

Изучение изменений пигментного состава природного и стабилизированного сока столовой свеклы в процессе хранения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Сергей Иванов, Василий Пасичный, Ирина Тимошенко

Национальный университет пищевых технологий, ул. Владимирская 68, 01033 Киев, Украина; тел. (+38044) 287-92-60; эл. почта i.timoshenko@bk.ru

Бетацианы свекольного сока крайне неустойчивы к воздействию внешних факторов, распадаются на протяжении достаточно короткого времени, что приводит к уменьшению их количества в растворе сока. Исследовали количество бетацианов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в природном соке столовой свеклы, соке стабилизированном смесью лимонной кислоты и полифосфатом, а также в соке, стабилизированном и очищенном диоксидом кремния. Метод заключается в разделении и количественном определении бетацианов. Были получены хроматографические профили всех трех образцов, что дало возможность определить суммарное содержание бетацианов в каждом из них. Установлено, что наибольшее их количество сохраняется в стабилизированном свекольном соке, пигменты которого менее подвержены воздействию внешних факторов за счет буферного комплекса, который образуют лимонная кислота с полифосфатом натрия в соотношении 1:0,75. Определяли Zeta–потенциал растворов с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) с электродной системой измерения Zeta–потенциала: Universal Dip cell (ZEN1002) и рамкой – Disposable polystyrene (DTS0012).

Подтверждена целесообразность дополнительной стабилизации сока столовой свеклы буферным комплексом и кремнеземом (диоксидом кремния), что улучшает стабильность системы (Zeta–потенциал) в процессе хранения.

На следующий день после выжимки суммарная концентрация бетацианов свекольного сока была 460 мг/дм³, уже через 40 минут – 456 мг/дм³, а через 80 минут – 446 мг/дм³. Установили, что с увеличением срока хранения до 8 суток, количество батацианов природного сока уменьшается почти в 2 раза, а в образцах стабилизированного сока уменьшается до 15 %. Определили, что условия и температура хранения также оказывают существенное влияние на остаточное количество пигментов. Для снижения потерь бетацианов в процессе хранения, рационально хранить стабилизированный свекольный сок при температуре 8 ± 1 °С, что позволит снизить потери бетацианов до 19 %.

Ключевые слова: свекольный сок, бетацианы, стабилизация, температура, хранение, хроматография.

Введение

За последние годы пищевая промышленность, как и другие отрасли, развивается стремительно быстро. Достижения пищевой химии оказывают влияние на качество продуктов питания, к сожалению, не всегда в лучшую сторону. На сегодняшний день большая часть потребителей отдает предпочтение натуральным продуктам, внешний вид которых требует дополнительного внимания.

Потребители давно привыкли к определенному цвету пищевых продуктов, связывая с ним их качество. Так традиционно для обеспечения необходимой розовой окраски вареных колбас использовался нитрит натрия, который вступает в реакцию цветообразования только с белками мяса. Замена значительной части мясного сырья в рецептуре растительными белками привела к необходимости дополнительного окрашивания мясных и мясосодержащих продуктов.

Натуральное сырье и продукты в процессе технологической обработки изменяют свою первоначальную окраску, а иногда даже приобретают неприятный вид, что делает такие продукты малопривлекательными. Поэтому для обеспечения необходимой окраски готовых мясных изделий широко используют как натуральные так синтетические пищевые красители. Использование натуральных красителей в мясной промышленности ограничено низкой стабильностью природных пигментов при значениях показателя активной кислотности рН мясных систем в пределах 5,7 – 6,4 и термолабильностью пигментов.

Источником красных пигментов могут выступать плоды, листья и другие части растений, окраска которых обусловлена биосинтезом из класса флавоноидов – антоцианов. При этом ряд объектов может иметь окраску красных тонов, обусловленную присутствием в тканях иных природных колорантов – бетацианов [1,2]. Помимо красящей способности, эти пигменты обладают широкой и разнообразной биологической активностью благодаря высоким антиоксидантным свойствам: способствуют расщеплению и усвоению белков пищи [3].

Содержание красящих пигментов и других компонентов в одинаковых видах одного и того же растения (например столовой свеклы), может существенно отличаться. Количество пигментов зависит от многих факторов: сорта свеклы, размера плода, условий выращивания. При производстве натурального красителя из плодов красной свеклы возникает

необходимость стабилизации технологических, физико-химических свойств бетациановых пигментов для обеспечения более широкого использования в различных пищевых продуктах [4,5]. Сложности, которые возникают при производстве свекольных красителей на основе сока свеклы, связаны не только с обеспечением устойчивости технологических свойств самих пигментов в процессе производства, но и с увеличением срока хранения. Натуральные красители, хранение которых предусмотрено в жидком агрегатном состоянии, являются также хорошей питательной средой для быстрого развития микроорганизмов, что отрицательно влияет на их технологические свойства [6]. Поэтому разработка новых технологий производства натуральных красителей и совершенствование существующих является главным направлением в этой области.

Целью нашей работы было исследование количества бетацианов свекольного красителя, разработанного нами на основе стабилизированного свекольного сока, и сока свеклы без дополнительной обработки и стабилизации, а также сравнить влияние условий и срока хранения на устойчивость и количество бетацианов.

Материалы и методы исследования

В качестве образцов исследовали три варианта растворов: 1 – свекольный сок, полученный центрифугированием столовой свеклы сорта «Бордо», 2 – свекольный сок стабилизированный смесью лимонной кислоты и полифосфата натрия, 3 - свекольный сок стабилизированный смесью лимонной кислоты, полифосфата натрия с добавлением кремнезема в качестве очистителя.

Для испытаний отбирали 20 см³ пробы каждого варианта. Пробу без разведения разделяли на две равные за объемом части в две противоположно размещенные центрифужные пробирки и центрифугировали 40 мин с частотой вращения 4000 мин⁻¹. Жидкость над осадком фильтровали через мембранный фильтр на основе замещенной целлюлозы в емкость для хроматографирования [6].

Определение содержания пигментов сока свеклы (бетацианов) осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе АТ 1200 с использованием рефрактометрического детектора (фирма «Agilent Technologies», США) соответственно стандартной методике определения содержания антоцианов в пищевом сырье методом ВЭЖХ» (метод анализа IFUMA71 Antocyanins by HPLC, 1998 г) [9].

Использование метода внутреннего стандарта дает возможность приблизительно оценить вклад каждого компонента пигмента за неимением дорогих и очень неустойчивых стандартных образцов возможных антоцианов, а в данном случае бетацианов. Метод

заключается в разделении и количественном определении бетацианов с помощью внутреннего стандарта – хлорида калистефина. Метод базируется на хроматографическом разделении на возвратно-фазовой колонке C₁₈ («Hypersil ODS», 250x4.0 мм с предколонкой) с дальнейшим регистрированием хроматограмм с помощью диодно-матричного УФ-детектора. В качестве элюентов использовали 2 раствора. Элюент А: 10 %-й водный раствор муравьиной кислоты, элюент В: 10 % муравьиной кислоты, 40 % воды, 50 % ACN. Управление хроматографической системой, получение хроматограмм проводилось с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Площадь и время удержания бетациановых сигналов, соотнесены к внутреннему стандарту, сравниваются с данными хроматограмм аутентичного сырья и библиотеки профилей сырья. Массовую концентрацию бетацианов, которая определяется в растворе подготовленного образца, вычисляют с помощью градуировочной характеристики (зависимость площади хроматограммного пика от массовой концентрации внутреннего стандарта). Площадь сигналов бетацианов образца сравнивали с площадью внутреннего стандарта – хлорида калистефина. Время анализа 10 минут, поток – 1,0 мл/мин, температура – 40 °С, детектирование – 518 нм.

Определяли Zeta–потенциал растворов с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) с электродной системой измерения Zeta–потенциала: Universal Dip cell (ZEN1002) и рамкой – Disposable polystyrene (DTS0012).

Абсолютную погрешность измерений определяли с помощью критерия Стьюдента, доверительный интервал P = 0,95, количество повторов в определениях 3 – 4-х кратное.

Результаты и обсуждение

Бетацианы нестабилизированного свекольного сока крайне неустойчивы и под воздействием внешних факторов распадаются на протяжении достаточно короткого времени, что приводит к уменьшению их количества в растворе сока. Так чистый свекольный сок, исследованный на следующий день после выжимки (хранение в условиях холодильника), имел суммарную концентрацию бетацианов 460 мг/дм³, через 40 минут – 456 мг/дм³, а через 80 минут – 446 мг/дм³, что подтверждает результаты исследований других авторов, изучавших характеристики пигментного комплекса столовой свеклы [7].

Таким образом для стабилизации бетацианов свекольного сока использовали в одном варианте стабилизирующую смесь - лимонную кислоту и полифосфат натрия [8], в другом варианте – эту же смесь с добавлением кремнезема в количестве 1% к объему стабилизированного сока. Оптимальная концентрация лимонной кислоты и полифосфата натрия составляла 1,75 %.

Хроматограммы исследуемых растворов (1 сутки хранения при температуре 8 ± 1 °C) представлены на рис. 1 - 3.

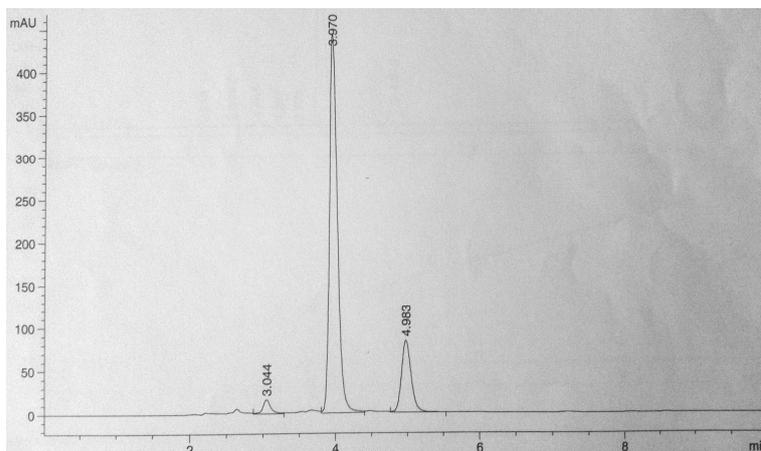


Рис. 1. Хроматограмма не стабилизированного свекольного сока
Fig. 1. A chromatogram of non stabilized beetroot juice

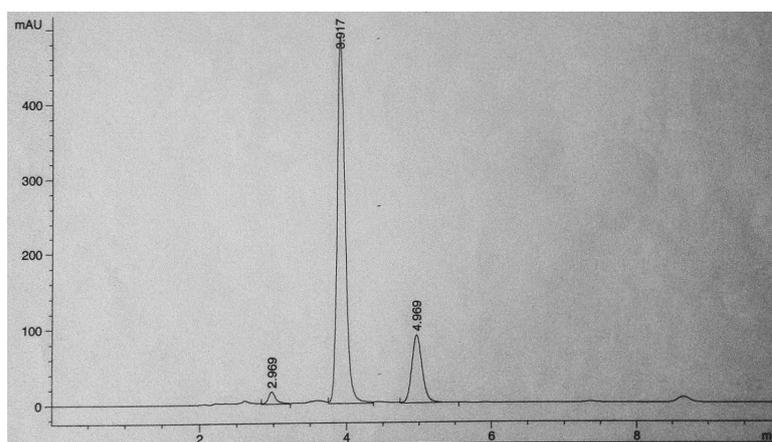


Рис. 2. Хроматограмма стабилизированного свекольного сока
Fig. 2. A chromatogram of stabilized beetroot juice

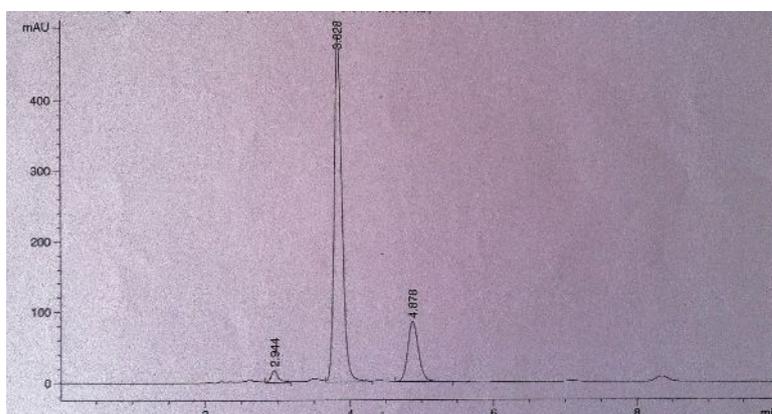


Рис. 3. Хроматограмма стабилизированного свекольного сока с кремнеземом
Fig. 3. A chromatogram of stabilized beetroot juice with silica

Несмотря на схожесть профилей хроматограмм (рис. 1 – 3), высота и ширина пиков имеет различия, что при подсчете суммарного количества бетацианов дает возможность установить, что концентрация пигментов в образцах свекольного сока стабилизированного больше, чем у сока не стабилизированного (табл.1).

Таблица 1. Суммарное содержания бетацианов в образцах на основе свекольного сока при температуре хранения $8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabl. 1. The total content of betacyanin in the samples of beetroot based juice at a storage temperature of $8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Вариант образца	Суммарное содержание бетацианов, мг/дм ³		
	Срок хранения, суток		
	1	5	8
1	460 ± 1,4	384 ± 1,1	248,6 ± 0,6
2	518 ± 1,8	494,6 ± 1,4	440,6 ± 0,8
3	512 ± 1,9	503,1 ± 1,8	469,0 ± 1,6

Суммарное содержание бетацианов в растворах свекольного сока уменьшается в процессе хранения во всех исследуемых образцах (табл.1). Количество бетацианов уменьшается на 46 % в свекольном соке после 8 суток хранения при $t = 8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, в то время как в стабилизированном соке потери составляют 15 % в тех же условиях, а в стабилизированном соке с кремнеземом – 8,4 %.

Также изучалось влияние температуры хранения на остаточное содержание суммарного количества бетацианов этих же растворов (табл. 2).

Таблица 2. Суммарное содержания бетацианов в образцах на основе свекольного сока при температуре хранения $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabl. 2. The total content of betacyanin in the samples of beetroot based juice at a storage temperature of $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Вариант образца	Суммарное содержание бетацианов, мг/дм ³	
	Срок хранения, суток	
	5	8
1	191,5 ± 1,6	139,0 ± 0,8
2	427,0 ± 1,8	326,0 ± 1,6
3	388,5 ± 1,8	282,7 ± 1,2

Увеличение температуры хранения до $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ приводит к значительным потерям пигментов раствора свекольного сока: после 8 суток хранения не стабилизированный свекольный сок – до 70 %, стабилизированный сок – до 34 %, что на 19 % больше, чем при хранении при температуре $8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Стабильность системы свекольного сока за счет введения стабилизирующих компонентов также была подтверждена с помощью определения Zeta–потенциала этих растворов (рис. 4).

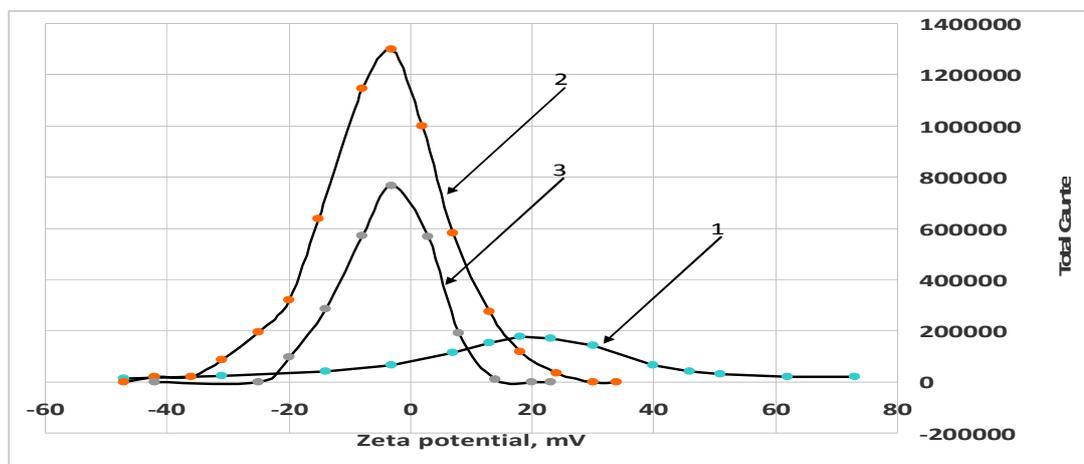


Рис. 4. Зета-потенциал свекольного сока и стабилизированного свекольного сока без кремнезема и с кремнеземом на шестые сутки хранения: 1 – свекольный сок, 2 –свекольный сок стабилизированный, 3 – свекольный сок стабилизированный с кремнеземом.

Fig 4. Zeta-potential of beetroot juice and the stabilized beetroot juice with silica on the sixth storage day: 1 – beetroot juice, 2 - stabilized beetroot juice, 3 - stabilized beetroot juice with silica.

Как видно из рис. 4 добавление кремнезема в стабилизированный свекольный сок повышает интенсивность ионизации раствора для определения Zeta–потенциала, указывает на дополнительную стабильность растворов свекольного красителя к нагреванию.

Выводы

1. Подтверждена необходимость введения стабилизирующих веществ в раствор свекольного сока, что дает возможность сохранить количество бетацианов в процессе хранения на 47 % больше, чем в природном свекольном соке.
2. Дополнительное введение кремнезема в стабилизированный раствор сока повышает стабильность раствора в процессе хранения.
3. Доказано, что для уменьшения потерь бетацианов в процессе хранения, рационально хранить стабилизированный свекольный сок при температуре 8 ± 1 °С, что позволит снизить потери бетацианов до 19 %.

Литература

1. Саенко И.И., Тарасенко О.В., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Бетацианы корнеплодов красной столовой свеклы // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. Белгород. 2012. Выпуск 18, № 3. С. 194-199.

2. Henriette M.C. Betalains: properties, sources, applications, and stability // Food Science Technology. 2009. Vol. 44, P. 2365-2376.
3. Bohm H. Opuntia dūlemi - An Interesting and Promising Cactaceae Taxon // Professional Association Cactus Develop. 2008. Vol. 10, P. 148–170.
4. Kirsten M.N., Florian C.S., Reinhold C. Betalain Stability and Degradation – Structural and Chromatic Aspects // Food Science. 2006. Vol. 71, P. 41-50.
5. Pavokovic D., Krsnik-Rasol M. Biotechnological Production of Betalains // Food Technology and Biotechnology. 2011. Vol. 49, P. 145-155.
6. Карбовская Р.В., Борис И.И. Идентификация антоцианов при помощи ВЭЖХ, как метод подтверждения аутентичности фруктово-ягодного сырья и готовой продукции // Журнал хроматографічного тавариства. 2008. т. VIII, № 3, 4. С. 15-19.
7. Дубініна А.А., Пенкіна Н.М., Черевична Н.І., Ольховська В.С. Характеристика пігментного комплексу столового буряка та закономірності змін його кольору // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2013. № 10 (64). т. 4. Р. 38-44.
8. Патент 70672 А Україна, МПК С 09 В 61/00. Спосіб виробництва червоного бурякового барвника / Пасічний В.М., Кремешна І.В., Жук І.З. ; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. -№ 20031212087; заявлений 23.12.2003; опублікований 15.10.2004. Бюл. № 10, 2004.
9. Lee J., Rennaker C., Wrolstad E. Correlation of two anthocyanin quantification method: HPLC and spectrophotometric methods // Food Chemistry. 2008. Vol. 110, P. 782-786.

Pateikta spaudai 2014-09

S. Ivanov, V. Pasichnyi, I. Timoshenko

Investigation of the changes in colour combination of natural and stabilized beetroot juice during the storage process by a high-performance liquid chromatography method

Summary

Betacyanins of beetroot juice are extremely unstable to external impact and degrade during a rather short period of time, resulting in decrease of their quantity in the juice solution. The quantity of betacyanins was investigated by a method of high-performance liquid chromatography in natural beetroot juice, juice stabilized with mixture of citric acid and polyphosphate, as well as in juice stabilized and purified with silicon dioxide. The method includes separation of betacyanins and quantitative measurement. Chromatographic profiles of all the three were received; it allowed to determine the total content of betacyanins in each of them. It has been determined that the largest quantity of betacyanins is preserved in the stabilized beetroot juice, pigments of which are less affected by external impact owing to the buffer complex, made by citric acid and sodium polyphosphate in 1:0.75 proportion. The analyzer of Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) with the electrode measuring system of ξ -potential: Universal Dip cell (ZEN1002) and frame - Disposable polystyrene (DTS0012) and defined Zeta-potential solutions was used.

The efficiency of additional stabilization of beetroot juice with buffer compound and silica (silicon dioxide) has been confirmed; it improved the system stability (electrokinetic potential) during the storage process.

It has been established that the quantity of betacyanins of natural juice reduces almost twice with the increase of storage life up to 8 days, while in the samples of stabilized juice, the changes range within 15 %. It has been determined that storage conditions and temperature have a significant impact on the residual quantity of pigments as well. In order to reduce betacyanins losses during the storage process, it is efficiently to store stabilized beetroot juice at the temperature of 8 ± 1 °C, which will allow to reduce betacyanins losses up to 19 %.

Key words: beetroot juice, betacyanins, stabilization, temperature, storage, chromatography.