает возможность осуществлять селективную экстракцию целевых БАВ, и таким образом получать экстракты из растительного сырья определенного состава.

Основная часть. Целью работы является сравнительный анализ жидкостной и сверхкритической флюидной экстракции феруловой кислоты из свекловичного жома.

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

Процесс выделения феруловой кислоты из растительного сырья в общем включает в себя следующие стадии [2, 3]:

- 1) высушивание растительного сырья при температуре, не превышающей 50°C;
- 2) измельчение сырья;
- 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 (концентрированная HCl, pH = 2);
- 5) нейтрализация полученной суспензии растительного сырья (NaOH, pH = 7);
- 6) экстракция феруловой кислоты из полученной суспензии растительного сырья;
- 7) 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 сополимерного состояния, в котором она присутствует в растении, связанная с полисахаридами, в основном араби-

нозой и лигнинами. Щелочная обработка по существу обеспечивает гидролитическое расщепление сложноэфирных связей, а кислотная – расщепление простых эфирных связей.

Выделение феруловой кислоты из гидролизованного сырья при проведении жидкостной экстракции (ЖЭ) осуществляли этилацетатом.

Ранее нами было показано, что наиболее эффективные и экономически целесообразные условия жидкостной 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 эффективный способ жидкостной 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 [3].

Однако известно, что жидкостные методы обладают низкой селективностью по отношению к конкретным компонентам. В связи с этим на кафедре биологии ФГБОУ ВО «Череповецкий государственный университет» (Российская Федерация) было проведено исследование применения метода СФЭ для выделения феруловой кислоты из отходов переработки сахарной свеклы на установке Rexo S-Series Reactor System. Подготовку сырья осуществляли путем применения щелочного и кислотного гидролиза, соотношение сырья и гидролизующего агента было таким же, как для ЖЭ (1 : 13,5). Также СФЭ подвергали и негидролизованное сырье, так как имелись сведения о возможности извлечения ФК без предварительного гидролиза [4]. Экстракцию проводили при давлении 165–170 атм, в качестве флюида использовали CO₂, в роли соразтворителя выступал 5%-й водный этанол (соотношение сырье : соразтворитель = 1 : 13,5) [4], температура и скорость потока составляли 46°C и 24 см³/мин соответственно. После проведения экстракции при 165–170 атм повышали давление в системе до 350 атм (предел для данного оборудования 400 атм). Собирали экстракт из приемника, а также оставшуюся жидкую фракцию в реакторе.

Из одного и того же сырья параллельно была проведена жидкостная экстракция ФК, условия которой описаны выше. Качественную идентификацию в полученных экстрактах осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах для ТСХ Kieselgel 60 F254 (Merck, США) в системе растворителей: вода : пропанол-2 : 25%-й водный раствор аммиака (1 : 8 : 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 с окраской и показателем $R_f = 0,5$ стандартного образца ФК (Sigma, США).

Количественный анализ полученных экстрактов проводили на хроматографе Waters с масс-спектрометрическим детектором на колонке с обращенно-фазным силикагелем C18 Symmetry 250 \times 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, 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 количественного анализа феруловой кислоты в полученных экстрактах с применением СФЭ представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что проведение СФЭ без предварительного гидролиза исходного сырья не эффективно, феруловая кислота в полученных экстрактах не была обнаружена. Также было выявлено, что основное количество феруловой кислоты извлекается при давлении 165–170 атм, при его повышении до 350 атм наблюдается дальнейшее выделение ФК, основная часть ФК извлекается в приемник. Далее было проанализировано остаточное содержание ФК в сырье после проведения СФЭ. Для этого прогидролизованное сырье подвергли экстракции водной фазой и этилацетатом в соотношении 1 : 13,5 : 13,5, а непрогидролизованное сырье перед экстракцией предваритель-

но подвергали гидролизу. Результаты количественного определения, а также качественного анализа экстрактов по компонентному составу методом ТСХ представлены в табл. 2.

Таблица 1
Условия и количественные характеристики сверхкритической флюидной экстракции ФК

Давление при СФЭ и место сбора экстракта	Содержание ФК в экстракте, мас. %	
	с гидролизом сырья	без гидролиза сырья
165–170 атм, реактор	0,054	Не обнаружена
350 атм, реактор	0,046	
165–170 атм, приемник	13,002	
350 атм, приемник	8,460	
Итого в приемнике (165–350 атм)	10,025	

Как видно из табл. 2, сверхкритическая флюидная экстракция является более селективным методом по сравнению с методом традиционной жидкостной экстракции и позволяет извлекать ФК только с четырьмя сопутствующими компонентами, в то время как жидкостная экстракция осуществляет извлечение не менее 10 компонентов, включая ФК. Таким образом, метод СФЭ позволяет получать фракцию феруловой кислоты с чистотой 10,025 мас. %, что выше чем при использовании ЖЭ (8,92 мас. %). Однако, как видно из табл. 2, сверхкритическая флюидная экстракция феруловой кислоты из свекловичного жома обеспечивает ее выход в 66,5 раз ниже выхода экстракта, полученного традиционным жидкостным способом извлечения, и поэтому является неэффективной.

Заключение. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что наиболее эффективно и экономически целесообразно получать феруловую кислоту с применением способа жидкостной экстракции, предусматривающего 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.

Таблица 2
Сравнительная характеристика результатов сверхкритической флюидной и жидкостной экстракций феруловой кислоты из свекловичного жома

Критерий оценки	Используемый метод				
	ЖЭ	СФЭ			
		без гидролиза	остаток в сырье	с гидролизом	остаток в сырье
Выход ФК по отношению к сухому сырью, мас. %	0,266	ФК не обнаружено	0,209	0,004	0,049
Количество выделенных компонентов	10	–	–	4	–
Чистота получаемого экстракта, мас. %	8,92	10,025			

Данный способ экстракции позволяет получить экстракт с содержанием в нем ФК 8,92 мас. % и выходом 0,266 мас. % по отношению к сухому сырью. Несмотря на то, что селективность сверхкритической флюидной экстракции выше, было установлено, что она является неэффективной при выделении ФК из свеклович-

ного жома по сравнению с жидкостной экстракцией, так как выход ФК уменьшился в 66,5 раз. Полученные результаты могут быть использованы сахарными комбинатами Республики Беларусь и Российской Федерации 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, 2016. С. 64.
2. Брушко Н. В., Феськова Е. В., Стасевич О. В. Влияние условий жидкостной экстракции на выделение феруловой кислоты из свекловичного жома // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнология, геоэкология. 2017. № 1. С. 98–101.
3. Tilay A., Bule M., Kishenkumar J., Annapure U. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: it's improved extraction and purification // *Agricultural and food chemistry*. 2008. № 56. P. 7644–7648.
4. Gharoof K., AL-Juhaimi F. Y., Choi Y. H. Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape (*Vitis labrusca* B.) Seeds // *Plant Foods Hum Nutr*. 2012. Vol. 67. P. 407–414.

References

1. Shemet S. N., Brushko N. V., Stasevich O. V. Determination of ferulic acid in sugar beetroot and its 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. Brushko N. V., Feskova E. V., Stasevich O. V. The influence of liquid extraction conditions of the isolation of ferulic acid from sugar beet pulp. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series 2, Chemistry technologies, Biotechnology, Geoecology, 2017, no. 1, pp. 98–101 (In Russian).
3. Tilay A., Bule M., Kishenkumar J., Annapure U. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: it's improved extraction and purification. *Agricultural and food chemistry*, 2008, no. 56, pp. 7644–7648.
4. Gharoof K., AL-Juhaimi F. Y., Choi Y. H. Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape (*Vitis labrusca* B.) Seeds. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012, vol. 67, pp. 407–414.

Информация об авторах

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

Лось Вадим Анатольевич – студент. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: los.vadim2011@yandex.by

Кутузов Михаил Николаевич – старший преподаватель кафедры биологии. Череповецкий государственный университет (162600, г. Череповец, пр-т Луначарского, 5, Вологодская обл., Российская Федерация). E-mail: kutuzov35@gmail.com

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 – graduate 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

Los Vadim Anatol'evich – student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: los.vadim2011@yandex.by

Kutuzov Michail Nicolaevich – Senior Lecturer, the Department of Biology. Cherepovets State University (5, Lunacharsky prospect, 162600, Cherepovets, Vologda region, Russian Federation). E-mail: kutuzov35@gmail.com

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 04.10.2017