

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования

«Российский экономический университет имени Г.В.Плеханова»

На правах рукописи

ХАРРИС МАРИЯ ОЛЕГОВНА

Исследование влияния фитостеринов на качество пива

05.18.15 – Технология и товароведение пищевых продуктов функционального и
специализированного назначения и общественного питания

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:

доктор технических наук,
профессор Елисеев М.Н.

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1 Роль стеринов растительного сырья, как индикаторов качества пива. Методы их идентификации и определения	9
1.1 Стерины, их функции и свойства, нахождение в растительном сырье, в том числе пивоваренном	9
1.2 Влияние фитостеринов на процесс пивоварения	23
1.3 Анализ фитостеринов в растительном сырье и пиве	34
1.3.1 Методы выделения липидной фракции	35
1.3.1.1 Экстагирование фитостеринов из растительного сырья.....	35
1.3.1.2 Экстрагирование липидной фракции растворителями.....	36
1.3.1.3 Экстрагирование фитостеринов методом гидролиза	41
1.4 Методы исследования фитостеринов с применением хроматографии	51
1.4.1 Хроматографический анализ свободных фитостеринов.....	51
1.4.2 Хроматографический анализ связанных фитостеринов.....	53
1.4.3 Количественный анализ фитостеринов	63
1.4.4 Хроматографические отклики фитостеринов	66
1.5 Нормативно-правовая база в отношении контроля фитостеринов	80
Глава 2 Определение фитостеринов различными хроматографическими методами	84
2.1 Объекты исследования	84
2.2 Методы исследования	86
2.3 Определение влияния сырья на содержание фитостеринов в пиве	98
2.3.1 Качественное определение фитостеринов методом ВЭЖХ пивоваренного сырья (солода и хмеля)	98
2.3.2 Качественное определение фитостеринов методом ВЭЖХ с	

масс- детектированием	105
Глава 3 Исследование содержания фитостеринов в пиве методом ВЭЖХ с масс-детектированием и методом ГХ.....	110
3.1 Анализ внутреннего стандарта при определении фитостеринов пива ...	110
3.2 Исследование образцов пива с целью определения в них фитостеринов методом ВЭЖХ с масс-детектированием	114
3.3 Определение содержания фитостеринов в пиве методом ГХ	120
Глава 4 Исследование влияния фитостеринов на процессы хранения пива с целью разработки метода прогнозирования стойкости пива.....	128
4.1 Исследование влияния фитостеринов на качество пива в процессе его старения	128
4.2 Разработка метода прогнозирования стойкости пива на основе определения количества фитостеринов в пиве	165
4.3 Расчет экономической эффективности от внедрения метода определения фитостеринов на производстве	167
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	169
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	171
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	172
Приложение А.....	190

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В последнее время в связи с изменением потребительского спроса, большое внимание уделяется прогнозированию качества пива при длительных сроках хранения, поскольку торговля должна четко представлять себе риски, связанные с его реализацией, а также понимать, какие параметры могут изменяться, влияя на сроки годности и качество этого напитка брожения. В связи с этим научные разработки в области продления сроков годности и определения тех или иных веществ, влияющих на стабильность пива в период его хранения, имеют первостепенное значение, но на данный момент не определены в нормативных документах. К таким веществам относятся фитостерины - стероидные спирты, входящие в липидной фракции растительного сырья, которые играют важную роль в технологических процессах приготовления пива и формировании его вкуса. Исследование влияния фитостеринов на качество пива актуально, поскольку определение качественного и количественного состава фитостеринов растительного сырья применяемого в производстве пива позволит идентифицировать соответствие зернового сырья, заявленного производителем, использованному сырью при производстве пива. А определение качественного и количественного состава фитостеринов в пиве позволит использовать их в качестве маркеров для определения их влияния на стабильность пива и прогнозирования его стойкости.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является исследование влияния фитостеринов на качество пива в период его продолжительного хранения. Установление уровня фитостеринов, оказывающего влияние на органолептические показатели и физико-химическую стабильность пива в зависимости от состава сырья, а также

разработка критериев оценки качества пива, позволяющих судить о скорости процесса старения в период его хранения.

Для осуществления поставленной цели решались следующие задачи:

- проведение анализа отечественных и зарубежных источников литературы с целью определения понятия класса веществ «фитостерины», их свойств и форм, а также выявление качественного и количественного содержания фитостеринов в сырье для производства пива и определение процессов, влияющих на качество пива в период его продолжительного хранения;

- проведение мониторинга методов исследования фитостеринов в продуктах питания из растительного сырья и разработка методов их выделения;

- изучение скорости протекания процессов старения пива в зависимости от применяемого сырья с помощью математического анализа данных состава засыпи зернопродуктов;

- обоснование и определение качественного и количественного состава фитостеринов пива, как маркеров его стабильности;

- исследование влияния фитостеринов растительного сырья на процессы старения и стабильность качества пива при хранении с помощью физико-химических показателей согласно международным методикам ЕВС;

- разработка метода прогнозирования стойкости пива на основе определения степени окисления фитостеринов в период его хранения.

Научная новизна

Научно обоснована и экспериментально подтверждена возможность использования метода газовой хроматографии для определения фитостеринов – для различных сортов пива, и высокоэффективной жидкостной хроматографии - для определения фитостеринов пивоваренного сырья; проведен подбор растворителей в соответствии с их элюирующей способностью для оптимального выделения фитостеринов из растительного сырья. Установлены качественный и количе-

ственный состав фитостеринов в пивоваренном ячменном солоде, хмеле, и в различных сортах пива отечественного и зарубежного производства. Установлено влияние уровня фитостеринов на органолептические показатели и физико-химическую стабильность пива, изучено их влияния на процессы старения в зависимости от состава сырья, из которого оно было изготовлено.

Разработаны критерии оценки качества пива, позволяющие судить о степени развития процесса старения. Научно обоснованно использование фитостеринов в качестве маркеров для определения стабильности пива и прогнозирования его стойкости.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны методы определения фитостеринов, как критерия, позволяющего судить о степени процесса старения в период его хранения. На основе анализа литературных данных установлена важная роль фитостеринов в процессе хранения пива, влияющих на образование прекурсоров веществ, обуславливающих появление пороков вкуса пива. Впервые разработан метод выделения фитостеринов из растительного сырья, применяемого в технологии производства пива. Разработан метод определения качественного и количественного состава фитостеринов для ячменного солода и хмеля. Изучены и адаптированы методы высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения фитостеринов в разных сортах отечественного и зарубежного пива, и методы газовой хроматографии для определения качественного состава фитостеринов различных сортов пива.

Разработан метод прогнозирования стойкости пива при хранении и проект документации на метод определения фитостеринов в пиве, позволяющий оценить фитостерины как важный критерий качества с целью мониторинга стабильности коллоидной системы пива в процессе хранения, а также определить соответствие заявленного сырья и применяемого на самом деле.

Положения, выносимые на защиту

- теоретическое обоснование негативного влияния содержания фитостеринов сырья для производства пива на качество пива в период его продолжительного хранения на основе анализа и систематизации литературных данных;
- база экспериментальных данных качественного и количественного состава фитостеринов в солоде пивоваренном ячменном, хмеле и готовом пиве, необходимая для мониторинга качества пива в процессе его выпуска и хранения;
- разработанные методы определения качественного и количественного состава фитостеринов в пиве, как маркеров его стабильности;
- результаты, характеризующие влияние уровня фитостеринов на процессы старения пива и вклад в органолептическую стабильность пива;
- установленные зависимости содержания фитостеринов в пиве от типа сырья, из которого оно было изготовлено;
- выявленные зависимости скорости протекания процессов старения от состава пивоваренного сырья;
- разработка метода прогнозирования стойкости пива на основе определения степени окисления фитостеринов в период его хранения.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность научных результатов обеспечиваются применением гостированных методик исследования с использованием многократных и параллельных испытаний, с последующей статистической оценкой воспроизводимости результатов анализа, а также сопоставлением полученных результатов с известными из научной литературы, апробацией полученных результатов на научных конференциях и в публикациях.

Результаты диссертационной работы были представлены на VI Всероссийской научно-практической конференции детских диетологов «Питание и здоровье» (г. Москва, 2012 г.), XXVII Международной научно-практической конферен-

ции «Наука и современность-2014», X Международной научно-практической конференции «Новое слово в науке и практике: Гипотезы и апробация результатов исследований» (г. Новосибирск, 2014 г.), Международной научно-практической конференции «Технические науки - основа современной инновационной системы» (г. Йошкар-Ола, 2014 г.).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 статей, из Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в журнале, цитируемом в наукометрической системе Scopus, 3 материала конференций.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, четырех экспериментов, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 71 рисунок, 41 таблицу и 1 приложение. Список литературы включает 170 источников российских и зарубежных авторов.

ГЛАВА 1 РОЛЬ СТЕРИНОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, КАК ИНДИКАТОРОВ КАЧЕСТВА ПИВА. МЕТОДЫ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1.1 Стерины, их функции и свойства, нахождение в растительном сырье, в том числе пивоваренном

Фитостерины – растительные стерины, выделяемые из неомыляемой части липидов растений. В природе существует более 200 фитостеринов, а наиболее распространёнными являются стигмастерин, brassикастерин и бета-ситостерин. Температуры плавления: стигмастерин – 170°C, brassикастерин – 148°C, бета-ситостерин – 140°C [101, с. 1813-1815]. Структурные формулы данных фитостеринов представлены на рисунке 1. Фитостерины представляют собой группу вторичных одноатомных циклических спиртов растительного происхождения.

Фитостерины сопряжены с различными соединениями в сырье, присоединенными к ним по боковой цепи, такими как десметил стерины - ситостерин, кампестерин, стигмастерин, авенастерины и станола, составляющие основную часть фитостеринов растительного сырья [86, с. 472-474; 101, с. 1813-1815]. Реже определяются монOMETил и диметил стерины. В сырье встречаются стерины в форме так называемых конъюгатов стеринОВ - сложные эфиры с жирными кислотами (SE), сложные эфиры с фенольными кислотами (SPHE), гликозиды (SG) и ацилированные гликозиды (ASG), могут иметь различные химические, технологические и питательные свойства. Холестерин обычно насчитывает 1-2% всех стеринОВ в растениях и может составлять 5% или больше в определенных растительных семействах, видах, органах или тканях [86, с. 427-474].

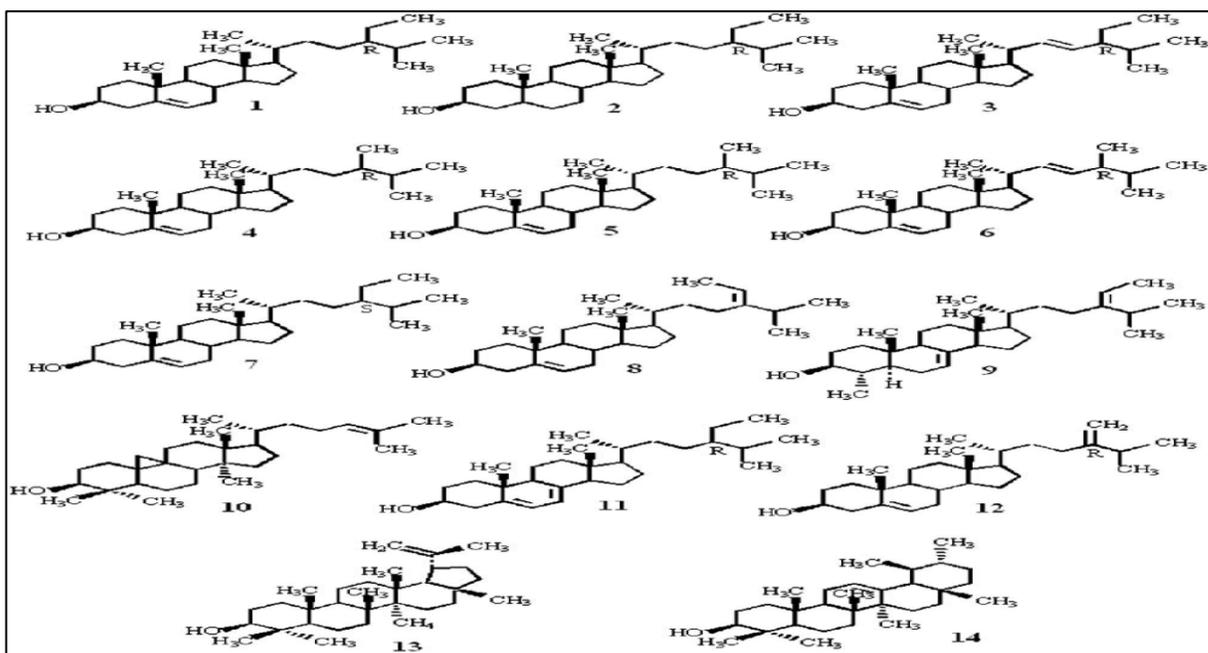


Рисунок 1 – Основные фитостерины и родственные соединения: **1** – ситостерин (*b*-ситостерин, стигмаст-5-ен-3 β -ол); **2** – ситостанол (стигмастан-3 β -ол); **3** – стигмастерин (стигмаста-5,22 E -диен-3 β -ол); **4** – кампестерин ((24 R)-эргост-5-ен-3 β -ол); **5** – кампестанол ((24 R)-эргостан-3 β -ол); **6** – браССикастерин ((24 R)-эргоста-5,22 E -диен-3 β -ол); **7** - *g*-ситостерин ((24 S)-стигмаст-5-ен-3 β -ол); **8** – фукостерин (стигмаста-5,24(28)-диен-3 β -ол); **9** - α 1-ситостерин (цитростадиенол, 4 α -метилстигмаста-7,24(28) Z -диен-3 β -ол); **10** – циклоартенол; **11** – 7-дигидроситостерин (стигмаста-5,7-диен-3 β -ол); **12** – 24-метилхолестерин (эргоста-5,24(27)-диен-3 β -ол); **13** – лупеол (*b*-вискол, фарагастерол, луп-20(29)-ен-*b*-ол); **14** - α -амирин (α -амиренол, урс-12-ен-3 β -ол). [97, с. 269-274]

Биосинтез стерина в растительных источниках осуществляется из уксусной и мевалоновой кислот в результате многостадийного ферментативного процесса через непосредственный предшественник – сквален, циклизация которого в организме проходит по-разному [13, с. 497-521]. Сами стерина являются предшественниками других стероидов – агликонных частей стероидных глюкозидов, регуляторов роста растений. Также они входят в состав клеточной мембраны благодаря комплексу с фитоллипидами и влияют на клеточный метаболизм растений.

На содержание и состав фитостерина влияет как наследственность, так и условия роста – температура, влага – при снижении температуры прорастания количество фитостерина уменьшается, а при повышении температуры – наоборот – увеличивается [150, с. 49-53].

Присутствуя в липидной фракции, фитостерины могут окисляться при обработке и хранении пищевых продуктов из растительного сырья. Реактивность стеринов и степень их деградации, по-видимому, зависят от структуры стерина, в основном, ненасыщенности кольцевой структуры, температуры и матричного состава [43, с. 34-37; 72, с. 161-188; 74, с. 387-388; 94, с. 141-148; 135, с. 635-638; 159, с. 465-472].

Фитостерины присутствуют во всех растительных формах сырья, данные представлены в таблице 1.

Как видно из данных таблицы 1, фитостерины присутствуют в различном растительном сырье, в том числе и зерновом, например, пшеница, ячмень и кукуруза, которое является основным для производства пива [7, с. 42]. Поэтому на составе фитостеринов зерна остановимся подробнее.

Таблица 1 – Соединения фитостеринов в растительном сырье

Источник	Содержание фитостеринов, г/кг							Ссылка
	брас-сика-стерин	кам-песте-рин	сито-сте-рин	стиг-масте-рин	аве-на-сте-рин	ста-нолы	всего	
Растительные масла								
Кукуруза (неочищенное масло)	н/о	1,69-2,59	5,41-9,89	0,58-0,98	0,1-0,36	н/о	7,80-11,40	48, с. 306-313; 56, с. 127-131; 144, с. 509-512; 148, с. 117-122
Кукуруза (очищенное масло)	н/о	1,23-1,64	4,54-5,43	0,46-0,76	0,10-0,41	0,004-0,33	1,44-9,52	107, с. 619-624; 112, с. 415-422; 113, с. 401-406; 144, с. 509-512; 148, 117-122
Оливковое холодного отжима	н/о	0,02-0,05	1,22-1,30	0-0,03	0,16-0,60	0,03-0,04	1,56-1,93	107, с. 619-624; 144, с. 509-512
Пальмовое неочищ.	н/о	0,14-0,20	0,43-0,52	0,07-0,10	0-0,03	н/о	0,69-0,79	56, с. 127-131; 144, с. 509-512
Пальмовое очищенное	н/о	0,14-0,18	0,35-0,41	0,07-0,10	0-0,03	сл	0,60-0,68	42, с. 83-88; 107, с. 619-624; 144, с. 509-512

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Арахисовое очищенное	0,01	0,24-0,38	1,15-1,69	0,12-0,22	0-0,21	0-0,03	1,67-2,29	107, с. 619-624;144, с. 509-512; 148, с. 117-122
Рапсовое неочищенное	0,55-1,11	1,56-2,93	2,84-4,20	0-0,02	0-0,13	н/о	5,13	148, с. 117-122
Рапсовое очищенное	0,51-0,92	1,64-3,00	1,38-3,95	0,01-0,16	0,06-0,36	н/о	2,50	148, с. 117-122
Соевое неочищенное	н/о	0,57-0,71	1,73-1,84	0,58-0,64	0,07	н/о	3,27	148, с. 117-122
Соевое очищенное	0,007	0,34-0,82	1,23-1,73	0,37-0,64	0,01-0,14	н/о	2,03-3,28	42, с. 83-88; 107, с. 619-624; 144, с. 509-512; 148, с. 117-122
Подсолнечное очищенное	0,02	0,27-0,55	1,94-2,57	0,18-0,32	0,19-0,56	0,04	2,63-3,76	107 с. 619-624; 144, с. 509-512
Злаки								
Ячмень	н/о	150-192	437-484	24-26	56-69	7-19	720-801	104, с. 235-245
Гречиха	н/о	93-200	775-1640	0,001-80	40	23	963-1980	104, с. 235-245; 148, с. 117-122
Кукуруза	н/о	320	1200	210	н/о	н/о	1780	127, с. 219-223; 129, с. 662-667; 148, с. 117-122
Просо	н/о	112	371	18	87	н/о	770	104, с. 235-245
Овес	н/о	32-51	237-323	11-38	15-212	н/о	350-611	76, с. 83-92; 104, с. 235-245; 165, с. 2077-2081
Рис	н/о	146	375	104	20	32	723	104, с. 235-245
Рожь	н/о	128-210	358-607	22-37	5-42	122-220	707-1134	55, с. 569-572; 104, с. 235-245
Пшеница	н/о	108-270	288-400	15-24	0-22	151-171	447-690	55, с. 569-572; 63, с. 1329-1334; 104, с. 235-245; 148, с. 117-122

Злаки обычно считаются хорошими источниками фитостеринов. Однако, между составом и содержанием фитостеринов в разных злаках, существуют различия.

Содержание общих фитостеринов в различных злаках варьируется приблизительно от 350 до 1200 мг кг⁻¹ сырого веса (св), хотя публиковались и более высокое содержание фитостеринов, особенно в более ранней литературе (Таблица 1). Исследования часто фокусировались только на нескольких образцах одного злака и представляли содержание стеридов только в процентных долях [36, с. 123-148]. Следовательно, они не осуществляют сравнение различных злаков. Прогресс в аналитических методах и различия в генетических факторах, условия роста и послеуборочная обработка могут повлиять на заявленные результаты. Только недавно начали применяться аналитические методы, способные высвобождать стериды из гликозидов, и таким образом, включать их в содержание общих стеридов [32, с. 238-241; 63, с. 1329-1334; 76, с. 83-92; 104, с. 235-245].

В Финляндии рожь содержала в среднем 955 мг кг⁻¹ фитостеринов, при этом соответствующими значениями для ячменя, пшеницы и овса были 761, 690 и 447 мг кг⁻¹ св, соответственно, когда два культурных сорта каждого их злаков отбирались из одного и того же места в одном и том же году [104, с. 235-245]. Аналогично, содержание общих фитостеринов, представленных как мг г⁻¹ липидов, показало, что овес содержал меньше фитостеринов, чем другие три злака, содержание общих стеридов во ржи, ячмене, пшенице и овсе составляло 71,2, 35,6, 42,0 и 12,1 мг г⁻¹, соответственно [42, с. 83-88]. С другой стороны, два культурных сорта овса с высоким содержанием жира (14-16% жира) содержали больше стеридов, чем два обычных культурных сорта овса (8.2–8.6% жира), 610 в отличие от 480 мг кг⁻¹ [169, с. 22-25]. Для кукурузы было недавно заявлено содержание общих стеридов 662–1205 мг кг⁻¹ [127, с. 219-223; 129, с. 662-667].

На содержание фитостеринов в злаках могут влиять как генетические факторы, так и место роста. Маатта и соавторы [76, с. 83-92] обнаружили статистически значимые различия в содержании общих стеридов в семи культурных сортах овса, которые выращивались в трех местах в Швеции, при этом в зависимости от местоположения

различий обнаружено не было. В содержании стеринов двух культурных сортов ячменя, овса, ржи или пшеницы были обнаружены всего лишь незначительные различия (7-11%), или позже, когда сравнивалось 10 культурных сортов ржи (общий диапазон 707–856 мг кг⁻¹ св) [104, с. 235-245]. Все сравниваемые образцы произрастали в одном и том же месте и в том же году. Однако, результаты, полученные в последнем исследовании, показали, что общие изменения в злаковом сырье, вызванные условиями роста, на которые повлияли место и год роста и более широкие генетические вариации, могут быть более значительными. Общий диапазон различных образцов ржи охватывал 707–1134 мг кг⁻¹ св. В двух гибридах желтозерной зубовидной кукурузы содержание общих стеринов различалось значительно; значения составили 752 и 1205 мг кг⁻¹ [127, с. 219-223]. Два других гибрида кукурузы содержали 662 и 703 мг кг⁻¹ стеринов [129, с. 662-667]. Моро и соавторы [84, с. 2869-2871] сравнили семена 49 образцов кукурузы; общие стерины различались значительно, от 1,8% до 4,4 % масла со средним значением 2,77%.

Ячмень является наиболее распространенным сырьем для производства пивоваренного солода различных типов. В ячмене фитостерины локализируются по всей зерновке и классифицируются как: некрахмальные и крахмальные липиды [61, с. 892-900]. Липидная фракция составляет в ячмене от 2 до 3%, иногда достигает 5,3%. Преимущественно (18% всего содержания) липиды содержатся в зародыше и тканях вокруг него, в эндосперме же содержится 3% всех липидов в основном в алейроновом слое, в шелухе содержание липидов достигает 5% их общего количества. В ячмене найдены такие жирные кислоты как миристиновая, пальметиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая линоленовая жирные кислоты. Ячмень также содержит 0,8 мг/г стеринов – стигмастерина, β -ситостерина, кампостерина. Они могут быть в свободной форме, также могут входить в состав гликозидов, или быть этерифицированными с другими жирными кислотами, или находиться в ацильной форме. β -ситостерин составляет 60% из всех стеринов ячменя.

При солодоращении часть липидов расходуется на дыхание при обмене веществ. Большая часть липидной фракции переходит в дробину.

В настоящее время при производстве пива в России часть солода (в среднем 15-20%) согласно ГОСТ 31711-2012 «Пиво. Общие технические условия» заменяют несоложенным зерновым сырьем, таким как ячмень, пшеница, рис, кукуруза, так как оно более дешевое по сравнению с солодом. Вносимое несоложеное зерновое сырье различается в зависимости от региона производства пива по количеству и видовому признаку. Так, для Америки более характерно применение кукурузы и риса, для Азии – риса, для Африки – сорга [9, с. 28-33].

В злаках среди фитостероинов доминирующим является ситостерин. Его доля в пшенице, ржи, ячмени и овсе варьировалась от 49% до 64% [104, с. 235-245]. В обзоре более ранних исследований Чанг и Ом [36, с.123-148] пришли к выводу о том, что доля ситостероинов в кукурузе, рисе, сорго и пшенице обычно составляет более 55%. К другим десметилам стеринам, находящиеся в значительном количестве, относятся кампестерин, стигмастерин, ситостерин, кампестерин и два авенастерина, $\Delta 5$ - и $\Delta 7$ -авенастерины. Станолы в частности находятся в пшенице и кукурузе [42, с. 83-88; 85, с. 2149-2154; 104, с. 235-245]. В пшенице ситостанолы насчитывали 9-14% и 12-16%, а кампестанол - 8-9% и 8-11% стероинов, соответственно [104, с. 235-245]. Аналогично, Дутта и Эпплквист [42, с. 83-88] заявили, что доля станолов составляла 23-26% в пшенице. В ячмене станолы не были обнаружены даже в малом количестве или не были обнаружены вообще [42, с. 83-88; 104, с. 235-245]. Доля авенастероинов значительна, в частности, в овсе [36, с. 123-148; 42, с. 83-88; 65, с. 16-17; 77, с. 171-172]. $\Delta 5$ -Авентастерины насчитывали 21-26%, а $\Delta 7$ -авенастерин - 5-8% общих фитостероинов [42, с. 83-88; 104, с. 235-245].

Монометил и диметил стеринны находятся в более малых количествах. Соотношение 4-десметиловых, 4-монометиловых и тритерпеновых спиртов/диметил стериннов составляло 85:3:12 в зерне пшеницы [95, с. 84-89]. Зерна сорго содержали 394 мг кг⁻¹ сухового веса (схв) десметил стериннов, когда содержание монометил стериннов

составляло 12,54 мг кг⁻¹ [97, 269-274]. Грамистерин, цитростадиенол и обтусифолиол были обнаружены как основные монометил стеринны в пшенице [95, с. 84-89] и в рисовых отрубях [71, с. 685-689]. Циклоартенол и 24-метилен циклоартанол являются диметил стеринами, обычно находимыми в злаках [36, с. 123-148; 71, с. 685-689; 97, с. 269-274; 104, с. 235-245].

Содержание фитостеринов исследовалось в помоле различных частей зерна. Значительные различия обнаружены в содержании фитостеринов в различных частях зерна и таким образом в различных продуктах помола. Такие фракции зерна, как зародыш и отруби, известны как наилучшие источники стериннов среди продуктов помола. Было отмечено, что содержание фитостеринов в продуктах помола ржи и пшеницы, по-видимому, взаимосвязано с их содержанием золы (Рисунок 2). Содержание общих стериннов 726–839 мг кг⁻¹ св в зернах пшеницы дало содержание общих стериннов 398-430 мг кг⁻¹ в наиболее переработанной муке (0,6% золы) и 1680-1770 мг кг⁻¹ в отрубях (4% золы). Наиболее высокие содержания, 4114 мг кг⁻¹, были обнаружены в зародышах пшеницы [104, с. 235-245]. Для пшеничных отрубей диапазон в недавних исследованиях составил 1479–1951 мг кг⁻¹ [55, с. 569-572; 77, с. 171-172; 104, с. 235-245; 127, с. 219-223; 129, с. 662-667; 169, с. 22-25]. С другой стороны, стеринны концентрируются во фракции отрубей овса [39, с. 581-583; 55, с. 569-572; 104, с. 235-245]. Содержание, обнаруженное в овсяных отрубях, составляло только 446 мг кг⁻¹ [104, с. 235-245] и 557-620 мг кг⁻¹ [55, с. 569-572]. Дутта и Эплквист [42, с. 83-88] определили концентрацию 9,4 мг г⁻¹ липидов овсяных отрубей, при этом концентрация в пшеничных отрубях была 44,9 мг г⁻¹.

Следует отметить, что помимо содержания общего фитостерина, состав стериннов также отличается в зависимости от различных частей зерна (наличие связанных конъюгатов). В пшенице и кукурузе станола концентрируются во внешних слоях зерна, при этом они практически отсутствуют в зародышах. В пшенице соответствующие значения для муки с 0,6% и 1,2% золы составили 14-15%, а для отрубей - 32% [104, с. 235-245]. В зародышах коммерческой пшеницы станола определялись только

в низком содержании, т.е. менее 1-3% [42, с. 83-88; 104, с. 235-245]. Станолаы не были обнаружены в зародышах кукурузы, разрезанных вручную, в которых в группу ситостеринов входили 71% этих соединений [85, с. 2149-2154]. В алейроне и фракция волокна главным стеринном был ситостанол (51% и 43%), а ситостерин насчитывал 21% и 34%, соответственно. Доля кампестерина также была значительной, 19% и 15%.

Фитостерины находятся в злаках в виде свободных стериннов (CC), эфиров с жирными кислотами (SE) и фенолокислотами (SPHE; главным образом стерил ферулаты, SFE), гликозиды (SG) и ацилированные гликозиды (ASG). Наличие этих классов варьируется среди различных злаков и в различных частях зерна.

Чанг и Ом [32, с. 238-241] осуществили обзор более ранних исследований и рассчитали, что в просе доля CC была наивысшей, 5,4% общих липидов, при этом SE, SG и AGS насчитывала 3%, 0,4% и 1,0%, соответственно. В двух более поздних исследованиях по кукурузе SE оказалось главным классом стерил липидов.

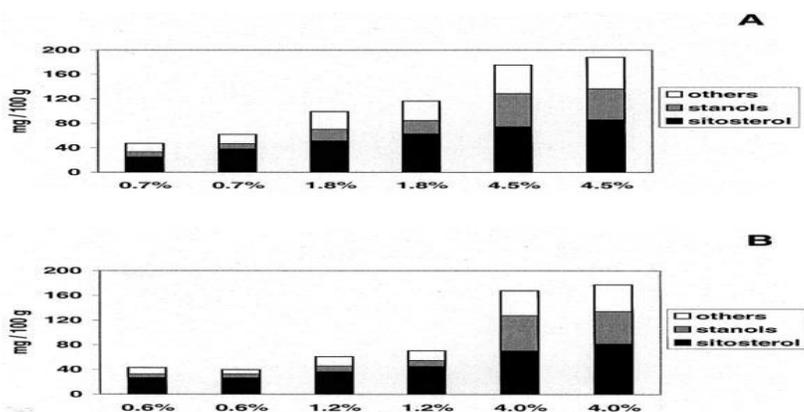


Рисунок 2 – Фракционирование фитостеринов в процессе измельчения ржи (А) и пшеницы (В) [104, с. 235-245]

Два гибрида кукурузы с общим содержанием фитостеринов 1,78% и 2,23% масла содержали 1,06-1,28% SE, 0,56-0,71% CC и 0,16-0,24% SFE в масле [127, с. 219-223]. Два других гибрида содержали 300-318 мг кг⁻¹ SE, 268-272 мг кг⁻¹ CC и 94-112

мг кг⁻¹ SFE [129, с. 662-667]. В семенах 49 образцов кукурузы SE и SFE значительно отличались, SE - от 0,76% до 3,09% масла (среднее значение 1,5%), а SFE - от 0,087% до 0,839% (среднее значение 0,27%). Доля СС составила 1% [84, с. 2869-2871]. Кроме того, сравнение ржи, ячменя, пшеницы и овса показало, что распределение конъюгатов стерина различается в зависимости от этих злаков (Рисунок 2); в SE ржи и ячменя были главным классом стерина, при этом в пшенице доминировали СС [140, с. 140-144]. С другой стороны, в овсе доля стерина, высвобожденных только после кислотного гидролиза, была намного больше, чем в других анализируемых злаках.

Локализация конъюгатов сильно различается в разных частях зерна кукурузы. Их распределение в разрезанных вручную фракциях алейрона, волокна, зародыша и перикарпия исследовалось Моро и соавторами [85, с. 2149-2154]. В алейроне (содержание масла 5,9%) концентрации SE, СС и SFE составили 3,37%, 0,51% и 6,31% масла; в волокне (содержание масла 1,9%) - 5,88%, 2,14% и 5,73%, в зародыше (содержание масла 40%) - 0,47%, 12,09% и 1,72%. Таким образом, во фракциях алейрона и волокна доминировали SE и SFE, при этом в зародыше доминировали SE и СС и находились в равных количествах. В перикарпии доминировал СС. Кроме того, восстановление классов стерина в продуктах помола кукурузы значительно зависело от применимых процессов [80, с. 1021-1027; 126, с. 123-128; 127, с. 219-223; 129, с. 662-667; 130, с. 436-441]. Фаррингтон и соавторы [46, с. 383-391] заявили, что некоторые изменения могут возникать в составе класса стерина при хранении. При длительном хранении (5 лет) пшеничной муки (три типа) содержание общего стерина оставалось неизменным, но содержание свободных стерина снизилось, а сложных эфиров увеличилось; содержание СС составляло 28-128 мг кг⁻¹ в начале и 8-90 мг кг⁻¹ после 5 лет, при этом содержание SE повысилось от 86-306 мг кг⁻¹ до 214-321 мг кг⁻¹.

По аналогии с содержанием общих стерина, конъюгаты стерина также варьируются в рамках одного и того же злака. В волоконном масле 16 гибридов кукурузы содержание SE варьировалось от 6,5% до 9,5%, СС - от 1,9% до 4,3%, а SFE - от 2,9%

до 9,2% [128, с. 305-307]. Между содержанием трех классов фитостеринов существовала значительная связь; увеличение количества любого из трех классов указывает на увеличение содержания двух других классов. Кроме того, значительные различия наблюдались в содержании трех классов фитостеринов в одном и том же гибриде, выращиваемого в различных местах. Эти различия могли относиться к ряду факторов, включая погоду, плодородность почвы, агроприемов или других факторов. Доли всех классов фитостеринов увеличивались с уменьшением содержания влаги при уборке урожая [131, с. 868-872].

Состав стероинов может отличаться в некоторой степени в СС и конъюгатах. В сорго десметил стероиды находились в виде СС, SE и SG, но монOMETИЛ стероиды были полностью свободными. Большая часть стигмастеринов находилась скорее в свободной форме, чем в виде сложных эфиров или гликозидов [97, с. 269-274]. В пшенице доля ситостеринов составила 65,5% в СС и 71,8% в SE, а соответствующими значениями для кампестерина были 26,0% и 22,8% [95, с. 84-89]. Эти авторы также наблюдали некоторые различия в монOMETИЛ и диметил стероидных. Как было проанализировано позже, состав стероидных SPHE значительно отличался от состава других классов стероидных.

SPHE представляют особый класс фитостеринов, которые представляют особый интерес в кукурузе и рисе. В случае с рисом этот интерес привел к коммерческому продукту γ -оризанолу, который является смесью, содержащей в основном диметил и десметил стероиды в виде эфиров феруловой кислоты [45, с. 1395-1399; 93, с. 927-930; 115, с. 287-295; 167, с. 1072-1076]. Влияние γ -оризанола на здоровье было широко изучено [116, с. 929-935; 123, с. 112; 153, с. 334-343; 167, с. 1072-1076]. SPHE также были изучены в виду своего антиоксидантного действия [67, с. 943-951; 70, с. 451-462; 158, с. 994-999; 165, с. 2077-2081].

В кукурузе основными SPHE оказались ситостанил и кампестанил ферулаты; также было обнаружено более низкое содержание ситостерил и кампестерил ферулатов, а также незначительное количество ситостанил и кампестанил *p*-кумаратов [125,

с. 561-566]. Позже в кукурузных отрубях в общем было обнаружено 16 соединений [92, с. 581-586]. Сложные эфиры ситостанила и кампестанила насчитывали 80,8% стеринов в SPHE, при этом только 10,7% составляли ситостерин, кампестерин и стигмастерин, являющиеся наиболее важными стеринами в других классах стероидов. Нортон [93, с. 927-930] показал, что ситостанил ферулат насчитывал 64-85% SPHE в отрубях кукурузы и соответствующих фракциях.

SPHE высоко локализируются в зерне кукурузы. Зайтц [124, с. 35-39; 125, с. 561-566] заявил, что они локализируются во внутреннем слое перикарпия. Следовательно, SPHE считались соединениями, устойчивыми к патогенам зерна, как в отношении грибков, так и насекомых [116, с. 929-935]. Недавние исследования Моро и соавторов [85, с. 2149-2154] и Сингха и соавторов [126, с. 123-128] показали, что SFE кукурузы сконцентрированы в оноклеточном слое алейрона. Исследования с разрезанием вручную показали, что 96% SFE, 64% CC и 90% SE грубого волокна располагались в слое алейрона.

Значительные различия наблюдаются между кукурузными отрубями (полученными сухим помолом) и волокном (полученного мокрым помолом). В отрубях содержание SPHE составляло 93,9 мг кг⁻¹ [92, с. 581-586], а в отрубях и связанных продуктах - 70-540 мг кг⁻¹ [93, с. 927-930]. Позже влияние процессов помола кукурузы на выход SFE было широко изучено [80, с. 1021-1027; 81, с. 400-406; 83, с. 531-536; 126, с. 124-128; 127, с. 219-223; 129, с. 662-667; 130, с. 436-441]. Масло, экстрагируемое из волокна кукурузы, может содержать до 6,75% SFE [108, с. 148-154]. Различные процессы дали уровни 200-260 мг кг⁻¹ в отрубях (1,3-1,8% в масле) и 440-1530 мг кг⁻¹ в волокне (1,7-5,7% масла) [83, с. 531-536]. Другие исследования процедур помола дали волокно кукурузы с содержанием SFE 1,06-5,89% в масле [127, с. 219-223; 130, с. 436-441]. С помощью экстрагирования сверхкритической жидкости совместно с фракционированием сверхкритической жидкости были также обогащены SFE кукурузных отрубей [139, с. 98-99] и волокна кукурузы [138, с. 775-786].

В SPHE рисовых отрубей состав стерина исключительный, по сравнению с составом общего стерина в зернах риса. Диметил стерина доминируют во фракции SPHE [45, с. 1395-1399; 93, с. 927-930; 115, с. 287-295; 164, с. 2724-2728]. Тремя основными соединениями являются циклоартенил, 24-метилен циклоартанил и кампестерил ферулаты [93, с. 927-930; 115, с. 27-295; 164, с. 2724-2728]. Кроме того, Сюй и Гобер [164, с. 2724-2728] определили семь других ферулатов в γ -оризаноле. Концентрация общего SPHE в коричневом рисе (без шелухи) составляла 456 мг кг⁻¹ зерен [82, с. 475-462] и в рисовых отрубях 3,4 г кг⁻¹ отрубей или 15,7 г кг⁻¹ масла [93, с. 927-930]. Намного более низкие содержания были обнаружены в коммерческих маслах [93, с. 927-930]. В побочном продукте помола риса, пыли от шелушения риса, уровень общего SPHE составил 1,19 г кг⁻¹ [55, с. 569-572], в рисовых отрубях, стабилизированных прессованием - 3,0-3,1 г кг⁻¹ [133, с. 665-668] и в рафинированном масле из рисовых отрубей - 115-787 мг кг⁻¹ [115, с. 287-295]. Оризанола были относительно устойчивыми к температуре прессования, но увеличение температуры прессования снизило удержание оризанола при хранении рисовых отрубей [133, с. 665-668]. Отруби риса-сырца потеряли 16,4% оризанола при хранении в течение 35 дней и 62,7% после 1 года. Для получения хорошего урожая γ -оризанола были разработаны способы экстрагирования [38, с. 287-293; 41, с. 177-181; 118, с. 257-263; 131, с. 868-872; 132, с. 692-695; 163, с. 547-551]. С помощью экстракции сверхкритической жидкости выход γ -оризанола был 5,39 г кг⁻¹ в рисовых отрубях [163, с. 547-551].

SPHE также находятся в значительном количестве во ржи, пшенице и тритикале [55, с. 569-572; 82, с. 455-462; 125, с. 561-566]. В пшенице и ржи основным компонентом был кампестанил ферулат, далее - ситостанил ферулат [55, с. 569-572; 125, с. 561-566]. Кроме того, обнаружены кампестерил и ситостерил ферулаты. Те же соединения, кампестанил и ситостанил ферулат, были основными компонентами в тритикале [125, с. 561-566]. В пшеничном зерне была определена концентрация общего SFE 62-123 мг кг⁻¹ (Зайтц), 53 мг кг⁻¹ (пшеница без шелухи) [82, с. 455-462] и 62-63 мг кг⁻¹ [55, с. 569-572]. Соответствующие значения для ржи составили 29 мг кг⁻¹ [125, с. 561-566]

и 55-64 мг кг-1 [55, с. 569-572], а для тритикала - 52 мг кг-1 [125, с. 561-566]. В пшенице и ржи стерил ферулаты локализовались во фракции отрубей; в пшеничных отрубях содержание было 30-39 мг кг-1, при этом в муке с 0,6% золы были обнаружены только следы [55, с. 569-572]. Аналогично в отрубях ржи было обнаружено 15-25 мг кг-1 SFE, и только следы в муке с 0,7% золы. Интересно, что в овсяных отрубях, или зернах овса или проса [82, с. 455-462] не было обнаружено стерил ферулатов [55, с. 569-572]. Во ржи без шелухи было обнаружено небольшое количество [82, с. 455-462].

Таким образом, фитостерины присутствуют во всем зерновом сырье, используемом для пивоварения. Количественный и качественный состав фитостеринов сильно зависит от типа зернового сырья, а также от условий его уборки и хранения. Еще одним важным видом сырья, без которого невозможен процесс производства пива, является хмель. Он широко распространен в мире и применяется не только для осветления и стерилизации сусла в классическом понимании, но и для расширения вкусового спектра с целью создания множества рецептур пива. Применение различных сортов хмеля позволяет добиться как тонкого хмелевого аромата, так и довольно ощутимой хмелевой горечи для более плотных сортов пива.

В хмеле содержатся такие важные для пивоварения компоненты, как горькие хмелевые смолы, эфирные масла и дубильные вещества (Таблица 2) [9, с. 58-64]. Шишки хмеля содержат также липиды и воски, сахаров, пентозанов, витаминов и органических кислот.

Таблица 2 – Химический состав высушенных хмелевых шишек (в среднем %)

Вода	10 – 14
Клетчатка	12 – 16
Азотистые вещества	15 – 24
Безазотистые экстрактивные вещества	25 – 30
Зола	6 – 9
Хмелевые смолы	10 – 20
Альфа – кислоты	2 – 16
β – фракция	6 – 9

Продолжение таблицы 2

γ – твердые смолы	2 – 3
Полифенольные (дубильные) вещества	2 – 5
Эфирные масла	0,2 – 3,8

В технологии пивоварения хмель оценивается с точки зрения наличия в нем горьких веществ - мягких смол (α -горькие кислоты –гумулоны, и β -горькие кислоты –лупулоны), неспецифических мягких смол (резупоны) и твердых смол, которые обуславливают хмелевую горечь пива вместе с полифенолами.

В составе хмеля также были обнаружены фитостерины. Вещества исследовались методом фотоколориметрирования и не разделялись на фракции. При максимуме светопоглощения при 260 нм, массовая доля фитостеринов в экстрагированном масле в расчете на этинилэстрадиол составила 18,7 %, а в расчете на исходный CO_2 экстракт, которых был объектом исследования [8, с. 56-64], массовая доля эстрогеноподобных веществ была равна 2,3 %.

Необходимо отметить, что содержание фитостеринов в зерновом сырье и хмеле, применяемом в пивоварении, изучены до некоторой степени. Рассмотрим влияние фитостеринов на процесс пивоварения.

1.2 Влияние фитостеринов на процесс пивоварения

В технологии пива основным сырьем является солод ячменный пивоваренный различных типов (светлый, темный, карамельный, жженный и т.д. для производства светлого и темного пива), несоложеное сырье (ячмень, пшеница, рис, кукуруза) и продукты их переработки, сахаросодержащее сырье (сахар, глюкозо-мальтозные сиропы и т.п.), хмель, дрожжи и вода [9, 37-98].

Рассмотрим основные стадии пивоварения.

Солодоращение – процесс приготовления солода из ячменя путем замачивания,

проращивания и сушки, температурный режим которого варьируется в зависимости от типа получаемого солода. Целью солодоращения является наиболее полное растворение веществ эндосперма ячменя для того, чтобы максимально полно извлечь экстрактивные вещества на стадии получения сусла (затирации).

Затирание зернопродуктов – смешивание помола солода и несоложенного зерна в различном соотношении с водой при гидромодуле 1:4 соответственно и экстрагирование экстрактивных веществ сырья при различных температурах (обычно от 43 до 78°C) согласно оптимуму действия ферментов солода, растворяющим наиболее крупные соединения, до конца не гидролизованные при солодоращении, способствующие также полному осахариванию сусла, то есть переходу крахмальных декстринов в три-, ди- и моносахариды.

Кипячение сусла – процесс осветления и обеззараживания отфильтрованного сусла путем его кипячения с хмелем и хмелепродуктами. На этой стадии белковые соединения, нестабильные вследствие своей полимерной структуры, взаимодействуют с полифенолами хмеля и оседают в виде бруса, осветляя сусло, а горькие вещества переходят из хмеля в сусло, таким образом, дезинфицируя его, также в сусло переходят и другие растворимые вещества хмеля.

Брожение сусла – процесс смешивания охмеленного охлажденного сусла и дрожжей и брожение при различных температурах в зависимости от применяемых дрожжей – низовых – при 7-9°C, верховых – при 13-15°C. На этой стадии экстрактивные вещества сусла, в основном аминокислоты и сахара, потребляются дрожжами для роста, деления и брожения, способствуя накоплению в сбраживаемой среде этилового спирта, углекислого газа и других вторичных продуктов брожения, не менее необходимых для получения сбалансированного с точки зрения органолептики пива. Дображивание – процесс выдержки снятого с дрожжей молодого пива и продолжению процессов брожения, связанных с преобразованием вторичных продуктов брожения, осветлению пива, накоплению и растворению углекислого газа и т.д.

Фильтрация, карбонизация, пастеризация – финальные стадии производства

пива, связанные с его осветлением, насыщением углекислотой и стабилизацией при повышенных температурах для длительного хранения с целью сохранения стабильного качества пива [7, с. 153-157]. Липидная фракция, которая содержится в основном сырье для производства пивоваренного солода – ячмене, в течение солодоращения претерпевает изменения и попадает в сусло при затирании.

При проращивании зерно теряет до 30% липидной фракции вследствие их гидролиза и расходования на синтез корешка и ростка, а также характерного аромата свежепросоженного солода [14, с. 49-58]. Липидный состав сусла зависит как от содержания жиров в зернопродуктах и соотношения между их фракциями, так и от режима затирания [10, с. 16-17]. При затирании часть липидной фракции, содержащейся в солоде, расщепляется под действием соответствующих ферментов (липаз) с выделением глицерина, фитостеринов и жирных кислот. Образовавшиеся фитостерины и ненасыщенные жирные кислоты далее претерпевают ферментативное (под действием липоксигеназы) и окислительное (при участии кислорода) расщепление с образованием прекурсоров карбониллов старения, которые обуславливают пороки вкуса пива. При затирании растворяются и насыщенные жирные кислоты, содержащиеся в зернах крахмала (амилопластах) в количестве 5-7%. Мутное сусло, полученное в результате недостатков при фильтровании затора, плохое отделение взвесей сусла - все это приводит к переносу в сусло свободных жирных кислот и фитостеринов, которые могут приводить к проблемам при фильтровании пива. Поэтому необходимо контролировать липидный состав сусла [1, с. 15-18; 4, с. 12-25], что позволит спрогнозировать более высокую вкусовую стабильность пива (Таблица 3).

Таблица 3 – Липидный состав сусла [2, с. 141-153].

Фракция	Содержание, мг/дм³	Фракция	Содержание, мг/дм³
Фосфолипиды	51,1	Жирные кислоты	61,8

Продолжение таблицы 3

Стерины	25,6	Триглицериды	51,1
Диглицериды	89,5	Эфиры стеролов	112,0

Источник: составлено на основе [2, с. 141-153].

Детальные исследования показали [4, с. 12-25; 22, с. 10-18], что на стадии кипячения сусла с хмелем многие производители, пытаясь сэкономить на энергозатратах, проводят недостаточно длительное кипячение сусла, в результате чего вследствие наличия диметилсульфида и других соединений могут возникнуть дефекты вкуса.

Во время термической выдержки протекает множество реакций. С одной стороны, вследствие распада жиров возникают ароматические вещества, которые частично удаляются с парами, с другой стороны в результате протекания реакции Майяра, образуются ароматические вещества, которые также потом испаряются, но затем вновь образуются, и оказывают влияние на вкус и стабильность вкуса пива.

На производстве для оценки термической нагрузки на сусло, эффективности системы кипячения наибольшее значение имеет определение аналитическими методами числа тиобарбитуровой кислоты (ТБЧ) и содержания 2-фурфурола, свободного ДМС или коагулируемого азота.

Необходимо отметить, что число тиобарбитуровой кислоты имеет отношение к окислительным реакциям липидов и характеризует их степень окисления. Чем оно больше, тем больше концентрация окисленных липидов и тем большее негативное влияние на вкус оказывается с их стороны. Нормальная разница показателя TBZ 10-15 для начала и конца кипячения 12% сусла.

При охмелении сусла содержание липидной фракции увеличивается в 2-3 раза за счет перехода в сусло жировых веществ хмеля, которые в процессе охмеления сусла частично осаждаются с белково-дубильным комплексом [10, с. 123-133].

Содержание хмелевых восков и липидов составляет в хмеле около 3% [15, с. 67-82; 17, с. 202-204], причем фракции фитостеринов, высоко- и среднемолекулярных

фракций свободных жирных кислот во время хранения хмеля увеличивают свою концентрацию, что также отрицательно влияет на стабильность вкуса пива.

В процессе брожения липидам принадлежит двоякая роль – с одной стороны дрожжи в 4-6 раз увеличивают свою массу, и с этой целью должно быть синтезировано соответствующее количество липидов, при этом необходим кислород [9, с. 363-369]. С другой стороны, дрожжи усваивают жирные кислоты и фитостерины из сусле, хотя могут синтезировать их и самостоятельно.

90% свободных жирных кислот сусле представлены высокомолекулярными жирными кислотами: пальмитиновой (16:0), линолевой (18:2), стеариновой (18:0) и олеиновой (18:1). С содержанием в пиве жирных кислот с числом углеродных атомов 6-10 связывают появление запахов и привкусов, ассоциирующихся с мыльными, масляными, жирными, прогорклыми и козлиными оттенками [12, с. 8-12].

В процессе брожения изменяется не только качественный, но и количественный состав кислот, в частности их общее содержание возрастает на 13-65%: с 5-7 мг/л в сусле до 6-12 мг/л в пиве. Это объясняется тем, что дрожжи ассимилируют непредельные длинноцепочечные жирные кислоты, а короткоцепочечные выделяются из клеток в пиво при их автолизе.

Фитостерины, находящиеся в сусле, при брожении, могут выполнять роль ростовых веществ, поскольку являются провитамином Д, что необходимо для нормального процесса размножения и брожения [11, с. 5-14]. В растениях провитаминами группы Д являются кампестерин, ситостерин, стигмастерин. Дрожжи синтезируют микостерин – эргостерин, который обнаружен в клеточных мембранах грибов и простейших, и выполняет многие функции, схожие с функциями холестерина в клетках животных. Эргостерин также является провитамином Д₂ [6, с. 25-42].

При концентрации глюкозы в сбраживаемой среде, превышающей 0,1 г/л, кислород важен не как акцептор водорода в цикле трикарбоновых кислот, но как необходимый элемент для синтеза ненасыщенных жирных кислот и стероидов, чрезвычайно важных для размножения самих дрожжей [11, с. 5-14].

Стерины в дрожжах синтезируются из сквалена. Существует значительное количественное и качественное отличие между аэробно и анаэробно разброженными дрожжами. Так, анаэробные дрожжи обнаруживают значительное содержание сквалена и пониженное содержание стеринов, в то время как аэробные, наоборот.

Стерины в большинстве случаев представлены в виде эфиров. В наибольшем количестве встречается цимостерин у аэробно выросших дрожжевых клеток, а именно 5 мг на 1 г сухого вещества. Синтез стерина, который начинается уже через полчаса после внесения дрожжей, тесно взаимосвязан с их ростом. Если аэрируются сами дрожжи, то одновременно начинается преобразование сквалена. 1 мг образующегося стерина соответствует биосинтезу 1000 мг сухого вещества дрожжей. Очевидно, что синтез стерина лимитирован внутриклеточной концентрацией, т.е. он прекращается, когда концентрация достигает определенной величины.

Существует также связь синтеза стеринов с запасом гликогена в клетке. На накопление гликогена в дрожжах во время брожения расходуется примерно 0,25 % экстракта. К началу брожения наблюдается стехиометрическая взаимосвязь между израсходованным гликогеном и образовавшимся стеринном. На каждый грамм гликогена образуется порядка 69 мг стерина. Если же после созревания в дрожжах мало гликогена, то дальнейшее брожение происходит медленнее.

Бродильная активность дрожжей взаимосвязана со скоростью их размножения, которая важна для быстрого сбраживания суслу. Скорость роста и размножения клеток, в свою очередь, зависит от сбалансированности состава суслу (содержания в нем α -аминного азота, факторов роста и некоторых микроэлементов), наличия в нем растворенного кислорода (более 8 мг/дм³). При недостатке стеринов поглощение аминного азота становится невозможным, даже при достаточном количестве аминного азота в среде [14, с. 307-308]. Насыщенные жирные кислоты активируют важные для реакции фосфорилирования АТФ-ферменты, внося свою лепту в расщепление глюкозы по схеме Эмбедена-Мейергофа-Парнаса.

Таким образом, фитостерины могут переходить в готовое пиво практически из

всех видов сырья, количественный и качественный состав фитостеринов при этом может меняться на различных стадиях производства. На этапах транспортировки и хранения могут протекать процессы, оказывающие влияние на состав и качество готового пива. В зависимости от природы возникновения эти процессы могут подразделяться на физические, физико-химические, химические. Физические и физико-химические протекают под воздействием температуры, относительной влажности воздуха, света, механических воздействий. Старение продуктов гидролиза белков и углеводов сопровождается снижением прочности межмолекулярных связей в продуктах гидролиза и нарушением коллоидного равновесия в водно-спиртовой среде. Изменение дисперсности коллоидов может являться причиной помутнения пива, при этом ухудшаются органолептические и физико-химические показатели, может выпадать осадок из веществ различной природы. К химическим процессам относятся окисление и прогоркание жиров, а также неферментативное потемнение продуктов в результате реакций меланоидинообразования (это окислительно-восстановительный процесс, способствующий образованию ромежуточных соединений, в основном альдегидов) [12, с. 8-12]. В процессе хранения пива происходят химические и физико-химические изменения его состава. В результате этого процесса происходит нарушение гармоничности восприятия напитка: снижается его горечь, пропадает ощущение свежести. Вещества, отвечающие за изменение запаха и вкуса при хранении пива приведены в таблице 4 [12, с. 8-12, 24].

Таблица 4 - Некоторые вещества, отвечающие за вкус пива

Компонент пива	Порог ощущения, мкг/л	Влияние на пиво	Запах и привкус
1	2	3	4
p-Метан-8-тиол-3-он	0,015	Признак состарившегося пива	Окисленного пива, листьев черной смородины, томатов, резины, кошачий запах

Продолжение таблицы 4

Изомасляный альдегид	1000	Признак порока вкуса пива	Орехов, миндаля, марципана
2,6,4-Трихлоранизол	0,025	Признак порока вкуса пива	Затхлый запах, запах корковой пробки
2-Этилфенхлор	5	Порок вкуса пива	Свежевскопанной земли, актиномицетов, кизельгура
2-метилбутаналь	1300	Признак состарившегося пива	Солодовый, хлебный, сусловый, фруктовый, запах и привкус
3-метилбутаналь	600		
2-фенилэтаналь	-		Хлебный запах и привкус
2-фурфурол	100-150		
5-метилфурфурол	17		
2-метилпропаналь	10		
Транс-2-ноненаль	0,11	Порок вкуса, признак старения	Бумажный, хлебный (старых хлебных крошек), картона, старого пива, окисленный запах
Ацетальдегид	10000	Индикатор высокой концентрации кислорода в пиве	Запах молодого, несозревшего пива, затхлый запах
3-метил-2-бетен-1-тиол	0,004	Порок вкуса, индикатор «старого» хмеля	Запах скунса, «засвеченный» запах
Изовалериановая кислота	1000	Индикатор «старого» хмеля, важная характеристика некоторых сортов хмеля	Запах и привкус старого хмеля, несвежего сыра, запах пота

Далее в таблице 5 приведены технологические стадии производства, в которых могут образовываться вышеперечисленные соединения, отвечающие за пороки вкуса пива.

Из всех перечисленных соединений, связанных с пороками вкуса пива, с липидной фракцией, в которую входят фитостерины, связан транс-2-ноненаль [1, с. 15-18; 12, с. 25-28]. Он ощущается при пороговой концентрации более 0,10 мкг/л. Данное соединение относится к алифатическим ненасыщенным альдегидам, и его образование связано с окислением липидной фракции и превращением жирных кислот. Син-

тез данного соединения может происходить ферментативным, неферментативным путем, при авто- и фотоокислении жирных кислот [12, с. 25-32].

Таблица 5 – Стадии производства пива, ответственные за образование веществ, связанных с образованием вкуса пива

Компонент пива	Запах	Технологическая стадия
p-Метан-8-тиол-3-он	Кошачий	Солодоращение, затираание, кипячение (кислород, термическая нагрузка) Ведение дрожжей Технология и оборудование розлива Материал упаковки Величина рН затора, промывных вод Контакт с дробинкой
Изомасляный альдегид	Ореховый	
2,6,4-Трихлоранизол	Затхлый	
2-Этилфенхлор	Земляной	
2-метилбутаналь	Хлебный, солодовый, сусловый, зерновой, фруктовый, специй	
3-метилбутаналь		
2-фенилэтаналь		
2-метилпропаналь		
Транс-2-ноненаль	Бумажный	Режим сушки солода Температура и рН затора Величина рН промывных вод Контакт с дробинкой
2-фурфурол	Хлебный	Режим сушки солода; Кипячение суслу с хмелем (при температуре выше 80°C); Окисление в готовом продукте (кислород, температура)

При солодоращении и затираании транс-2-ноненаль образуется ферментативном путем при участии липазы и липоксигеназы, которые гидролизуют высшие жирные кислоты, что может приводить к прохождению в сусле ферментативного и радикального окисления. Индикатором ферментативного окисления липидов является липоксигеназа.

Свободные ненасыщенные жирные кислоты, глицерин и фитостерины под действием фермента липоксигеназы превращаются в гидропероксиды и пероксиды жирных кислот, являющиеся прекурсорами образования транс-2-ноненала.

Окисление веществ липидной фракции, в том числе фитостеринов, может проходить под действием света, повышенной температуры, кислотности, ионов металлов.

Вещества липидной фракции, оставшиеся в сусле после удаления белковых взвесей на стадии охмеления сусла, окисляются в пиве по радикальному механизму. В результате возникают гидропероксижирные кислоты и новые активные радикалы. Гидроперекиси под действием света, температуры, катализаторов расщепляются до карбонильных соединений и кислот [33, с. 31-36]. В течение этого процесса образуются насыщенные (пентаналь, гексаналь и т.д.) и ненасыщенные (транс-2-ноненаль) альдегиды, кетоны (2-пентанон, 2-гексанон, 2-гептанон, 2-нонанон и т.д.), лактоны, фураны при катализе ионов тяжелых металлов, в частности меди.

Также важным с точки зрения образования транс-2-ноненала является вторичное автоокисление альдегидов, связанное со снижением горечи пива при его хранении. Причиной этого является окисление изогумулонов, в котором принимает участие кислород [32, с. 238-241; 35, с. 427-460].

Таким образом, существует заметное влияние небольших количеств липидной фракции, в том числе ненасыщенных жирных кислот и фитостеринов, на качество, стабильный вкус и пороки вкуса пива.

В таблице 6 приведены стадии процесса пивоварения, которые являются критическими точками для возникновения проблем, связанных с окислением веществ липидной фракции.

Как видно из таблицы 6, контролируются различные показатели, но не содержание ненасыщенных жирных кислот.

Как следует из вышесказанного, роль фитостеринов, как сопутствующих веществ неомыляемой фракции липидов, различна.

В составе жиросодержащих продуктов (молоко, масла, маргарины и др. продукты, в том числе на их основе) они выполняют антиоксидантную функцию для предотвращения окисления жиров [2, с. 141-153]. В составе растений стерины защищают их от теплового удара, для этого требуется на 100 г продукта 700 мг стерола или

0,7% [3, с. 30-35]. Необходимо отметить тот факт, что в составе пива фитостериновая фракция столь количественно мала, что не может выполнять функции антиоксидантных веществ вследствие, во-первых, недостаточного количества (для сравнения – по мнению ученых, эффективное потребление фитостеринов в сутки должно составлять 340 мг против 85 мг полифенольных соединений для достижения значимого эффекта [3, с. 30-35]), во-вторых, стерины растительного происхождения менее устойчивы по сравнению со стеринами животного происхождения в кислой среде и разрушаются, теряя свои протекторные свойства [3, с. 30-35].

Таблица 6 – Проблемы, связанные с выделением высших жирных кислот по стадиям производства пива, и контролируемые параметры для их мониторинга

Стадия	Проблема	Негативные последствия	Контролируемые параметры
Фильтрация затора	Получение мутного сусла, плохая фильтрация	Образование гидро-оксикислот, гидропероксидов, а также соединений, влияющих на стабильность вкуса пива	Йодное число, прозрачность, содержание сухих веществ, температура
Охмеление сусла	Недостаточное удаление бруса сусла, мутное сусло	Превращение жирных кислот при брожении из бруса, ухудшение вкуса пива	Горькие вещества изомеризованные и неизомеризованные, мягкие смолы, pH сусла, содержание сухих веществ
Охлаждение сусла	Проблема частичного удаления взвесей охлаждающегося сусла	Плохое брожение вследствие дефицита ненасыщенных жирных кислот	Температура сусла
Брожение: - начало	Недостаток высших жирных кислот приводит к замедлению брожения, нарушению выделения вторичных продуктов брожения	Несбалансированный вкус пива	Содержание сухих веществ, кислотность сбраживаемого сусла
- конец	Автолиз, выделение жирных кислот и их сложных эфиров	Ухудшение вкуса пива, а также его пенообразующих свойств	Содержание сухих веществ

Продолжение таблицы 6

Готовое пиво	Пороки вкуса, недостаточное пенообразование	Превращения высокомолекулярных жирных кислот	Содержание действительного экстракта, спирт, цвет, кислотность, уровень CO ₂
--------------	---	--	---

Таким образом, можно констатировать тот факт, что в течение хранения пива при сдвиге коллоидного равновесия и повышения кислотности пива, фитостерины являются дополнительным источником возникновения веществ, влияющих на органолептическую нестабильность пива, поскольку их малое количество и неустойчивость в кислой среде приводит к их деструкции. Необходимо отметить, что антиоксидантная активность фитостеринов в 4 раза ниже, чем у полифенолов, а, как известно, содержание полифенолов в пиве гораздо большее, чем фитостеринов, и даже при существенном их количестве, в ряде случаев полифенолы не предотвращают коллоидного помутнения пива при хранении.

1.3 Анализ фитостеринов в растительном сырье и пиве

Анализ фитостеринов в растительном сырье и пиве - сложная задача, поскольку эти соединения находятся как в виде свободных спиртов, в так и в виде различных конъюгатов, и, следовательно, могут быть с легкостью экстрагированы или, наоборот, крепко связаны с липидной фракцией растительной матрицы.

Значительные усилия были предприняты для разработки надежных, простых и экономичных методов анализа фитостеринов. Традиционные методы, использовавшиеся до настоящего времени, изначально были разработаны для анализа холестерина и содержали несколько этапов очищения и насыщения. Модернизация приготовления образцов и хроматографических технологий привела к значительному прогрессу [34, с. 1120-1123; 44, с. 485-497; 57, с. 218-221; 152, с. 39-47].

1.3.1 Методы выделения липидной фракции

1.3.1.1 Экстрагирование фитостеринов из растительного сырья

Эффективное экстрагирование фитостеринов из липидной фракции растительной матрицы - наиболее важный этап процедуры приготовления образцов. Потери, вызванные использованием неподходящего экстракционного раствора и технологии, не могут быть компенсированы позже при анализе. При сравнении методов экстракции внимание следует уделять различным конъюгатам, в которых могут существовать фитостерины, т.е. в виде свободных спиртов, сложных эфиров, гликозидов или ацилированных гликозидов. Растворимость различных соединений фитостерина значительно варьируется. Неполярные липидные растворители эффективны при экстрагировании свободных и жирных кислот - этерифицированных фитостеринов. Более полярные фитостерин гликозиды плохо растворяются в неполярных растворителях, и, таким образом, для их экстрагирования следует использовать более полярные растворители.

Состав липидной фракции растительной матрицы также оказывает большое влияние на то, с какой легкостью высвобождаются фитостерины. Фитостерины в неочищенных и рафинированных маслах могут быть легко растворены вместе с образцом в неполярном растворителе. Также относительно легко высвобождается большинство фитостеринов из масличных семян, орехов и других тканей с высоким содержанием жира с помощью экстракции растворителем, при этом через твердые стенки клеток или из сложных матриц полисахарида-протеина, находящихся во влажных растительных тканях и злаках, экстрагировать фитостерины намного сложнее.

Один подход к улучшению экстрагируемости фитостеринов из сложных растительных матриц заключается в деградации матрицы с помощью щелочи, кислоты или

ферментативного гидролиза. Щелочные растворители эффективно растворяют жировые и белковые матрицы, при этом кислотный гидролиз необходим для разложения некоторых полисахаридов, таких как крахмал. Поскольку щелочной гидролиз обычно используется в качестве средства отделения стеринов от омыляемых липидов, экстрагирование липидов до гидролиза может быть опущено. Следует помнить, что эти обработки также гидролизуют конъюгаты фитостеринов, что делает их неподходящими, когда должны быть исследованы цельные молекулярные виды конъюгатов фитостеринов. Гидролитические процедуры также могут иметь негативный эффект для некоторых фитостеринов, таких как Δ^7 -фитостерины. Следует избегать воздействия тепла, света и воздуха, некоторые исследователи добавляют антиоксиданты к смесям при их экстракции [96, с. 111-117; 136, с. 3033-3039].

Для экстракции фитостеринов из растительной матрицы существуют разнообразные методы, различающиеся по эффективности, специфичности, надежности и экономичности. Таким образом, должна быть включена валидация (например, тест на выявление вещества) фитостеринов для оптимизации каждой процедуры экстрагирования образца для каждого типа растительной матрицы.

1.3.1.2 Экстрагирование липидной фракции растворителями

При непосредственной экстракции фитостеринов из растительной матрицы, размер частиц образца должен быть однородным и небольшим для улучшения эффективности экстрагирования. Семена и высушенные растительные материалы размельчаются порошкообразным стеклом [90, с. 457-500], в кофемолке [106, с. 197-198], ступе [98, с. 1073-1078], на дробилке [136, с. 3033-3039; 146, с. 356-361] или лопастном шлифовальном станке [87, с. 449-451]. В некоторых исследованиях размеры частицы тщательно характеризуются прохождением образцов через сито [87, с. 449-451; 151, с. 115-141]. Влажные ткани могут быть гомогенизированы в растворителе.

Фитостерины могут экстрагироваться из высушенного на воздухе растительного материала или из влажных тканей. С высушенным материалом использовались несмешивающиеся с водой растворители, такие как гексан, но с влажными тканями нужны водорастворимые растворители и смеси растворителей для эффективного экстрагирования липидов [108, с. 148-154]. При использовании для экстрагирования неполярных растворителей высушивание образца имеет очень большое значение, поскольку остаточная влага может изолировать фитостерины от растворителя.

Для высвобождения липидов из объекта использовались как неполярные, так и полярные растворители, и их смеси. Неполярные растворители экстрагируют фитостерины как часть липидной фракции и обычно используются для экстрагирования масляных семян. Полярные растворители более селективны, поскольку они высвобождают полярные соединения фитостеринов лучше, чем неполярные растворители. Поскольку большинство фитостеринов в масличных семенах существует в виде свободных спиртов или эфиров жирных кислот, они с легкостью экстрагируются неполярными растворителями, при этом другие растительные материалы, такие как злаки, также содержат гликолизированные фитостерины, растворимые в полярных растворителях.

Для высвобождения фитостеринов из семян мака и подсолнечника [121, с. 129-134], виноградного сусла [89, с. 803-806], кукурузных волокон [136, с. 3033-3039] и масличных семян [62, с. 1525-1530] используется экстрагирование с помощью гексана, а нефтяной эфир - из тыквенных семян [68, с. 149-156; 96, 111-117]. Гексан и метилен хлорид имели одинаковую эффективность при экстрагировании основных фитостеринов из высушенных семян женьшеня, поскольку результаты были сопоставимы [146, с. 356-361]. После экстрагирования неочищенное масло получается после центрифугирования или фильтрации, например, через ацетат целлюлозы или стекловолоконные фильтры [62, с. 1525-1530; 146, с. 356-361].

В зависимости от эффективности процедуры экстрагирования, последняя

должна повторяться такое количество повторностей, чтобы обеспечить полное выделение липидов. Обычно экстрагирование осуществляется три раза. Экстрагирование растворителем становится более эффективным при нагревании образца и непрерывном экстрагировании. В аппарате Сокслета высушенные и гомогенизированные образцы взвешиваются в экстракционных гильзах, подвергаемых постоянному экстрагированию нагретым растворителем в течение нескольких часов. Непрерывное экстрагирование липидов нагретым гексаном использовалось для кунжутных семян [98, с. 1073-1078], межплодников авокадо [56, с. 127-131], жареного кофе [48, с. 306-313] и семян ягод [148, с. 117-122], и более полярным ацетоном для масла какао [112, с. 415-422]. Экстрагирование жиров также может быть улучшено с помощью ультразвуковой ванны [87, с. 449-451; 96, с. 111-117] и перемалывания влажного образца с помощью сульфата натрия до экстрагирования [107, с. 619-624].

Для экстрагирования фитостеринов из различных растительных материалов применялся наиболее распространенная смесь растворителей, хотя этот метод изначально был разработан для экстрагирования липидов из животных тканей [42, с. 83-88; 148, с. 117-122]. Экстрагирование хлороформом и метанолом с дальнейшим очищением путем разделения на хлороформ и водные фазы применялось для экстрагирования липидов из семян и листьев овса [145, с. 745-750], семян и зрелых тыквенных растений [68, с. 149-156], растительных тканей [34, с. 1120-1123], листьев всходов огурцов [35, с. 427-460], плодов паприки [77, с. 171-172; 89, с. 803-806], пищевых бобов [151, с. 115-141], лиофилизированных клеток сельдерея [35, с. 427-460], листьев дерева [64, с. 155-159], ломкой фасоли [88, с. 3793-3795], плодов томатов [37, с. 34-40], картофеля [33, с. 31-36], семян черники и брусники [150, с. 49-53] и экспериментального рациона [161, с. 1085-1088]. Экстракт многократно промывался растворами солей или водой для удаления нелипидных загрязнителей. Фишвик и Рай [53, с. 127-131], сравнивая три процесса экстрагирования или экстрагирование общих липидов и классов липидов из различных растительных материалов, обнаружили, что экстраги-

рование хлороформом и метанолом было очень эффективно при экстрагировании липидов из тканей с высоким содержанием воды, например, томаты, шпинат, картофель и горошек.

Поскольку гидролитические и окислительные ферменты, присутствующие в растительных тканях, могут поддерживать свою активность в течение экстрагирования хлороформом-метанолом, до экстрагирования следует использовать денатурирование путем кипячения в изопропиловом спирте, который считается самым безопасным и наиболее эффективным растворителем [34, с. 1120-1123; 53, с. 127-131; 60, с. 23-27; 88, с. 3793-3795; 109, с. 330-337], или же в этиловом спирте [168, с. 227-229], метиловом спирте [34, с. 1120-1123] или воде [90, с. 457-500; 93, с. 927-930]. Также осуществлялось лишение гидролитических ферментов активности нагревом в микроволновой печи [52, с. 587-592].

В некоторых случаях хлороформ был заменен менее токсичным растворителем дихлорметаном, обладающим экстрагирующими свойствами, сопоставимыми со свойствами хлороформа [107, с. 619-624; 111, с. 123-142]. Как альтернатива экстрагированию хлороформом-метанолом, Хара и Радин [66, с. 24-35] ввели метод экстрагирования жиров смесью гексана-изопропилового спирта, преимущество которого заключается в его меньшей токсичности. Эта процедура менее трудоемкая, поскольку нет необходимости в промывке экстракта липидов, опускается формирование эмульсии. Однако, Дутта и Эпплквист, а также другие [34, с. 1120-1123; 42, с. 83-88] использовали эту смесь растворителей для экстрагирования фитостеринов с другими липидами из образцов злаков, они удалили водорастворимые загрязнители из экстракта с помощью двухфазной системы хлороформа-метанола-воды Фольша и коллег [113, с. 401-406]. Процедуры промывки также использовались после других методов экстрагирования [100, с. 1000-1004; 106, 197-198]. Смеси других растворителей для высвобождения фитостеринов из различных растительных материалов включают гексан с этанолом [54, с. 2591-2597] или этилацетатом [122, с. 1421-1427]. С целью экстраги-

рования, в частности, более полярных конъюгатов полистеринов (т.е. стерил гликозидов и эфиров фенольными кислотами), используются более полярные растворители. Для высвобождения стерил гликозидов из рисовых отрубей [149, с. 267-272] и семян *Cucos circinalis* [147, с. 331-339] использовался метиловый спирт, и ацетон для экстрагирования стерил ферулатов из злаков [47, с. 319-334; 137, с. 704-708].

Свойства растворимости липидов злаков использовались для их классификации как свободных или связанных липидов. Классификация основывается на их последовательной экстракции [74, с. 387-388; 94, с. 141-148]. Свободные липиды с легкостью экстрагируются неполярными растворителями, такими как гексан. Связанные липиды могут также быть разделены на две категории: слабосвязанные на поверхности полисахаридов и экстрагируемые полярными растворителями, и сильносвязанные в матрице полисахаридов и высвобождаемые только такими смесями растворителей, как матрица полисахаридов, например, водонасыщенным *n*-бутанолом (ВНБ) [74, с. 387-388]. В другом исследовании некрахмалистые липиды экстрагировались из пшенично муки с помощью ВНБ при комнатной температуре, а крахмалистые липиды - той же смесью растворителей при 90-100°C [43, с. 28-37]. Обычно орошение в ВНБ считается наиболее эффективным методом экстрагирования липидов злаков, поскольку он эффективно проникает в крахмалистую матрицу [106, с. 197-198]. Оно лучше, чем экстрагирование растворителем хлороформа-метанола при экстрагировании липидов из высушенного горошка и пшеничной муки [53, с. 127-131]. В одном исследовании оба растворителя использовались для экстрагирования общих липидов из зерен пшеницы [93, с. 927-930]. Альтернативный метод, включающий определение связанных липидов из злаков при анализе фитостеринов, состоит в кислотном гидролизе осадка, полученного после выведения свободных липидов, смесью гексана-изопропилового спирта. С помощью этого метода также высвобождаются фитостерины, связанные с полисахаридами [34, с. 1120-1123].

Один из способов снижения использования органических растворителей при

приготовлении образца заключается в применении сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ) для экстрагирования и концентрирования фитостеринов из масло- и жиросодержащих матриц. Сверхкритическое CO_2 - чаще всего используемый растворитель, который может быть модифицирован совместными растворителями, например, метиловым спиртом и метил-трет-бутиловым эфиром [72, с. 161-188]. При использовании СФЭ важно поддерживать соответствующий поток и давление, а также оптимальные параметры для получения полного и быстрого экстрагирования фитостеринов [44, с. 485-497]. Тем не менее, надлежащее обогащение фитостеринов требует многократных экстракций [44, с. 485-497]. При комбинировании СФЭ с помощью углекислого газа и метил трет-бутил эфира в качестве совместного растворителя с амино-абсорбента, можно обогатить фитостерины из соевого масла [72, с. 161-188]. Поскольку липиды обладают уникальной экстрагируемостью в СФЭ, также можно было использовать эту технологию для фракционирования экстракта. Например, результаты общего экстракта рисовых отрубей в СФЭ достигали своего максимума через 10 минут экстрагирования, при этом концентрации γ -оризанола были наивысшими после 15 минут [135, с. 635-638].

1.3.1.3 Экстрагирование фитостеринов методом гидролиза

Гидролиз конъюгатов фитостеринов в общих липидах, жирах и маслах.

В высокожирных продуктах питания, например, маслах, жирах и масличных семенах, фитостерины существуют в основном как свободные стеринны и сложные эфиры. Для обеспечения анализа свободных стериннов в этих образцах необходим только разрыв связей эфиров, что легко осуществляется с помощью щелочного гидролиза. Фитостерин гликозиды и ацетилированные гликозиды стабильны в течение щелочного гидролиза. Когда свободные фитостерины должны быть высвобождены из этих производных, ацетальные связи должны быть подвержены гидролизу кислотой

или ферментативному гидролизу.

Для омыления экстрагированных липидов или рафинированных масел и жиров использовалось множество процедур. Чаще всего липиды гидролизировались в гидроксиде калия метаноле или этаноле в течение до 1 ч, после чего смесь остужали и разводили, а омыляемые липиды экстрагировали раствором. В зависимости от размера образца, инкубация осуществлялась либо под рефлюксом, или в пробирках. Фитостерины могут быть защищены от окисления при омылении добавлением 3% пиригаллола или аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта [34, с. 1120-1123; 135, с. 635-638]. В комплексном исследовании по методологии 8-мин инкубация при 80°C была признана достаточной для гидролиза всех холестериновых эфиров в образце масла [34, с. 1120-1123]. Позже продолжительность омыления от 10 до 60 мин дала равное получение фитостерина [117, с. 1272-1280]. Авторы отметили, что смеси должны активно встряхиваться несколько раз при омылении. В качестве более мягкой альтернативы омылению для высвобождения свободных стероидов из эфиров можно использовать ферментативный гидролиз с триглицеридэстеразой [51, с. 93-96].

После омыления смесь должна быть разведена водой до разделения жидких фаз неомыляемых липидов в растворителе. Доли щелочного спирта, воды и растворителя должны тщательно контролироваться, чтобы избежать потери фитостероидов в водной фазе. Растворители, используемые для экстрагирования фитостероидов, включают гексан [33, с. 31-36; 34, с. 1120-1123; 87, с. 449-451], гептан [134, с. 46-49], циклогексан [107, с. 619-624; 161, с. 1085-1088], хлороформ [103, с. 763-769], изопропиловый спирт [68, с. 149-156], сложный этиловый эфир [39, с. 581-583; 62, с. 1525-1530; 104, с. 235-245; 120, с. 303-309] и трет-бутилметиловый эфир [146, с. 356-361]. При исследовании добавленного холестерина с радиоактивной меткой и холестерил олеата из пищевых масел после омыления и экстрагирования диэтиловым эфиром было обнаружено, что восстановление 60% и 90% было получено после одной или двух экстракций, соответственно [127, с. 219-223]. Только после пяти экстракций диэтиловым эфиром восстановление составило $100,5 \pm 1,4\%$. Когда Тойво и коллеги [117, с. 1272-1280; 145, с.

745-750] сравнили гексан, циклогексан и смесь гексана-диэтилового эфира (1:1) для экстрагирования неомыленных липидов, они не обнаружили статистической разницы между растворителями, но предпочли циклогексан в своих методах. Одним преимуществом использования циклогексана вместо диэтилового эфира для экстрагирования неомыленных липидов являлось то, что он растворял намного меньше воды, чем диэтиловый эфир, т.е. 1 по сравнению с 100 $\mu\text{л}$ в 11 $\mu\text{л}$, соответственно, что упрощает дальнейшие этапы анализа [34, с. 1120-1123]. Во время промывки экстрактов не смешивающиеся с водой растворы нелегко формируют эмульсии и в дальнейшем они не нуждаются в высушивании сульфатом натрия до испарения растворителя [57, с. 218-221]. Было обнаружено, что фитостерины лучше экстрагируются из смеси омыления из высокожирной образцова смеси диэтилового эфира-гексана (1:1), чем циклогексаном. Установлено, что большое количество мыла может удерживать фитостерины в водной фазе, если только полярные растворители не используются для разрыва этих взаимосвязей. Или же экстрагирование должно быть повторено несколько раз [57, с. 218-221].

Неомыливаемые липиды также могут быть изолированы от смеси с помощью адсорбционной хроматографии твердофазной экстракцией оксидом алюминия [76, с. 83-92; 129, с. 662-667; 165, с. 2077-2081; 166, с. 5620-5629; 167, с. 1072-1076; 168, с. 227-229; 169, с. 22-25]. Таким образом, можно избежать формирования этой эмульсии. Жирно-кислые мыла абсорбируются на поверхности и формируют нерастворимые мыла. В одном методе элюированный раствор далее очищается в четырехкомпонентной аминовой колонке [76, с. 83-92]. Известно несколько исследований, в которых экстрагированные липиды или масла были подвержены кислотному гидролизу, выполняемому, когда свободные фитостерины должны быть высвобождены из гликозидов и ацетилированных гликозидов. Фракции стерил гликозидов и экстракты общих липидов из растительных материалов были гидролизованы либо с помощью хлористоводородной, либо серной кислотой [33, с. 31-36; 111, с. 123-142; 112, с. 415-422; 168, с. 227-229]. Кессельмайер и коллеги предпочли ферментативное переваривание с

β -глюкозидазей кислотному гидролизу [65, с. 16-17; 145, с. 745-750]. Джонкер и коллеги [55, с. 569-572; 63, с. 1329-1334] доказали, что большинство распространенных фитостеринов, т.е. кампестерин, ситостерин и стигмастерин, были стабильными на этапе кислотного гидролиза, а при C-3 не возникло вызванной кислотой дигидрации. То, что кислота разлагает до 80% фитостеринов, противоречит одному отчету [145, с. 745-750]. Риски и преимущества кислотного гидролиза должны быть тщательно сравнены, поскольку некоторые группы фитостеринов чувствительны к кислой среде. Фитостерины в нескольких растительных семействах, например, тыквенных и чайных, состоят в основном из $\Delta 7$ -стеринов, которые легко разлагаются или изомеризируются в течение кислотного гидролиза. Следовательно, кислотный гидролиз должен быть пропущены при анализе этих материалов и заменен ферментативным гидролизом [36, с. 123-148; 63, с. 1329-1334]. Произошел некоторый распад $\Delta 5$ - и $\Delta 7$ -авенастерил гликозидов и изомеризация $\Delta 5$ -авенастерина [84, с. 2869-2871; 145, 745-750].

Содержание $\Delta 5$ -авенастерина цельнозерновой муки составило 1,9 и 2,7 мг/100 г с кислотным гидролизом и без него, при этом содержание общих фитостеринов увеличилось на 25% при кислотном гидролизе [117, с. 1272-1280]. Таким образом, необходимо достигать компромисса между некоторыми незначительными изменениями в профилях фитостеринов и улучшениями в общих результатах. Было обнаружено, что растительная матрица защищает фитостерины в ходе кислотного гидролиза, т.е. изолированные гликозиды фитостерина склонны к разложению.

Было предположено, что образцы пищевых продуктов должны быть подвержены кислотному гидролизу до щелочного гидролиза, поскольку фитостерил гликозиды, будучи относительно полярными соединениями, могут оставаться в водной фазе и утратиться после омыления. Таким образом, они не были бы экстрагированы неомыленным материалом [108, с. 148-154].

Экстрагирование свободных фитостеринов после гидролиза питательных веществ. Фитостерины могут быть проанализированы в образцах продукции без предварительного экстрагирования липидной фракции. Хотя основной целью различных

методов гидролиза является высвобождение свободных стероидов из конъюгатов, такие также различаются по усилению эффективности экстрагирования с помощью деградации растительной матрицы. По сравнению с методами, включающими экстрагирования липидов, он более экономичный, быстрый и более безопасный, поскольку токсичные растворители липидов могут быть заменены менее токсичными [57, с. 218-221].

Методы прямого омыления для определения свободных и эстерифицированных фитостероидов происходят от методов анализа фитостероидов в маслах и жирах, а также анализа холестерина в различных продуктах питания [65, с. 16-17; 85, с. 2869-2871]. Индык и др. [58, с. 394-400] обосновал простой метод прямого омыления с дальнейшим экстрагированием неомыляемых липидов для анализа различных типов пищевых продуктов на холестерин, фитостероиды и токоферолы. С помощью этого метода содержание фитостероидов в растительном масле и образцах молочной смеси, а также двух сертифицированных эталонных материалах Бюро эталонов Европейского сообщества (БЭЭС) было сравнено с содержанием фитостероидов, указанного в литературе, и с ориентировочными значениями, предоставленными БЭЭС. Их вывод о том, что предварительная изоляция липидной фракции до омыления необязательна при анализе фитостероидов и холестерина, был позже подтвержден другими [97, с. 269-274; 117, с. 1272-1280]. Более того, было заявлено, что прямое омыление более эффективно в непрямых методах для анализа холестерина в молочных продуктах, поскольку при экстрагировании липидной фракции некоторые стероиды могут быть разделены на водную фазу и, следовательно, потеряны [71, с. 685-689; 95, с. 84-89].

Прямое омыление может применяться для сухих и жидких образцов [95, с. 84-89]. Во-первых, образцы тщательно распределяются в этиловом или метиловом спирте, после чего добавляется концентрированный раствор гидроксида калия. В одном исследовании объема спирта 4 мл оказалось достаточно для 1 го образца [97, с. 269-274]. Температуры омыления варьируются от 30°C до 85°C и по времени - от 8 мин до 60 мин, а окончательная концентрация гидроксида калия составляет 0,33 - 0,5

М в этиловом спирте [57, с. 2591-2597; 95, с. 84-89; 97, с. 269-274; 140, с. 140-144].

При сравнении метода прямого омыления для анализа эргостерина из злаков и других пищевых веществ с методом, включающим этап экстрагирования метиловым спиртом до омыления, метод прямого омыления дал результат по эргостерину выше на 12–377% [80, с. 1021-1027]. Аналогичное содержание фитостеринов и холестеринов было получено при подвергании цельнозерновой муки и диетического составного образца прямому омылению и экстрагированию общих липидов хлороформом-метиловым спиртом с последующим омылением [117, с. 1272-1280].

Лиофилизированные и замороженные диетические образцы, грибы и пищевые продукты были проанализированы на наличие фитостеринов с помощью прямого омыления. Фитостерины были восстановлены из омыленной смеси диэтиловым эфиром [126, с. 124-128], циклоксаном [130, с. 436-441; 140, с. 140-144] или экстракцией гексаном [80, с. 1021-1027]. Для высвобождения гликозидных фитостеринов, являющихся важными конъюгатами, допустим, в злаках, необходим кислотный гидролиз до омыления. Уже в 1985 г. Джонкер и коллеги ввели метод для анализа фитостеринов непосредственно из растительных материалов. Они подвергали гидролизу образцы пищи в 6 М хлористо-водородной кислоте в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Далее смесь остужали и нейтрализовали с помощью пелетов из гидроксида калия, липиды омыляли в этиловом гидроксиде калия еще в течение 30 мин, и, наконец, неомыляемые липиды экстрагировали толуолом и очищали в течение нескольких этапов отмывания. Позже этот метод был модифицирован добавлением этапа экстрагирования липидной фракции после кислотного гидролиза и оптимизированием этапов гидролиза и растворителей для экстрагирования липидной фракции [63, с. 1329-1334; 117, с. 1272-1280].

Включение этапа кислотного гидролиза в анализ фитостеринов увеличило измеряемое содержание в различных продуктах питания и составах диеты на 1-156% (Таблица 1). Как ожидалось, кислотный гидролиз оказывал только незначительный эффект на содержание фитостеринов в маслах и масличных семенах, поскольку они

содержат в основном свободные и этерифицированные стерины. Растительные и злаковые продукты содержали большее количество фитостерин гликозидов и, таким образом, кислотный гидролиз увеличил содержание фитостеринов, по меньшей мере, на 21%. С кислотным гидролизом содержание фитостеринов в составе трех голландских экспериментальных диет увеличилось на 20%, 26% и 38% [55, с. 569-572] и в составе одной диеты США на 15% [117, с. 1272-1280]. Следует отметить, что некоторое увеличение количества фитостеринов могло произойти благодаря их улучшенному высвобождению после гидролиза. В голландском исследовании содержание холестерина также немного увеличилось (<4%), хотя не считается, что холестерин формирует гликозиды [55, с. 569-572]. Если образец был богат кислотостойкой целлюлозой, как, например, фракции отрубей, можно усилить экстракцию фитостеринов предварительной обработкой образца ферментами целлюлазы [90, с. 457-500]. Однако, содержание фитостеринов в цельнозерновой муке и диетических составных образцах было равным, когда их анализировали с экстрагированием общих липидов и без него до кислотного и щелочного гидролиза [117, с. 1272-1280], это означает, что оба метода подходят для анализа распространенных продуктов питания. Методы прямого кислотного и щелочного гидролиза использовались для изучения содержания фитостеринов в овощах, ягодах и злаках, употребляемых в Швеции, Нидерландах [38, с. 287-293; 46, с. 383-391] и в Финляндии [128, с. 305-307; 131, с. 868-872] (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнение двух методов приготовления образцов для анализа содержания фитостеринов в пище (мг/100 г СВ)

Образец	Пробоподготовка	Содержание фитостеринов				Ссылка
		<i>кампестерин</i>	<i>сигмастерин</i>	<i>ситостерин</i>	<i>общее количество</i>	
Цветная капуста	A*	7,4	1,7	21,6	31,4	55, с. 569-572
	B**	6,4	1,4	173,0	26,0	

Продолжение таблицы 7

Латук	A	1,1	4,5	10,6	17,4	117, с. 1272- 1280
	B	1,0	4,3	7,9	14,0	
Ржаной хлеб (свет- лый)	A	21,2	2,2	37,7	64,0	
	B	13,0	1,5	23,7	41,2	
Цельнозер-новая мука	A	10,1	1,6	38,9	65,5	
	B	8,5	1,4	29,2	52,1	
Рапсовое масло	A	242	2,8	375,0	704,0	
	B	238	2,5	370,0	694,0	
Зерно подсолнеч- ника	A	19,0	20,7	128,0	176,0	
	B	17,8	20,5	124,0	170,0	
Высушенный лук	A	5,6	3,4	45,8	55,9	
	B	2,1	1,3	18,4	21,8	

A* - прямой кислотный гидролиз с дальнейшим омылением, B** - прямое омыление

Обогащение и очищение свободных фитостеринов. Методы обогащения и очищения, необходимые после экстрагирования липидной фракции и высвобождения свободных стероидов, зависят от окончательного применимого аналитического метода и области исследования. Современные методы хроматографии позволяют нам использовать специфичные процедуры обогащения и очищения.

Методы хроматографии обычно используются в течение подготовки образцов и концентрируют фитостерины из липидной фракции. Нормально-фазовая (НФ), обращенно-фазовая (ОФ) хроматография и хроматография с серебрением используются в процедурах очистки образцов. Фитостерины чаще всего очищаются от неомыляемых веществ или экстрактов общих липидов кремниевой кислотой и окисью алюминия. Также могут использоваться ОФ материалы, например, Lipidex 5000 и октадецил-связанный диоксид кремния. Как правило, когда количество липидов составляет, по меньшей мере, 200 мг, используются технологии хроматографии на колонках, при этом также могут применяться тонкослойная хроматография меньшего количества образцов (ТСХ) или твердофазная экстракция (ТФЭ) [44, с. 485-497]. Таким образом, в аналитической работе ТСХ и ТФЭ являются двумя наиболее распространенными технологиями.

Омыление также может считаться этапом очищения, поскольку оно удаляет триглицериды, фосфолипиды и другие эфиры из экстракта липидной фракции [108, с.

148-154]. До анализа методом газовой хроматографии (ГХ) обычно удаляются омыляемые липиды, при этом, это не является необходимым до высокоэффективной жидкостной хроматографии с нормальными фазами, поскольку масляная матрица не препятствует анализу. Чтобы улучшить отделение фитостеринов в обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и избежать загрязнения колонки, рекомендуется омыление образца масла [45, с. 1395-1399].

Чтобы подтвердить, что все липиды были омылены, ТСХ диоксидом кремния может быть выполнена, например, с помощью гексан-диэтил эфир-уксусной кислоты с объемными соотношениями 400:45:4 или 85:15:1 [34, с. 1120-1123; 115, с. 287-295]. Очистка фитостеринов препаративной ТСХ все же является распространенным этапом до анализа ГХ [39, с. 581-583]. Неомыляемые липиды применяются на пластинке для ТСХ, элюированной, скажем, гексан-диэтил эфиром (1:1) [169, с. 22-25] или одной из вышеуказанных смесей. После разработки пластинки фитостерины могут быть визуализированы как деструктивными, так и недеструктивными методами [44, с. 485-497; 164, с. 2724-2728]. Стандарты фитостеринов могут быть обуглены после распыления серной или фосфорномолибденовой кислотой или погружены в пары йода, чтобы определить относительные удержания (ОУ) для обеспечения сбора образцов фитостеринов. Недеструктивные средства визуализации соединений включают распыление 2,7-дихлорфлуоресцентом [123, с. 112], берберины гидрохлоридом [111, с. 123-142] или метиловым спиртом [169, с. 22-25]. Метиловый спирт делает пластинку прозрачной, а фитостерины определяются как белые зоны. После недеструктивного распыления фитостерины могут быть соскоблены с пластинки, экстрагированы из диоксида кремния, например, диэтиловым эфиром или смесью хлороформа-диэтилового эфира, и использоваться для дальнейшего анализа.

Фитостерины могут быть очищены из неомыляемых липидов с помощью ТФЭ диоксидом кремния, что намного быстрее очистки ТСХ. Например, неомыляемый образец липидной фракции может использоваться на кассете из диоксида кремния в низкополярном растворителе. Фитостерины адсорбируются на поверхности диоксида

кремния, а интерферирующие соединения отмываются смесями растворителей с увеличивающимися полярностями. И наконец, свободные фитостерины высвобождаются полярным растворителем, таким как 50-70% диэтиловым эфиром в гексане [116, с. 929-935; 128, с. 305-307]. Четвертичные кассеты с аммоний-связанной фазой использовались для высвобождения свободных стероидов из экстракта липидной фракции [51, с. 93-96], а кассеты с оксидом алюминия - для обогащения свободных стероидов после омыления [76, с. 83-92]. Холестерин и, позже, фитостерины были изолированы из окисленной смеси для омыления кассетами из октадецил силила, вместо экстрагирования неомыляемых липидов [153, с. 334-343; 167, с. 1072-1076].

Омыление экстрактов липидов также можно не применять. Фитостерины могут быть отделены от промытого нейтрального экстракта липидной фракции осаждением дигитонина [35, с. 427-460]. В более современном подходе свободные стероиды и токоферолы в образцах растительных масел были напрямую силилированы. Это привело к снижению полярности, а силилированные фитостерины и токоферолы могли быть изолированы вместе с неполярными фитостерил эфирами из немного более полярной фитостериновой матрицы с помощью ТФЭ диоксида кремния [70, с. 451-462].

Восстановление фитостероидов после этапов очищения и обогащения является важным фактором в количественных анализах. Существует несколько способов для количественного сбора фитостероидов после омыления и экстрагирования растворителей [127, с. 219-223], но результаты от осаждения и методы хроматографии значительно отличаются. Например, фитостероиды из концентратов дали высвобождение 85% и 95% в течение ТСХ силикатным гелем и хроматографии на колонке с флорисилом, соответственно [165, с. 2077-2081]. Для технологий ТФЭ были зафиксированы более высокие и большие восстанавливаемые степени извлечения. Степень извлечения добавленных сито- и стигмастероидов составила 100% и 99%, когда они применялись на кассете из диоксида кремния и элюированы гексан-этил ацетатом (60:40) [162, с. 645-649].

1.4 Методы исследования фитостеринов с применением хроматографии

1.4.1 Хроматографический анализ свободных фитостеринов

Отдельные свободные фитостерины чаще всего анализируются методом капиллярной ГХ. Отделение, основанное на количестве атомов углерода, получается с легкостью. В настоящее время $\Delta 5$ -стерины и их соответствующие станола, $\Delta 7$ -стерины и некоторые продукты изомеризации также могут быть отделены в эффективных колонках методом капиллярной ГХ. Технологии ВЭЖХ реже используются для отделения свободных фитостеринов, чем ГХ, но существуют некоторые применения [44, с. 485-497; 101, с. 1813-1815]. Одной из причин ограниченного использования ВЭЖХ может быть то, что нет такого общего и чувствительного детектора ВЭЖХ фитостеринов, как пламенно-ионизационный детектор в ГХ. Однако, с новыми технологиями отделения и возможностями определения были предприняты попытки применить ВЭЖХ для анализа свободных фитостеринов в продуктах питания. В этом разделе будут описаны принципы отделения хроматографией. За последние несколько лет были опубликованы обширные обзоры хроматографического анализа фитостеринов и соответствующих соединений [44, с. 485-497; 57, с. 218-221; 67, с. 943-951; 125, с. 561-566; 159, с. 465-472; 164, с. 2724-2728].

Препаративная хроматография свободных стероидов. Применение методов препаративной хроматографии рекомендуется до аналитического отделения при определении фитостеринов в образцах с неизвестным или сложным составом фитостеринов. Например, когда известно, что образец содержит ряд различных свободных стероидов, например, дес-, моно- и диметил стероидов, $\Delta 5$ - и $\Delta 7$ -стероидов, некоторые из них, возможно, частично совпадают друг с другом, при аналитическом отделении. ТСХ с диоксидом кремния в качестве адсорбента также может использоваться для отделения различных свободных стероидов друг от друга на основании их полярности [44, с. 485-

497]. Использование ТСХ с хлороформом-диэтиловым эфиром (9:1, объемное содержание) в качестве подвижной фазы в результате отделения десметил стеринов (O_u 0,25-0,34), монометилловых стеринов (O_u 0,34-0,40) и диметил стеринов (O_u 0,40-0,46) [98, с. 1073-1078]. Когда ТСХ была элюирована с бензеном-хлороформом (3:1, объемное содержание), относительная мобильность дес-, моно- и диметил стеринов составляла 0,15, 0,22 и 0,27, соответственно [149, с. 267-272]. Более детальное отделение было достигнуто с помощью элюирования *n*-гексан-диэтил эфиром (1:1, объемное содержание). Были получены следующие значения O_u : Δ^7 -стерины 0,33, Δ^5 -стерины 0,35, монометилловые стерины 0,45; и диметил стерины 0,53 [92, с. 581-586; 169, с. 22-25].

ТСХ с серебрением применялось для отделения свободных стеринов в соответствии с их номером и конфигурацией двойных связей. Десметил и монометилловые 24-этилиден стерины, экстрагированные из масел семян пасленовых и сформированные в ацетаты, были фракционированы на пластинках из диоксида кремния, обогащенных нитратом серебра с элюированием метилен хлоридом-тетрахлоридом углерода (1:5) [124, с. 35-39]. Акийшица и коллеги использовали эту технологию для отделения ацетилированных десметил, монометилловых и диметил стеринов, экстрагированных из различных растительных материалов до масс-спектрометрии (МС) и идентификации ядерным магнитным резонансом (ЯМР) [35, с. 427-460; 82, с. 475-462; 83, с. 531-536; 149, с. 267-272]. Стерины с различной ненасыщенностью в кольцевой структуре также могут отделять с помощью ТСХ с серебрением. 7-Дегидрохолестерин, десмостерол и холестерин обладали относительной мобильностью 0,29, 0,69 и 0,72, когда пластинки из диоксида кремния и нитрата серебра были элюированы хлороформом-ацетоном (85:15, объемное содержание) [81, с. 400-406]. После визуализации групп фитостеринов с неструктурными пятнами, фракции фитостеринов переносятся из диоксида кремния и используются для дальнейшего анализа.

1.4.2 Хроматографический анализ связанных фитостеринов

Аналитическая газовая хроматография. Несколько методов ГХ доступны для анализа фитостеринов из питательных веществ. Некоторые из них могут разделять только несколько наиболее распространенные фитостерины, при этом другие также могут разделять несколько второстепенных соединений. Анализ многокомпонентных продуктов питания, содержащих значительное количество других неомыляемых жиров, особенно токоферолов, требует эффективного разделения с помощью ГХ [57, с. 218-221]. Ранее, совместная элюция α -токоферола со стеринами давала ложные результаты. Выбор метода должен быть основан на проблеме исследования.

Протоколы ГХ по холестерину могут быть приняты для анализа фитостеринов, но требуется лучшее разрешение вследствие разнообразия фитостеринов, присутствующих в растительных материалах. Разделения фитостеринов, изначально проводимые на неполярно объединенных (3-8 мм внутренний диаметр) колонках, в настоящее время выполняются на капиллярных колонках (0,1-0,32 мм внутренний диаметр), неполярных или с промежуточной полярностью [44, с. 485-497; 57, с. 218-221; 164, с. 2724-2728]. Образцы фитостеринов вводятся с помощью различных технологий, включая с делением, делением/без деления и в колонку. Некоторые исследователи используют холодный ввод непосредственно в колонку, который обеспечивает лучшую стабильность фитостеринов и являются наиболее надежными для количественного анализа и менее дискриминирующими, чем ввод с делением [57, с. 218-221]. Прогоны выполняются либо изотермично, либо с программированием температуры. Фитостерины чаще всего обнаруживаются с помощью пламенно-ионизационного детектора или с помощью МС. Пламенно-ионизационная детекция (ПИД) - это универсальный детектор, обладающий хорошей чувствительностью, линейностью реагирования и обобщенностью, а МС подходит для структурной идентификации и количественной оценки [44, с. 485-497].

Недериватизованные фитостерины плохо испаряются и относительно неустойчивы при высоких температурах, что делает их определение при аналитических анализах ненадежными. Однако, достижения в современных капиллярных колонных технологиях дали возможность некоторым исследователям анализировать фитостерины как свободные спирты [134, с. 46-49; 139, с. 98-99; 140, с. 140-144]. Для улучшения испарения, стабильности и разрешения на ГХ фитостерины обычно преобразовывают в их триметилсилиловые эфиры (ТМС) или производные ацетата. Производные характеризуются меньшей асимметрией на хроматограммах по сравнению со свободными стеринами. Производные ТМС больше подходят для количественного анализа, их проще и быстрее получить, чем производные ацетата [44, с. 485-497].

N,O-Бис(триметилсилильный)трифторацетамид (БСТФА) с триметилхлорсиланом или трет-бутилметиловым эфиром - наиболее используемые смеси дериватизации. Поскольку стерин растворяется в этих смесях, в эти смеси добавляется пиридин [57, с. 218-221]. N-метил-p-триметилсилильный гептафторбутырамид (МСГФБА) с 1-метилмидазолом и триметилсилилимидазолом являются другими используемыми силилирующими реагентами. В общем, время инкубации варьируется от 15 минут до 12 ч, а температуры - от комнатной температуры до 80°C. В немецком методе рекомендуется МСГФБА, поскольку он подходит для обычной работы и полностью формирует фитостерины и бетулин, используемые в качестве внутреннего стандарта [169, с. 22-25]. Однако, БСТФА также подходит для формирования бетулина [39, с. 581-583]. Высокое содержание МСГФБА также защищает детектор, и использование пиридина в качестве растворителя можно опустить. Реагент БСТФА дал больше точности и степень извлечения фитостерина, чем реагент высокотемпературного пиролиза Sylon [107, с. 619-624]. После дериватизации с помощью БСТФА смесь содержит избыток реагента и побочные продукты, которые испаряются и удаляются испарением под потоком азота. Осадок растворяется, скажем, в гексане до анализа ГХ [34, с. 1120-1123; 87, с. 449-451; 131, с. 868-872; 138, с. 775-786]. При условии, что производные

ТМС защищены от влаги, они могут храниться в реагенте для дериватизации в условиях охлаждения в течение нескольких недель [34, с. 1120-1123] и в гексане при 20°C в течение 3 дней [115, с. 287-295; 138, с. 775-786]. Производные ацетата формируются с помощью инкубации, например, в свежеприготовленном растворе ангидрида уксусной кислоты - пиридине при 75-80°C в течение 1 ч [123, с. 112].

Выделения основных фитостеринов, допустим, из пищевых масел и других продуктов можно достичь с помощью неполярной или низкополярной колонки. Например, 5% фенилметилсиликоновая колонка (например, SPB-5, HP-5) с размерами (25-30) м x 0,25 мм внутреннего диаметра и 0,25 мкм толщина пленки отделяет ТМС фитостерина менее чем за 30 мин [107, с. 619-624; 132, с. 692-695; 133, с. 665-668]. Время анализа может быть даже меньше, поскольку всего 9 мин требовалось для отделения основных свободных стероидов от пищевых масел на низкополярной колонке (5% поперечно связанного фенилметилсиликона; CP-сил-5CB, 10 м x 0,32 мм, 0,12 мкм) с 1-м деактивированной колонкой [134, с. 46-49]. В ней некоторые второстепенные соединения совместно элюировались с другими. Селективность колонок может быть улучшена путем увеличения их полярности. ТМС ситостанила и кампестанила может быть отделен довольно хорошо от соответствующих фитостеринов с помощью аполлярной метилсиликоновой колонки (OV-1; 25 м x 0,32 мм, 0,52 мкм) [34, с. 1120-1123], при этом исходное отделение было достигнуто с помощью 14% цианопропилфенилметилполисилозановой колонки средней полярности (DB-1701; 30 м x 0,25 мм, 0,25 мкм) [138, с. 775-786]. Отделение производных станилов из производных стероидов также может быть выполнено без более длинных низкополярных колонок, таких как 5% перекрестно соединенных фенилметилсиликоновых колонок 60 м [34, с. 1120-1123; 117, с. 1272-1280].

Анализ ГХ тыквенных семян и других масел, содержащих Δ^7 -стероиды, вызывает больше трудностей по сравнению с анализом масел, содержащих в основном Δ^5 -стероиды, и не может быть выполнен с помощью аполлярной колонки. С помощью пе-

рекрестно соединенной 65% диметил-35% дифенилполисилокановой колонки средней полярности (HP-35; 30 м x 0,25 мм, 0,25 μ м) четыре производных ТМС Δ 7-стеринов были выделены из ТМС ситостеринов и 24-метилхолестерил [36, с. 123-148; 96, с. 111-117]. Другая колонка средней полярности (33% фенилметилполисилокан, OV-61; 25 м x 0,25 мм, 0,1 μ м) использовалась для отделения продуктов изомеризации Δ 7-стеринов, например, Δ 8(14)-стеринов и Δ 14-стеринов, из стеридов подсолнечного масла, сформированных в их эфирах ТМС [63, с. 1329-1334]. Отделение может быть выполнено колонкой высокой полярности (100% цианопропилсиликон; CP-сил-88, 100 м x 0,25 мм, 0,1 μ м).

Если образец содержит монометилвые и диметилвые стериды в добавок к Δ 5- и Δ 7-стеринам, то они препаративно фракционируются с помощью, например, ТМС до анализа ГХ. Далее анализ десметил, монометилвых и диметилвых стеридов осуществляется на обычной аполярной [97, с. 269-274] или низкополярной колонке [33, с. 31-36]. До 25 производных ТМС различных фитостеридов из ягод облепихи крушинной могло быть отделено на 14% цианопропилфенилметил-полисилозановой колонке (DB-1701; 30 м x 0,25 мм, 0,25 μ м) за 60 мин без предварительного фракционирования в дес-, моно- и диметил стериды [104, с. 235-245].

Одновременный анализ фитостеридов и токоферидов может быть выполнен с помощью капиллярной ГХ без риска совместного элюирования холестерина и токоферина. Силилированные фитостериды и токофериды были отделены на низкополярной колонке (DB-17HT, 13 м x 0,32 мм; HP-5MS; 30 м x 0,25 мм) [70, с. 451-462; 118, с. 257-263].

Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография. ОФ-ВЭЖХ более селективна для отделения гомологов свободных стеридов и ненасыщенных аналогов, чем НФ-ВЭЖХ. В НФ-ВЭЖХ отделение основывается на гидрофобных взаимосвязях между аналитами и постоянной фазой, на которую влияет размер молекул и количество двойных связей, при этом в НФ-ВЭЖХ отделение в основном основано на адсорбционных взаимосвязях и разнице в полярности [44, с. 485-497].

Одно из самых ранних отделений свободных стеринов было проведено с помощью колонки С6 с градиентным элюированием из 50%-100% ацетонитрила в воде и УФ-детектированием при 200 нм [145, с. 745-750]. Этот метод использовался для отделения свободных стеринов, экстрагированных из листьев и семян овса. Образцы фитостеринов были подвергнуты ТСХ очищению до анализа ВЭЖХ, но был необходим этап дериватизации. Поскольку некоторые фитостерины совместно элюировались в этой системе, например, Δ^7 -стигмастенол и стигмастерин, результаты были подтверждены анализом ГХ. Однако, авторы пришли к выводу, что этот метод ОФ-ВЭЖХ мог использоваться как быстрый метод для анализа фитостеринов в пище. Когда применимость двух систем ОФ-ВЭЖХ с УФ-детектированием при 206 нм сравнивалась с анализом восьми обычных фитостеринов, колонка С18 и 80-85% метиловый спирт в воде в качестве элюента оказалась лучше, чем колонка С8 и 99% метиловый спирт в воде [41, с. 177-181]. С помощью метода использования колонки С18 может быть осуществлено исходное отделение основных фитостеринов из омыленных экстрактов масла и экстрактов морских водорослей, при этом с колонкой С8 фитостерины совместно не элюировались. Селективность этих двух систем колонок для фитостеринов была различной, что было подтверждено неоднородным порядком элюирования соединений. Поскольку хроматограммы содержали несколько неопределенных пиков, требовалось подтверждение идентификации фитостерина с помощью ГХ анализа. Позже стигмастерин и ситостерин могли быть отделены с помощью узкокалиберной колонки С8, изократичного ацетонитрил-водного (86:14, объемное содержание) элюирования и УФ-абсорбции при 208 нм детектировании [162, с. 645-649]. Метод ОФ-ВЭЖХ оказался достаточно чувствительным для обнаружения этих фитостеринов и концентраций, присутствующих в соевом масле. Хотя суточная точность и междневная воспроизводимость стандартных соединений были хорошими, а степень извлечения, добавляемого стигмастерина и ситостерина из масляной матрицы, также была хорошей при 1,08% и 0,97%, соответственно, общая хроматограмма содержала значительное количество других соединений, которые могли повлиять на

анализ.

Хотя более простая подготовка образцов считается важным преимуществом ВЭЖХ над анализом ГХ, рекомендуется омылять образцы для выведения сложных глицериновых эфиров, которые иначе загрязняют колонку и мешают отделению при использовании ОФ-ВЭЖХ. Это имеет большее значение с высокожирными образцами, чем с образцами с низким содержанием жира. Уорнер и Маунтс обнаружили, что простое омыление образцов растительного масла непосредственно перед анализом ОФ-ВЭЖХ необходимо для анализа фитостеринов, но не для анализа токоферолов [45, с. 1395-1399]. Они использовали колонку С18, и элюирование раствором метиловый спирт - вода (98:2, объемное содержание) и испарительную детекцию светорассеяния (ИДСР). В другом исследовании ОФ-ВЭЖХ использовалась для одновременного анализа фитостеринов, холестерина и токоферолов в молочных и немолочных продуктах и маслах. Образцы были омылены до анализа. Здесь три основных фитостерина и холестерин могли быть определены отдельно, при этом два токоферина совместно элюировали друг с другом. Лимит определения аналитов составлял образец приблизительно 10 мг/кг [95, с. 84-89].

Эргостерин, присутствующий, например, в грибах и продуктах питания, загрязненных плесневыми грибами, имеет две двойных связи ($\Delta^5,7$) в его стеринном кольце. Таким образом, он обладает УФ-абсорбцией при 282 нм, что позволяет ему быть специфично и чувствительно обнаруженным УФ-детектором. Швадорф и Мюллер [80, с. 1021-1027] разработали чувствительный и надежный метод анализа для изучения эргостерина в злаках и комбикорме с помощью НФ-ВЭЖХ. Другие фитостерины, не имеющие кольцевой структуры стерина, не мешают анализу. Они использовали омыление без каких-либо дальнейших методов очищения, что позволило этому методу очень быстро определить загрязнение плесенью.

Другие методы разделения. Сверхкритическая жидкостная хроматография (СЖХ) представляет собой технологию, подходящую для отделения нелетучих и термически нестойких соединений с помощью сверхкритического диоксида углерода в

качестве мобильной фазы. Отделение осуществляется быстро, стоимость относительно низкая, и может использоваться УФ детекция при длинных волнах (например, 190 нм) или ПИД [44, с. 485-497; 164, с. 2724-2728]. Несмотря на эти преимущества, СЖХ использовалась только в анализе свободных фитостернинов в нескольких исследованиях. Это может быть из-за относительно плохой разделительной мощности, которая ниже мощности ВЭЖХ [44, с. 485-497]. Однако, Лампи, Снайдер и коллеги [72, с. 161-188] успешно использовали технологию СЖХ с капиллярной колонкой (Dionex SB-октил-50, 10 м x 0,1 мм, 0,5 μ м) при 100°C и с градиентом давления диоксида углерода для выделения четырех основных фитостернинов от смесей растительных липидной фракции, экстрагируемых с помощью СЖХ. Было осуществлено эффективное отделение фитостернинов друг от друга и от других присутствующих липидов. Кроме того, отклики ПИД на фитостерины были линейными в рамках широкого диапазона.

Капиллярная электрохроматография (КЭХ) - другая относительно новая технология, которая в последнее время применяется для анализа липидов. КЭХ приводится в действие электроосмотической силой, как и электрофорез, и с легкостью модифицируется такими условиями, как и в ВЭЖХ. Она обладает лучшей разделительной способностью, чем СЖХ и ВЭЖХ [44, с. 485-497]. Три основных фитостерина из рапсового масла были отделены как 1-метилпиридиний 2-алкокси р-толуенсульфонаты. Производная имела положительный заряд и обладала УФ-абсорбцией при 284 нм. Анализ выполнялся в 77-см капиллярной трубке из диоксида кремния с метиловым спиртом - ацетонитрилом-уксуснокислотным буфером с метилированным β -циклодекстрином [163, с. 547-551]. Абиди и соавторы [25, с. 463-467] разделили четыре группы стернинов, т.е. ланостерин, эргостерин, стигмастерин и ситостерин с помощью 40-см октадецил-силановой (ОДС) колонки. Они пришли к выводу, что структура боковых цепей была решающим фактором разделения, поскольку стеринны элюировались в соответствии с гидрофобностью их боковых цепей.

Определение фитостернинов с помощью хроматографии и спектроскопии. ГХ,

комбинированная с детекцией МС, - распространенный метод идентификации фитостеринов. Ионизация электронным ударом (ЭУ) дает положительно заряженные молекулярные ионы ($[M^+]$), которые разлагаются на типичные фрагментационные ионы. Ионизация чаще всего осуществляется при напряжении 70 эВ. Как производные ТМС, так и ацетатные производные, фитостерины имеют типичные схемы фрагментации, которые имеют значение при определении их молекулярных масс и структурных характеристик. Высокие температуры ионизации могут модифицировать фрагментацию, поскольку гидроксильные группы при С-3 нестабильные и, следовательно, с легкостью обезвоживаются. Исследования Рахиера и Бенвениста [92, с. 581-586], а также Гоуда [108, с. 148-154] применяются при подробном описании масс-спектральной идентификации фитостеринов. В 1967 г. были опубликованы [32, с. 238-241; 105, с. 939-966] данные ГХ-МС о 15 стеринах, проанализированных как свободные спирты и дериватизированные в ТМС, ацетаты и трифторацетаты. Данные включали базовые пики, многочисленные пики и пики фрагментом выше m/z 210. Он также описал формирование фрагментации каждого иона. Таблица 8 содержит краткий обзор исследований, в которых использовалась ГХ-МС для подтверждения идентификации фитостеринов при анализе пищевых продуктов.

Таблица 8 – Исследования фитостеринов пищевых продуктов методом удерживания ГХ и схем фрагментации МС

Форма фитостеринов	Источник фитостеринов	Колонка ГХ (м×мм вн. д.)	Условия ионизации	Удержание ГХ	Масс-спектр. данные	Кол-во стероинов	Ссылка
Свободные	Подсолнечное масло	OV-240 (40 x 0,25)	70 эВ	Время удерживания	Спектры МС	6 ^a	56, с. 127-131
	Соки ананаса, маракуи, апельсина, грейпфрута	DB5-МС (12,5 x 0,20, 0,33 μм)			Ионы	7	49, с. 23-35
	Масло жожоба	HP-1 (30 x 0,25, 0,25 μм)	70 эВ, 200°C	ОВУ к холестерину	Ионы	12	131, с. 868-872
	Масло бурачки	CP-сил 8CP (30 x 0,25, 0,25 μм)		ОВУ к α-холестану	Ионы	17	27, с. 653-658
Триметилсиллил эфир	Кунжутное семечко	BP5 (19 x 0,33)	70 эВ, 250°C	ОВУ к α-холестану	Ионы	17	91, с. 429-440
	Подсолнечное масло	OV-240 (40 x 0,25)			Спектры МС	7 ^a	56, с. 127-131
	Растительные масла и липиды злаков	BP5 (25 x 0,33, 0,5μм)	70 эВ, 250°C	ОВУ к α-холестану	Спектры МС и ионы	2 ^b	29, с. 3000-3003
	Овсяное и подсолнечное масло	DB-1701 (30 x 0,25, 0,25 μм)	70 эВ, 280°C	ОВУ к α-холестану	Спектры МС	8	130, с. 436-441
	Масло рисовых отрубей	SPB-5 (30 x 0,25, 0,1 μм)	70 эВ, 280°C	ОВУ к α-холестану	Ионы	10	114, с. 457-460
	Ягоды облепихи крушиновой	DB-1701 (30×0,25, 0,25 μм)	70 эВ, 180°C	ОВУ к холестерину	Ионы	25	97, с. 269-274
	Черника и брусника	DB-1701 (30×0,25, 0,25 μм)	70 эВ, 180°C	ОВУ к холестерину	Ионы	10	138, с. 775-786
	Масло зерен женьшеня	DB-5 (60 x 0,32, 0,25 μм)	70эВ	ОВУ к α-холестану	Ионы	12	134, с. 46-49
	Семена стеркулиевых	MEGA SE54 (25×0,32, 0,15 μм)	70 эВ, 300°C		Ионы	5	80, с. 1021-1027

Примечания: ОВУ, относительное время удерживания; ^a Δ7-стерины и продукты их изомеризации; ^b станола

В общем, свободные $\Delta 5$ -стерины формируют интенсивные M^+ , которые могут быть основными пиками. Молекулярные ионы ТМС и ацетатные производные чаще всего десилилируются или деацетилируются (РОН) и имеют сильный ион $[M^+-ROH]$ [105, с. 939-966]. В массовых спектрах ТМС фитостеринов существует $[M^+]$, при этом они отсутствуют в массовых спектрах ацетатов [91, с. 429-440]. Существуют некоторые характерные ионы, которые могут использоваться для дифференциации $\Delta 5$ -стеринов, $\Delta 7$ -стеринов и станолов друг от друга. $\Delta 5$ -стерины формируют типичные ионы при $[M^+-129]$, когда теряется часть кольца А; $\Delta 7$ -стерины всегда имеют интенсивный пик при m/z 255, который является фрагментом четырехкольцевой структуры; а станола имеют базовый пик при m/z 215, формирующийся после удаления боковой цепи и части кольца Δ .

Структура боковых цепей может быть выведена из ионов, когда целая боковая цепь (БЦ) или БЦ и РОН отщепляются от M^+ . $\Delta 5$ -стерины теряют воду легче, чем метиловые группы, при этом потеря воды происходит с $\Delta 7$ -стеринами [63, с. 1329-1334].

Ацетатные производные подходят для определения ненасыщения в БЦ, поскольку фрагментация происходит чаще в БЦ, если она содержала ненасыщение, при этом кольцевая структура была разорвана насыщенной БЦ [123, с. 112].

Несколько исследований выявили характерные схемы массовой фрагментации и данные удерживания ГХ по фитостеринам, присутствующим в продуктах питания. Некоторые из наиболее недавних исследований представлены в табл. 8. Больше массовых спектров фитостеринов доступно в различных библиотеках по МС.

Хотя ГХ-МС была эффективным инструментом для объяснения структур фитостеринов, другие технологии необходимы для определения, например, расположения двойных связей в кольце, схемы замещения в боковой цепи и конфигурации эпимеров на С-24 [108, с. 148-154]. Спектроскопия ЯМР разрешила многие такие проблемы.

Спектры ЯМР 1H и ЯМР ^{13}C использовались для структурного анализа фитосте-

ринов [73, с. 233-236]. Улучшения в технологиях ОФ-ВЭЖХ сделали ее мощным инструментом для изоляции отдельных стероидов до ЯМР. Таким образом, спектральные данные ЯМР в комбинации с данными о времени удерживания от различных разделений ГХ и масс-спектральными данными от ГХ-МС позволяют совершать идентификацию и доказательство структуры пищевых фитостероидов [73, с. 233-236]. Например, были опубликованы таблицы химических сдвигов ЯМР фитостероидов в общем [35, с. 427-460; 108, с. 148-154] и в Cucurbitaceae [32, с. 238-241; 82, с. 475-462] и диметил стероидов [83, с. 531-536].

1.4.3 Количественный анализ фитостероидов

Для выполнения количественного анализа фитостероидов все этапы процедуры, включая приготовление образцов и окончательный хроматографический анализ, должны быть тщательно спланированы и валидированы. Все этапы экстрагирования должны быть повторены много раз для получения высокой степени извлечения, а потеря следует избегать. Наиболее общим средством контроля за процедурой является добавление внутреннего стандарта для компенсации потерь.

Исследования степени извлечения большого диапазона фитостероидов не могут выполняться, поскольку только несколько фитостероидов коммерчески доступны с разумной чистотой и количеством. Следовательно, многие исследования эффективности методов были проведены с использованием холестерина и некоторых из наиболее легкодоступных фитостероидов, а именно, стигматесрина и ситостанола.

В некоторых исследованиях количество фитостероидов было определено спектрофотометрически, хотя было выполнено качественное разделение посредством ГХ [148, с. 117-122].

Внутренний стандарт.

Европейское исследование по сравнению методов анализа холестерина выявило

тот факт, что внутренние стандарты не использовались для контроля потерь в течение анализа пищевых масел [39, с. 581-583]. Даже важнее добавлять внутренний стандарт рано в образцы пищи, которые подвергаются нескольким этапам гидролиза, экстрагирования и очищения, а не только окончательному хроматографическому анализу.

В настоящее время всего несколько внутренних стандартов широко используются (Таблица 9). Они добавляются в смеси образцов на различных этапах в течение аналитической процедуры. Две явные причины различий в дополнительных этапах заключаются в химической разнородности внутренних стандартов с фитостеринами и их изменяющейся стабильности в течение процедуры. Холестерин и его соответствующий станол холестеранол химически наиболее аналогичны фитостеринам, содержащим 3β -гидроксильные группы в структуре стерина, что показывает их "поведение" в течение различных этапов приготовления образцов очень схожими с поведением фитостерина. Следует помнить, что холестерин может также присутствовать в небольших количествах в материалах растительного происхождения и, таким образом, должен быть компенсирован при использовании в качестве внутреннего стандарта. Холестерин превалирует над другими видами внутренних стандартов, поскольку его содержание в пищевых продуктах может быть проигнорировано. Он также может использоваться, когда образцы включают материалы животного происхождения и содержат холестерин. Однако, ГХ с высоким разрешением нужна для отделения холестерина от холестеранола. Эпимер С3 холестеранола, а именно, эпихолестерин, также использовался в качестве внутреннего стандарта для анализа фитостерина [128, с. 305-307]. К сожалению, эпихолестерин неустойчив к кислотному гидролизу. В таблице 9 описаны стандарты, используемые для количественного анализа в ГХ.

Таблица 9 – Внутренние стандарты (ВНСТ) используются для количественного анализа ГХ

Соединение	Образец	Добавление ВНСТ	Основные этапы после добавления ВНСТ	Дериватизация	Ссылка
Бетулин	Общий рацион	После омыления	ТСХ	Силилирование	126, с. 124-128
	Масла и жиры	До омыления	Омыление, Al ₂ O ₃ и ТСХ очистка	Силилирование с МСГФБА	165, с. 2077-2081
	Масла	До омыления	Омыление	Силилирование с БСТФА /ТМХС	132, с. 692-695
Холестан	Растительная ткань	До гомогенизации	Щелочной и кислотный гидролиз	Силилирование	164, с. 2724-2728
	Смешанный рацион	До кислотного гидролиза	Щелочной и кислотный гидролиз	Силилирование с диметил-формамидом / биссилил-трифторацетамид ^а	55, с. 569-572
	Приготовленные продукты	До омыления	Омыление	Силилирование с БСТФА /ТМХС ^а	48, 306-313
	Масло и мясо	До омыления	Омыление	Силилирование с БСТФА /ТМХС ^а	62, 1525-1530
	Масло	До омыления	Омыление	Силилирование с реагентом Tri-Sil ^а	142, с. 687-688
	Неочищенное масло из семян	До омыления	Омыление	Силилирование с БСТФА/ТМХС ^а	118, с. 257-263
Дигидрохолестерин	Измельченные семена тыквы	До экстрагирования	Экстрагирование липидов, хроматография с диоксидом кремния, щелочной гидролиз	Силилирование с БСТФА в ТБМЭ	36, с. 123-148

ВНСТ, внутренний стандарт; МСГФБА, N-метил-N-(триметилсилил) гептафторбутирамид; БСТФА/ТМСХ, N,O-бис(триметилсилил) трифторацетамид с 1% триметилхлорсилан; ТБМЭ, трет-бутилметилловый эфир. ^а ВНСТ не дериватизируется.

Холестан с той же кольцевой структурой стерина, что и холестерин, но с отсутствием β-гидроксильной группы, также является широко используемым внутренним

стандартом. Он хорошо отделяется от холестерина и фитостеринов в условиях ГХ, но также ведет себя иным образом на этапах приготовления образца. Будучи менее полярным, чем фитостерины, он не элюирует совместно со стеринами в методах препаратив

ной хроматографии. Кроме того, он не дериватизируется, как фитостерины, поскольку он не имеет гидроксильной группы.

Бетулин (Луп-20[29]-эн-3 β ,28-диол), четвертый наиболее распространенный внутренний стандарт, содержит две гидроксильные группы и, таким образом, является более полярным, чем фитостерины. Его хроматографические характеристики и характеристики растворения отличаются от фитостеринов - бетулин не растворяется в неполярных углеводородах, таких как гексан, но требует более полярного растворителя, такого как ди-изопропил эфир или хлороформ. Различия в поведении при ТСХ стерин и внутреннего стандарта были продемонстрированы и компенсированы в немецком методе анализа фитостеринов. Поскольку бетулин имел меньший относительный коэффициент удерживания (0,3), чем другие стерин (0,33-0,53), все полосы были собраны для дальнейшего анализа [92, с. 581-586; 129, с. 662-667; 169, с. 22-25]. Более того, было обнаружено, что бетулин разлагается больше при кислотном гидролизе, чем фитостерины, что делает его неподходящим внутренним стандартом при использовании гидролиза.

1.4.4 Хроматографические отклики фитостеринов

Считается, что ГХ в сочетании с ПИД дает общую и линейную реакцию на аналогичные соединения при условии оптимизации хроматографических параметров. Экспериментально полученные факторы отклика должны быть лучше определены, чтобы компенсировать различия в откликах в ПИД и потери в ходе процедуры ГХ, и

часто определялись для анализа холестерина [57, с. 218-221]. Однако, невозможно измерить факторы отклика для всех фитостероинов, поскольку на рынке доступно только ограниченное количество соединений относительно высокой чистоты. Чтобы рассчитать фактическую чистоту стандарта стерина, рекомендован метод нормализации, т.е. предположение того, что все присутствующие стеринны дают одинаковый отклик на хроматограмме [50, с. 948-950]. Однако, стандарты стероинов могут содержать растворители, воду или другие соединения, которые не могут быть определены с помощью ГХ. Например, кристаллы ситостерина могут присутствовать в ангидрате, семигидрате и моногидрате.

Отклики фитостероинов были определены в отношении внутренних стандартов. Хотя α -холестан не имеет гидроксильные группы и бетулин-два-гидроксильные группы, которые могут быть дериватизованы, производная ТМС не влияет на отклик ПИД [169, с. 22-25]. Таким образом, выбор внутреннего стандарта не должен иметь сильное действие на относительные отклики. В одном исследовании по сравнению откликов холестерина и бетулина, отклики оказались линейными, повторяемыми и практически равными (1.028 ± 0.056 , $N = 21$) [39, с. 581-583], при этом в другом отклики изменялись ежедневно [71, с. 685-689]. Таким образом, в европейском методе по обнаружению ситостерина или стигмастерина в масле стандартная смесь фитостероинов и бетулина (внутренний стандарт) анализируется до и после каждого отбора проб [50, с. 948-950]. Однако, факторы отклика бетулина и стероинов оказались идентичными в пределах экспериментальной ошибки, если общая процедура выполнялась точно, а бетулин был полностью дериватизирован в ТМС [169, с. 22-25]. Факторы отклика, относящиеся к внутреннему стандарту, используемому в количественном анализе всех фитостероинов, могут основываться, например, на холестерине [132, с. 692-695], стигмастерине [70, с. 451-462] или ситостерине [104, с. 235-245; 133, с. 665-668]. Калибровки ситостерина и стигмастерина выполнялись ежедневно для анализа фитостероинов в растительных маслах [62, с. 1525-1530]. Стандартные кривые отклика че-

тырех фитостеринов на шести уровнях также были определены, а отклики других фитостеринов были взяты из стандартного соединения с самым близким количеством атомов общего углерода [128, с. 305-307; 161, с. 1085-1088]. Очень хорошее линейное определение было получено для холестерина и стигмастерина между 0,05 и 0,5 мг/образец [107, с. 619-624], для кампестерина и ситостерина между 5 и 300 мкг/мл [62, с. 1525-1530] и для четырех фитостеринов - между 1 и 200 мкг [128, с. 305-307]. Многие исследователи используют равные отклики фитостеринов к α -холестану [34, с. 1120-1123; 142, с. 687-688; 148, с. 117-122; 156, с. 3411-3416], которые относительно основаны на надлежащих рабочих характеристиках ГХ-ПИД, описанных выше. Рекомендуется время от времени проверять, чтобы факторы отклика были близки к 1,00. В лаборатории ежедневно анализировалась проба, включающая равные количества холестерина, холестанола и стигмастерина для подтверждения отделения и определения эффективности нашей хроматографической системы [128, с. 305-307].

В одном исследовании, в котором стерины были проанализированы как ацетатные производные, отклики шести стеринных производных были линейными в диапазоне 2-15 нг, а отклики были настолько аналогичными, что поправочные коэффициенты не использовались [123, с. 112].

Существует несколько возможных методов детекции ВЭЖХ для фитостеринов. УФ и ИДСР - чаще всего используемые методы, соответствующие [44, с. 485-497; 164, с. 2724-2728]. Поскольку фитостерины имеют любые специфические хромофоры в своей структуре, абсорбция при 190-210 нм измеряется только с помощью УФ. На данных длинах волн в основном двойные связи между атомами углерода абсорбируют свет и, таким образом, молярная абсорбционная способность различных фитостеринов значительно отличается.

УФ детектирование при $\lambda = 210-214$ нм использовалось для анализа основных фитостеринов и холестерина из образцов пищи внешним стандартным методом. Калибровочная кривая холестерина была линейной в течение двух порядков величин и также использовалась для количественного анализа фитостеринов [95, с. 84-89].

Позже стигмастерин и ситостерин были определены с помощью УФ-абсорбции при 208 нм [162, с. 645-649]. Линейность ВЭЖХ-УФ стигмастерина и ситостерина была отличной ($\geq 0,999$ и $1,000$) при уровнях концентрации 0,7-70 $\mu\text{г}/\text{мл}$, а уклоны калибровочного выравнивания составляли - 0,102 и 0,089, соответственно. Лимит детектирования, 0,5 $\mu\text{г}/\text{мл}$, был достаточно низким, чтобы обеспечить определение фитостеринов на уровнях, присутствующих в пищевых маслах.

ИДСР дает очень стабильную базовую линию и нечувствительна к изменениям в составе растворителя в ходе прогонов, как только условия работы были оптимизированы. Калибровка каждого соединения необходима для количественного определения, поскольку отклики сильно зависят от молекулярной массы [43, с. С.36; 44, с. 485-497; 164, с. 2724-2728]. Фитостерины в растительных маслах были проанализированы с помощью ВЭЖХ-ИДСР [45, с. 1395-1399]. Калибровочные кривые для четырех фитостеринов были измерены и определены как линейные в исследуемом диапазоне (10-100 $\mu\text{г}$), но отклики детектора значительно варьировались. Уклоны калибровочных кривых brassicasterина и стигмастерина были приблизительно на одном уровне и составляли около 10% уклона калибровочной кривой ситостерина, при этом этот уклон для кампестерина был где-то посередине. Количественный анализ ситостерина и стигмастерина из образцов масла также выполнялся с помощью масс-спектрометрии с химической ионизацией при атомном давлении (ХИАД), которая предоставляет данные об идентификации изучаемых соединений [162, с. 645-649].

Эти несколько примеров показывают, что количественный анализ фитостеринов более надежно выполняется с помощью ГХ-ПВД, чем с помощью ВЭЖХ, особенно, когда чистый эталонный стандарт не доступен для точной калибровки.

Эталонные методы и материалы. До применения метода анализа фитостеринов он должен быть утвержден. Процедура приготовления образцов должна быть достаточно эффективной для изолирования всех стеринов, чтобы высвободить их из конъюгатов и очистить экстракты, при необходимости, без потерь, и, наконец, для их анализа с помощью хроматографии [152, с. 39-47]. Один подход заключается в сравнении

метода с эталонным методом, который был утвержден международным или национальным органом. Другой способ - использовать эталонные образцы, содержание фитостеринов которых было подтверждено. К сожалению, ни один из них не применяется непосредственно для анализа сложных питательных веществ, поскольку эталонные методы и материалы доступны только для образцов масла и жиров. Обычно большого интереса оценка анализа фитостеринов не вызывала, поскольку фитостерины не являются питательными веществами или вредными соединениями. Эталонные методы анализа холестерина в пищевых продуктах применялись и к анализу фитостеринов. Следует помнить, что растительные материалы содержат многочисленные соединения, которые могут влиять на хроматографическое количественное определение.

Международная ассоциация теоретической и прикладной химии [85, с. 2149-2154] опубликовала стандартный метод идентификации и определения стеридов в животных и растительных маслах и жирах.

Этот метод не включал добавление внутреннего стандарта, а количественный анализ был плохо разъяснен. В европейском методе анализа стеридов жирных веществ [120, с. 303-309] холестеранол в качестве внутреннего стандарта добавлялся в образец до омыления, чтобы обеспечить количественный анализ. Метод включал препаративное отделение стеридов на базовых пластинках ТСХ из диоксида кремния, дериватизацию эфиров ТМС и анализ с помощью капиллярной ГХ. Отклики фитостеринов считались равными откликам холестеранола. Немецкий метод определения стеридов [92, с. 581-586; 169, с. 22-25] более сложный, чем вышеупомянутые методы, включая несколько этапов очищения. Бетулин, внутренний стандарт, добавляется в образец жира или масла до омыления. Неомыляемые липиды изолируются колоночной хроматографией с окисью алюминия и ТСХ с силикатным гелем. Стериды дериватизируются в ТМС и анализируются с помощью ГХ методом внутреннего стандарта без поправочных коэффициентов для откликов детектора. Все этапы в методе тщательно разъясняются и обсуждаются. Другой европейский эталонный метод был опубликован в 2001 г. для анализа ситостерина или стигмастерина в сливочном масле [160, с.

648-651]. В данном методе после добавления бетулина в качестве внутреннего стандарта в смесь для омыления, стерина экстрагируются и дериватизируются в ТМС до ГХ. Стандартные растворы анализируются до и после каждого отбора проб, а факторы отклика, полученные из них, используются при расчете содержания стерина в образцах сливочного масла. Ассоциация официальных химиков-аналитиков опубликовала два официальных метода для анализа холестерина в многокомпонентной пище. В первый входил отдельный этап экстрагирования липидов [65, с. 16-17] при этом второй базировался на прямом омылении [40, с. 417-477].

В настоящее время, доступно только два эталонных материала для фитостеринов. Они поставляются ВСР. Один из них представляет собой смесь соевого и кукурузного масел (ВСР 162), а другой - молочный жир, насыщенный фитостеринами (ВСР 164).

Валидация метода анализа фитостеринов должна выполняться с помощью исследования извлечения добавленных фитостеринов и конъюгатов, а также исследования повторяемости и воспроизводимости. Более того, процедура метода должна выполняться с использованием внутренних эталонных образцов, испытательных смесей и растворов сравнения; кроме того, особенно при применении новых типов пищевых продуктов целый метод должен быть оценен.

Хроматографический анализ конъюгатов фитостеринов. Масла, жиры и другие продукты питания растительного происхождения содержат различные классы конъюгатов фитостеринов, а именно, свободные спирты (СС), этерифицированные жирные кислоты (SE) или фенолокислоты (SPHE), гликозиды (SG) и ацетилированные стеридовые гликозиды (ASG). Сложные эфиры с жирными кислотами обычно находятся в различных питательных веществах, при этом возникают сложные эфиры с фенолокислотами (в основном, феруловой кислотой), например, в некоторых фракциях отрубей злаков. Химические свойства и физиологическое действие классов фитостеринов значительно отличаются друг от друга. Таким образом, существует необходи-

мость определения, в каких конъюгатах присутствуют пищевые фитостерины. Существуют многочисленные средства для отделения различных классов фитостеринов, согласно обзору Моро и коллегам [86, с. 472-474]. Более того, было опубликовано несколько исследований, в которых конъюгаты фитостеринов отделялись от образцов пищевых продуктов [44, с. 485-497; 86, с. 472-474]. Большинство из них было выполнено с помощью НФ-ВЭЖХ.

Препаративное разделение конъюгатов фитостеринов. Препаративное разделение необходимо, когда содержание и состав фитостеринов каждого класса должны быть изучены отдельно, чтобы изолировать их от других соединений в экстракте липидов для изучения нетронутых молекул. В растительных маслах и жирах фитостерины встречаются в основном в качестве СС и SE, при этом в других материалах также присутствуют SG, ASG и SPHE.

СС и SE довольно легко отделить друг от друга адсорбционной хроматографией, поскольку они имеют различную полярность. Ранее конъюгаты фитостеринов были отделены с помощью открытой колоночной хроматографии. Когда диоксид кремния использовался в качестве адсорбента, а растительное масло в гексане применялось к колонке, SE элюировалась 2% этил ацетатом в гексане и далее триглицеридами, элюированными 10% этил ацетатом в гексане, и наконец, СС, которые элюировались 100% этил ацетатом [155, с. 757-761]. Для компенсации потери, возникающей в течение хроматографии, холестерин и холестерил геникозанат добавлялись в качестве стандартов. Позже двухэтапная открытая колоночная хроматография используется для количественного разделения СС и SE [132, с. 692-695]. Растительное масло было растворено в гексане и применялось в колонке из диоксида кремния, из которого были элюированы SE гексан-этил ацетатом (90:10, объемное содержание) и СС гексан-диэтил эфиром-этиловым спиртом (25:25:50, по объему). Модельные соединения стеринов использовались для подтверждения селективности разделения.

Аналогично, препаративное разделение классов фитостеринов может быть осуществлено с помощью SPE. Например, кассеты из диоксида кремния использовались

для очищения стерильных эфиров от 1-20 мг общих липидов. Стерильные эфиры элюировались от диоксида кремния с петролейным эфиром - диэтиловым эфиром (98.5:1.5, объемное содержание) [34, с. 1120-1123]. Маломасштабное отделение СС и SE от растительных масел также может выполняться с помощью SPE с использованием нейтральных кассет из окиси алюминия [35, с. 427-460]. Аликвоты 100-200 мг образцов масел были растворены в гексане вместе с холестерином и холестерильным эфиром в качестве внутренних стандартов. SE были собраны с помощью элюирования кассеты с гексаном и гексаном-диэтиловым эфиром (80:20, объемное содержание). СС были элюированы этиловым спиртом - гексаном-диэтиловым эфиром (50:25:25, по объему). Процедура разделения SPE была достаточной и не приводила к потерям, потому что степень извлечения добавленных маркеров свободных и эстерифицированных стероидов составляла 100% и 105% соответственно, а содержание фитостероидов в образцах растительного масла были ближе при анализе разделением SPE, чем прямым анализом.

Разделение липидов в граммовом масштабе должно выполняться в открытых колонках. Липидная фракция красного сладкого перца разделялись на нейтральные липиды, гликолипиды и фосфолипиды с использованием колоночной хроматографии с силикатным гелем. Эти три класса липидов элюировались из колонки с помощью хлороформа, ацетона и метилового спирта, соответственно [77, с. 171-172]. Колоночная хроматография на окиси алюминия использовалась для изоляции от 0,1-2 г экстрактов липидов или масел [34, с. 1120-1123].

Чистота классов фитостероидов может с легкостью подтверждаться на пластинках ТСХ с силикатным гелем. Пластинки ТСХ с силикатным гелем (20 см x 20 см) были сначала обработаны раствором изопропиловый эфир - уксусная кислота (96:4, объемное содержание) на 10 см, а затем раствором диэтиловый эфир - гексан - уксусная кислота (90:10:1, объемное содержание). В этой системе относительная подвижность стерильных эфиров была на 50% выше, чем подвижность свободных стероидов [158, с. 994-999]. Четыре класса фитостероидов из растительного материала может

быть отделено на ТСХ силикатным гелем с дихлорметаном-метиловым спиртом-водой (85:15:0.5, объемное содержание) в качестве проявляющегося растворителя, создавая относительно удерживания 0,35 для SG, 0,55 для ASG, 0,7 для CC и 0,9 для SE [111, с. 123-142]. ТСХ также использовалась в качестве препаративных средств для изоляции стерильных эфиров [34, с. 1120-1123; 99, с. 193-196].

Многоэтапный метод приготовления образцов был разработан и утвержден для анализа нетронутых Δ^5 - и Δ^7 -стерильных гликозидов в растительных материалах [36, с. 123-148]. Стерильные гликозиды были изолированы от экстрактов липидов хроматографией с использованием силикатного геля и очищены растворением остатка в 1,2-диметоксиэтаном, содержащим 10% этиламин, и использованы на кассете SPE с фенолборной кислотой. После промывки колонки SG были элюированы метиловым спиртом, содержащим сорбит (1 ммоль/3 мл). Элюат высушивался и растворялся в соответствующем растворителе до анализа ВЭЖХ. Более того, авторы использовали двухэтапную процедуру хроматографии для изоляции SG от смеси для омыления липидов из тыквенных семян, которые должны использоваться в качестве эталонных соединений.

Фитостерины, этерифицированные фенольными кислотами, а именно, ферулатами, были фракционированы из экстрактов рисовых отрубей в колонке из диоксида кремния с использованием гексана и диэтилового эфира или этилацетата в качестве смесей элюентов. Фитостерил ферулаты были изолированы с помощью 100% диэтилового эфира [154, с. 75-83] и 50% этилацетата в гексане [149, с. 267-272] после последовательного элюирования других соединений с увеличивающейся полярностью.

Анализ профилей липидной фракции. Многочисленные процедуры препаративной ТСХ, некоторые из которых были описаны выше, традиционно использовались для количественного отделения различных классов липидов. В настоящее время профили общих липидов из экстрактов обычно анализируются процедурами НФ-ВЭЖХ. Отделение ВЭЖХ стало более распространенным с введения ELSD в середине

80-х гг. Для качественного анализа используются различные адсорбенты и растворители для элюирования [44, с. 485-497; 101, с. 1813-1815].

Липидная фракция мягких растительных тканей была разделена на 23 класса с использованием колонкой из диоксида кремния (LiChrosorb Si-60, 100 x 3 мм, 7 μ m) и троичной градиентной системой, состоящей из смеси изо-октан-тетрагидрофурана, изопропанола и воды [157, с. 683-688]. СС, АSG и SG были получены как отдельные пики, при этом SE совместно элюировали с каротеноидами. Когда в пшеничной муке анализировали содержание липидной фракции с использованием соответствующего метода, были отделены 17 и 7 классов липидов, соответственно. SE совместно элюировали с триглицеридами [43, с. 28]. В представленных исследованиях было осуществлено надлежащее отделение классов липидов с широким диапазоном полярностей, но отделение и баланс системы ВЭЖХ заняло 80 мин. Более быстрое отделение классов липидов, экстрагированных из кукурузного волокна, выполнялось на диольной колонке (LiChrosorb Diol, 100 x 3 мм, 5 μ m) с бинарным градиентным элюированием (гексан-уксусная кислота и изопропанол) [136, с. 3033-3039]. В этой системе SE добывали из триглицеридов, свободных жирных кислот, СС и SPHE. По меньшей мере, 10 пиков было обнаружено из экстракта липидов томатов после отделения на колонке из диоксида кремния (LiChrospher Si-60, 125 x 4 мм, 5 μ m) с градиентным элюированием (хлороформ и метиловый спирт-вода (95:5, объемное содержание) [52, с. 587-592]. Окись алюминия (LiChroCART, 125 x 4 мм, 5 μ m) с линейным бинарным градиентным элюированием (0,5% тетрагидрофуран в гексане и тетрагидрофуран-изопропанол-гексан (20:20:60, по объему)) отделяла неполярные липиды быстро (около 10 мин) и эффективно, что приводит к отличному получению SE из восковых эфиров и триглицеридов [79, с. 561-565]. Отделение неполярных классов липидов также осуществлялось с помощью колонки из окиси алюминия и бинарной градиентной системы при 75°C [114, с. 457-460]. Во всех этих системах ВЭЖХ ИДСР использовалась в качестве общего детектора. Однако, отклики детектора варьировались между классами липидами. Стерил гликозиды дали трехкратный отклик по сравнению

с ацилированными стерил гликозидами [52, с. 587-592].

СЖХ также использовалась для отделения классов липидов друг от друга. Одним из преимуществ СЖХ над ВЭЖХ является то, что ПИД можно использовать для детектирования соединений после СЖХ. Устройство СЖХ с капиллярной колонкой (Dionex SB-Октил-50, 10 м x 0,1 мм, 0,5 $\mu\text{м}$) и диоксидом углерода в качестве газаносителя использовалось для отделения СС и SE от свободных жирных кислот и триглицеридов дистиллятов-дезодорантов растительных масел [78, с. 208-209].

Анализ специфичных классов конъюгатов фитостеринов. Фитостерины, эстерифицированные жирными кислотами. Считается, что фитостерины, эстерифицированные с жирными кислотами (SE), выполняют функцию консервационного соединения. Они изучаются, чтобы понять биохимию фитостеринов в растениях и для идентификации аутентичности пищевых масел, помимо других причин. Таким образом, необходимы аналитические методы для исследования этих соединений. Были предприняты попытки добыть эти сложные смеси с помощью ВЭЖХ, ГХ и их комбинаций и с помощью хроматографических технологий. Для идентификации натуральной SE в растительных маслах и выявления допущений о структурах SE, был разработан метод ОФ-ВЭЖХ с УФ-детектированием при $\lambda = 205$ нм [100, с. 1000-1004]. Относительные объемы удерживания синтезированных SE вместе с холестерил олеатом внутреннего стандарта были определены до того, как были рассчитаны доли ненасыщения и количество атомов углеводорода. Химическая структура доли жирной кислоты оказала более сильное воздействие на поведение удерживания по сравнению с эфирами специфичной жирной кислоты, которые были разложены на ряд частично пересекающихся пиков, содержащих различные доли фитостеринов.

Чтобы улучшить отделение, SE вначале фракционировались на эфиры, имеющие жирные кислоты с короткой и длинной цепью с помощью адсорбционной ВЭЖХ [34, с. 1120-1123]. Ненасыщение долей жирных ацилов ранее характеризовалось препаративной и аналитической хроматографией серебрением. Эфиры с насыщенными

жирными ацилами, по меньшей мере, с восемью атомами углеводорода имели наивысшую мобильность ($O_u = 0,75 - 0,8$), далее идут мононенасыщенные ($O_u = 0,65$), диненасыщенные ($O_u = 0,55$), триненасыщенные ($O_u = 0,35$) и тетраненасыщенные эфиры ($O_u = 0,20$), элюированные гексаном-толуолом на пластинках из диоксида кремния, пропитанных нитратом серебра (7:3, объемное содержание). Далее фракции были подвержены ОФ-ВЭЖХ или ГХ-МС, используемых в режиме химической ионизации отрицательных ионов аммонием в качестве реагирующего газа. В системе МС использовались сформированные специфические фрагментарные ионы для долей стерина и жирных кислот.

Позже эффективность отделения ГХ и ВЭЖХ была улучшена. До 25 нетронутых молекул SE были, по меньшей мере, частично отделены высокотемпературной ГХ на колонках средней полярности, содержащей 50% фенил и 50% метилполисилоксан (25 м x 0,25 мм, 0,1 μ м). Ввод был выполнен холодной технологией на колонке во избежание распада и разделения образцов [102, с. 419-434]. Те же образцы были подвержены системам ОФ-ВЭЖХ-масс детектирования, состоящих из колонки из октадецил-связанной диоксида кремния (Spherisorb, ODS-2, 100 x 3 мм, 0,5 μ м) с градиентным элюированием ацетонитрила, воды и этилацетата. С помощью ВЭЖХ было определено около 16 пиков. При комбинировании данных из этих двух анализов профили SE растительных масел могли быть разложены, поскольку в ГХ время удерживания увеличивалось со степенью ненасыщения, при этом в ВЭЖХ действие было противоположным. Улучшения в технологии по комбинированию инструментов ВЭЖХ и ГХ дало возможность анализировать SE с использованием онлайн ВЭЖХ без трудоемких препаративных хроматографических процедур. ОФ-ВЭЖХ, например, с колонкой из цианопропил диоксида кремния или диоксида кремния используется для удаления триглицеридов и других интерферирующих соединений до высокотемпературой ГХ. Образцы масла обычно были дериватизированы в пиконил эфиры [110, с. 3-19] или эфиры ТМС [166, с. 5620-5629; 170, с. 1620-1624], чтобы можно было включить свободные стеринны при анализе. Онлайн ВЭЖХ-ГХ дает воспроизводимые результаты

свободных стеринов, при этом эстерифицированные стерины частично могут распадаться в течение ГХ благодаря высоким температурам [110, с. 3-19]. Когда передаточные температуры и эффективность были тщательно оптимизированы, метод оказался применимым к качественному и количественному анализу СС и SE в метиловых эфирах растительного масла [166, с. 5620-5629]. Термическая дегградация SE в течение ГХ требует, чтобы коэффициенты коррекции были определены отдельно от факторов коррекции свободных стеринов. Функция калибровки для холестеринстеарата в отношении бетулина составляла $1,65 \pm 0,03$ [166, с. 5620-5629]. Когда холестерин лаурат использовался в качестве внутреннего стандарта, относительный фактор отклика 1,0 использовался для всех SE [69, с. 463-471]. SE растительного масла из фракций стеридов анализировались тандемной спектрометрией с прямым электрораспылением с тройным четырехугольным инструментом LS-MS-MS [33, с. 31-36; 75, с. 997-1006]. Образец был растворен в хлороформ-метиловом спирте, содержащем ацетат аммония, были измерены индикаторы иона-предшественника в режиме положительных ионов. SE были идентифицированы и количественно определены на основании ионов $[M + NH_4]^+$. Система была тщательно откалибрована 11 холестерил эфирами, из которых были рассчитаны молярные факторы коррекции. Молярные соотношения SE были подтверждены отдельным анализом фитостеринов с помощью ГХ после омыления. После отделения SE на высокотемпературной колонке ГХ (DB-5ht; 15 м x 0,25, 0,1 μ м) с помощью ввода непосредственно в холодную колонку использовалась МС для подтверждения идентичности синтезированных эфиров фитостеринов [69, с. 463-471]. Авторы использовали МС в режиме положительной химической ионизации с аммонием в качестве реагента, поскольку они посчитали ее наиболее эффективным средством для генерирования интенсивных ионов-аддуктов $[M + NH_4]^+$ и двух фрагментов, соответствующих потерям жирной кислоты с водой и без нее.

Фитостерины, этерифицированные фенольными кислотами. Двумя наиболее распространенными фитостеринами, эстерифицированными фенольными кислотами (SPHE), являются транс-феруловая кислота и транс-кумаровая кислота. Ферулаты и

кумараты присутствуют во внешних слоях многих злаков и являются важными составляющими фитостеринов во фракциях отрубей и, особенно, в маслах из отрубей риса и кукурузы [101, с. 1813-1815; 152, с. 39-47]. Смесь фитостерил ферулатов под названием γ -оризанол коммерчески экстрагируется из рисовых отрубей. Их анализ чаще всего выполняется с помощью ОФ-ВЭЖХ, в которой отделение основывается на различиях в молекулярной массе и гидрофобности. Доли фенольной кислоты в фитостерин ферулатах и кумаратах абсорбируют свет при 290-340 нм, что дает возможность отслеживать их с помощью УФ-детектора. Ферулаты и кумараты могут различаться их немного разными УФ спектрами [47, с. 319-334]. Существует несколько систем ОФ-ВЭЖХ для анализа ферулатов и кумаратов, произведенных из злаков [47, с. 319-334; 154, с. 75-83]. До 10 конъюгатов было отделено от рисовых и кукурузных экстрактов с использованием колонки C18 ОФ (Deltabond ODS, 250 x 4,6 мм, 5 μ m) и ацетонитрила-*n*-бутанола-уксусной кислоты-воды (82:3:2:13, по объему) в качестве системы растворителей [49, с. 23-35]. Фитостерил ферулаты γ -оризанола были отделены, а их доли фитостерила, идентифицированные с помощью ГХ-МС после гидролиза [122, с. 1421-1427]. Позже несколько структур было идентифицировано с помощью УФ, МС и 1H ЯМР спектрографических данных, данных об удерживании при НФ- и ОФ-ВЭЖХ и с помощью сравнения с синтезированными соединениями [59, с. 5300-5307; 149, с. 267-272]. Стерил ферулаты из злаков также были идентифицированы с помощью ВЭЖХ-МС [137, с. 704-708].

Фитостерил гликозиды. Фитостерил гликозиды (SG), также называемые стеролинами, широко распространены в съедобных растениях и являются важными составляющими в нашем рационе. Например, сумма SG и ASG в пшеничной муке и горошке составляла 31,0 и 42,6 мг/100 г сухого продукта, соответственно [52, с. 587-592]. SG семян токсичного цикаса также могут быть связаны с нейродегенеративными расстройствами [32, с. 238-241; 147, с. 331-339]. Анализ нетронутой SG выполняется с помощью ОФ-ВЭЖХ после препаративного фракционирования на класс гликозидов с помощью хроматографией диоксидом кремния, например [145, с. 745-750]. УФ и ELSD

использовались для мониторинга элюирующихся соединений. Доли жирных кислот могут быть высвобождены из ASG с помощью мягкого омыления для улучшения отделения на ОФ-ВЭЖХ [36, с. 123-148; 145, с. 745-750], или ASG также может быть проанализирована нетронутой [77, с. 171-172]. До сих пор глюкоза была единственной долей углевода в гликозидах фитостеролов. Когда SG листьев и семян овса были разделены на колонке С6 (гексил Spherisorb 125 x 4,6 мм, 5 мкм) водой и градиентным элюированием ацетонитрилом, было определено пять пиков, два из которых содержали два соединения [145, с. 745-750]. Позже 10 SG были отделены и идентифицированы из сои и тыквенных семян [36, с. 123-148]. Молекулярные частицы SG и ASG, экстрагированные из красного сладкого перца, были проанализированы ОФ-ВЭЖХ в сочетании с ХИАД-МС и подтверждены анализом ГХ гидролизованного фитостерина и долей жирных кислот [77, с. 171-172]. Кампестерил и ситостерил глюкозиды были двумя идентифицированными SG. В AGS кампестерил и ситостерил глюкозиды были эстерифицированы пальмитиновой, стеариновой, ленолевой и леноленовой кислотами. В другом исследовании глюкозиды кампестерина и дигидробрассикастерина, ситостерина и стигмастерина были идентифицированы посредством МС и ЯМР спектроскопией [147, 331-339].

1.5 Нормативно-правовая база в отношении контроля фитостеролов

Внимание со стороны правовой системы государства в Российской Федерации в отношении контроля фитостеролов в продуктах питания носит скорее рекомендательный характер, что подтверждено следующими документами:

1 Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). Утверждено решением Комиссии таможенного союза 28 мая 2010 г. № 299.

2 МР 2.3.1.2432-08 Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых

веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации ГУ ВНИИ Питания РАМН, 2008г.

В пищевой отрасли существует два нормативных документа в отношении методики определения фитостеринов:

1 ГОСТ Р 51471-99 Жир молочный. Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стериннов.

2 ИСО 12078:2006 Жир молочный обезвоженный. Определение состава стериннов газожидкостной хроматографией (Контрольный метод)

Вышеперечисленные документы имеют единую область применения - стандарт устанавливает контрольный метод газожидкостной хроматографии для определения состава стериннов в обезвоженном молочном жире, выделенном из молочных продуктов. В случае анализа молочного жира в смеси с растительными жирами установленная методика позволяет производить оценку наиболее важных фитостеринов. Методика была подтверждена на пробах молочного жира, содержащих приблизительно от 28 % до 32 % растительного жира.

Необходимо отметить, что на данный момент в пищевой отрасли наравне с упомянутыми Санитарно-эпидемиологическими и гигиеническим требованиям к товарам действуют главенствующий закон, нормирующий безопасность продукции – ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», в котором нет нормирования содержания фитостеринов, в частности, для пивоваренной продукции.

Исходя из обзора нормативной документации, актуальность контроля фитостеринов отмечена в области молока и молочной продукции, в которой этот показатель является определяющим для идентификации молочной продукции.

Таким образом, для пивоваренной продукции, показатель содержания фитостеринов недостаточно изучен, и поэтому его содержание никак не нормируется, а указанные нормы потребления носят рекомендательный характер, не относящийся к влиянию фитостеринов на процессы старения пива и вклад фитостеринов в органолептическую и физико-химическую стабильность пива.

Заключение по главе 1

Фитостерины, содержащиеся в липидной фракции всех растений и продуктах питания, в том числе напитках брожения (пиве), имеют различный состав и биологически-активные функции. Состав фитостеринов пива также зависит от состава липидной фракции исходной растительной матрицы применяемого в технологии зернового сырья, причем количественный и качественный состав фитостеринов зависит от вида зернового сырья, а также условий его уборки и хранения.

На сегодняшний день влияние фитостеринов на качество пива недостаточно изучено, а методы определения фитостеринов в сырье и готовой продукции в пивоваренной отрасли отсутствуют, хотя отмечено возможное негативное влияние стеридов растительного происхождения на стабильность вкуса пива. Например, во время хранения пива при сдвиге коллоидного равновесия и повышения кислотности пива, фитостерины являются дополнительным источником возникновения веществ, влияющих на органолептическую стабильность пива.

Анализ фитостеринов в растительном сырье и продуктах питания на его основе - сложная задача, поскольку эти соединения находятся как в виде свободных спиртов, так и в виде различных конъюгатов, и, следовательно, могут быть легко экстрагированы или крепко связаны с растительной матрицей. Приготовление образцов и аналитический метод должны быть тщательно оценены при анализе содержания фитостеринов.

Отмечено, что существует ряд методов количественного выделения фитостеринов из различных растительных матриц, однако количество проведенных исследований с наработкой данных по фитостеринам в растительном сырье и продуктах на их основе, все еще невелико. Методы качественного и количественного выделения фитостеринов из зернового сырья, хмеля и хмелепродуктов недостаточно изучены для пивоваренной отрасли.

Таким образом, разработка аналитического метода качественного и количе-

ственного определения фитостеринов в пиве имеет актуальность и важна для пивоваренной отрасли с целью определения степени влияния фитостеринов на качество пива в течение хранения. Также важное значение имеет возможность выявить сырье, применяемое для производства пива, на основе определения количества фитостеринов, так как на данный момент способа определения сырья по готовому продукту (пиву) не существует.

Глава 2 Определение фитостеринами различными хроматографическими методами

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования выбрано следующее пивоваренное сырье и полупродукты производства, физико-химические параметры которых представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Физико-химические показатели пивоваренного солода, суслу и хмеля

Характеристики	Показатели солода пивоваренного ячменного пльзеньского, светлого (Бельгия)	
	фактическая	по ГОСТ 29294-2012
<i>Солод светлый пивоваренный ячменный</i>		
Массовая доля влаги, %	4,4	до 5
Массовая доля экстракта в сухом веществе, %	81,0	не менее 78
Продолжительность осахаривания, мин	20	не более 20
Разница массовых долей экстрактов в сухом веществе солода тонкого и грубого помолов, %	1,7	до 2,5
рН	5,65	-
Цвет лабораторного суслу до кипячения, ц.ед.	0,20	не более 0,2
Массовая доля белковых веществ солода, %	10,9	не более 11,5
Растворимый белок, %	4,5	-
Число Кольбаха, %	41,3	39-41
Вязкость лабораторного суслу, сПз	1,57	-
Фриабильность, %	89,0	-
<i>Суслу из солода светлого пивоваренного ячменного</i>		
Экстрактивность, % а.с.в.	8,4	-
Аминный азот, мг/дм ³	220	-
Содержание редуцирующих веществ, %	82	-

Продолжение таблицы 10

Прозрачность	Прозрачное с блеском	-
<i>Показатели хмеля гранулированного «Пилигрим» (Англия)</i>		
Массовая доля влаги, %	5,0	до 5
Содержание α -кислоты, %	9,8	до 11

Физико-химические показатели образцов отечественного и импортного пива, использованных для исследования состава стерина, представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Показатели анализируемого пива

№ образца	Название образца	Характеристика образца		
		Производитель (дата производства)	Объемная доля этилового спирта, %об., не менее	Концентрация начального сусла, % масс.
<i>Отечественные образцы пива</i>				
1	«Tuborg» (лицензионное), светлое, фильтрованное, пастеризованное	ОАО Пивоваренная компания «Балтика», г. Тула (ноябрь 2014 г.)	4,0	11,0
2	«Три медведя», светлое, фильтрованное, пастеризованное	ООО «Объединенные пивоварни «Хайнекен», г. Санкт-Петербург (ноябрь 2014 г.)	4,5	11,5
3	«Жигули барное», светлое, фильтрованное, пастеризованное	ЗАО «Московская пивоваренная компания», Московская обл. (ноябрь 2014 г.)	4,0	11,4
4	«Lowenbrau», светлое, фильтрованное, пастеризованное	ОАО «САН ИнБев», г. Калуга (ноябрь 2014 г.)	4,5	12,0
<i>Импортные образцы пива</i>				
1	«Krushovice Cerne», темное, фильтрованное пастеризованное	«Хайнекен Интернейшнл», Чехия (октябрь 2014 г.)	3,8	10,0
2	«Birra Moretti», светлое, фильтрованное пастеризованное	«Fabbrica di birra e ghiaccio», Италия (октябрь 2014 г.)	4,6	10,6
3	«Spaten» светлое фильтрованное пастеризованное	«Шпатен», Германия (ноябрь 2014 г.)	5,2	12,0
4	«Tsingtao» светлое, фильтрованное пастеризованное	«Циндао», Китай (ноябрь 2014 г.)	4,7	11,0

Для приготовления сусла использовали конгрессный метод затираания при соотношении солода пивоваренного ячменного и воды 1:4, с выдержкой определенных температурных пауз (Таблица 12).

Таблица 12 – Режим затираания солода

Температура, °С	Продолжительность, Мин
47	30
Подъем до 52	5
52	30
Подъем до 63	11
63	30
Подъем до 72	9
72	40 мин

Затор остужали до 20°C, доводили водой до массы содержимого заторного стакана 500 г, фильтровали.

2.2 Методы исследования

В качестве методов исследования использовали обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию со светорассеиванием, а также обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-детектированием с целью исследования фитостеринов в сырье по методу [152, с. 39-47]. Для определения растительных стеридов в пивоваренной продукции использовали также высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-детектированием и высокоэффективную газожидкостную хроматографию также с масс-детектированием.

В качестве стандартов для отработки хроматографических методов использовали:

- для определения качественного состава пивоваренного сырья и сусла растворы, содержащие холестерин, β -ситостерин в смеси дихлорметан-этанол фирмы «Panreac»;

- для определения качественного и количественного состава фитостеринов пива использовали растворы, содержащие холестерин, β -ситостерин и кампестерин в смеси дихлорметан-этанол фирмы «Panreac».

Приготовление стандартных растворов для хроматографирования образцов со-
лода, сусла и хмеля.

Навеску холестерина массой $100 \text{ мг} \pm 0,001 \text{ г}$ взвешивали на аналитических весах, растворяли в смеси 50 см^3 этанола, 15 см^3 дихлорметана и доводили до метки дистиллированной водой, при необходимости фильтровали. Таким же образом готовили базовый раствор β -ситостерина. Из приготовленного таким образом базовых растворов холестерина и β -ситостерина концентрацией 1 мг/см^3 отбирали по 1 см^3 из каждого раствора и помещали их в мерную колбу на 100 см^3 , растворяли в смеси 50 см^3 этанола и 15 см^3 дихлорметана, далее добавляли в раствор 35 см^3 дистиллированной воды, перемешивали растворы до полного растворения. Время хранения раствора 1 месяц при температуре $4-8^\circ\text{C}$.

Приготовление стандартных растворов для хроматографирования образцов
пива.

Навеску холестерина массой $100 \text{ мг} \pm 0,001 \text{ г}$ взвешивали на аналитических весах, растворяли в 50 см^3 этанола, 15 см^3 дихлорметана, доводили до метки дистиллированной водой, при необходимости фильтровали. Таким же образом готовили базовый раствор β -ситостерина и кампестерина. Из приготовленного таким образом базовых растворов холестерина и β -ситостерина концентрацией 1 мг/см^3 отбирали по 1 см^3 из каждого раствора и помещали их в мерную колбу на 100 см^3 , растворяли в смеси 50 см^3 этанола и 15 см^3 дихлорметана, далее добавляли в раствор 35 см^3 дистиллированной воды, перемешивали растворы до полного растворения. Время хранения раствора 1 месяц при температуре $4-8^\circ\text{C}$.

Получение фитостеринового комплекса сырья. Экстракцию фитостеринов из солода пивоваренного ячменного, сусла и хмеля гранулированного проводили методом MacMurrey and Morrison (1970), используя дихлорметан.

Разделение фитостеринов сырья проводили двумя методами колоночной жидкостной хроматографией:

- с типом колонки Agilent Hypersil ODS 2.0 x125 mm с детектором Agilent Technologies 1200 Series и детектором по светорассеиванию Alltech 3300 ELSD на сорбенте полиэфирэфиркетоне;

- с масс-детектором LS/MSD Trap SL и детектором Agilent 1100 Series LS/MS; источником ионов АРСІ со скоростью газа распылителя (азота) 10 л/мин и давлением небулайзера 50 psi; температурой газа-осушителя 350°C и энергией разделения 1,2.

Разделение и количественное определение фитостеринового комплекса пива проводили тремя методами колоночной хроматографии:

- с масс-детектором LS/MSD Trap SL и детектором Agilent 1100 Series LS/MS; источником ионов АРСІ со скоростью газа распылителя (азота) 10 л/мин и давлением небулайзера 50 psi; температурой газа-осушителя 350°C и энергией разделения 1,2 и колонкой Agilent Hypersil ODS 2.0 x125 mm;

- с масс-детектором LS/MSD Trap SL и детектором Agilent 1100 Series LS/MS; источником ионов АРСІ со скоростью газа распылителя (азота) 10 л/мин и давлением небулайзера 50 psi; температурой газа-осушителя 350°C и энергией разделения 1,2 и колонкой Symmetry C8 2.1 x150 mm;

- методом газовой хроматографии типа Agilent 7890A GC/МС с масс детектором.

Физико-химические показатели качества пива определяли согласно ГОСТ 31711-2012.

Определение мутности пива. Мутность пива определяли на аппарате (мутномере) Vos Rota 90/25 Hazemeter (Haffmans, Нидерланды) нефелометрическим методом по измерению потока света под углами 90° и 25° и обозначали как H_{90} и H_{25} . Для этого

пиво освобождали от CO_2 , заполняли им кювету аппарата, герметично ее закрывали и опускали в измерительную камеру мутномера, при помощи автоматической системы аппарата, измеряли величину мутности образца пива. Величина, полученная при измерении под углом 90° , характеризует мелкодисперсные коллоидные частицы (типа растворенных в пиве белков и т.д.), размером 0,01-0,10 мкм, а величина, полученная при измерении под углом 25° обуславливает присутствие в пиве крупных частиц дрожжей или фильтрующего материала, размером 0,1-1,0 мкм.

Принцип действия мутномера основан на измерении фотоприемником сигнала от галогеновой лампы, которая излучает свет под разными углами и, в зависимости от находившихся в коллоидной системе веществ, происходит либо рассеивание, либо поглощение пропускаемого света, что и регистрируется фотоэлементом аппарата.

Диапазон измерения мутности имеет диапазон от 0,00 до 100,00 ед. ЕВС, его разрешающая способность соответствует 0,01 ед. ЕВС, воспроизводимость измерений соответствует 1%.

Определение тиобарбитурового числа. Тиобарбитуровое число (ТБЧ), мг/дм³, определяли по ГОСТ Р 55810-2013, причем перед началом опыта образец пива освобождали от CO_2 .

Определение содержания полифенолов проводили согласно [16, с. 246-250].

Содержание изогумулона проводили по методу Клоппера в модификации Бауша по ИК 10-05031536-127-91.

Содержание меланоидинов определяли по методу Колотуши, основанном на определении цвета пива, выраженного в см³ 0,1н раствора J_2 в 100 см³ с последующим пересчетом на количество меланоидинов (Таблица 13). В свою очередь, цвет пива определяли согласно ГОСТ 12789-87.

Содержание меланоидинов рассчитывается мг/100 см³ пива.

Таблица 13 – Зависимость между опт. плотностью и концентрацией меланоидинов

Оптическая плотность D, длина волны 490 нм	Кол-во меланоидинов, мг/100 см ³	Цветность по йоду, см ³ 0,1н р-ра J ₂ в 100 см ³	Оптическая плотность D, длина волны 490 нм	Кол-во меланоидинов, мг/100 см ³	Цветность по йоду, см ³ 0,1н р-ра J ₂ в 100 см ³
0,196	7,0	0,52	0,511	19,0	1,40
0,209	7,5	0,56	0,525	19,5	1,43
0,223	8,0	0,60	0,538	20,0	1,46
0,236	8,5	0,63	0,551	20,5	1,50
0,249	9,0	0,66	0,564	21,0	1,53
0,262	9,5	0,70	0,577	21,5	1,58
0,275	10,0	0,73	0,590	22,0	1,61
0,288	10,5	0,77	0,603	22,5	1,64
0,301	11,0	0,81	0,617	23,0	1,70
0,314	11,5	0,84	0,630	23,5	1,72
0,327	12,0	0,88	0,643	24,0	1,75
0,340	12,5	0,91	0,656	24,5	1,78
0,354	13,0	0,95	0,669	25,0	1,82
0,367	13,5	0,99	0,682	25,5	1,84
0,380	14,0	1,02	0,695	26,0	1,90
0,393	14,5	1,06	0,708	26,5	1,93
0,406	15,0	1,10	0,722	27,0	1,96
0,419	15,5	1,13	0,735	27,5	2,00
0,432	16,0	1,17	0,748	28,0	2,04
0,445	16,5	1,21	0,761	28,5	2,07
0,459	17,0	1,24	0,777	29,0	2,11
0,472	17,5	1,28	0,787	29,5	2,15
0,485	18,0	1,31	0,800	30,0	2,18
0,498	18,5	1,35			

Проведение корреляционно-регрессионного анализа. Проводимый корреляционно-регрессионный анализ имел своей целью нахождение уравнения регрессионной зависимости между выборочным рядом величин, а также установлением корреляционной взаимосвязи между выбранными параметрами с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Он рассчитывается по формуле (1):

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2) \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

где x_i – значение независимой переменной,

\bar{x} – среднееарифметическое значение независимой переменной;

y – значение зависимой переменной;

y_i – среднееарифметическое значение зависимой переменной.

Коэффициент корреляции имеет следующие свойства:

- при $r=0$ величины X и Y некоррелированы, но это не значит, что между ними отсутствует какая-либо связь;
- при $r \neq 0$ величины X и Y коррелированы;
- при r $-1 \leq r \leq 1$ и если $|r|=1$ имеется линейная функциональная зависимость.

В таблице 14 представлена градация силы связи между переменными.

Таблица 14 – Сила связи между переменными

Величина коэффициента корреляции по абсолютной величине	Характеристика связи
$r=0$	Связь между некоррелированными переменными
$0 < r < 0,3$	Слабая
$0,3 \leq r \leq 0,7$	Средняя
$0,7 \leq r \leq 1,0$	Сильная
$r=1$	Функциональная

Мерой изменчивости коэффициента корреляции служит ошибка коэффициента корреляции m , вычисляемая по формуле (2):

$$m = \sqrt{(1 - r^2)/(n - 2)} \quad (2)$$

Зная ошибку коэффициента корреляции, можно вычислить критерий достоверности t для него по формуле (3):

$$t = I \frac{r}{m} I = Ir \cdot \sqrt{\frac{n-2}{1-n^2}} I \quad (3)$$

Вычисленное по модулю значение критерия достоверности t сравнивается по значению с критерием Стьюдента $t_{ст}$ для $k=n-2$ и уровнем доверительной вероятности $P=0,95$ (Таблица 15).

Таблица 15 – Стандартные значения критерия Стьюдента [5]

К	Доверительная вероятность			К	Доверительная вероятность		
	Р				Р		
	0,95	0,99	0,999		0,95	0,99	0,999
1	12,71	63,66	636,62	6	2,45	3,71	5,96
2	4,30	9,92	31,60	7	2,36	3,50	5,40
3	3,18	5,84	13,94	8	2,31	3,36	5,04
4	2,78	4,60	8,61	9	2,26	3,25	4,78
5	2,57	4,03	6,86	10	2,23	3,17	4,59

Если $t > t_{ст}$ делается вывод о наличии корреляционной связи между величинами. Если условие не выполняется, связь недостоверна, случайна.

Для того, чтобы оценить степень изменения зависимых применяется регрессионный анализ, устанавливающий формулу уравнения зависимости величин, связанных корреляционными связями.

Вычисляют коэффициенты для парных уравнений по формулам (4-5):

$$Y = a_1 + b_{y/x} X - \text{прямое уравнение,} \quad (4)$$

$$X = a_2 + b_{x/y} Y - \text{обратное}, \quad (5)$$

где a и b – параметры, которые необходимо определить,

$b_{y/x}$ и $b_{x/y}$ – коэффициенты регрессии, вычисляемые по формулам (6-7)

$$b_{x/y} = \frac{\sum(x_i - x')(y_i - y')}{\sum(y_i - y')^2}, \quad (6)$$

$$b_{y/x} = \frac{\sum(x_i - x')(y_i - y')}{\sum(x_i - x')^2} \quad (7)$$

Коэффициент a определяется по формуле:

$$a_1 = y' - b_{x/y} \cdot x', \quad a_2 = x' - b_{y/x} \cdot y'$$

После подстановки коэффициентов в формулу получаем окончательные уравнения парной регрессии по формулам (8-9):

$$y_x = y' + \frac{\sum(x_i - x')(y_i - y')}{\sum(x_i - x')^2} \cdot (x - x'), \quad (8)$$

$$x_y = x' + \frac{\sum(x_i - x')(y_i - y')}{\sum(y_i - y')^2} \cdot (y - y') \quad (9)$$

С целью оценки полученных данных следует выбрать доверительный интервал, который оценивается σ – средне квадратичным отклонением регрессии и характеризует на графике зону, в которую попадают некоторые адекватные полученные значения с частотой 95% от исследуемой совокупности.

σ вычисляется по формуле (10-11):

$$\sigma_{x/y} = \sigma_y \sqrt{1 - r^2}, \quad (10)$$

$$\sigma_{x/y} = \sigma_x \sqrt{1 - r^2} \quad (11)$$

Данные величины абсолютны, и для удобства пользуются относительными погрешностями уравнений по формулам (12-13):

$$\sigma'_{y/x} = \frac{\sigma_{y/x}}{y'} 100\%, \quad (12)$$

$$\sigma'_{x/y} = \frac{\sigma_{x/y}}{x'} 100\% \quad (13)$$

Проведение множественного корреляционного-регрессионного анализа. Вследствие необходимости решения вышеуказанной проблемы применялась множественная корреляция, которая позволяет обнаружить взаимосвязь большого числа одновременно и совокупно действующих факторов. Данная задача решается методом множественного корреляционного анализа.

Построение многофакторной корреляционной модели начинается с установления формы связи, используя графический метод, после чего проводят отбор факторных признаков и включают их в модель.

Для определения силы связи и отбора факторов считают средний квадрат отклонений фактических значений X от значений, вычисленных по формуле (16) с учетом всех факторных признаков:

$$(S'_{xi})^2 = \left[\frac{1}{1-n} (X_i - X'_i)^2 \right] \quad (16)$$

Расчитывают коэффициент парной корреляции R_{xixi+1} по формуле (17):

$$R_{x_i x_{i+1}} = \frac{X'_i \cdot X'_{i+1} - X'_i \cdot X'_{i+1}}{S_{X_i} \cdot S_{X_{i+1}}} \quad (17)$$

Сравнивая коэффициенты парной корреляции между собой, освобождаются от нескольких зависимых с меньшей парной корреляцией, и далее строят уравнение зависимостей все отобранных факторов по уравнению (18):

$$Y_{i,i+1\dots i+n} = A_0 + A_1 X_1 + A_2 X_2 + \dots + A_n X_n \quad (18)$$

Для решения данного уравнения составляют систему из n уравнений по формуле (14) и решают его.

Для выполнения вышеперечисленных методик использовались следующие приборы и посуда:

Центрифуга для пробирок объемом не менее 15 см^3 и относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 4000;

лабораторная мельница ИКА.

шейкер для встряхивания пробирок объемом не менее 15 см^3 ;

весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 100 г и погрешностью $\pm 0,0001$ г;

магнитная мешалка с подогревом ИКА С-MAG HS 4;

водяная баня;

роторные испарители Heidolph Hei-Var;

круглодонные колбы объемом 100 мл;

колбы мерные наливные объемом 50 и 100 см^3 по ГОСТ 1770;

цилиндры мерные лабораторные с носиком 2-го класса точности вместимостью 100 см^3 по ГОСТ 1770;

автоматические пипетки с переменным объемом $0,1-1,0 \text{ см}^3$

полимерные пробирки объемом 15 см^3 с герметичной крышкой;

виалы с крышкой.

Использовались следующие реактивы:

- ✓ β – ситостерин;
- ✓ холистерин;
- ✓ кампестерин;
- ✓ дихлорметан;
- ✓ этанол;
- ✓ метанол;
- ✓ ацетон;
- ✓ ацетонитрил для ВЭЖХ;
- ✓ сульфат натрия;
- ✓ гексан;
- ✓ сульфат аммония;
- ✓ метанольный раствор едкого калия;
- ✓ диэтиловый эфир гексана;
- ✓ изопропанол для ВЭЖХ;
- ✓ соляная кислота;
- ✓ вода дистиллированная.

Исследования проводились в течение 2011-2014 гг. в лаборатории «Химии пищевых продуктов» ФГБУ «НИИ питания РАМН».

Общая схема проведения исследования по теме диссертации представлена на рисунке 3.

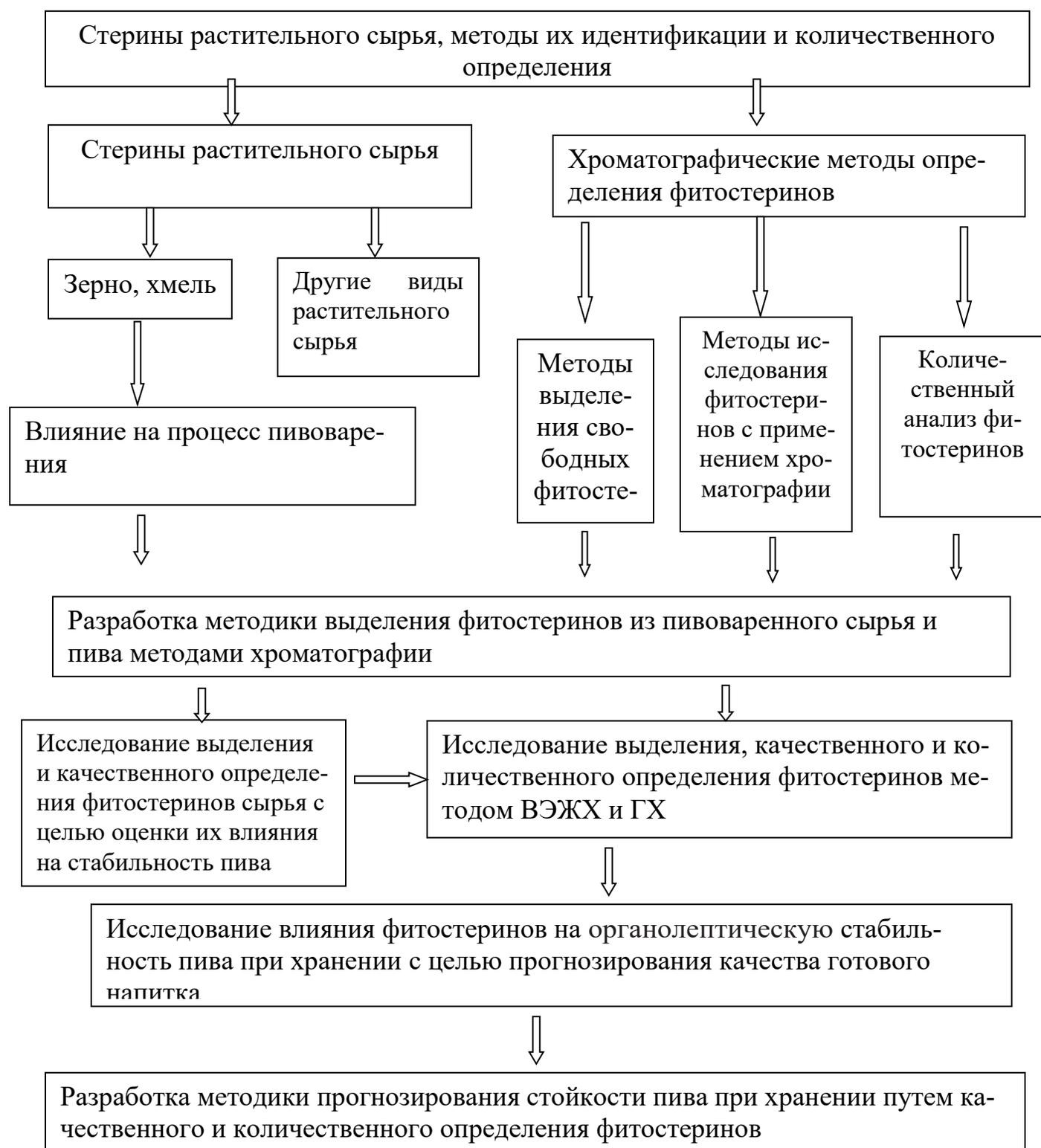


Рисунок 3 – Структура диссертационной работы

2.3 Определение влияния сырья на содержание фитостеринов в пиве

Известно, что наиболее точным методом определения как качественного, так и количественного содержания веществ любой природы является хроматография.

С целью определения содержания стероидов в пиве необходимо определить их качественный состав в исходном сырье – солоде и хмеле, которые являются основным источником возникновения фитостеринов в пиве.

Для наиболее точного определения исследуемых веществ необходимо правильно подобрать как растворитель, так и состав подвижной фазы (в случае применения жидкостной хроматографии).

2.3.1 Качественное определение фитостеринов методом ВЭЖХ пивоваренного сырья (солода и хмеля)

Для выделения фитостеринов из исследуемых объектов проводили экстракцию в следующем порядке:

- около 50 г солода отбирали методом квадратов из объединенной пробы образца, подвергали измельчению в лабораторной мельнице и из полученного помола отбирали навеску солода массой 5 мг и помещали в мерную колбу на 100 см³, куда последовательно добавляли 10 см³ дистиллированной воды, 5 см³ дихлорметана, смесь перемешали до полного растворения; далее 1 мл приготовленного раствора приливали в полимерную пробирку объемом 15 см³ с герметичной крышкой и центрифугировали в течение 5 мин с относительной силой центрифугирования (RCF) не менее 10 000, после чего для анализа отбирали надосадочную жидкость;

- навеску суслы, приготовленного по п. 2.1, массой 5 мг помещали в мерную

колбу на 100 см³, куда последовательно добавляли 10 см³ дистиллированной воды, 5 см³ дихлорметана, перемешали до полного растворения и переносили 1 см³ приготовленного раствора в полимерную пробирку объемом 15 см³ с герметичной крышкой, после чего раствор центрифугировали в том же порядке, как было описано выше;

- около 10 г хмеля отбирали из объединенной пробы, измельчали на мельнице и из полученного измельченного образца отбирали навеску хмеля 5 мг, помещали его в мерную колбу на 100 см³, куда последовательно добавляли 10 см³ дистиллированной воды, 5 см³ дихлорметана, перемешали до полного растворения и из полученной суспензии отбирали 1 см³ в полимерную пробирку объемом 15 см³ с герметичной крышкой и далее проводили центрифугирование как было описано выше.

Получение хроматограмм для внутреннего стандарта определения фитостеринов.

Как известно, для правильного проведения процедуры качественного и количественного определения искомых веществ необходимо правильно подобрать состав подвижной фазы для разделения определяемых компонентов из раствора внутреннего стандарта и режим его введения.

Для определения стериев растительного происхождения был выбран градиентный режим подачи элюэнта, поскольку данные соединения являются веществами, чувствительными к составу раствора подвижной фазы, поэтому их хроматографируют в градиентном режиме, поскольку при постоянной концентрации элюэнта фитостерины либо не удержаться на колонке, либо будут иметь очень небольшой объем удерживания, учитывая их достаточную молекулярную массу. Параметры хроматографирования представлены в таблице 16, а влияние состава компонентов подвижной фазы на время удерживания компонентов внутреннего стандарта представлено в таблице 17 и на рисунках 4-6.

Таблица 16 – Параметры хроматографирования

Параметр	Значение
<i>Насос:</i>	
– скорость потока	0,5 м/мин
– длина волны светорассеивания	210 нм
<i>Инжектор</i>	
– объем ввода	5 мкл
<i>Термостат колонок</i>	
– температура	20°C

Таблица 17 – Влияние состава подвижной фазы на время удерживания компонентов внутреннего стандарта

Характеристика	Хроматографические параметры подвижной фазы в зависимости от ее состава		
	Содержание (%) дихлорметана (раствор А) + ацетонитрила (раствор В)		Содержание (%) дистиллированной воды (раствор А) + ацетонитрила (раствор В)
	I вариант	II вариант	III вариант
Время элюирования, мин:			
- 0	A=5, B=95	A=0, B=100	A=5, B=95
- 5	A=5, B=95	-	-
- 15	-	A=20, B=80	A=0, B=100
- 20	-	-	A=0, B=100
- 25	-	-	A=5, B=95
- 30	A=50, B=50	-	-
Время удерживания (t_R), мин:			
- холестерин	3,094	3,837	10,0
- β-ситостерин	3,878	4,844	13,4
- третий компонент	3,467	4,324	11,5

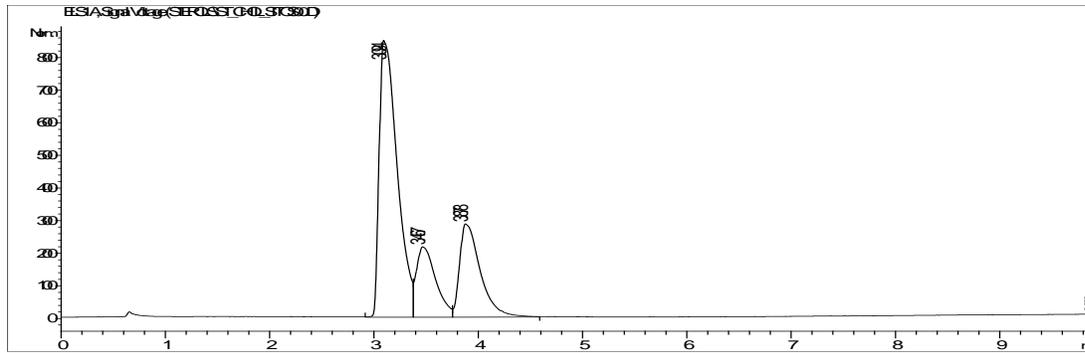


Рисунок 4 – Хроматограмма раствора внутреннего стандарта I вариант

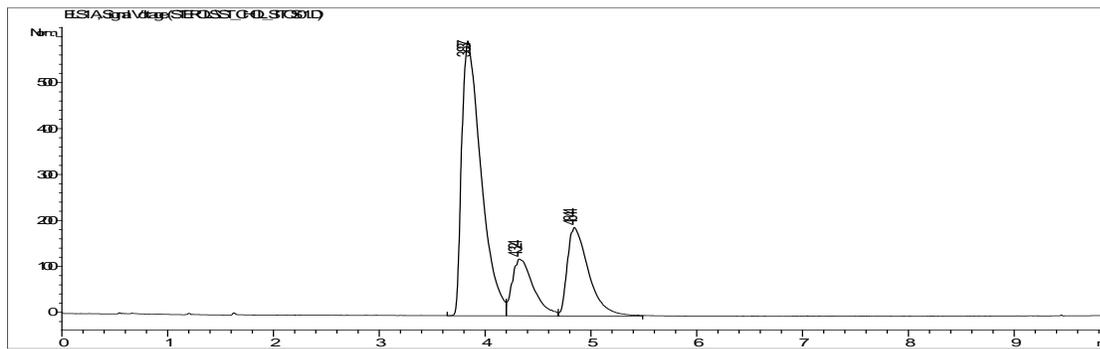


Рисунок 5 – Хроматограмма раствора внутреннего стандарта II вариант

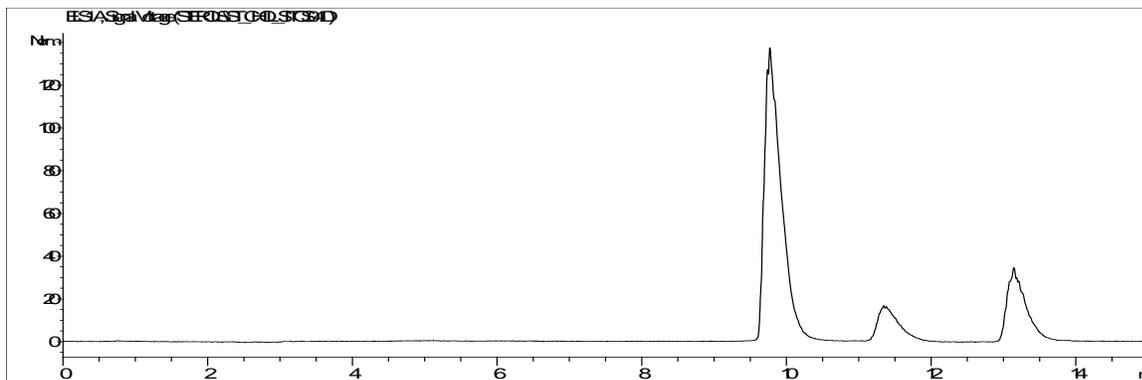


Рисунок 6 – Хроматограмма раствора внутреннего стандарта III вариант

Для того чтобы правильно оценить эффективность разделения веществ внутреннего раствора стандарта, необходимо вычислить степень распределения двух компонентов R_s , коэффициент емкости k' , который характеризует удерживание веществ в хроматографической колонке.

Степень распределения двух компонентов (R_s) вычисляется по формуле (18)

следующим образом:

$$Rs = 2 \cdot \frac{T_r - T_0}{W_1 + W_2}, \quad (18)$$

где T_r и T_0 – время удерживания второго и первого вещества соответственно, мин;

W_1 и W_2 – ширина пиков второго и первого вещества соответственно, мин.

Степень распределения двух компонентов по литературным данным считается удовлетворительной, а калибровочная кривая достоверной, если $Rs \geq 1,5$.

Коэффициент емкости (k') по формуле (19) рассчитывается следующим образом:

$$k' = \frac{T_r - T_0}{T_0} \quad (19)$$

Калибровочная хроматограмма считается достоверной, когда коэффициент емкости наибольший по сравнению со всеми вариантами калибровочных хроматограмм.

Данные расчета эффективности полученных трех вариантов хроматограмм представлены в таблице 18, данные получены на основании полученных кривых (Рисунки 4-6).

Таблица 18 – Параметры по определению эффективности разделения веществ

Параметр	Вариант хроматографирования		
	I	II	III
T_{r1} , мин	3,094	4,324	11,5
T_{r2} , мин	3,467	4,844	13,4
T_{r3} , мин	3,878	3,837	10,0
T_0 , мин	0,6	1,6	0,7
W_1 , мин	0,4	0,4	0,3
W_2 , мин	0,5	0,4	0,7
Rs , среднее	0,91	0,65	1,8
k' , среднее	4,8	1,7	15,6

Как видно из рисунков 4-6, в процессе анализа на хроматограммах время удерживания самого раствора элюирования меняется в зависимости от состава подвижной фазы. Данные таблицы 17 показывают эффективность применения III варианта состава подвижной фазы для достижения поставленной цели – получения калибровочной хроматограммы растворов сравнения. Для достижения оптимального разделения веществ стандарта необходимо добиться максимального разнесения компонентов по времени, о чем и свидетельствует наибольший коэффициент k' и величина R_s больше 1,5 в III варианте. Во все трех вариантах хроматографирования в процессе анализа вышел пик дополнительного раствора вещества со временем удерживания 11,5 мин.

Таким образом, было принято решение использовать состав III подвижной фазы для анализа образцов.

Определение качественного состава фитостеринов сырья

После определения наиболее эффективного состава подвижной фазы раствора стандарта, исследовали состав фитостеринов сырья: солода, суслы и хмеля. Условия проведения ВЭЖХ образцов представлены в таблице 19, а полученные хроматограммы – на рисунках 7-8.

Таблица 19 – Параметры хроматографирования

Параметр	Значение	
<i>Насос:</i>		
– состав подвижной фазы	Компонент А – вода дистиллированная, компонент В – ацетонитрил.	
– условия градиентного элюирования	Время, мин	Содержание компонента В, %
	0	95
	15	100
	20	100
	25	95
– скорость потока	0,5 м/мин	
– длина волны	210 нм	
<i>Инжектор</i>		
– объем ввода	5 мкл	
<i>Термостат колонок</i>		
– температура	20°C	

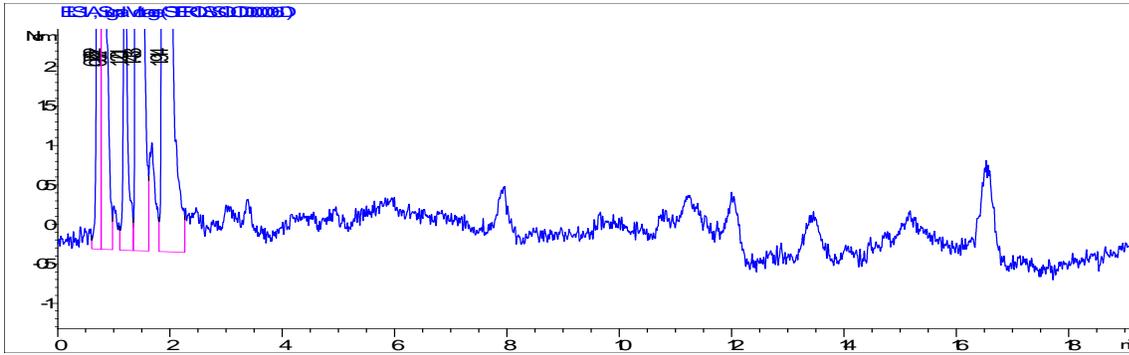


Рисунок 7 – Хроматограмма фитостеринов солода

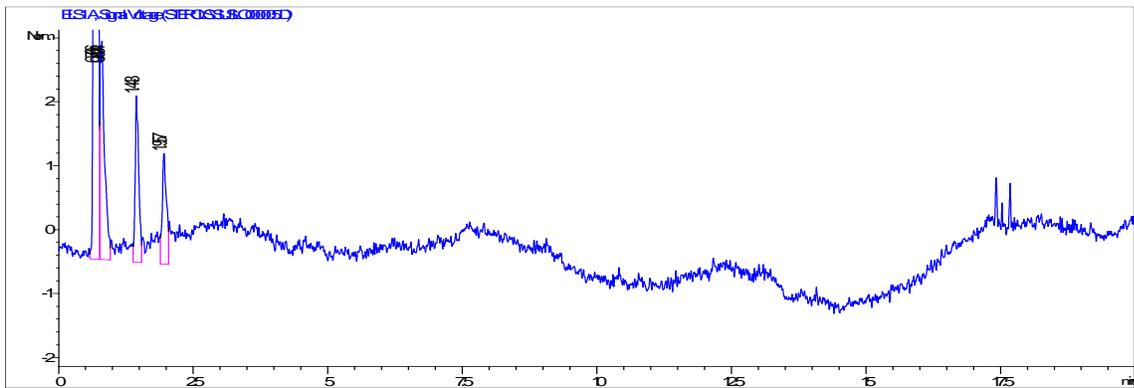


Рисунок 8 – Хроматограмма фитостеринов образца сусле

Как видно из полученных хроматограмм для солода и сусле (Рисунки 7-8), не удалось применить детектирование со светорассеиванием с целью определения качественного и количественного содержания фитостеринов вследствие получения нечеткой картины разделения веществ, это же относится и к образцу анализируемого хмеля.

Таким образом, было принято решение использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с использованием масс-детектора.

2.3.2 Качественное определение фитостеринов методом ВЭЖХ с масс-детектированием

Условия пробоподготовки, состав подвижной фазы для определения фитостеринов методом ВЭЖХ с масс-детектированием не были изменены.

Условия детектирования: тип детектора: Agilent 1100 Series LC/MS; источник ионов: АРСІ; скорость газа-распылителя (азот): 10 л/мин; давление небулайзера: 50 psi; температура газа-осушителя (азот): 350°C; полярность: положительная; тип детектирования: LC/MSD Trap SL; энергия разрушения (амплитуда): 1,2;

Хроматографирование проводилось при температуре термостата 20°C для сохранения стабильного состояния детектируемых веществ.

Отработанный раствор внутреннего стандарта подвергался разведению в соотношении 1:1, результаты хроматографирования представлены на рисунках 9-11.

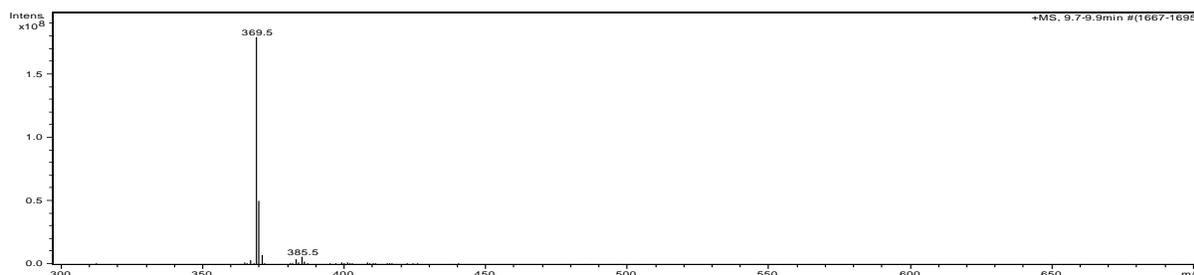


Рисунок 9 – Масс-спектр холестерина

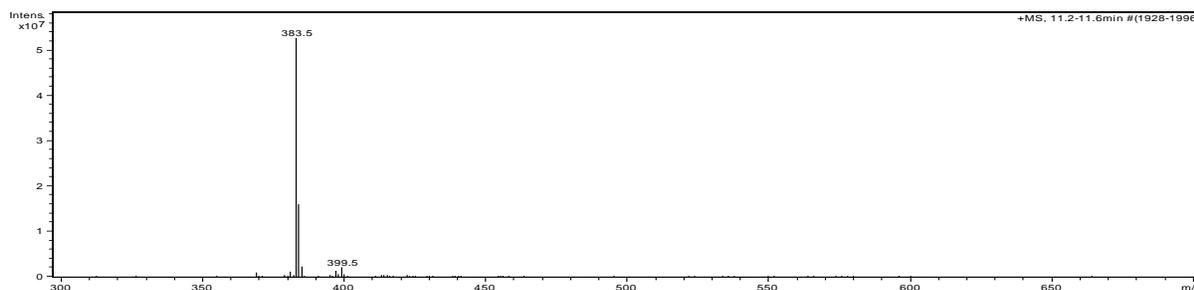


Рисунок 10 – Масс-спектр кампестерина

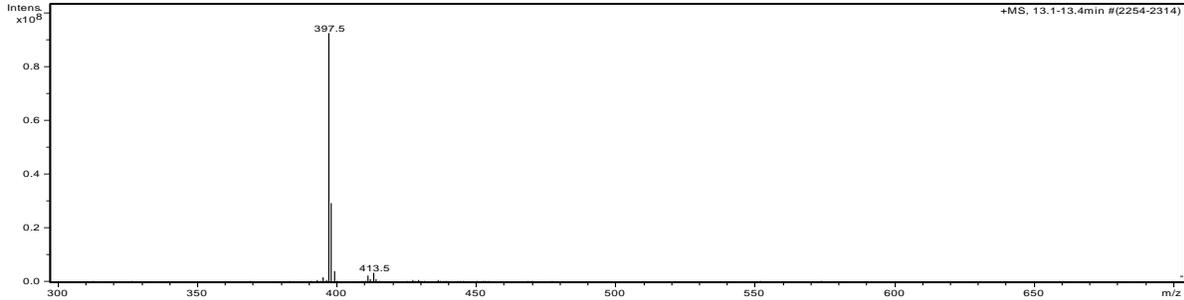


Рисунок 11 – Масс-спектр бета-ситостерина

Исходя из данных хроматографических исследований (Рисунки 9-11), в процессе масс-детектирования раствора внутреннего стандарта удалось подтвердить наличие в растворе холестерина и β -ситостерина, исходя из их молекулярных масс. Так же удалось идентифицировать дополнительный третий пик на предыдущих хроматограммах с применением светорассеивания (Рисунки 4-6) – данный пик по молекулярной массе соответствовал кампестерину.

После получения калибровочных хроматограмм по раствору внутреннего стандарта, в анализируемых образцах сырья определяли содержание фитостеринов, согласуясь с отработанным режимом их хроматографирования. Хроматографический анализ образца солода представлен на рисунках 12-13, а хмеля – на рисунках 14-17.

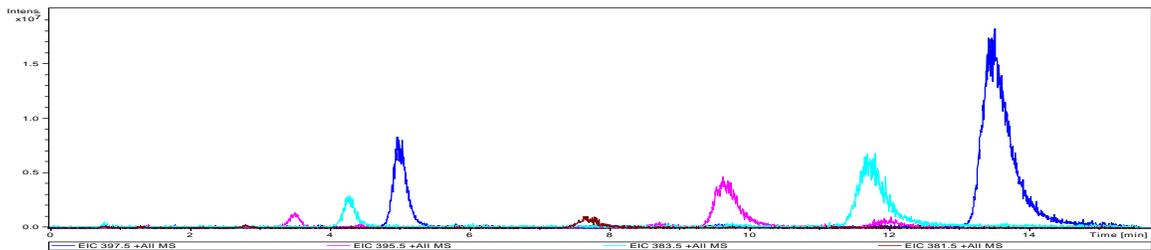


Рисунок 12 – Хроматограмма состава фитостеринов солода с разрушением основных ИОНОВ

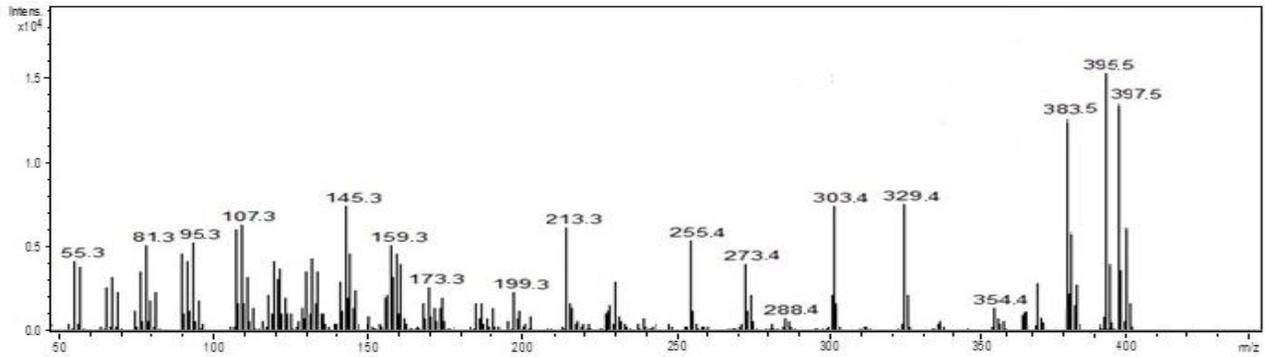


Рисунок 13 – Масс спектрограмма фитостеринов солода (где масс спектрограмма 383,5 соответствует кампестерину, 395,5 – стигмастерину, 397,5 – β -ситостерину)

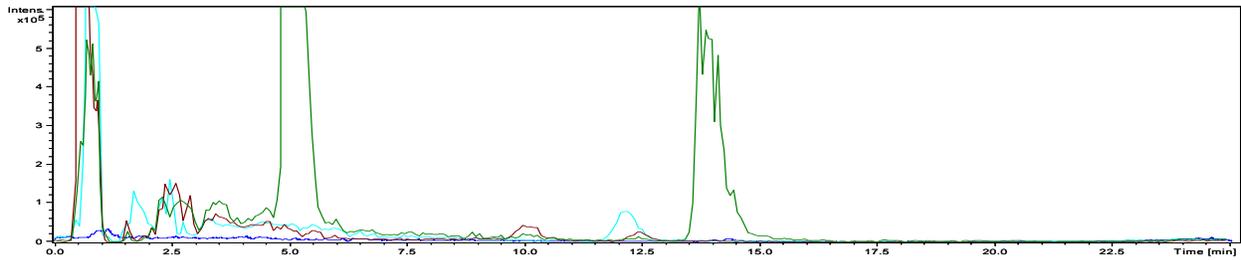


Рисунок 14 – Хроматография пиков фитостеринов хмеля

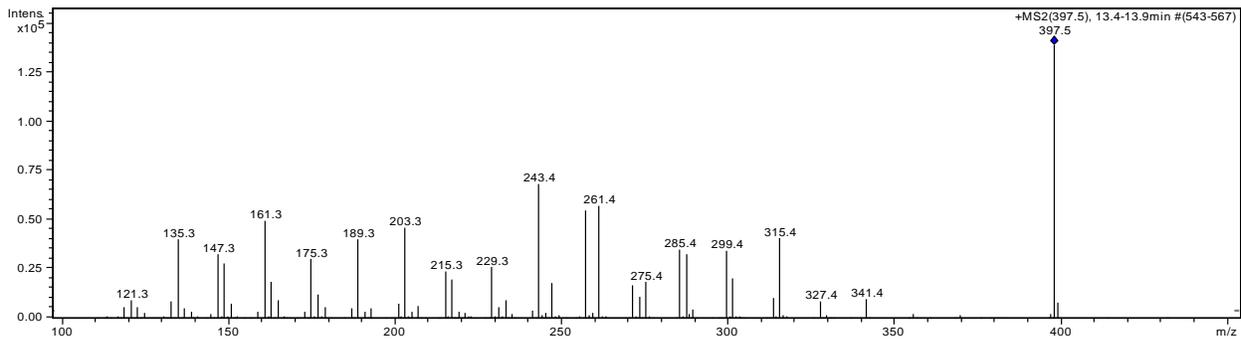


Рисунок 15 – Масс-спектрограмма β -ситостерина в образце хмеля

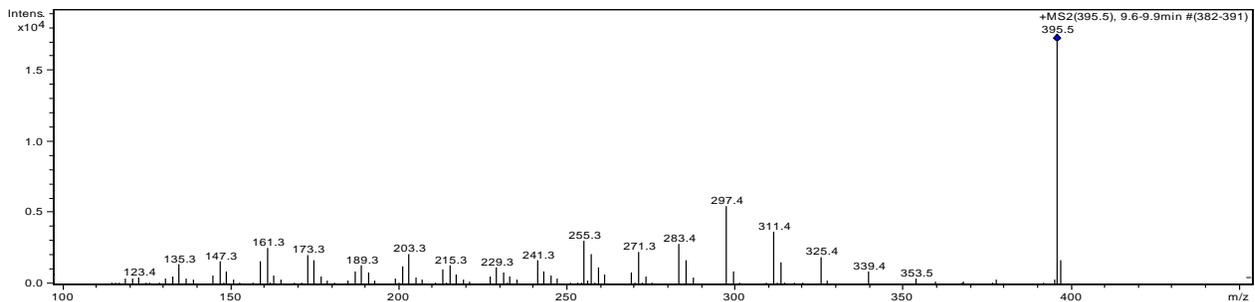


Рисунок 16 – Масс-спектрограмма стигмастерина в образце хмеля

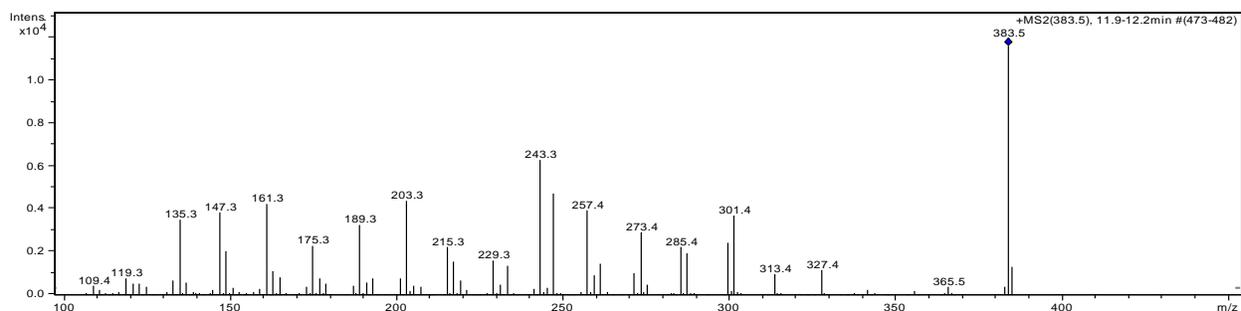


Рисунок 17 – Мас-спектрограмма кампестерина в образце хмеля

Как следует из рисунков 12-17, в процессе масс-детектирования образцов солода и хмеля, по молекулярным массам удалось установить наличие следующих фитостероидов: β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин, что, говорит о том, что солод и хмель являются источниками фитостероидов и в процессе затирания и охмеления они переходят сначала в сусло, а затем в пиво.

Основываясь на полученных данных, выявлялся предел обнаружения фитостероидов при использовании раствора внутреннего стандарта. Раствор обнаружения разводился в 2, 10 и 100 раз. Результаты исследования представлены на рисунках 18–20 [17, с. 202-204; 23, с. 46-51].

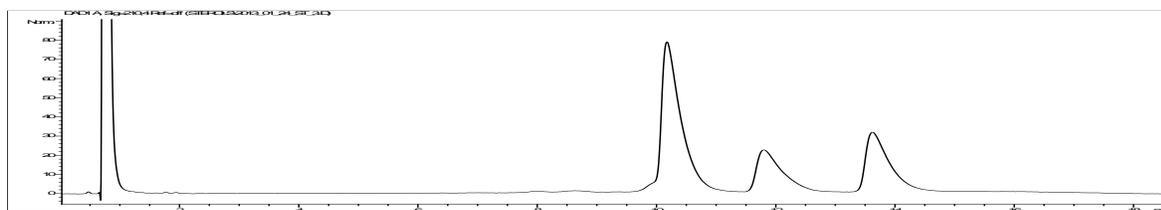


Рисунок 18 – Хроматограмма раствора сравнения при его разбавлении соотношении 1:1

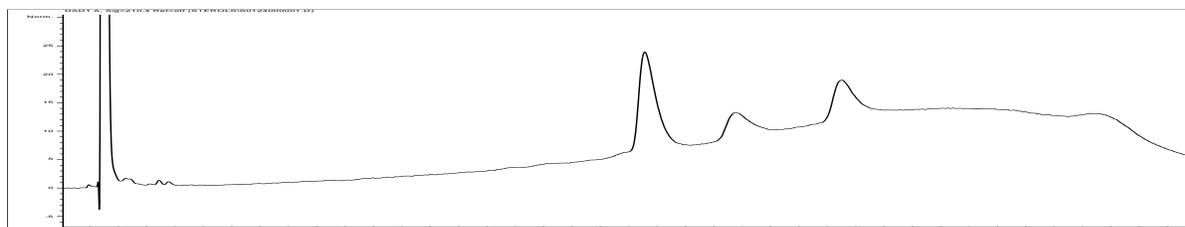


Рисунок 19 – Хроматограмма раствора сравнения при его разбавлении в соотношении 1:10

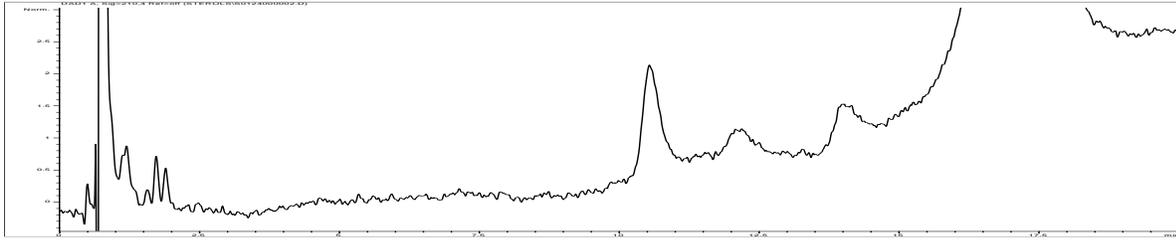


Рисунок 20 – Хроматограмма раствора сравнения при его разведении в соотношении 1:100

При разведении раствора внутреннего стандарта в два (Рисунок 18) и десять раз (Рисунок 19), на хроматограмме наблюдается сигнал, описывающий содержание стерина стандарта, отличимый от фона.

При разведении раствора внутреннего стандарта в 100 раз (Рисунок 20), невозможно различить сигнал стерина от фона.

Таким образом, по предварительным данным ВЭЖХ с масс –детектированием образцов, можно сделать вывод, что солод и хмель являются источниками фитостерина (β -ситостерина, стигмастерина и кампестерина), которые, будучи в составе липидной фракции, являются причинами липидного окисления пива в процессе хранения.

Глава 3 Исследование содержания фитостеринов в пиве методом ВЭЖХ с масс-детектированием и методом ГХ

Проведенный анализ сырья, примененного в пивоварении, выявил четыре основных фитостерина. Однако для того, чтобы проследить их переход в готовый напиток, прежде всего, необходимо разработать методику выделения фитостеринов из пива, как коллоидной системы, содержащей вещества различной природы.

3.1 Анализ внутреннего стандарта при определении фитостеринов пива

Поскольку пиво как объект для пробоподготовки для дальнейшего выявления фитостеринов не изучен, вещества подвижной фазы подбирались по их элюирующей способности, используя следующий ряд: метанол~ацетонитрил~ацетон~диоксан~тетрагидрофуран~изопропанол, результаты представлены в таблице 19 и на рисунках 21-22.

Объем ввода инжектора составил 5 мкл, температура термостата колонок составила 20°C.

Влияние состава подвижной фазы на разделение образцов стандарта представлено в таблице 19 и рисунках 23-31.

Таблица 19 – Влияние состава подвижной фазы на время удерживания компонентов внутреннего стандарта

Характеристика	Соотношение компонентов подвижной фазы, %							
	изопропанол (раствор А) +вода (раствор В)					ацетонитрил- тетрагидрофу- ран (раствор А)+вода (раствор В)		ацетонит- рил (рас- твор А)+вода (раствор В)
<i>№ варианта</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>	<i>VIII</i>
Время элюирования, мин:								
Время элюирования, мин: - 0	A=100 B=0	A=70 B=30	A=60, B=40	A=30, B=70	A=60, B=40	A=80, B=20	A=50 , B=50	A=70, B=30
- 10	A=100 B=0	A=100 B=0	A=80, B=20	A=70, B=30	A=90, B=10	A=85, B=15	A=85 , B=15	A=100, B=0
- 15	-	-	A=100 , B=0	A=100 , B=0	A=100, B=0	-	-	-
- 20	A=100 , B=0	A=100 , B=0	A=60, B=40	A=30, B=70	A=60, B=40	A=85, B=15	A=85 , B=15	A=100, B=0
- 21	A=100 , B=0	-	A=60, B=40	A=30, B=70	A=60, B=40	A=80, B=20	A=50 , B=50	A=70, B=30
Время удерживания (t _R), мин:								
Холестерин	-	-	-	-		-	-	8,745
β-ситостерин	-	-	-	-		-	-	10,240
Кампестерин	-	-	-	-		-	-	9,435

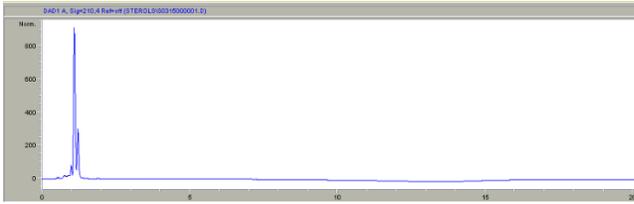


Рисунок 23 – Хроматограмма I варианта подвижной фазы

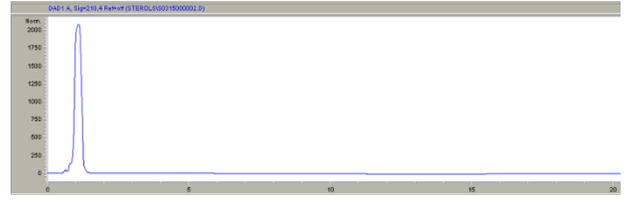


Рисунок 24 – Хроматограмма II варианта подвижной фазы

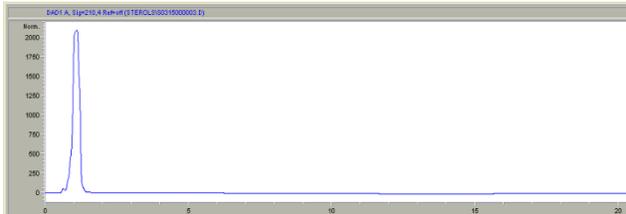


Рисунок 25 – Хроматограмма III варианта подвижной фазы



Рисунок 26 – Хроматограмма IV варианта подвижной фазы

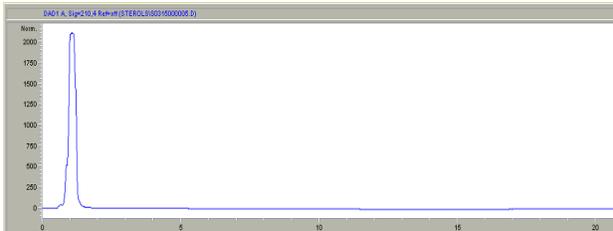


Рисунок 27 – Хроматограмма V варианта подвижной фазы



Рисунок 28 – Хроматограмма VI варианта подвижной фазы

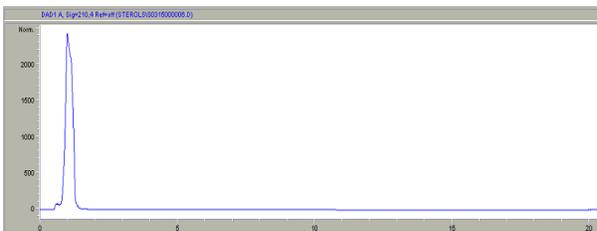


Рисунок 29 - Хроматограмма VII варианта подвижной фазы

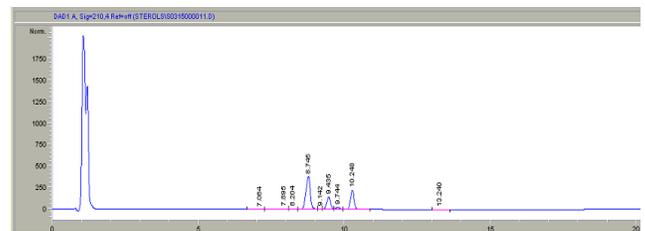


Рисунок 30 – Хроматограмма VIII варианта подвижной фазы

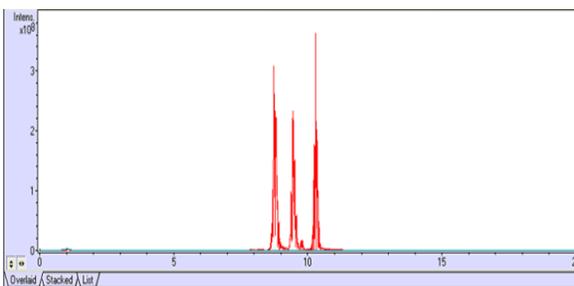


Рисунок 31 – Хроматограмма масс-спектров VIII варианта подвижной фазы

Как показывают данные таблицы 19 и рисунков 23-30, только применение ацетонитрила в сочетании с водой в качестве компонентов подвижной фазы дало значимое разделение компонентов.

Однако, полученные хроматограммы (Рсунки 30 и 31) не обладали хорошим качеством. Поэтому с целью улучшения разделения было принято решение изменить условия хроматографирования, путем замены колонки Agilent Hypersil ODS 2.0x125 mm (C18) на Symmetry® C8 5µm 2.1x150 mm, при использовании ацетонитрила в качестве растворителя, результаты хроматографирования приведены в таблице 20 и рисунках 32-33.

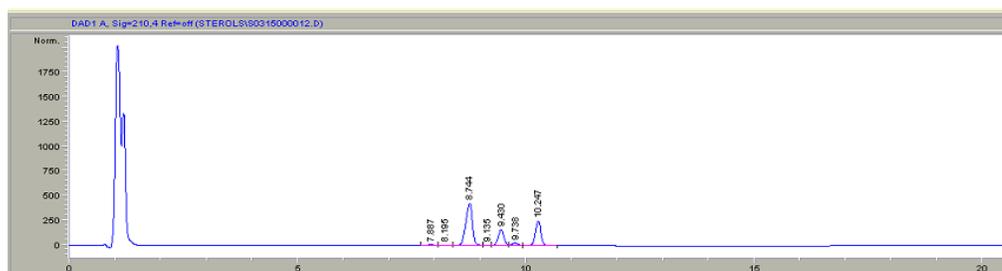


Рисунок 32 – Хроматограмма стандартных растворов при замене колонки

Таблица 20 - Условия проведения ВЭЖХ

Параметр	Значение		
Насос:			
– состав подвижной фазы	Компонент А - ацетонитрил, компонент В - вода.		
– условия градиентного элюирования	Время, мин	Содержание компонента А, %	Содержание компонента В, %
	0	80	20
	10	100	0
	20	100	0
	21	80	20
Инжектор			
– объем ввода	5 мкл		
Термостат колонок			
– температура	20°C		

Продолжение таблицы 20

<i>Хроматографические характеристики</i>	
– примерное время удерживания, (tr) мин.	8,744 мин (холестерин), 9,430 мин (кампестерин), 10,247 мин (бета-ситостерин)

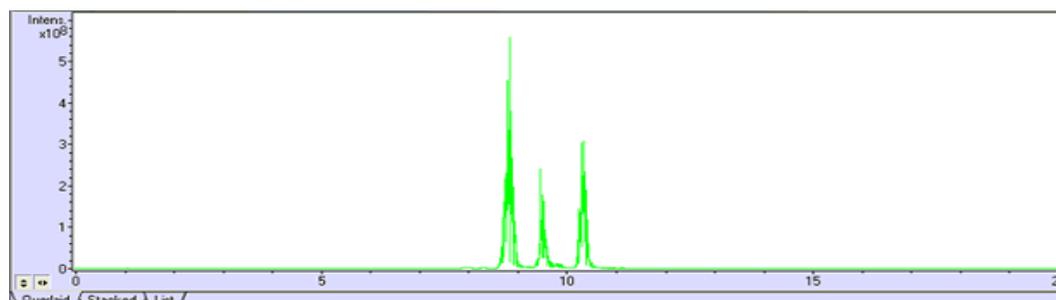


Рисунок 33 – Хроматограмма разделения веществ раствора внутреннего стандарта

Как видно из данных таблицы 20 и рисунков 32 и 33, после изменения условий хроматографирования, путем замены колонки, разделение определяемых веществ увеличилось, время удерживания разделяемых веществ в смеси было определено (Таблица 18), поэтому было принято решение использовать данный состав подвижной фазы для анализа образцов пива.

3.2 Исследование образцов пива с целью определения в них фитостеринов методом ВЭЖХ с масс-детектированием

Для успешного выделения фитостеринов из объекта исследования необходимо учесть все формы, в которых стеринны могут находиться, то есть подобрать правильную схему извлечения.

Пробоподготовка образцов пива для анализа осуществлялась тремя различными методами:

1. Метод 1 – 10 см³ каждого образца пива смешали с 5 мл дихлорметана. Смеси перемешивали в течение 20 минут. Полученные образцы хроматографировали (рисунки 34-37; 44).

2. Метод 2 - в 4 мерных колбы на 100 см³ отмеряли по 10 см³ каждого образца пива, затем добавляли по 2 см³ соляной кислоты, после чего к каждому раствору добавляли по 5 см³ дихлорметана. Смеси подогревали при температуре 150 °С в течение 20 минут, затем хроматографировали полученные образцы (Рисунки 38-39; 45).

3. Метод 3 - в 4 пробирки по 50 см³ отмеряли по 5 см³ каждого образца пива, добавляли по 1 см³ метанола (20%), далее пробирки закрывали и встряхивали в течение 30 секунд, после чего добавляли в следующей последовательности: 4 г сульфата аммония, 5 см³ ацетона, 5 см³ гексана. Пробирки оставляли на 30 мин, затем пипеткой отбирали верхний слой растворов в другие пробирки, которые помещали на водяную баню и выпаривали в течение 30 мин, при температуре 100°С, далее добавляли по 1 см³ сульфата натрия и тщательно перемешивали. Содержимое пробирок отфильтровывали в колбы на 100 см³. В колбы добавляли по 1 см³ метанольного раствора щелочи (КОН). Колбы нагревали до 80°С в течение 30 минут. Из каждой колбы отбирали по 100 см³ раствора, который затем помещали в виалы. Виалы закрывали и подогревали в течение 1 часа, при температуре 60 °С. В каждую виалу добавляли по 3 см³ Н₂О и по 1 см³ насыщенного раствора сульфата аммония. После в каждую виалу добавляли по 2 см³ дихлорметана, встряхивали в течение 5 минут, полученные образцы хроматографировали (Рисунки 40- 41; 46).

Условия проведения ВЭЖХ представлено в таблице 21.

Необходимо отметить тот факт, что отечественные образцы пива «Туборг» (лицензионное), «Три медведя», «Жигули барное» и «Lowenbrau» не дали четкой картины присутствия фитостеринов при всех 3 способах пробоподготовки, что может говорить о низком содержании в них солода, а также о возможной замене солода на ячмень, глюкозо-мальтозные сиропы и др. сахаросодержащее сырье. Импортные образцы позволили получить хроматограммы, представленные на рисунках 34-41.

Таблица 21 – Условия проведения ВЭЖХ

Параметр	Значение		
<i>Насос:</i>			
– состав подвижной фазы	Компонент А - ацетонитрил, компонент В - вода.		
– условия градиентного элюирования	Время, мин	Содержание компонента А, %	Содержание компонента В, %
	0	80	20
	10	100	0
	20	100	0
	21	80	20
<i>Инжектор</i>			
– объем ввода	5 мкл		
<i>Термостат колонок</i>			
– температура	20°C		

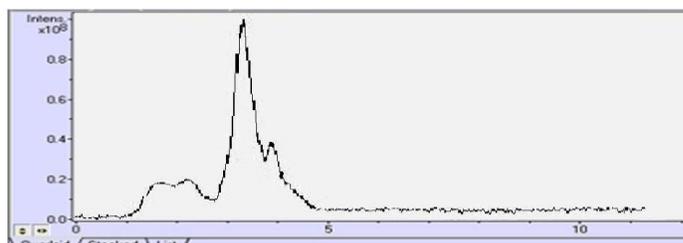


Рисунок 34 – Хроматограмма образца пива «Krushovice Cerne» при выделении 1 методом

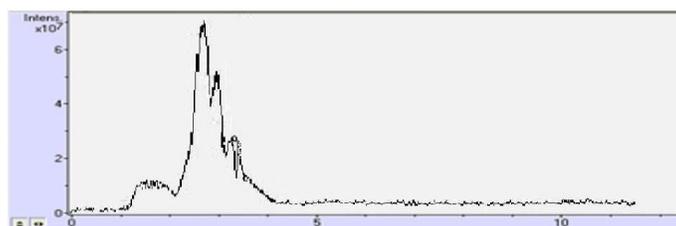


Рисунок 35 – Хроматограмма определения фитостерина у образца пива «Birra Moretti» при первом способе разделения

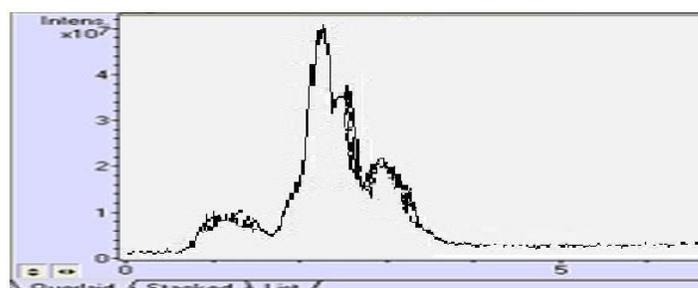


Рисунок 36 – Хроматограмма определения фитостерина у образца пива «Spaten» при первом способе разделения

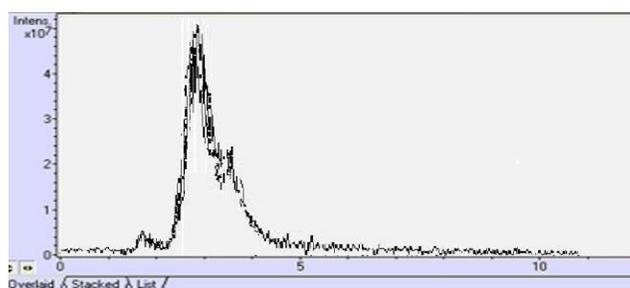


Рисунок 37 – Хроматограмма определения фитостерина у образца пива «Tsingtao» первым способом выделения

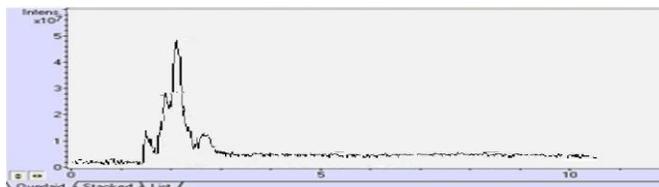


Рисунок 38 – Хроматограмма определения фитостеринов у образца пива «Krushovice Cerne» и «Birra Moretti», полученные при втором методе разделения

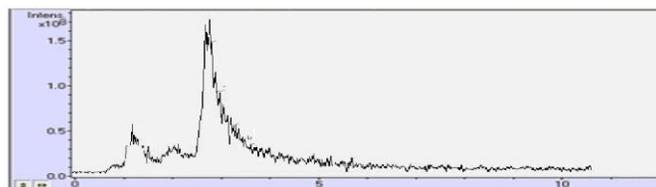


Рисунок 39 – Хроматограммы определения фитостеринов у образцов пива «Spaten» и «Tsingtao», полученные при втором методе разделения

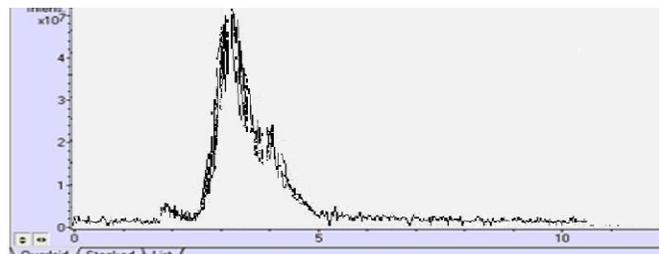


Рисунок 40 – Хроматограммы определения фитостеринов у образцов пива «Krushovice Cerne» и «Birra Moretti», полученные при третьем методе разделения

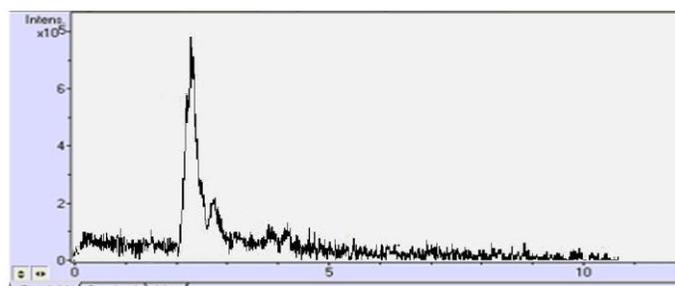


Рисунок 41 – Хроматограмма определения фитостеринов в образцах пива «Spaten» и «Tsingtao», полученные третьим методом разделения

Анализ приведенных хроматографий (Рисунки 34-41) показал, что в процессе анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-детектированием, не смотря на разницу в подготовке проб, ни в одном из образцов импортного пива также не удалось обнаружить наличие фитостеринов.

Таким образом, для дальнейшего анализа фитостеринов в пиве необходимо изменить подход к пробоподготовке анализируемых образцов, при этом состав подвижной фазы при хроматографировании остался неизменным.

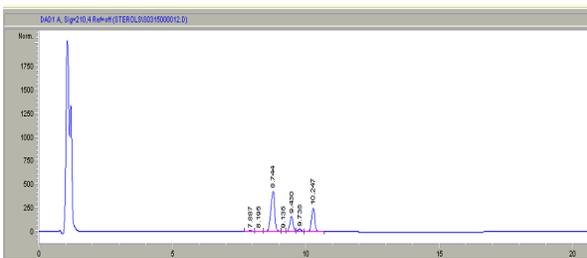
Для идентификации фитостеринов в пиве было решено определить их содержание в объединенной пробе импортных образцов, поэтому пробоподготовку образцов пива изменили следующим образом: в мерную колбу на 150 см^3 отмеряли по 25 см^3 каждого образца пива. Получили объединенный образец импортного пива в виде пробы 100 см^3 . Затем в колбу добавили 10 см^3 соляной кислоты (HCl-20%), затем образец подогрели на водяной бане в течение 30 мин и охлаждали. Содержимое колбы

поместили в 4 пробирки по 25 см³, в каждую добавили по 10 см³ дихлорметана, после пробирки помещали на шейкер для встряхивания и центрифугировали для разделения фаз, после чего дихлорметан отобрали из пробирок. Процедуру добавления дихлорметана, встряхивания, а затем отделения его на центрифуге повторяли 3 раза.

Далее содержимое всех пробирок помещают в круглодонную колбу для отгонки растворителя-дихлорметана на роторном испарителе. Остаток на стенках колбы смывали 1 см³ дихлорметана. Наконечник для автоматической пипетки заполняли сульфатом натрия (Na₂SO₄), для обезвоживания раствора. Далее автоматической пипеткой с наконечником отбирали содержимое круглодонной колбы и помещали в 2 виалы. Виалы закрывали и подогревали в течение 1 часа на магнитной мешалке с подогревом, при температуре 60°C. После в каждую виалу добавляли по 2 см³ дихлорметана, встряхивали в течение 5 минут. Полученные образцы хроматографировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс – детектированием, условия проведения ВЭЖХ представлены в таблице 22, хроматограммы – на рисунках 42-43.

Таблица 22 – Условия проведения ВЭЖХ

Параметр	Значение		
Насос:			
– состав подвижной фазы	Компонент А - ацетонитрил, компонент В - вода.		
– условия градиентного элюирования	Время, мин	Содержание компонента А, %	Содержание компонента В, %
	0	80	20
	10	100	0
	20	100	0
	21	80	20
Инжектор			
– объем ввода	5 мкл		
Термостат колонок			
– температура	60°C		
Хроматографические характеристики			
– примерное время удерживания, мин. (t _R)	8,744 мин (холестерин), 9,430 мин (кампестерин), 10,247 мин (бета-ситостерин)		



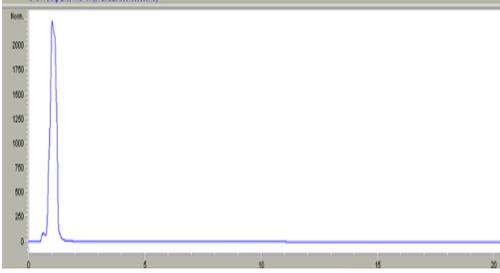


Рисунок 44 – Хроматограмма образцов отечественного пива по 1 методу пробоподготовки

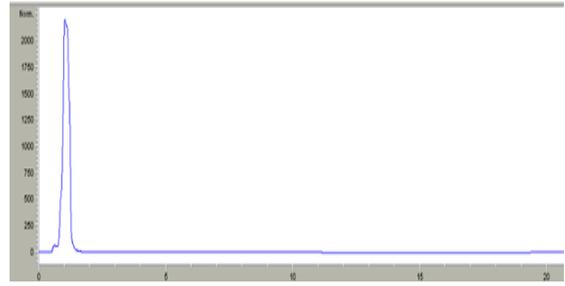


Рисунок 45 – Хроматограмма образцов отечественного пива по 2 методу пробоподготовки

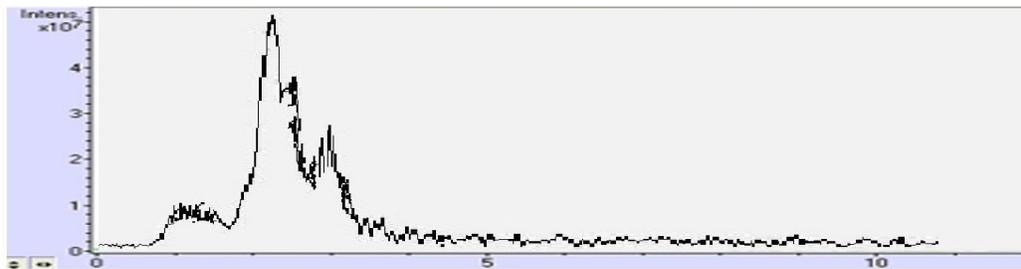


Рисунок 46 – Хроматограмма образцов отечественного пива по 3 методу пробоподготовки

В процессе анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс - детектированием, не смотря на разницу в подготовке проб, ни в одном из образцов пива не удалось обнаружить наличие фитостеринов, они находились на пределе обнаружения, что показывают рисунки 42-46.

Для дальнейшего анализа фитостеринов в пиве было принято решение изменить подход к пробоподготовке анализируемых образцов, а также метод определения – ВЭЖХ было заменено на газовую хроматографию (ГХ) с масс-детектированием.

3.3 Определение содержания фитостеринов в пиве методом ГХ

По сравнению с предыдущим экспериментом было проведено изменение ме-

тогда определения с высокоэффективной жидкостной хроматографии на газовую хроматографию с масс - детектированием, отличительными чертами метода являются высокая точность и чувствительность. Пробоподготовка образцов пива осуществлялась по следующему методу: в три мерные колбы на 250 см³ отмеряли по 100 см³ каждого образца пива, далее в каждую колбу ввелись вещества в следующем порядке: внутренний стандарт (для контроля эффективности пробоподготовки), 15 см³ соляной кислоты (HCl, 1Н); колбы подогревались на водяной бане в течение 30 минут, охлаждались и в каждую колбу вносили по 60 г насыщенного раствора сульфата аммония, колбы встряхивались 15 минут на шейкере; затем в колбы вносили по 40 см³ дихлорметана и встряхивали 15 минут для разделения фаз, после чего верхний слой удаляли, а нижний слой фильтровали через складчатый фильтр, с добавлением хлорида кальция, для обезвоживания раствора, в конические колбы. С помощью роторного испарителя отгоняли растворитель, а остаток со стен колб смывали 1 см³ дихлорметана. Далее автоматической пипеткой с наконечником отбирали содержимое колб и помещали в 3 виалы. Виалы закрыли и подогревали в течение 30 минут на магнитной мешалке с подогревом, при температуре 80°С. После в каждую виалу добавляли по 2 см³ дихлорметана, встряхивали в течение 5 минут. Полученные образцы хроматографировали результаты исследований представлены на рисунках 47-54 и таблице 24.

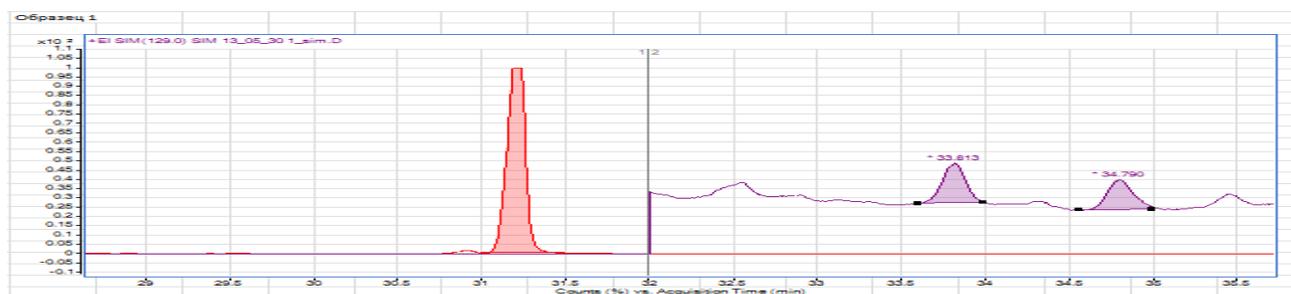


Рисунок 47 – Хроматограмма образца пива Krushovice Cerne

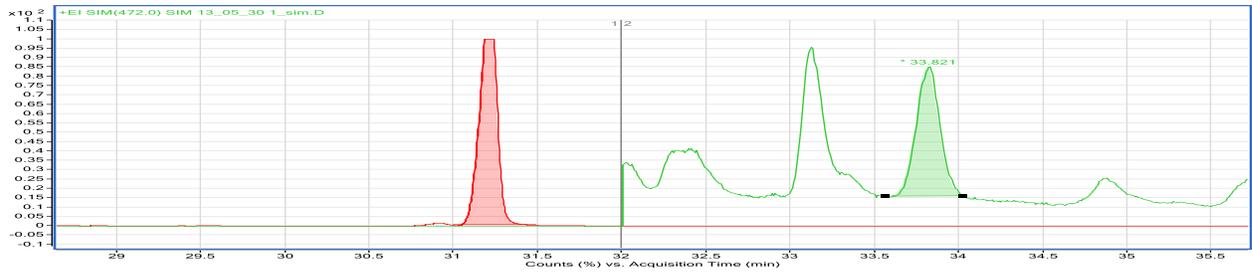


Рисунок 48 – Хроматограмма образца пива Birra Moretti

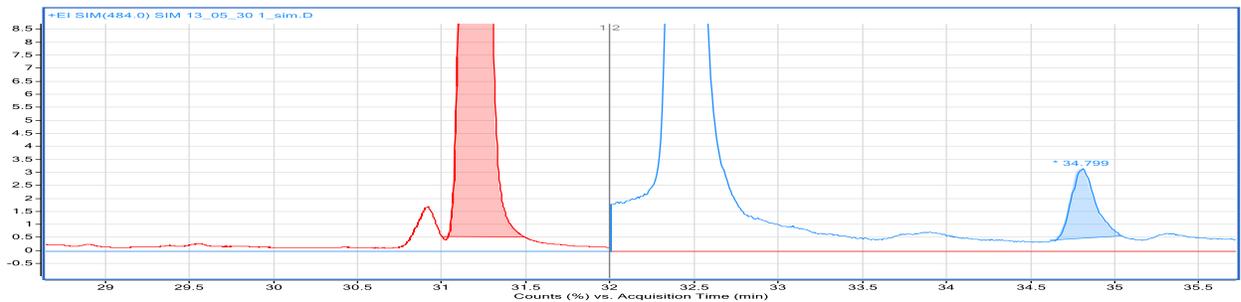


Рисунок 49 – Хроматограмма образца пива Birra Moretti

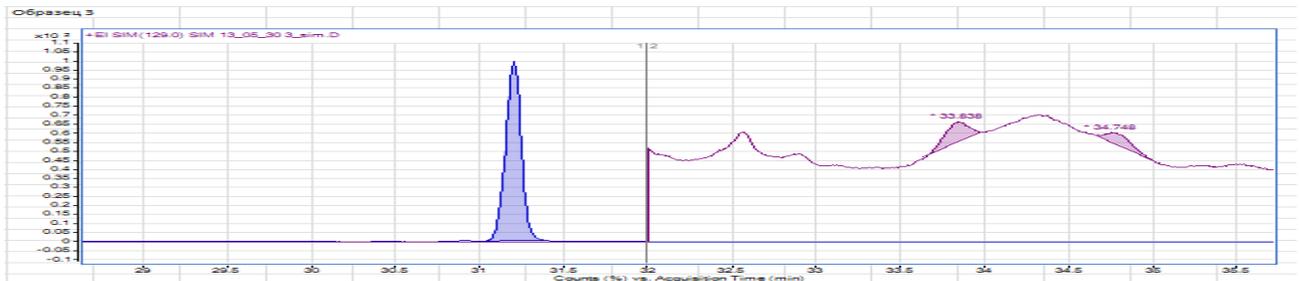


Рисунок 50 – Хроматограмма образца пива Spaten

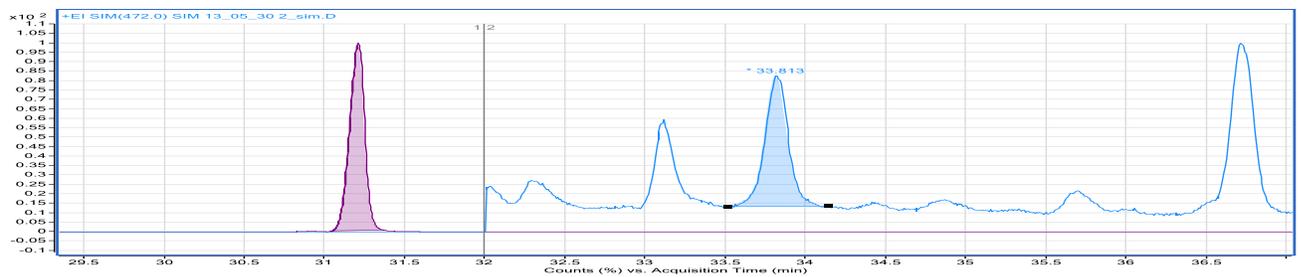


Рисунок 51 – Хроматограмма образца пива Tsingtao

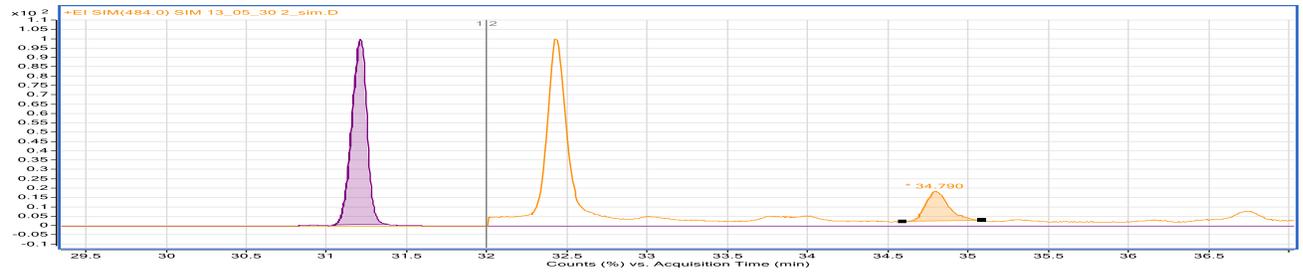


Рисунок 52 – Хроматограмма образца пива Tsingtao

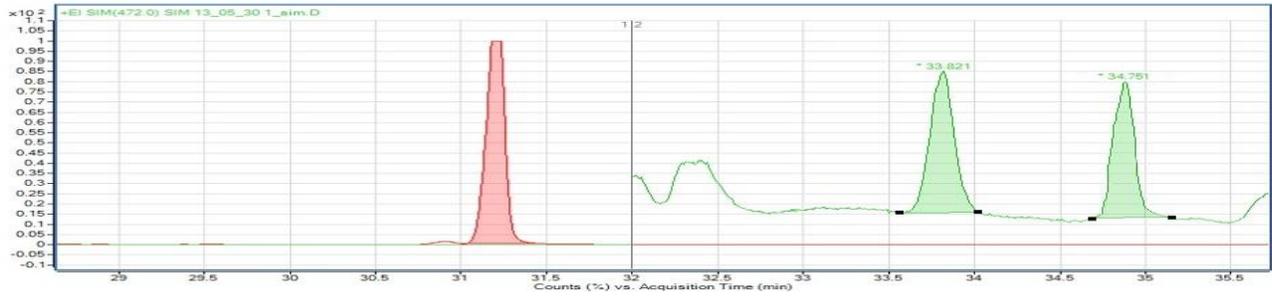


Рисунок 53 – Хроматограмма образца Lowenbraw

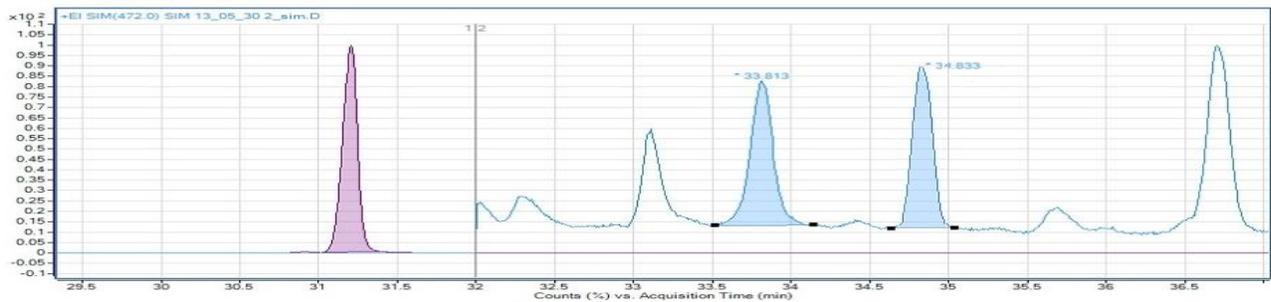


Рисунок 54 – Хроматограмма образца Жигули барное

Таблица 24 – Хроматографические параметры фитостеринов

Хроматографические параметры						Вещество
Peak	Время выхода, мин	Площадь пика	Интенсивность пика	Ширина пика	Массовое разрешение	
<i>Krushovice Cerne</i>						
2	33,813	1918216,74	203407,2	0,379	0,147	кампестерин
3	34,79	1652007,05	152343,98	0,43	0,169	стигмастерин
<i>Birra Moretti</i>						
2	33,821	685747,64	70042,5	0,455	0,151	кампестерин
3	34,799	638226,12	63026,45	0,43	0,154	стигмастерин
<i>Spaten</i>						
2	33,838	654868,21	66612,2	0,346	0,194	кампестерин
3	34,748	366910,97	32102,62	0,362	0,175	стигмастерин
<i>Tsintao</i>						
2	33,813	350267,59	34308,12	0,624	0,149	кампестерин
3	34,79	286650,15	28578,68	0,497	0,142	стигмастерин
<i>Lowenbrau</i>						
2	33,821	685745,24	70034,5	0,450	0,150	кампестерин
3	34,851	658226,82	68030,45	0,440	0,145	стигмастерин
<i>Жигули барное</i>						
2	33,813	580469,79	34310,12	0,626	0,150	кампестерин
3	34,833	548226,12	33026,45	0,43	0,144	стигмастерин

Градуировочный коэффициент К рассчитывают по формуле (20):

$$K = \frac{M_1 \cdot S_2}{M_2 \cdot S_1}, \quad (20)$$

где M_1 – масса введенного индивидуального фитостерина, мкг

S_1 – площадь пика индивидуального фитостерина

M_2 – масса внутреннего стандарта, мкг

S_2 – площадь пика внутреннего стандарта

Концентрацию фитостеринов, C_f , мкг/л, рассчитывают по следующей формуле (21):

$$C_{\phi} = \frac{h_{\phi} \cdot M_{\text{вн ст}} \cdot 1000}{h_{\text{вн ст}} \cdot V_{\text{п}}}, \quad (21)$$

где h_{ϕ} – высота пика фитостерина

$M_{\text{вн ст}}$ – масса вводимого внутреннего стандарта, мкг

$h_{\text{вн ст}}$ – высота пика внутреннего стандарта

$V_{\text{п}}$ – проба пива, взятого на анализ, см³

1000 – коэффициент пересчета см³ в дм³

Данные расчета концентрации фитостеринов представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Расчет концентрации фитостеринов

Вещество	Площадь пика	Добавлено холестерина, мкг	К	Объем пива, взятый на анализ, V пива, см ³	Концентрация фитостерина, Сф, мкг/дм ³
<i>Krushovice Cerne</i>					
Холестерин	130672039	200	1		
Кампестерин	1918216	2,935924	1	100	29,35924
Стигмастерин	1652007	2,528478	1	100	25,28478
<i>Birra Moretti</i>					
Холестерин	130672039	200	1		
Кампестерин	685747	1,04957	1	100	10,4957
Стигмастерин	638226	0,976836	1	100	9,768364
<i>Spaten</i>					
Холестерин	62348383	200	1		
Кампестерин	654868	2,100674	1	100	21,00674
Стигмастерин	366910	1,176967	1	100	11,76967
<i>Tsingtao</i>					
Холестерин	130672039	200	1		
Кампестерин	350267,59	0,795667	1	100	7,9567
Стигмастерин	286650	0,65114	1	100	6,511542
<i>Lowenbrau</i>					
Холестерин	130672039	200	1		
Кампестерин	685745	1,84957	1	100	18,4725
Стигмастерин	658227	0,987856	1	100	9,87856
<i>Жигули барное</i>					
Холестерин	130672039	200	1		
Кампестерин	580470	1,53567	1	100	15,3567
Стигмастерин	548226	0,976836	1	100	9,76836

Таким образом, содержание фитостеринов в пиве, представлено в таблице 26.

Таблица 26 – Содержание фитостеринов в различных сортах пива

Название сорта пива	Содержание, мкг/дм ³	
	кампестерина	стигмостерина
«Krushovice Cerne»	29,4	25,3
«Birra Moretti»	10,5	9,8
«Spaten»	21,0	11,7
«Tsingtao»	7,9	6,5
«Lowenbrau»	18,5	9,9
«Жигули барное»	15,4	9,8

Необходимо отметить тот факт, что в отечественных образцах пива «Туборг» (лицензионное) и «Три медведя» фитостерины находились ниже предела их обнаружения при их определении методами газовой хроматографии, что говорит о низком содержании в них солода, а также о возможной замене солода на ячмень, глюкозо-мальтозные сиропы и др. сахаросодержащее сырье.

Полученные данные качественного и количественного состава фитостеринов сырья и готового пива показали, что источником фитостеринов – стигмастерина и кампестерина – является используемое растительное сырье – солод, ячмень [104, с. 235-245] и хмель. Так, при затирании зернопродуктов (солода или ячменя и солода) они переходят в сусло, а на стадии кипячения суслы с хмелем экстрагируются из хмеля. Однако, после брожения в готовом пиве остаются только кампестерин и стигмастерин. Вероятно, β -ситостерин более реакционноспособен и поэтому преобразовывается в технологическом процессе в карбонильные соединения, либо полностью используется дрожжами как ростовое вещество. Данные таблице 26 свидетельствуют о том, что концентрация кампестерина превышает концентрацию стигмастерина на 7-80% и, вероятно, зависит от применяемого в технологии солода и хмеля.

На рисунке 55 представлены схематично стадии перехода фитостеринов из сырья в готовое пиво (по нашему мнению).



Рисунок 55 – Стадии перехода фитостеринов в пиво

Глава 4 Исследование влияния фитостеринов на процессы хранения пива с целью разработки метода прогнозирования стойкости пива

4.1 Исследование влияния фитостеринов на качество пива в процессе его старения

Известно, что условия хранения, транспортирования пива напрямую влияют на его физико-химические и сенсорные параметры.

Пиво является подвижной коллоидной системой, равновесие которой зависит от таких факторов, как температура окружающей среды, в частности, отсутствия перепадов температуры, свет, отсутствия перемешивания и т.д. Сдвиг равновесия влечет за собой протекание нежелательных необратимых процессов превращения веществ, оказывающих значимое влияние на качество реализуемого пива, в результате чего образуется осадок небиологической природы, что связано с коллоидной нестабильностью, и изменяется органолептический профиль, что связано с вкусовой или сенсорной стабильностью пива [32, с. 238-241], за что отвечает ряд веществ, в том числе, транс-2-ноненаль [12, с. 25].

Фитостерины, входящие в состав липидной фракции, осуществляют свой вклад в нарушение стабильности вкуса пива, поэтому исследование степени влияния фитостеринов на физико-химические и органолептические параметры пива при хранении имеет важное значение.

С целью изучения вклада фитостеринов в процессы окисления, в течение которого изменяются многие соединения пива, что приводит к сдвигу коллоидного равновесия, исследование проводилось посредством 2-х этапов:

1 этап – Определение физико-химическими методами степени нарушения коллоидного равновесия в пиве, позволяющими оценить риски окислительных процессов.

2 этап – При возникновении окислительных процессов более детальное исследование пива - определение количества фитостеринов хроматографическими методами.

Для достижения сдвига коллоидного равновесия применяли метод так называемого «искусственного» старения пива.

Нами исследовалось влияние основных способов старения пива, представленных в таблице 27, на органолептические и физико-химические показатели, свидетельствующие о нарушении стабильности пива.

Таблица 27 – Способы старения пива [10, с. 239; 16, с. 246-250; 17, с. 202-204]

Название метода	Температурные и временные условия метода			
	1 этап		2 этап	
	<i>t, °C</i>	<i>τ, сут</i>	<i>t, °C</i>	<i>τ, сут</i>
Метод ЕВС	60	7	0	1
Метод Каглера	0	0,25	66	0,67
Ускоренный тест	40	2	0	1
Метод Грабка	0	7	45	3
Метод Шапона	-5	40 мин	-	-

Исследование влияния методов старения на качество пива проводилось в два подэтапа.

На первом подэтапе исследовалось влияние процесса старения пива на органолептические (сенсорные) показатели пива. Для того чтобы выявить влияние сенсорной нестабильности на вкус пива и образование нежелательных соединений, проводился профильный метод оценки.

Сенсорная нестабильность – это изменение вкуса, аромата и прозрачности пива в период его хранения.

Профильный метод оценки основан на графическом изображении результатов дегустации в виде профилограммы. При описании интенсивности изменения оттенков вкуса пользовались 5-ти бальной шкалой (Таблица 28).

Измеряемые дескрипторы отобраны в зависимости от оттенка запаха и привкуса основных соединений, отвечающих за органолептическую нестабильность пива (Таблица 4), связанных образованием транс-2-ноненаля [12, с. 8-12], данные представлены на рисунках 56-61.

Таблица 28 – Шкала оценки образцов пива по профильному методу

Градация, баллы	Интенсивность восприятия	Градация, баллы	Интенсивность восприятия
0	отсутствует	3	Отчетливая
1	легкая	4	Значимая
2	воспринимаемая	5	интенсивная

Дескрипторы, положительно влияющие на органолептику пива – это солодовый вкус и хмелевая горечь.

Дескрипторы, отрицательно влияющие на органолептику пива [12, с. 8-12]– это бумажный, серный, хлебный, кошачий, затхлый и окисленные тона во вкусе.



Рисунок 56 – Изменение вкусовых профилей пива Lowenbrau в зависимости от метода старения (контроль – исходное необработанное пиво)

На рисунке 56 представлена органолептическая профилограмма пива «Lowenbrau» до и после обработки методами старения. Исходное пиво обладало сбалансированным вкусом, хорошо выраженным солодовым вкусом и хмелевой горечью,

без посторонних тонов во вкусе и аромате. Обработка привела к накоплению окисленных, затхлых и серных тонов во вкусе, которых не было в исходном пиве.



Рисунок 57 – Изменение вкусовых профилей пива Жигули барное в зависимости от метода старения (контроль – исходное необработанное пиво)

На рисунке 57 представлена органолептическая профилограмма пива «Жигули барное» до и после обработки методами старения. Исходное пиво обладало выраженным солодовым вкусом и легкой хмелевой горечью, без посторонних тонов во вкусе и аромате. Обработка привела к образованию окисленных, кошачьих, хлебных и серных тонов во вкусе, которые отсутствовали в исходном пиве.

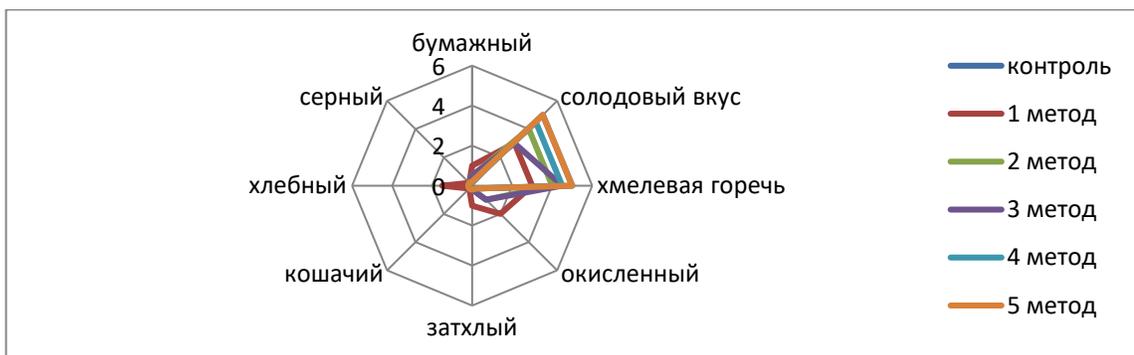


Рисунок 58 – Изменение вкусовых профилей пива Krushovice Cerne в зависимости от метода старения (контроль – исходное необработанное пиво)

На рисунке 58 представлена органолептическая профилограмма пива «Krushovice Cerne» до и после обработки методами старения. Исходное пиво обладало выраженным карамельным солодовым вкусом, что характерно для темного пива, со

сбалансированной хмелевой горечью, без посторонних тонов во вкусе и аромате. Обработка привела к умеренному снижению хмелевой горечи, в отличие от светлых сортов пива, и возникновению окисленных, затхлых и хлебных оттенков во вкусе, которых не было в исходном пиве.

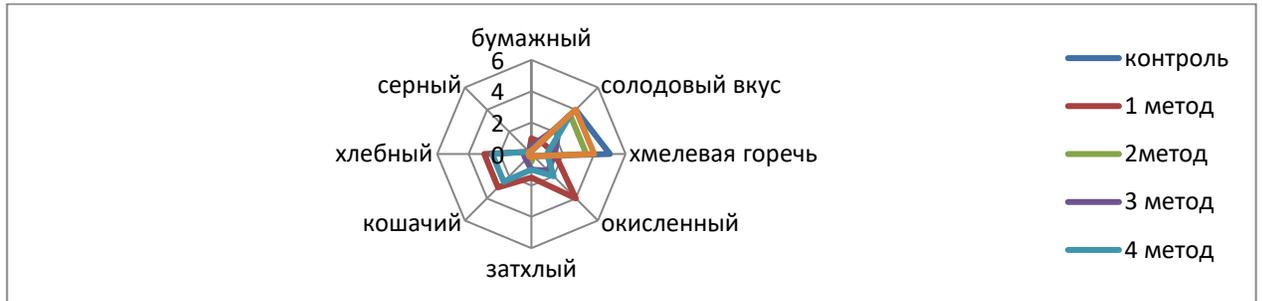


Рисунок 59 – Изменение вкусовых профилей пива Birra Moretti в зависимости от метода старения (контроль – исходное необработанное пиво)

На рисунке 59 представлена органолептическая профилограмма пива «Birra Moretti» до и после обработки методами старения. Исходное пиво обладало выраженной хмелевой горечью на фоне сниженного солодового вкуса, без посторонних тонов во вкусе и аромате. Обработка привела к снижению хмелевой горечи, и к возникновению окисленных, кошачьих и хлебных тонов во вкусе, которых не было в исходном пиве.

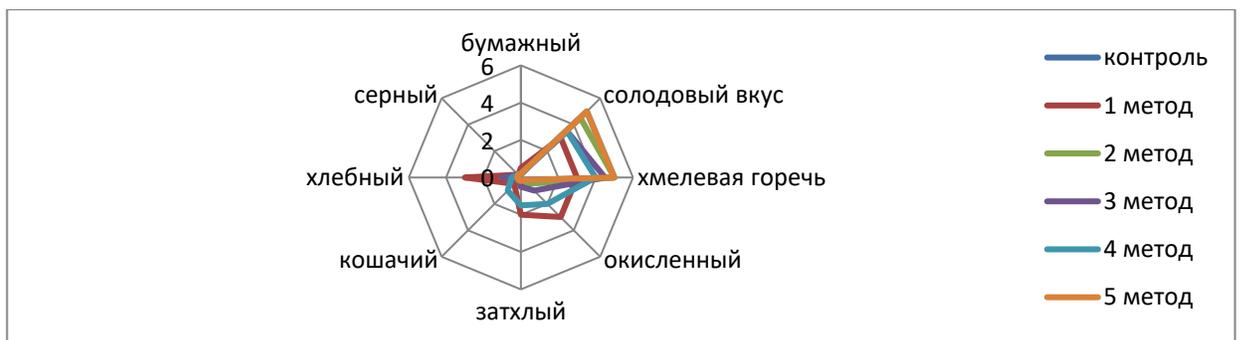


Рисунок 60 – Изменение вкусовых профилей пива Spaten в зависимости от метода старения (контроль – исходное необработанное пиво)

На рисунке 60 представлена органолептическая профилограмма пива «Spaten»

до и после обработки методами старения. Исходное пиво обладало сбалансированным вкусом, без посторонних тонов во вкусе и аромате. Обработка привела к возникновению затхлых и хлебных тонов во вкусе, которых не было в исходном пиве, с одновременным снижением солодового вкуса и хмелевой горечи.

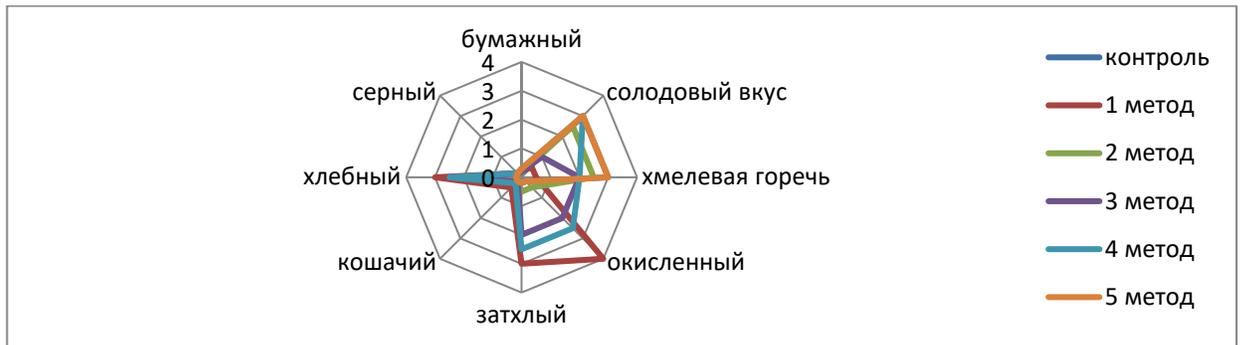


Рисунок 61 – Изменение вкусовых профилей пива Tsingtao в зависимости от метода старения (контроль – исходное необработанное пиво)

На рисунке 61 представлена органолептическая профилограмма пива «Tsingtao» до и после обработки методами старения. Исходное пиво обладало невыраженным солодовым вкусом и хмелевой горечью, очень водянистым вкусом, без посторонних тонов во вкусе и аромате. Обработка привела к возникновению окисленных, затхлых и хлебных тонов во вкусе, которых не было в исходном пиве, на фоне резкого снижения солодовго вкуса и хмелевой горечи.

Как показывают профилограммы (Рисунки 56, 61), в процессе обработки различными способами старения пива, наиболее заметнее на вкус оказывает влияние метод ЕВС (№ 1 на профилограммах), который приводит к образованию в пиве альдегидных, окисленных, хлебных тонов, которые наиболее интенсивно влияют на вкус пива из всех выбранных способов. Метод Каглера (№ 2 на профилограммах) приводит также к изменению органолептических показателей, но в пиве сохраняется хмелевой аромат, солодовый вкус, но примешиваются окисленные тона.

Ускоренный тест влияет сильнее метода Каглера на профили пива, но не так интенсивно как метод ЕВС: в образцах заметны фенольные, окисленные, хлебные

тона, отсутствует хмелевой аромат пива.

Метод Грабака (№ 4 на профилограммах) приводит к образованию в пиве прокислых, альдегидных и хлебных тонов, но сохраняет оттенок хмелевого тона в напитке.

На втором подэтапе исследовалось влияние процесса старения пива на физико-химические показатели пива (Таблица 29). Наряду с содержанием фитостеринов, оценивались следующие физико-химические показатели: мутность, содержание метаноидинов, содержание аминного азота, полифенолов, тиобарбитуровое число. Необходимо отметить, что взятые за основу определяемые показатели не случайны, поскольку хорошо изучены и описывают процессы нарушения коллоидного равновесия при старении пива, кроме фитостеринов. Данные показатели позволяют дополнительно оценить степень окисленности коллоидной системы, то есть помогут в изучении влияния фитостеринов в нарушении коллоидного равновесия и сенсорной нестабильности пива.

Мутность пива, измеряемая под двумя углами 90° и 25° , характеризует размер частиц, участвующих в образовании мути: коллоидные частицы размером 0,1-1,0 мкм связаны с частицами фильтровальных материалов, оклеивающих веществ, стабилизаторов, к ним также относятся белковые, дубильные и красящие вещества, клетки дрожжей и бактерии и они измеряются при 25° ; частицы размером менее 0,1 мкм характеризуют белково-дубильные комплексы, комплексы белок-белок, гуммивещества и др. и измеряются под углом 90° и увеличение данного показателя мутности говорит о холодном обратимом помутнении пива. Существуют также молекулярно-дисперсные частицы с размером менее 0,001 мкм, которые также определяются под углом 90° и они характеризуют хорошо растворимые соединения, которые невозможно визуально обнаружить [10, с. 231-232].

Полифенолы, как известно, участвуют в образовании белково-дубильных комплексов с образованием водородных связей, могут претерпевать изменения в ходе реакции окисления, а также полимеризоваться (укрупняться) до более весомых с точки

зрения молекулярной массы соединений.

Пептиды, участвующие в образовании коллоидного помутнения с полифенолами, определяются показателем аминный азот, поэтому он также важен при исследовании процессов старения пива, также из пептидов и аминокислот образуются альдегиды, являющиеся прекурсорами карбоновых соединений, ответственных за органолептическую нестабильность пива.

Меланоидины влияют на окисляемость пива при хранении [10, с. 231-237] поскольку быстро реагируют с окислителями, сдвигая равновесное состояние пива (время их реакции составляет 15 сек - 5 мин).

Показатель содержание изогумулона характеризует содержание в пиве хмелевых смол, которые медленно преобразовываются при окислении пива под воздействием кислорода или света (150 мин и более).

Вышеописанные показатели помогут количественно оценить глубину сдвига коллоидной системы пива в процессе его старения. В качестве косвенного показателя среди прочих определялось тиобарбитуровое число – число тиобарбитуровой кислоты имеет отношение к окислительным реакциям липидной фракции и характеризует степень ее окисления; чем оно больше, тем больше концентрация окисленных липидов, меньше содержание фитостеринов, и тем большее влияние на вкус оказывается с их стороны. Задачей исследования являлось исследовать зависимость всех дополнительных качественных показателей и тиобарбитурового числа, характеризующего содержание фитостеринов как липидной фракции. Таким образом, мы можем подобрать оптимальный метод «искусственного» старения пива, наибольшим образом способствующий окислительным реакциям в готовом пиве, влияющий на содержание фитостеринов.

Показатель число тиобарбитуровой кислоты характеризует степень окислительных процессов, выражаясь в количестве малонового альдегида на единицу продукции, и указывает на негативные процессы в хранящемся пиве.

Таблица 29 – Изменение физико-химических показателей пива в зависимости от метода старения

Образец	Измеряемый показатель	Содержание показателя в зависимости от способа старения пива					
		к	1	2	3	4	5
Lowenbrau	Мутность, ед.	H ₉₀ =0,52±0,1 H ₂₅ =0,68±0,1	H ₉₀ =5,91±0,1 H ₂₅ =2,90±0,1	H ₉₀ =0,54±0,1 H ₂₅ =0,68±0,1	H ₉₀ =0,65±0,1 H ₂₅ =0,71±0,1	H ₉₀ =0,82±0,1 H ₂₅ =0,27±0,1	H ₉₀ =0,67±0,1 H ₂₅ =0,77±0,1
	Содержание меланоидинов, мг/дм ³	255±1,0	550±1,0	255±1,0	320±1,0	380±1,0	253±1,0
	Кислотность, к.ед.	3,2±0,2	5,75±0,2	4,25±0,2	4,75±0,2	4,45±0,2	3,8±0,2
	Содержание аминного азота, мг/дм ³	196,0±1,0	140,0±1,0	195,8±1,0	168,0±1,0	210,0±1,0	195,7±1,0
	Содержание полифенолов, мг/дм ³	262,4±1,5	145,0±1,5	201,6±1,5	215,6±1,5	171,4±1,5	262,4±1,5
	Тиобарбитуровое число, мг/дм ³	1,17±0,1	2,03±0,1	1,64±0,1	1,48±0,1	1,8±0,1	1,48±0,1
	Содержание изогу-мулона, мг/дм ³	14,46±0,2	7,2±0,2	11,37±0,2	9,89±0,2	9,37±0,2	14,45±0,2
Жигули барное	Мутность, ед.	H ₉₀ =0,31±0,1 H ₂₅ =0,20±0,1	H ₉₀ =6,55±0,1 H ₂₅ =4,0±0,1	H ₉₀ =0,32±0,1 H ₂₅ =0,25±0,1	H ₉₀ =0,91±0,1 H ₂₅ =0,70±0,1	H ₉₀ =1,72±0,1 H ₂₅ =0,37±0,1	H ₉₀ =0,33±0,1 H ₂₅ =0,23±0,1
	Содержание меланоидинов, мг/дм ³	380±1,0	675±1,0	380±1,0	500±1,0	550±1,0	378±1,0
	Кислотность, к.ед.	3,2±0,2	5,5±0,2	5,0±0,2	4,5±0,2	5,3±0,2	3,6±0,2
	Содержание аминного азота, мг/дм ³	224,0±1,0	154,0±1,0	221,7±1,0	196,0±1,0	182,0±1,0	210,5±1,0
	Содержание полифенолов, мг/дм ³	258,7±1,5	205,0±1,5	232,4±1,5	218,6±1,5	210,3±1,5	226,1±1,5
	Тиобарбитуровое число, мг/дм ³	1,03±0,1	1,71±0,1	1,48±0,1	1,64±0,1	1,65±0,1	1,56±0,1
	Содержание изогу-мулона, мг/дм ³	16,49±0,2	10,92±0,2	16,41±0,2	13,49±0,2	12,5±0,2	16,45±0,2

Продолжение таблицы 29

Birra Moretti	Мутность, ед.	H ₉₀ =0,51±0,1 H ₂₅ =0,53±0,1	H ₉₀ =7,33±0,1 H ₂₅ =3,09±0,1	H ₉₀ =0,62±0,1 H ₂₅ =0,60±0,1	H ₉₀ =1,0±0,1 H ₂₅ =1,06±0,1	H ₉₀ =0,65±0,1 H ₂₅ =0,55±0,1	H ₉₀ =0,55±0,1 H ₂₅ =0,56±0,1
	Содержание меланоидинов, мг/дм ³	75,0±1,0	440,0±1,0	75,0±1,0	108,6±1,0	115,0±1,0	73,0±1,0
	Кислотность, к.ед.	2,3±0,2	3,5±0,2	2,7±0,2	3,2±0,2	3,0±0,2	2,6±0,2
	Содержание аминного азота, мг/дм ³	112,0±1,0	84,0±1,0	112,0±1,0	94,1±1,0	100,5±1,0	112,0±1,0
	Содержание полифенолов, мг/дм ³	263,6±1,5	92,3±1,5	202,4±1,5	138,7±1,5	169,4±1,5	235,3±1,5
	Тиобарбитуровое число, мг/дм ³	0,68±0,1	1,25±0,1	0,95±0,1	1,14±0,1	1,24±0,1	0,95±0,1
	Содержание изогумуллона, мг/дм ³	12,69±0,2	5,88±0,2	10,03±0,2	7,5±0,2	8,81±0,2	11,4±0,2
Krushovice Cerne	Мутность, ед.	H ₉₀ =0,57±0,1 H ₂₅ =1,10±0,1	H ₉₀ =0,97±0,1 H ₂₅ =1,16±0,1	H ₉₀ =0,70±0,1 H ₂₅ =1,15±0,1	H ₉₀ =0,75±0,1 H ₂₅ =1,05±0,1	H ₉₀ =0,56±0,1 H ₂₅ =1,10±0,1	H ₉₀ =0,57±0,1 H ₂₅ =1,10±0,1
	Содержание меланоидинов, мг/дм ³	3500±1,0	3700±1,0	3500±1,0	3500±1,0	3500±1,0	3500±1,0
	Кислотность, к.ед.	2,7±0,2	4,3±0,2	3,6±0,2	4,0±0,2	3,0±0,2	2,8±0,2
	Содержание аминного азота, мг/дм ³	215,0±1,0	140,0±1,0	209,4±1,0	180,0±1,0	209,6±1,0	208,4±1,0
	Содержание полифенолов, мг/дм ³	289,6±1,5	245,2±1,5	263,3±1,5	260,1±1,5	280,1±1,5	284,4±1,5
	Тиобарбитуровое число, мг/дм ³	1,17±0,1	1,87±0,1	1,58±0,1	1,62±0,1	1,30±0,1	1,27±0,1
	Содержание изогумуллона, мг/дм ³	10,4±0,2	6,46±0,2	8,20±0,2	8,3±0,2	9,5±0,2	9,8±0,2

Продолжение таблицы 29

Spaten	Мутность, ед.	H ₉₀ =0,80±0,1 H ₂₅ =0,49±0,1	H ₉₀ =10,4±0,1 H ₂₅ =22,9±0,1	H ₉₀ =0,99±0,1 H ₂₅ =0,55±0,1	H ₉₀ =4,50±0,1 H ₂₅ =9,48±0,1	H ₉₀ =2,92±0,1 H ₂₅ =1,53±0,1	H ₉₀ =0,90±0,1 H ₂₅ =0,55±0,1
	Содержание меланоидинов, мг/дм ³	47,5±1,0	580,0±1,0	47,5±1,0	60,0±1,0	150,4±1,0	48,0±1,0
	Кислотность, к.ед.	2,8±0,2	4,0±0,2	3,5±0,2	3,7±0,2	3,6±0,2	3,0±0,2
	Содержание аминного азота, мг/дм ³	210,0±1,0	196,0±1,0	209,4±1,0	130,5±1,0	182,5±1,0	209,4±1,0
	Содержание полифенолов, мг/дм ³	264,0±1,5	106,6±1,5	210,0±1,5	148,5±1,5	162,4±1,5	252,1±1,5
	Тиобарбитуровое число, мг/дм ³	1,07±0,1	1,87±0,1	1,55±0,1	1,75±0,1	1,69±0,1	1,42±0,1
	Содержание изогумулона, мг/дм ³	12,92±0,2	6,05±0,2	10,20±0,2	7,80±0,2	8,40±0,2	12,05±0,2
Tsingtao	Мутность, ед.	H ₉₀ =0,79±0,1 H ₂₅ =0,36±0,1	H ₉₀ =12,5±0,1 H ₂₅ =17,3±0,1	H ₉₀ =0,85±0,1 H ₂₅ =0,58±0,1	H ₉₀ =2,60±0,1 H ₂₅ =1,30±0,1	H ₉₀ =8,20±0,1 H ₂₅ =1,70±0,1	H ₉₀ =0,85±0,1 H ₂₅ =0,55±0,1
	Содержание меланоидинов, мг/дм ³	45±1,0	410,0±1,0	60,0±1,0	95,0±1,0	125,0±1,0	50,0±1,0
	Кислотность, к.ед.	2,0±0,2	3,0±0,2	2,5±0,2	2,7±0,2	2,7±0,2	2,5±0,2
	Содержание аминного азота, мг/дм ³	196,0±1,0	112,0±1,0	196,0±1,0	168,1±1,0	167,9±1,0	195,1±1,0
	Содержание полифенолов, мг/дм ³	142,0±1,5	73,8±1,5	110,1±1,5	90,3±1,5	78,3±1,5	111,5±1,5
	Тиобарбитуровое число, мг/дм ³	0,78±0,1	1,92±0,1	1,17±0,1	1,60±0,1	1,40±0,1	0,96±0,1
	Содержание изогумулона, мг/дм ³	5,03±0,2	2,79±0,2	4,88±0,2	3,00±0,2	2,80±0,2	3,90±0,2

Как видно из данных таблицы 29, метод Шапона, 5 столбец таблицы 29, и метод Каглера, 3 столбец таблицы 29, значительно не влияют на процессы старения пива, лишь приводят к обратимому сдвигу коллоидной стабильности, поскольку незначительно повышается мутность на фоне практически не изменяющихся физико-химических показателей.

Наибольший вклад в нарушение коллоидного равновесия, если судить по титроарбитражному числу, кислотности, содержанию изогулмулона, внес метод определения коллоидной стойкости по ЕВС – мутность пива превышает значение 2 ед. мутности, и все контролируемые показатели превышают те же значения в других образцах значительно.

В течение обработки всех образцов пива этим способом старения, происходит наиболее значимое снижение содержания аминного азота, что коррелирует с литературными данными [119, с. 301-307], в которых отмечается снижение уровня глутатиона, метионина, фенилаланина, гистидина и тирозина в пиве, хранящемся 6-9 месяцев, также было подтверждена корреляция между ухудшением вкуса пива (образованием карбониллов старения) и снижением уровня аминокислот в пиве (Рисунок 62).

Концентрация полифенолов уменьшается за счет образования белково-дубильных комплексов с образованием коллоидного помутнения, что подтверждает уровень мутности образцов пива. Как видно из рисунка 63, снижение концентрации полифенолов связано с нарастанием ТБЧ, что говорит о взаимосвязи окисления липидной фракции и окислением полифенолов в пиве при старении.

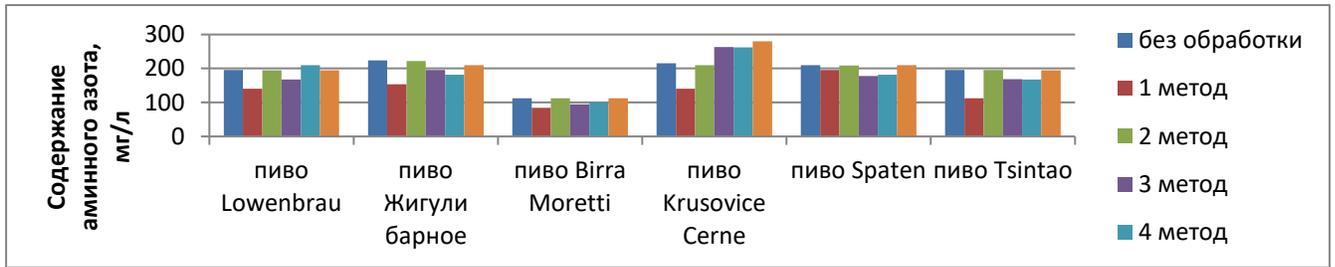


Рисунок 62 – Изменение содержания аминокислот в зависимости от метода старения пива

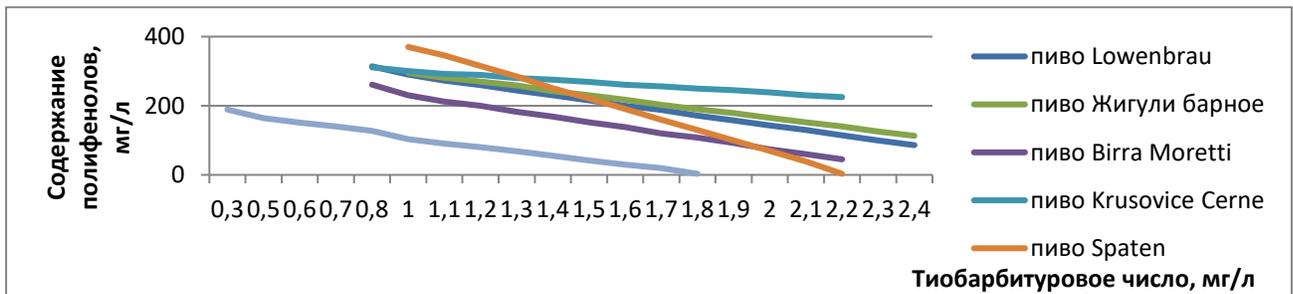


Рисунок 63 – Изменение содержания полифенолов в зависимости от ТБЧ пива

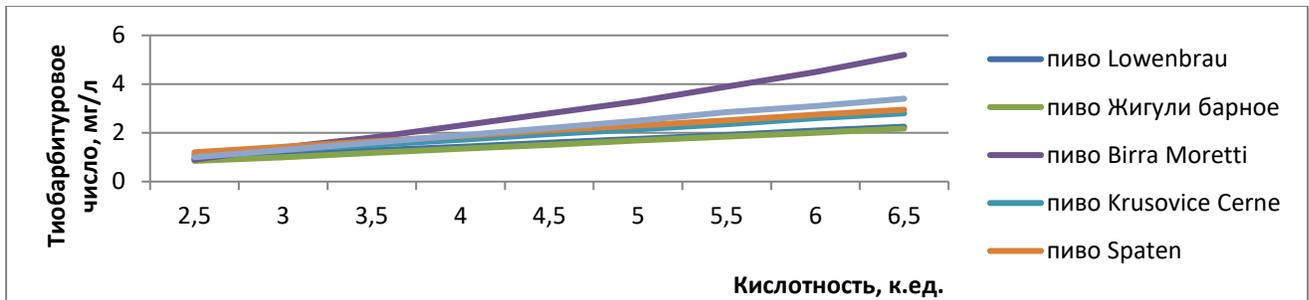


Рисунок 64 – Изменение кислотности в зависимости от тиобарбитурового числа пива

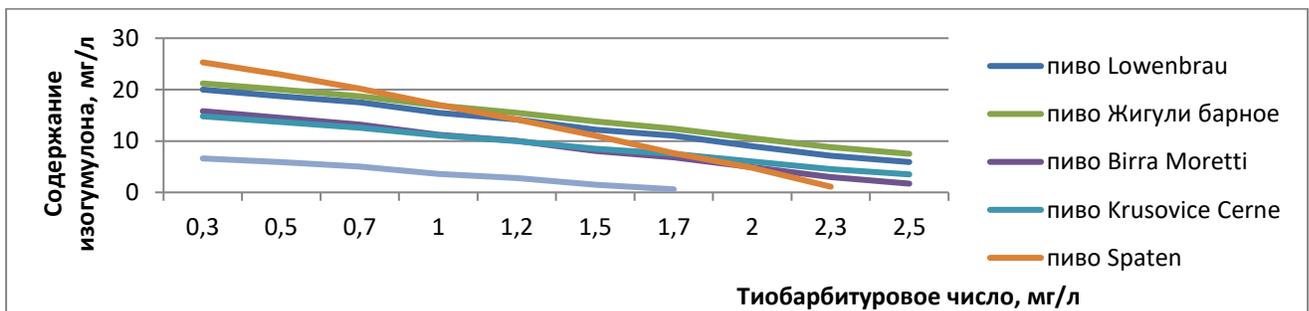


Рисунок 65 – Изменение содержания изогулмона в зависимости от ТБЧ

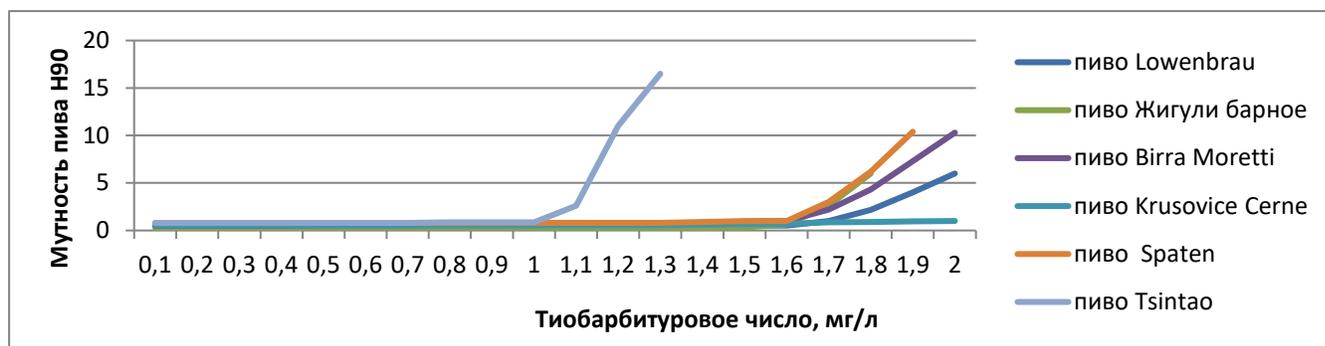


Рисунок 66 – Изменение мутности Н90 в зависимости от ТБЧ

Кислотность пива увеличивается за счет образования альдегидов, эфиров, карбониллов старения, что, с другой стороны, подтверждается возрастанием тиобарбитурового числа, характеризующего степень окисления органических соединений (Рисунок 64).

Содержание изогумуллона снижается за счет его окисления, что подтверждается как органолиптическими, так и физико-химическими показателями пива (Рисунок 65).

Мутность пива также менялась в зависимости от изменения тиобарбитурового числа (Рисунок 66).

Причем, необходимо отметить, что смещение равновесного состояния у пива «Tsingtao» происходило ранее, а характер изменения мутности пива «Krusovice Cerne» вообще отличался от остальных образцов пива, что объясняется использованием различного зернового и сахаросодержащего сырья в технологии его производства – в пиве «Tsingtao» применяется рис как несоложеное сырье, а в пиве «Krusovice Cerne» присутствует темный солод, соответственно содержание меланоидинов в нем наибольшее из всех образцов.

Полученные графики были математически изучены и получены уравнения зависимостей с помощью программы Excel (Таблицы 30).

Как видно из данных таблицы 30, зависимости №1-3 носят линейный характер. Если рассматривать зависимость изменения полифенолов от ТБЧ, то есть изменения фитостеринов, то можно заметить близкий по значению коэффициент при переменной

всех образцов пива, кроме «Tsingtao», что можно объяснить разницей в используемом на приготовление пива, сырье: в образце пива «Tsingtao» более преобладает несоложеное сырье, что подтверждается органолептическим характером и физико-химическими показателями (Таблицы 29). Остальные образцы пива в той или иной степени содержат преобладающее количество солода [18, с. 128-131; 19, с. 163-166].

Таблица 30 – Уравнения основных зависимостей при исследовании методов старения пива на основании рисунков 62-66

Наименование пива	Уравнение зависимости содержания			
	Полифенолов от ТБЧ	ТБЧ от кислотности	Изогумулона от ТБЧ	Мутности (Н90) от ТБЧ
№ зависимости	1	2	3	4
Lowenbrau	$y = -145x + 432,5$	$y = 0,32x + 0,14$	$y = -6,3x + 21,8$	$y = 6,13x^2 - 22,68x + 23,1$ для $x > 1,65$
Жигули барное	$y = -130x + 425$	$y = 0,34x$	$y = -6,3x + 23,1$	$y = 3,38x^2 - 15,21x + 17,45$ для $x > 1,5$
Birra Moretti	$y = -156x + 386$	$y = 0,64x - 1,3$	$y = -6x + 17,5$	$y = 6,3x^2 - 20,16x + 25,42$ для $x > 1,6$
Krushovice Cerne	$y = -162x + 362$	$y = 0,42x + 0,04$	$y = -5x + 16$	$y = 1,37x^2 - 3,2x + 2,16$ при $x > 1,15$
Spaten	$y = -152x + 449$	$y = 0,42x + 0,16$	$y = -12,1x + 29$	$y = 4,15x^2 - 13,28x + 16,55$ для $x > 1,6$
Tsingtao	$y = -61x + 166$	$y = 0,9x - 0,63$	$y = -4,4x + 3,7$	$y = 4,46x^2 - 6,69x + 9,9$ для $x > 0,8$

Изменение протекающих окислительных процессов согласуется с коэффициентами при переменных в уравнениях таблицы 30 - наибольшей скоростью протекания окислительных процессов, характеризующихся индексом ТБЧ, из сортов пива характеризуется пиво «Tsingtao», поскольку коэффициент при переменной в уравнении у него больший.

Опираясь на полученные данные (Таблица 26) и данные из литературы, предположили, что фитостерины пива из солода и несоложеного сырья, окисляются быст-

рее за счет своего меньшего количества по сравнению с фитостеринами чисто солодового пива, поскольку свободные фитостерины несоложеного зерна локализируются в оболочках и зародышевой части, и большей частью удаляются при фильтрации, а связанные фитостерины не могут попасть в сусло вследствие сильных коллоидных связей [9, с. 257-259; 24, с. 42-43].

В образцах пива «Kurshovice Cerne» и «Spaten» из солода наблюдается близкая зависимость изменения тиобарбитурового числа, косвенно характеризующего фитостерина, и кислотности, поскольку коэффициенты перед переменными близки по значениям. Разница между коэффициентами перед переменными в образцах импортного пива «Birra Moretti» и «Tsingtao» близки между собой, что говорит о присутствии в них несоложеного сырья. Соответственно можно сделать вывод о том, что влияние на прохождение окислительных процессов имеет применяемое в технологии сырье: пиво «Birra Moretti» предположительно производилось из ячменя (но это не указано на этикетке), а «Tsingtao» – изготавливалось с применением риса в качестве несоложеного зерна.

Если рассматривать влияние индекса ТБЧ, то есть влияние фитостеринов, на изменение мутности H_{90} , то необходимо отметить, что процесс до некоторых значений индекса ТБЧ носит линейный характер и даже описывает уравнение постоянной, а затем носит параболический характер. Окисление фитостеринов в образцах чисто солодового пива проходит с меньшей скоростью, что и отражено на рисунке 6б, где пиво «Tsingtao» мутнеет быстрее, а для сдвига равновесия в других образцах пива, в которых большее содержание фитостеринов, необходимо большее время. Данный факт можно также объяснить за счет содержания одной из антиоксидантных групп пива (наряду с полифенолами и редуктонами) – меланоидинов – содержание их, как уже говорилось выше, в пиве «Tsingtao» ниже, соответственно, помутнение или сдвиг коллоидного равновесия за счет окислительных процессов, наступает раньше по сравнению с пивом из солода.

Также необходимо отметить, что характер зависимости мутности от ТБЧ для

пива «Kurshovice Cerne» описывается изогнутой параболой, что говорит о сильном антиокислительном действии всех групп антиоксидантов пива (меланоидинов, полифенолов, редуктонов), которые препятствуют выраженному нелинейному развитию помутнения до некоторого критического значения, когда и происходит основной сдвиг коллоидного равновесия. Для остальных образцов пива характер зависимости помутнения от ТБЧ, то есть изменения фитостеринов, был идентичен и порог наступления необратимого помутнения превышал $1,6 \text{ мг/дм}^3$ ТБЧ.

Исходя из рисунков 62-66, следует, что, если оценивать отечественные образцы пива, графики пива из солода «Lowenbrau» и «Жигули барное» идут параллельно и отличаются от графиков пива «Tsingtao» из солода и несоложенных материалов углом наклона, что может быть параметром для оценки состава засыпи для приготовления того или иного пива, связанного с содержанием фитостеринов. В образцах импортного пива не наблюдается такой четкой зависимости, она носит частичный характер, и это связано с иным сырьем готового пива, то есть другим содержанием в пиве фитостеринов, а также технологией его приготовления.

Приведенные нами данные в таблицы 30 и рисунков 62-66 указывают на непосредственное влияние окисления фитостеринов на окислительные изменения (индекс ТБЧ), изменение которых в дальнейшем влияет на вкус пива, а состав готового напитка может быть охарактеризован с их помощью.

Таким образом, существует зависимость между окислением фитостеринов и процессами старения пива, проходящими с разной интенсивностью у образцов, приготовленных только из солода и из солода и несоложенного зерна, которые различаются по уровню главных антиокислительных соединений – полифенолов, меланоидинов, редуктонов, фитостеринов, при критическом сдвиге коллоидного равновесия в пиве. Представляется целесообразным изучить корреляцию изменения индекса ТБЧ, то есть содержания фитостеринов в образцах пива, в зависимости от косвенных показателей.

На втором этапе исследовалось влияние фитостеринов на окислительные процессы в пиве. Наибольший вклад в сдвиг коллоидного равновесия пива внес метод ЕВС, и, следовательно, он был взят за основу для изучения влияния фитостеринов как представителей липидной фракции на окислительные процессы, то есть уровень ТБЧ, в готовом пиве.

Пробоподготовка образцов пива проводилась без изменений (п. 2.3.3), условия хроматографирования были те же, и они показали наличие определяемых фитостеринов в образцах пива: «Krushovice Cerne» (Рисунок 67), «Spaten» (Рисунок 68), «Birra Moretty» (Рисунок 69), «Lowenbrau» (Рисунок 70) и «Жигули барное» (Рисунок 71).

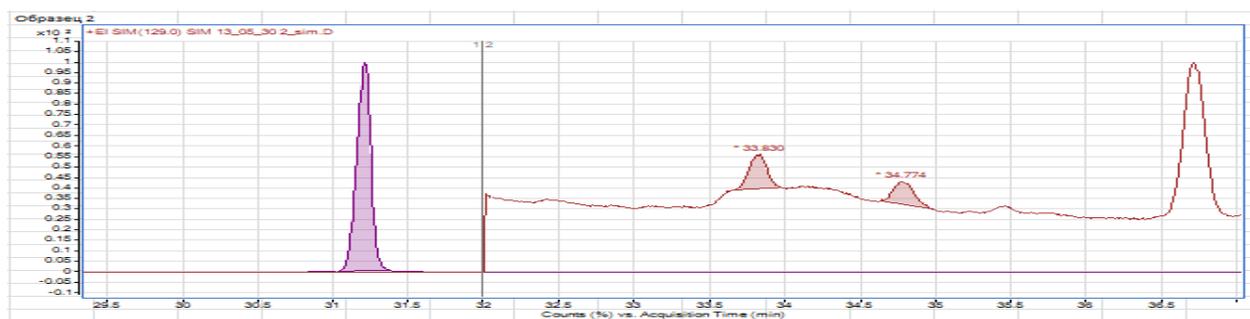


Рисунок 67 – Содержание фитостеринов в пиве «Krushovice Cerne» после выдержки по методу ЕВС

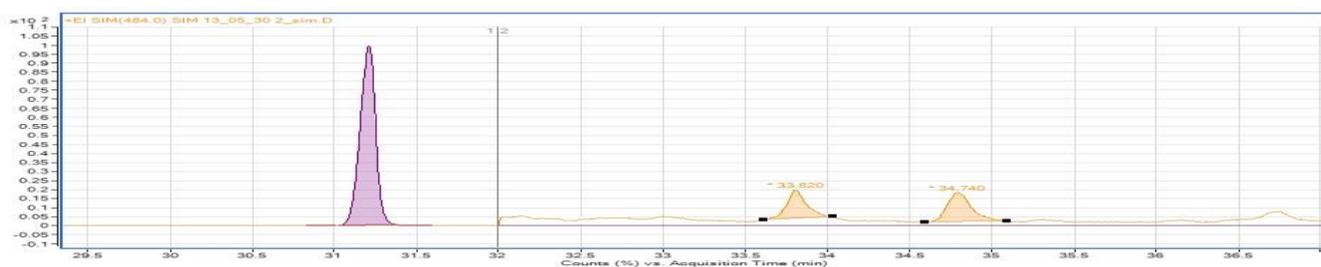


Рисунок 68 – Содержание фитостеринов в пиве «Spaten» после выдержки по методу ЕВС

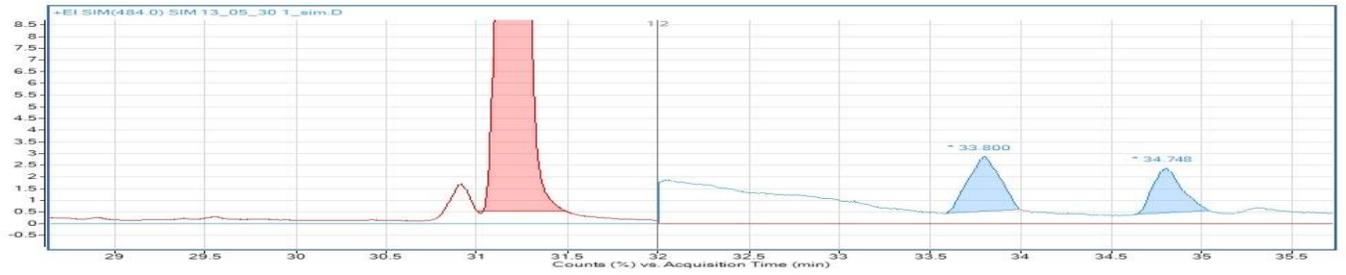


Рисунок 69 – Содержание фитостеринов в пиве «Birra Moretty» после выдержки по методу ЕВС

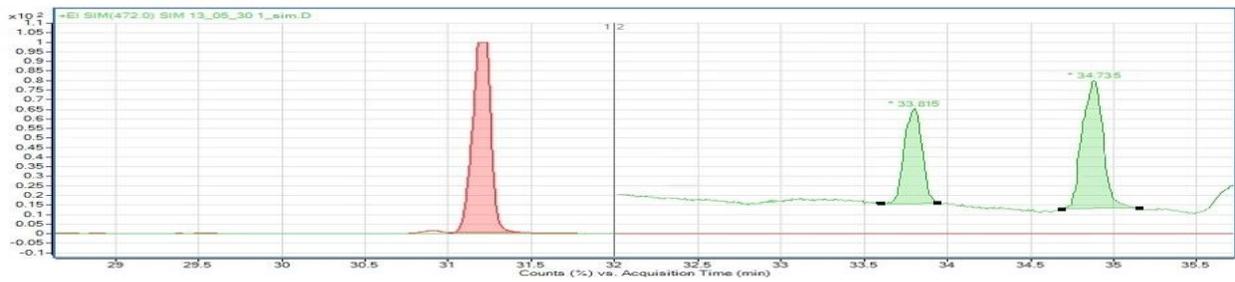


Рисунок 70 – Содержание фитостеринов в пиве «Lowenbrau» после выдержки по методу ЕВС

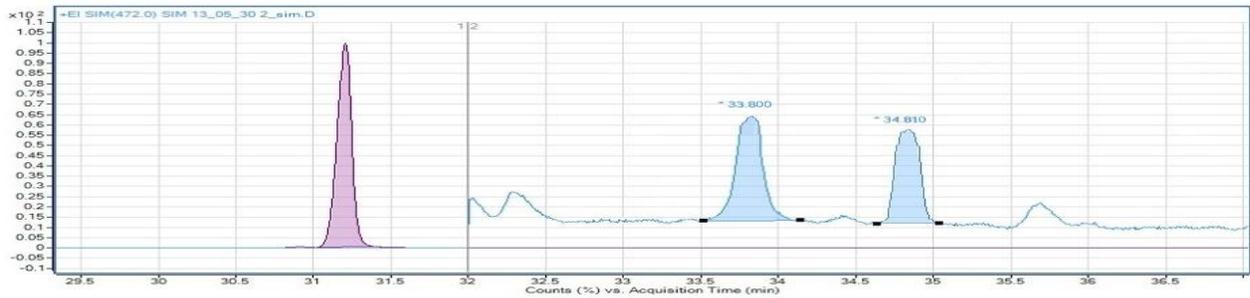


Рисунок 71 – Содержание фитостеринов в пиве «Жигули барное» после выдержки по методу ЕВС

Таблица 31 – Хроматографические параметры образцов пива

Хроматографические параметры						Вещество
Peak	Время выхода	Площадь	Интенсивность пика	Ширина пика	Массовое разрешение	
<i>Krushovice Cerne</i>						
2	33,83	740652,87	88878,79	0,32	0,131	кампестерин
3	34,774	561907,21	59752,92	0,371	0,147	стигмастерин
<i>Spaten</i>						
2	33,820	256825,1	23124,58	0,390	0,140	кампестерин
3	34,740	285530,0	22158,31	0,375	0,128	стигмастерин
<i>Birra Moretty</i>						
2	33,800	526815,93	5908838,1	0,480	0,143	кампестерин
3	34,748	212742,04	25210,58	0,400	0,125	стигмастерин
<i>Lowenbrau</i>						
2	33,815	274298,09	28013,8	0,448	0,136	кампестерин
3	34,735	226974,76	27212,18	0,435	0,132	стигмастерин
<i>Жигули барное</i>						
2	33,800	232187,9	13724,05	0,570	0,138	кампестерин
3	34,810	189043,5	12232,02	0,420	0,131	стигмастерин

Таблица 32 – Расчет концентрации фитостероидов

Вещество	Площадь	Добавлено холестанола, мкг	К	Объем пива на анализ, V пива, см ³	Концентрация фитостерина, Сф, мкг/дм ³
<i>Krushovice Cerne</i>					
Холестанол	88043655	200	1		
Кампестерол	740652	1,682465	1	1000	1,682465
Стигмастерол	561907	1,276428	1	1000	1,276428
<i>Spaten</i>					
Холестанол	118792763	200	1		
Кампестерол	256825,1	0,601355	1	1000	0,601355
Стигмастерол	285530,0	0,390135	1	1000	0,390135
<i>Birra Moretty</i>					
Холестанол	13058343	200	1		
Кампестерол	526815,9	0,616764	1	1000	0,616764
Стигмастерол	212742	0,515789	1	1000	0,515789

Продолжение таблицы 32

	<i>Lowenbrau</i>				
Холестанол	871146932	200	1		
Кампестерол	274298	1,088241	1	1000	1,088241
Стигмастерол	226975	0,551264	1	1000	0,551264
	<i>Жигули барное</i>				
Холестанол	41565589	200	1		
Кампестерол	232187,9	0,905881	1	1000	0,905881
Стигмастерол	189043,5	0,541156	1	1000	0,541156

Таким образом, содержание фитостеринов в пиве до и после ускоренного старения по методу ЕВС, представлено в таблице 33.

Таблица 33 – Содержание фитостеринов в различных сортах пива до и после обработки

Название сорта пива	Содержание, мкг/дм ³			
	кампестерина		стигмостерина	
	до обработки	после обработки	до обработки	после обработки
«Krushovice Cerne»	29,4	1,7	25,3	1,3
«Birra Moretti»	10,5	0,6	9,8	0,5
«Spaten»	21,0	0,6	11,7	0,4
«Tsingtao»	7,9	-	6,5	-
«Lowenbrau»	18,5	1,1	9,9	0,6
«Жигули барное»	15,4	0,9	9,8	0,5

Как видно из данных таблицы 33, искусственное старение пива методом ЕВС приводит к уменьшению концентрации фитостеринов в 17-35 раз, а в некоторых случаях содержание фитостеринов ниже порога их обнаружения, причем более термолabileм оказался стигмостерин по сравнению с кампестерином.

Наибольшим значением по содержанию фитостеринов после искусственного старения обладало темное пиво «Krushovice Cerne», что коррелирует с изменением индекса ТБЧ – в данном образце тиобарбитуровое число увеличивается меньше всего

по сравнению с другими образцами (Таблица 29). По-видимому, это объясняется применением в производстве данного пива темного и карамельного солодов по рецептуре.

В таблице 34 представлены образцы пива в порядке убывания индекса ТБЧ и содержания фитостеринов.

Таким образом, есть четкая зависимость между индексом ТБЧ и содержанием фитостеринов в пиве: чем больше содержание фитостеринов, тем меньше индекс ТБЧ, что говорит о коллоидном равновесии пива, то есть о высоких качественных показателях готового напитка.

Таблица 34 – Содержание ТБЧ и фитостеринов в образцах пива

Наименование образца пива	Содержание в пиве						
	Тиобарбитуровое число, мг/дм ³			Фитостеринов, мкг/дм ³			
	исход- ное	после обра- ботки*	увеличе- ние, раз	исходное		после обработки	
камп.				стиг- маст.	камп.	стиг- маст.	
«Kurshovice Cerne»	1,17	1,87	1,6	29,4	25,3	1,7	1,3
«Lowenbrau»	1,17	2,03	1,74	18,5	9,9	1,1	0,6
«Жигули барное»	1,03	1,71	1,75	15,4	9,8	0,9	0,5
«Birra Moretti»	0,68	1,25	1,84	10,5	9,8	0,6	0,5
«Spaten»	1,00	1,87	1,86	21,0	11,7	0,6	0,4
«Tsingtao»	0,78	1,92	2,5	7,9	6,5	-	-

* после обработки – имеется ввиду применение метода ЕВС для искусственного старения пива

Основываясь на вышесказанном, подтвердилась наша гипотеза о том, что фитостерины в пиве не могут себя полностью охарактеризовать как антиоксиданты, и сами окисляются в процессе нарушения коллоидного равновесия.

С целью нахождения численной зависимости содержания фитостеринов от индекса ТБЧ, задействовались данные по светлому солодовому пиву, исключая темное «Krushovice Cerne» и светлое, но приготовленное с применением несоложенного сырья, «Tsingtao», вследствие отсутствия сходных образцов пива по применяемому сырью.

Получаются следующие значения (содержание фитостеринов усреднялось):

1,2 мг/дм³ ТБЧ соответствует 14,2 мкг/дм³ фитостеринов

1,0 мг/дм³ ТБЧ соответствует 12,6 мкг/дм³ фитостеринов

0,7 мг/дм³ ТБЧ соответствует 10,2 мкг/дм³ фитостеринов

Иначе говоря, 1 мг/дм³ ТБЧ соответствует 12,6 мкг/дм³ фитостеринов в исходном пиве.

Для того чтобы охарактеризовать достоверность получившихся зависимостей содержания фитостеринов или изменения ТБЧ, от измеряемых косвенных показателей нарушения коллоидного равновесия пива, а также вклада фитостеринов в изменение равновесного состояния пива, использовался математический анализ полученных уравнений зависимостей (Таблица 29) – корреляционный и регрессионный анализ [5, с. 92-253; 21, с. 125-143], программа Statistica.

Корреляционная связь характеризуется соответствием значения одной величины нескольким значениям другой, она может иметь как линейный, так и нелинейный характер. Поскольку нарушение равновесного состояния коллоидной системы – пива – является сложным процессом, зависящим от многих параметров, математический корреляционно-регрессионный анализ был разбит на несколько этапов: первый этап включал в себя исследование характера корреляционной зависимости изменения ТБЧ как степени окисления липидной фракции, то есть фитостеринов, от концентрации полифенолов и изогумулона, поскольку данные соединения наибольшим образом подвержены окислению и характер протекания этих реакций наиболее показателен с точки зрения нарушения равновесия коллоидной системы, также исследованию подвергался процесс изменения мутности пива в зависимости от увеличения ТБЧ, как результирующий процесс влияния вклада от окисления липидной фракции на качество пива; второй этап включал в себя поиск зависимости изменения контролируемых параметров качества пива от увеличения степени окисления липидной фракции.

Данные, полученные в ходе экспериментов (Таблица 29), сведены в таблице 34.

На основании данных таблицы 34 и формул 1,3,8-13, были получены следующие величины (Таблица 35).

Таблица 35 – Влияние ТБЧ на изменение концентрации полифенолов в пиве

Наименование образца пива	Величины					
	X_i	$(X_i - X')^2$	Y_i	$(Y_i - Y')$	$(Y_i - Y')^2$	$(X_i - X')(Y_i - Y')$
Lowenbrau	0,5	0,95	360	146,3	21403,7	142,59
	0,7	0,60	290	108,1	11685,6	83,73
	1,0	0,23	275	76,25	5814,1	36,56
	1,5	0,00063	225	11,25	126,6	0,28
	1,7	0,051	185	-28,75	826,6	-6,49
	2,0	0,28	145	-68,75	4726,6	-36,38
	2,1	0,39	130	-83,75	7014,1	-52,30
	2,3	0,68	100	-113,75	12939,1	-93,80
	$X_i' = 1,48$	$\Sigma = 3,175$	$Y_i' = 213,7$ 5		$\Sigma = 64536,4$	$\Sigma = 74,19$
Жигули барное	0,5	0,95	350	120,0	14400,0	116,96
	0,7	0,60	325	95,0	9025,0	73,59
	1,0	0,23	300	70,0	4900,0	33,57
	1,5	0,00063	230	0	0	0
	1,7	0,051	200	-30,0	900,0	-6,77
	2,0	0,28	160	-70,0	4900,0	-37,04
	2,1	0,39	150	-80,0	6400,0	-50,0
	2,3	0,68	125	-105,0	11025,0	-86,59
	$X_i' = 1,48$	$\Sigma = 3,175$	$Y_i' = 230,0$		$\Sigma = 51550$	$\Sigma = -43,72$
Birra Moretti	0,5	0,95	308	151,1	22840,3	-147,35
	0,7	0,60	265	108,1	11692,1	-83,80
	1,0	0,23	230	73,1	5347,9	-34,73
	1,5	0,00063	151	-5,9	34,5	-0,15
	1,7	0,051	121	-35,9	1286,7	-8,07
	2,0	0,28	75	-81,9	6702,7	-42,98
	2,1	0,39	60	-96,9	9383,8	-60,54
	2,3	0,68	45	-111,9	12514,9	-92,29
	$X_i' = 1,48$	$\Sigma = 3,175$	$Y_i' = 156,9$		$\Sigma = 69802,9$	$\Sigma = -469,90$
Krushovice Cerne	0,5	0,95	330	59,5	3540,3	-58,01
	0,7	0,60	319	48,5	2352,3	-37,59
	1,0	0,23	300	29,5	870,3	-14,01
	1,5	0,00063	269	-1,5	2,3	-0,038
	1,7	0,051	258	-12,5	156,3	-2,81

Продолжение таблицы 35

Krushovice Cerne	2,0	0,28	239	-21,5	992,3	-16,54
	2,1	0,39	230	-40,5	1640,3	-25,31
	2,3	0,68	219	-51,5	2652,3	-42,49
	$X_i'=1,48$	$\Sigma=3,175$	$Y_i'=270,5$		$\Sigma=12206,4$	$\Sigma=-196,79$
Spaten	1,1	0,15	349	168,4	28348,5	-65,14
	1,3	0,035	285	104,4	10893,1	-20,74
	1,5	0,00017	221	40,4	1629,7	-0052
	1,7	0,045	160	-20,6	425,6	-4,39
	2,0	0,26	70	-110,6	12238,9	-56,76
	2,1	0,37	40	-140,6	19776,8	-86,21
	1,2	0,082	315	134,4	18055,3	-38,57
	2,2	0,51	5	-175,6	30845,9	-125,23
	$X_i'=1,49$	$\Sigma=1,46$	$Y_i'=180,6$		$\Sigma=122213,8$	$\Sigma=-396,51$
Tsingtao	0,1	0,50	212	85,8	7353,1	-60,88
	0,3	0,26	189	62,8	3937,6	-32,00
	0,5	0,092	165	38,8	1501,6	-12,01
	0,7	0,012	140	13,8	189,1	-1,51
	1,0	0,036	103	-23,3	540,6	-4,41
	1,1	0,084	91	-35,3	1242,6	-10,22
	1,3	0,24	68	-58,3	3393,1	-28,54
	1,5	0,48	42	-84,3	7098,1	-58,13
	$X_i'=0,81$	$\Sigma=1,70$	$Y_i'=126,3$		$\Sigma=25255,5$	$\Sigma=-207,70$
Влияние ТБЧ на изменение концентрации изогумулона в пиве						
Lowenbrau	0,3	0,70	19,0	6,6	43,56	5,52
	0,5	0,41	18,0	5,6	31,36	3,58
	0,7	0,19	17,5	5,1	26,01	2,22
	1,0	0,02	15,0	2,6	6,76	0,36
	1,5	0,13	12,0	-0,4	0,16	-0,14
	2,0	0,74	8,0	-4,4	19,36	-3,78
	2,5	1,85	6,0	-6,4	40,96	-8,70
	2,6	2,14	4,0	-8,6	73,96	-12,58
	$X_i'=1,39$	$\Sigma=5,69$	$Y_i'=12,4$		$\Sigma=242,13$	$\Sigma=-13,47$
Жигули бар- ное	0,3	0,70	21,0	6,9	47,61	5,77
	0,5	0,41	20,0	5,9	34,81	3,78
	0,7	0,19	18,0	3,9	15,21	1,70
	1,0	0,02	16,0	1,9	3,61	0,27
	1,5	0,13	13,5	-0,6	0,36	-0,22
	2,0	0,74	10,5	-3,6	46,79	-3,10
	2,5	1,85	7,8	-6,3	39,69	-8,57
	2,6	2,14	6,0	-8,1	65,61	-11,85
	$X_i'=1,39$	$\Sigma=5,69$	$Y_i'=14,1$		$\Sigma=253,33$	$\Sigma=-12,22$

Продолжение таблицы 35

Birra Moretti	0,3	1,18	15,9	7,1	50,41	7,72
	0,5	0,79	14,5	5,7	32,49	5,05
	0,7	0,47	13,2	4,4	19,36	3,02
	1,0	0,15	11,1	2,3	5,29	0,89
	1,5	0,013	8,0	-0,8	0,64	-0,09
	2,0	0,38	4,9	-3,9	15,21	-2,39
	2,5	1,24	1,8	-7,0	49,0	-7,79
	2,6	1,47	1,0	-7,8	60,84	-9,46
	$X_i'=1,39$	$\Sigma=5,69$	$Y_i'=8,8$		$\Sigma=233,24$	$\Sigma=-36,42$
Krushovice Cerne	0,3	0,70	14,8	6,7	31,92	-4,73
	0,5	0,41	13,7	4,6	20,70	-2,91
	0,7	0,19	12,7	3,6	12,60	-1,55
	1,0	0,02	11,0	1,9	3,42	-0,26
	1,5	0,13	8,5	-0,7	0,42	-0,23
	2,0	0,74	6,0	-3,2	9,92	-2,71
	2,5	1,85	3,5	-5,7	31,92	-7,68
	2,6	2,14	3,0	-6,2	37,82	-8,99
	$X_i'=1,14$	$\Sigma=6,18$	$Y_i'=9,5$		$\Sigma=148,72$	$\Sigma=-29,06$
Spaten	0,3	0,92	25,0	10,6	112,36	-10,20
	0,5	0,58	22,9	8,5	72,25	-6,48
	0,7	0,32	20,3	5,9	34,81	-3,32
	1,0	0,069	16,9	2,5	6,25	-0,65
	1,3	0,0014	13,0	-1,4	1,96	-0,052
	1,5	0,056	11,0	-3,4	11,56	-0,81
	2,0	0,54	4,8	-9,6	92,16	-7,07
	2,3	1,075	1,0	-13,4	179,56	-13,89
	$X_i'=1,26$	$\Sigma=3,57$	$Y_i'=14,4$		$\Sigma=510,91$	$\Sigma=-42,48$
Tsingtao	0,1	0,60	7,5	3,3	10,82	-2,55
	0,3	0,33	6,5	2,3	5,2-	-1,32
	0,5	0,14	5,9	1,7	2,85	-0,63
	0,7	0,03	5,0	0,8	0,62	-0,14
	1,0	0,015	3,7	-0,5	0,26	-0,06
	1,5	0,39	1,5	-2,7	7,34	-1,69
	1,2	0,11	2,8	-1,4	1,98	-0,46
	1,7	0,68	0,8	-3,4	11,62	-2,81
	$X_i'=0,88$	$\Sigma=2,29$	$Y_i'=4,2$		$\Sigma=40,77$	$\Sigma=-9,66$

Таблица 36 – Влияние ТБЧ на изменение концентрации полифенолов и изогумулона в пиве

Наименование образца пива	Величины						Критерий достоверности t
	Коэффициент корреляции r_{xy}	Уравнение корреляции	Абсолютная погрешность		Относительная погрешность		
			$\sigma_{y/x}$	$\sigma_{x/y}$	$\sigma'_{y/x}$	$\sigma'_{x/y}$	
<i>Влияние ТБЧ на изменение концентрации полифенолов в пиве</i>							
Lowenbrau	0,96	$y_x=213,75-23,4x$ $x_y=6,22-0,0011y$	0,096	0,63	0,05	4,2	13,9
Жигули барное	0,91	$y_x=230,0-131,8x$ $x_y=1,71-0,001y$	0,098	0,67	0,04	4,5	8,9
Birra Moretti	-0,99	$y_x=375,2-148x$ $x_y=2,53-0,0067y$	0,095	0,14	0,06	9,49	17,2
Krushovice Cerne	-0,99	$y_x=361,9-62x$ $x_y=5,84-0,0016y$	0,09	0,59	0,03	4,0	17,2
Spaten	-0,94	$y_x=584,5-271,6x$ $x_y=2,07-0,0032y$	0,15	0,45	0,08	3,0	6,75
Tsingtao	-0,99	$y_x=224,7-121,5x$ $x_y=1,85-0,0082y$	0,07	0,85	0,006	10,5	17,2
<i>Влияние ТБЧ на концентрацию изогумулона в пиве</i>							
Lowenbrau	-0,96	$y_x=12,4-2,37x$ $x_y=3,08-0,056y$	0,14	0,76	1,1	5,5	4,1
Жигули барное	-0,92	$y_x=14,76-2,15x$ $x_y=4,38-0,048y$	0,12	0,82	1,8	5,8	14,8
Birra Moretti	-0,99	$y_x=17,7-6,4x$ $x_y=2,76-0,16y$	0,13	0,81	1,5	5,8	17,2
Krushovice Cerne	-0,96	$y_x=14,5-4,7x$ $x_y=2,93-0,2y$	0,26	0,12	2,8	10,5	8,4
Spaten	-0,99	$y_x=29,4-11,9x$ $x_y=2,46-0,08y$	0,70	0,12	4,9	9,5	17,2
Tsingtao	-0,99	$y_x=7,9-4,2x$ $x_y=1,87-0,24y$	0,08	0,34	1,90	3,9	17,2

По данным таблицы 35 можно сказать, что все описанные в таблице процессы носят сильный корреляционный характер, поскольку, основываясь на данных таблицы 14, коэффициент корреляции r_{xy} удовлетворяет диапазону от 0,7 до 1.

Вычисленное значение критерия достоверности t необходимо сравнить с критерием Стьюдента для $k=n-2$, где n – количество проведенных экспериментов или повторностей опыта. Из данных таблицы 15 находим, что при $k=8-2=6$ и доверительной вероятностью $P=0,95$ критерий Стьюдента равен 2,45, а это означает, что для всех уравнений реакций, описанных в таблицы 34, корреляционная связь является достоверной.

Зависимость изменения мутности от увеличения ТБЧ выражается параболой (Рисунок 6б), поэтому для него не приемлем анализ с помощью линейной корреляции.

Если линейная регрессия не является прямой, то зависимость между переменными называют нелинейной корреляционной зависимостью. Она бывает полиномиальная (в частности, параболическая), степенная (например, гиперболическая), экспоненциальная, гармоническая и др.

В случае нелинейной корреляционной зависимости, уравнение регрессии записывают в виде (22):

$$y=a_0+a_1x+a_2x^2 \quad (22)$$

Оценки чисел a_0 , a_1 и a_2 для неизвестных параметров истинного уравнения находят по методу наименьших квадратов, решая систему из трех уравнений по формулам (23):

$$\begin{cases} na_0+[x]a_1+[x^2]a_2=[y] \\ [x]a_0+[x^2]a_1+[x^3]a_2=[xy] \\ [x^2]a_0+[x^3]a_1+[x^4]a_2=[x^2 y] \end{cases} \quad (23)$$

Далее для оценки силы корреляционной криволинейной связи необходимо вычислить индекс корреляции i по формуле (24):

$$i = \sqrt{1 - \frac{S_{yx}^2}{S_y^2}}, \quad (24)$$

где $S_{yx}^2 = (\sum(y_i - y'_{xi})^2) / n$ – средний квадрат отклонений фактических значений y от значений y' , вычисленных по уравнению регрессии;

$S_y^2 = (\sum(y_i - \bar{y})^2) / n$ – средний квадрат отклонений фактических значений y от их средней арифметической.

Индекс корреляции варьирует от 0 до 1, чем ближе к 1, тем сильнее корреляционная связь.

Представим данные таблицы 29 в следующем виде – таблица 37, некоторые величины таблиц рассчитаны по формулам 23,24.

Таблица 37 - Влияние ТБЧ на изменение мутности в пиве

Образец пива	Величины						
	X_i	$(X_i)^2$	$(X_i)^3$	$(X_i)^4$	Y_i	$X \cdot Y$	$X^2 \cdot Y$
<i>Влияние ТБЧ на изменение мутности в пиве</i>							
Löwenbrau	0,8	1,823	2,460	3,32	0,5	0,4	0,91
	1,0				0,58	0,58	1,057
	1,2				0,6	0,72	1,094
	1,5				0,8	1,2	1,46
	1,7				1,3	2,21	2,37
	1,9				5,0	9,5	9,11
	$X_i' = 1,35$				$Y_i' = 1,46$	$(XY)' = 14,64$	$(X^2 \cdot Y)' = 16,02$
Жигули барное	1,37	3,35	6,13	11,22	0,8	1,096	2,68
	1,55				1,0	1,55	3,35
	1,6				1,8	2,88	6,03
	1,65				2,7	4,46	9,045
	1,75				4,5	7,88	15,075
	1,9				10,5	19,95	35,18
	$X_i' = 1,83$				$Y_i' = 3,55$	$(XY)' = 37,8$	$(X^2 \cdot Y)' = 71,36$
Britta Moretti	0,8	1,88	2,57	3,52	0,5	0,4	0,32
	1,0				0,58	0,58	0,58
	1,2				0,6	0,72	0,86
	1,5				0,8	1,2	1,8
	1,6				1,0	1,6	2,56
	1,9				7,3	13,87	26,35
	$X_i' = 1,37$				$Y_i' = 1,80$	$(XY)' = 3,06$	$(X^2 \cdot Y)' = 5,41$

Продолжение таблицы 37

Kur-shovice Cerne	1,17	3,13	5,55	9,82	0,57	0,67	0,78
	1,5				0,64	0,96	1,44
	1,6				0,75	1,2	1,92
	1,7				0,79	1,34	2,28
	1,8				0,89	1,60	2,88
	1,87				0,97	1,81	3,39
	$X_i'=1,77$				$Y_i'=0,86$	$(XY)'=1,35$	$(X^2 \cdot Y)'=2,20$
Spaten	1,37	3,35	6,13	11,22	0,8	1,096	1,5
	1,55				1,0	1,55	2,4
	1,6				1,8	2,88	4,61
	1,65				2,7	4,46	7,35
	1,75				4,5	7,88	13,78
	1,9				10	19,0	36,1
	$X_i'=1,83$				$Y_i'=3,58$	$(XY)'=6,27$	$(X^2 \cdot Y)'=11,1$
Tsing- tao	0,68	1,12	1,19	1,26	0,79	0,54	0,36
	0,85				0,80	0,68	0,58
	0,95				0,85	0,81	0,77
	1,0				1,2	1,2	1,2
	1,1				2,1	2,31	2,54
	1,25				12,5	15,36	19,55
	$X_i'=1,06$				$Y_i'=3,17$	$(XY)'=3,59$	$(X^2 \cdot Y)'=4,20$

По данным таблицы 36 была составлена система из трех уравнений, и решена с получением уравнения криволинейной зависимости по формуле (23).

Пиво Löwenbrau:

$$\begin{cases} 6a_0 + 1,35a_1 + 1,82a_2 = 1,46 \\ 1,35a_0 + 1,82a_1 + 2,46a_2 = 14,46 \\ 1,82a_0 + 2,46a_1 + 3,32a_2 = 16,02 \end{cases} \quad \begin{array}{l} \text{корни уравнения: } a_0 = -1,19; a_1 = -9,4; a_2 = 6,9 \\ \text{уравнение зависимости: } y = 6,9x^2 - 9,4x - 1,19 \end{array}$$

Пиво Жигули барное:

$$\begin{cases} 6a_0 + 1,83a_1 + 3,35a_2 = 3,55 \\ 1,83a_0 + 3,35a_1 + 6,13a_2 = 14,64 \\ 3,35a_0 + 6,13a_1 + 11,22a_2 = 71,36 \end{cases} \quad \begin{array}{l} \text{корни уравнения: } a_0 = -0,43; a_1 = 27,4; a_2 = 14,82 \\ \text{уравнение зависимости: } y = 14,8x^2 + 27,4x - 0,43 \end{array}$$

Пиво Britta Moretti:

$$\left\{ \begin{array}{l} 6a_0 + 1,37a_1 + 1,88a_2 = 1,8 \\ 1,37a_0 + 1,88a_1 + 2,57a_2 = 3,06 \\ 1,88a_0 + 2,57a_1 + 3,52a_2 = 5,41 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} \text{корни уравнения: } a_0 = -0,038; a_1 = -7,7; a_2 = 6,8 \\ \\ \text{уравнение зависимости: } y = 6,8x^2 - 7,7x - 0,038 \end{array}$$

Пиво Spaten:

$$\left\{ \begin{array}{l} 6a_0 + 1,83a_1 + 3,35a_2 = 3,58 \\ 1,38a_0 + 3,35a_1 + 6,13a_2 = 6,27 \\ 3,35a_0 + 6,13a_1 + 11,22a_2 = 11,1 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} \text{корни уравнения: } a_0 = -0,192; a_1 = -30,4; a_2 = 17,7 \\ \\ \text{уравнение зависимости: } y = 17,7x^2 - 30,4x - 0,192 \end{array}$$

Пиво Kurshovice Cerne:

$$\left\{ \begin{array}{l} 6a_0 + 1,77a_1 + 3,13a_2 = 0,86 \\ 1,77a_0 + 3,13a_1 + 5,55a_2 = 1,35 \\ 3,13a_0 + 5,55a_1 + 9,82a_2 = 2,20 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} \text{корни уравнения: } a_0 = 0,14; a_1 = -15,6; a_2 = 9 \\ \\ \text{уравнение зависимости: } y = 9x^2 - 15,6x + 0,14 \end{array}$$

Пиво Tsingtao:

$$\left\{ \begin{array}{l} 6a_0 + 1,06a_1 + 1,12a_2 = 3,17 \\ 1,06a_0 + 1,12a_1 + 1,19a_2 = 3,59 \\ 1,12a_0 + 1,19a_1 + 1,26a_2 = 4,20 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} \text{корни уравнения: } a_0 = -0,012; a_1 = -65,6; a_2 = 65 \\ \\ \text{уравнение зависимости: } y = 65x^2 - 65,6x - 0,012 \end{array}$$

По полученным уравнениям была составлена таблица данных 37, для вычисления индекса корреляции i по формуле (24).

Таким образом, исходя из данных таблицы 37, между переменными X и Y существует тесная корреляционная связь, поскольку i ближе к 1, а уравнение изменения мутности пива от увеличения ТБЧ описывается параболической регрессионной линией. Нижеуказанные расчеты подтвердили предположение о связи окисления липид-

ной фракции и изменением содержания веществ в коллоидной системе пива (полифенолов, изогумулона, мутностью, то есть нарушением стабильности белковых молекул).

Представляется интересным выяснить, насколько взаимосвязаны между собой различные показатели пива, представленные в таблицы 38. Для нахождения корреляционной зависимости обсчитывались данные о содержании полифенолов, изогумулона, кислотности и аминного азота во взаимосвязи с изменением тиобарбитурового числа, то есть окислением фитостеринов.

Таблица 38 - Данные о содержании полифенолов, изогумулона, кислотности и аминного азота во взаимосвязи с изменением тиобарбитурового числа

Образец пива	Величины				i
	X_i	Y'_x	$(Y_i - Y'_{xi})^2$	$(Y_i - Y')^2$	
Lowenbrau	0,8	-4,31	23,16	0,92	0,94
	1,0	-3,7	18,31	0,77	
	1,2	20,03	37,52	0,74	
	1,5	-2,59	11,49	0,44	
	1,7	2,73	13,69	0,025	
	1,9	5,85	0,72	12,53	
			$\Sigma=104,89$	$\Sigma=15,43$	
Жигули барное	1,37	-0,84	7,75	27,52	0,94
	1,55	-4,65	6,60	34,58	
	1,6	-3,35	3,08	28,50	
	1,65	-2,01	0,69	23,42	
	1,75	0,75	0,94	13,60	
	1,9	6,05	41,35	16,50	
			$\Sigma= 60,41$	$\Sigma= 144,12$	
Birra Moretti	0,8	-1,85	1,69	5,52	0,87
	1,0	-0,94	1,49	2,31	
	1,2	0,514	1,44	0,0074	
	1,5	3,71	1,0	8,47	
	1,6	5,05	0,64	16,40	
	1,9	9,88	30,25	6,65	
			$\Sigma=36,51$	$\Sigma=39,36$	
Krushovice Cerne	1,17	-5,79	0,084	27,25	0,99
	1,5	-3,01	0,048	5,62	
	1,6	-1,78	0,012	1,06	
	1,7	-0,37	0,049	0,18	

Продолжение таблицы 38

	1,8	1,22	0,0009	0,11	
	1,87	2,44	0,0121	2,16	
			$\Sigma=0,21$	$\Sigma=36,38$	
Spaten	1,37	-0,86	7,76	276,22	0,93
	1,55	-4,79	6,65	33,52	
	1,6	-3,52	3,17	28,30	
Spaten	1,65	-2,16	0,77	23,62	
	1,75	0,814	0,85	13,59	
	1,9	5,95	41,22	16,10	
			$\Sigma=60,39$	$\Sigma=391,65$	
Tsingtao	0,68	-14,56	5,66	189,61	0,64
	0,85	-8,81	5,62	64,16	
	0,95	-3,67	5,38	7,95	
	1,0	-0,61	3,88	0,35	
	1,1	6,48	1,14	19,18	
	1,25	19,55	87,05	49,70	
			$\Sigma=108,73$	$\Sigma=331,05$	

Анализ проводился на примере одного пива, отбирались показатели с линейной зависимостью, что следует из рисунков 62-66, поэтому для образца пива «Spaten» данные таблицы 29 представлялись в следующем виде (Таблица 39).

По формулам 16 и 17 вычислили среднеквадратичное отклонение и парный коэффициент регрессии, данные представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Данные среднеквадратичных отклонений и парный коэффициент регрессии

Величины			
$(S'_i)^2$	S'_i	$R_{x_i x_{i+1}}$	
$(S'_{x1})^2=28699,9$	$S'_{x1}=169,4$	$R_{x1x2}=0,79$	$R_{x2x4}=0,91$
$(S'_{x2})^2=59,8$	$S'_{x2}=7,7$	$R_{x1x3}=0,99$	$R_{x3x4}=0,57$
$(S'_{x3})^2=3,55$	$S'_{x3}=1,9$	$R_{x1x4}=0,99$	-
$(S'_{x4})^2=205,3$	$S'_{x4}=14,3$	$R_{x2x3}=0,50$	-
$(S'_y)^2=0,42$	$S'_y=0,65$	-	-

Таблица 38

Наименование показателя	Факторы	Значение факторов								
		1	2	3	4	5	6	7	Сумма	Среднее
Содержание полифенолов, мг/дм ³	X ₁	535	465	380	220	190	70	10	1870	267,1
Содержание изогумулона, мг/дм ³	X ₂	22,8	20,3	16,9	11,0	9,5	4,8	2,4	87,7	12,5
Кислотность, к.ед.	X ₃	0,75	1,25	2,0	3,25	3,4	4,3	4,75	19,7	2,8
Содержание аминного азота, мг/дм ³	X ₄	229	222	218	205	203	196	190	1463	209
Содержание ТБЧ, мг/дм ³	Y	0,5	0,7	1,0	1,5	1,6	2,0	2,2	9,5	1,36
	X ₁ Y	267,5	325,5	380	330	304	140	22	1769	252,7
	X ₂ Y	11,4	14,2	16,9	16,5	15,2	9,6	5,3	89,1	12,7
	X ₃ Y	0,375	0,875	2,0	4,875	5,44	8,6	10,5	32,6	4,7
	X ₄ Y	114,5	155,4	218,0	307,5	324,8	392,0	418,0	1930,2	275,7
	X ₁ X ₂	12198	9439,5	6422	2420	1805	336	24	32644,5	4663,5
	X ₁ X ₃	401,2	581,3	760,0	715,0	646,0	301,0	47,5	3452,0	493,1
	X ₁ X ₄	122515	103230	82840	45100	38570	13720	1900	407875	58267,9
	X ₂ X ₃	17,1	42,4	33,8	35,8	32,3	20,6	11,4	193,4	27,6
	X ₂ X ₄	5221,2	4506,6	3684,2	2255	1928,5	940,8	456,0	18992,3	2713,2
	X ₃ X ₄	171,8	277,5	436,0	666,3	690,2	842,8	902,5	3987	569,6
	X ₁ ²	286225	216225	144400	48400	36100	4900	100	736350	-
	X ₂ ²	519,8	412,1	285,6	121,0	90,3	23,0	5,8	1457,6	-
	X ₃ ²	0,5625	1,5625	4,0	10,5625	11,56	18,49	22,56	69,3	-
	X ₄ ²	52441	49284	47524	42025	41209	38416	36100	306999	-
	(X ₁ -X' ₁) ²	71770	39164	12746	2218	5944	38848	66100	172199	-
	(X ₂ -X' ₂) ²	106,1	60,8	19,4	2,3	9,0	59,3	102,0	358,8	-
	(X ₃ -X' ₃) ²	4,2	2,4	0,64	0,2	7,8	2,25	3,8	21,3	-
	(X ₄ -X' ₄) ²	400	169	81	16	36	169	361	1232	-
	(Y-Y') ²	0,74	0,44	0,13	0,02	0,06	0,41	0,71	2,51	-

Из таблицы 39 следует, что наибольшим коэффициентом корреляции связаны 1, 3 и 4 факторы, поэтому необходимо один из них исключить из модели множественной линейной корреляции. Для этого необходимо вычислить коэффициенты парной корреляции R_{YX_1} , R_{YX_3} и R_{YX_4} аналогично формуле 17, на основании данных таблицы 38:

$$R_{YX_1} = \frac{(Y \cdot X_1)' - Y' \cdot X_1'}{S_y' \cdot S_{X_1}'}; R_{YX_1} = 0,99,$$

$$R_{YX_3} = \frac{(Y \cdot X_3)' - Y' \cdot X_3'}{S_y' \cdot S_{X_3}'}; R_{YX_3} = 0,69,$$

$$R_{YX_4} = \frac{(Y \cdot X_4)' - Y' \cdot X_4'}{S_y' \cdot S_{X_4}'}; R_{YX_4} = 0,92$$

Следовательно, Y с фактором X_3 связан слабее остальных факторов и его можно исключить из модели. Включение оставшегося X_2 обусловлено его сильной корреляционной связью с Y, коэффициент корреляции рассчитан на основании данных таблицы 38:

$$R_{YX_2} = \frac{(Y \cdot X_2)' - Y' \cdot X_2'}{S_y' \cdot S_{X_2}'}; R_{YX_2} = 0,96$$

С целью нахождения силы линейной зависимости коэффициент корреляции R рассчитывался по преобразованной формуле (1):

$$R = \sqrt{\frac{R_{YX_1}^2 + R_{YX_2}^2 + R_{YX_4}^2 - 2 \cdot R_{X_1X_2} R_{YX_1} R_{YX_2} R_{X_1X_4} R_{YX_4}}{(1 - R_{X_1X_2}^2) \cdot (1 - R_{X_1X_4}^2) \cdot (1 - R_{X_2X_4}^2)}} = 0,98$$

По формуле (2) вычисляем критерий достоверности многофакторной модели,

подставляя $R=0,98$, $n=7$ и получаем $11,01$. Сравнивая это показатель с критерием Стьюдента из таблицы 15 для $k=n-2=7-2=5$ и $P=0,95$ $t_{ст}=2,57$, получаем большую величину, следовательно, с вероятностью 95% можно утверждать, что связь между величиной ТБЧ и содержанием полифенолов, изогумулона и аминокислот существует, и имеет весомое значение.

Для многофакторной модели по уравнению (18) зависимость будет выражена следующим образом: $Y=A_0+A_1X_1+A_2X_2+A_3X_4$.

Для нахождения величин A_0 , A_1 , A_2 и A_3 аналогично криволинейной зависимости составим систему уравнений по формуле:

$$\begin{cases} nA_0+\sum X_1A_1+\sum X_2A_2+\sum X_4A_3=\sum Y \\ \sum X_1A_0+\sum X_1^2A_1+\sum X_1X_2A_2+\sum X_1X_4A_3=\sum X_1Y \\ \sum X_2A_0+\sum X_1X_2A_1+\sum X_2^2A_2+\sum X_2X_4A_3=\sum X_2Y \\ \sum X_4A_0+\sum X_1X_4A_1+\sum X_4^2A_2+\sum X_1X_4A_3=\sum X_4Y, \end{cases}$$

Подставив данные таблицы 38, получим следующие уравнения:

$$\begin{cases} 7A_0+1870A_1+87,7A_2+1463A_3=9,5 \\ 1870A_0+736350A_1+32644,5A_2+407875A_3=1769 \\ 87,7A_0+32644,5A_1+1457,5A_2+18992,3A_3=89,1 \\ 1463A_0+407875A_1+306999A_2+407875A_3=1930,2, \end{cases}$$

Решив систему уравнений методом Крамера, получаем величины:

$A_0=3,5$, $A_1=-0,003$, $A_2=0,002$ и $A_3=-0,0067$, подставляем в уравнение для многофакторной модели и получаем:

$$Y=3,5-0,003X_1+0,002X_2-0,0067X_4,$$

где X_1 – содержание полифенолов, мг/дм³;

X_2 – содержание изогумулона, мг/дм³;

X_4 – содержание аминного азота, мг/дм³.

Для оценки адекватности полученного уравнения регрессии вычислим среднюю ошибку аппроксимации ε по формуле (25):

$$\varepsilon = \frac{1}{p} \sum \frac{|Y - Y'_{1,2,4}|}{Y} \cdot 100\% \quad (25)$$

где p - число факторов в модели.

Для вычисления формулы (25) построим таблицу 40 на основе данных таблицы 38.

Таблица 40 – Данные среднеквадратичных отклонений и парный коэффициент регрессии

Y	$Y'_{1,2,4}$	$ Y - Y'_{1,2,4} $	$\frac{ Y - Y'_{1,2,4} }{Y}$
0,5	0,41	0,09	0,18
0,7	0,66	0,04	0,06
1,0	0,93	0,07	0,07
1,5	1,48	0,02	0,01
1,6	1,58	0,02	0,01
2,0	1,98	0,02	0,01
2,2	2,17	0,03	0,014
			$\Sigma=0,354$

По формуле (19) находим:

$$\varepsilon = \frac{1}{3} \cdot 0,354 \cdot 100 = 11,8\%$$

Отсюда следует, что среднеквадратичная ошибка небольшая, что подтверждает тот факт, что построенная модель адекватно описывает опытные данные.

Таким образом, в результате корреляционного анализа была доказана связь окисления липидной фракции, то есть изменения содержания фитостеринов, с изменением содержания веществ в коллоидной системе пива. Многофакторный анализ выявил корреляционную взаимосвязь между изменением тиобарбитурового числа и таких показателей как содержание полифенолов, изогумулона и аминного азота, то есть показал зависимость изменения фитостеринов от перечисленных показателей, и подтвердил то, что фитостерины действительно вносят вклад в нарушение стабильности коллоидной системы пива при окислении.

4.2 Разработка метода прогнозирования стойкости пива на основе определения количества фитостеринов в пиве

В настоящее время ведущие мировые компании по производству пива стараются учитывать риски при реализации пива, которые связаны с условиями транспортировки и реализации готовой продукции. Это позволяет закладывать производителям материальные средства и минимизировать свои потери.

Рисками при реализации пива могут быть физические (температура, влажность, давление), химические (белковые, силикатные, полифенольные виды помутнения), микробиологические факторы (развитие патогенной микрофлоры), а также механические, связанные с порчей транспортной и потребительской тары (нарушение целостности, бой).

К химическим факторам относится также окисление липидной фракции, приводящее к возникновению пороков вкуса пива, возникающих при хранении.

В отечественной отрасли в готовом пиве контролируют основные показатели качества пива – сухие вещества, спирт, кислотность, содержание CO₂, микробиологические показатели, которые входят в ГОСТ 31711-2012 «Пиво. Общие технические

условия». Но их недостаточно и они не информативны, поскольку могут только косвенно характеризовать состояние готового пива, и не позволяют прогнозировать процесс старения пива.

На основании полученных нами данных, представленных в таблицу 34, был разработан порядок анализа готового пива в рамках методики прогнозирования стойкости на основе определения количества фитостеринов в пиве.

В качестве маркера стойкости пива на первом этапе предварительно проводится анализ ТБЧ в исходном пиве по ГОСТ Р 55810-2013.

Причем его содержание в исходном пиве не должно превышать 0,7-1,2 мг/дм³ – это касается как светлого, так и темного пива. Увеличение данного значения до 2,0 мг/дм³ и выше влечет за собой расширенный анализ, поскольку есть риск возникновения окислительных процессов, что говорит о снижении качества пива.

На втором этапе рекомендуется контролировать содержание фитостеринов по разработанному методу (см. Приложение А), влияющих на образование веществ-прекурсоров, ответственных за ухудшение органолептических показателей и появление пороков вкуса пива. Данный показатель позволяет оценить возникающие риски при реализации готовой продукции.

Содержание кампестерина в темном пиве должно быть на уровне 28-30 мкг/дм³ и более, в светлом пиве этот показатель должен быть не менее 15 мкг/дм³. По содержанию стигмастерина темное пиво должно иметь этот показатель на уровне 20-25 мкг/дм³ и более, а светлое пиво – не менее 9,5 мкг/дм³.

Снижение содержания фитостеринов до уровня 2 мкг/дм³ и ниже или их обнаружение говорит о том, что в пиве произошли необратимые изменения, влекущие за собой появление вкусовых пороков (Рисунков 62-66, Таблица 29).

Показатель содержания фитостеринов пива важно контролировать в течение хранения с целью повышения качества реализуемой продукции.

Проведенные исследования говорят также о перспективности определения содержания фитостеринов как веществ, переходящих в пиво из зернового сырья и хмеля,

по которым можно идентифицировать пиво на соответствие требованиям ГОСТ 31711-2012 в части применяемого сырья при производстве пива (Таблица 30).

По предварительным исследованиям, содержание кампестерина на уровне 15-20 мкг/дм³ и более и стигмастерина на уровне 9 мкг/дм³ и более говорит о том, что пиво произведено из солодового сырья. Снижение содержания данных фитостеринов до 6-8 мкг/дм³ говорит о применении несоложенного сырья в технологии пива. Но для более точного анализа необходимо набрать больший объем статистики.

4.3 Расчет экономической эффективности от внедрения метода определения фитостеринов на производстве

Фитостерины – вещества липидной природы, ответственные за образование прекурсоров карбониллов старения пива, образование которых приводит к ухудшению органолептических показателей пива. Данный факт является основанием для возврата партии товара от закупщика производителю на основании брака.

С целью минимизации материальных затрат на неуплату неустойки, возврат партии товара и экономии потерь на производстве вследствие переработки партии бракованного напитка, необходимо ввести в заводской лаборатории порядок определения содержания фитостеринов в каждой изготавливаемой партии товара в готовой продукции. Экономический расчет производился для пивоваренного предприятия с объемом выпуска продукции 1 млн в год. Принимаем в расчет стоимость газового хроматографа 2,5 млн рублей, расходных материалов – 50 тыс. рублей, частоту закупки расходных материалов – 6 месяцев, то есть 2 раза в год – общая стоимость расходных материалов – 100 тыс в год. Затраты на поверку и содержание хроматографа – 40 тыс.руб. в год или 3,34 тыс. руб. в месяц.

Как показывают данные таблицы 41, стоимость проданного товара компании с учетом расхода на определение фитостеринов в месяц больше на 330 млн руб. в случае

крупной пивоваренной компании и 20,8 млн руб. в случае минипивоваренной компании больше стоимости товара с учетом возврата бракованного пива. Также в таблице 41 приведены убытки компании при возврате продукции в месяц, тыс. руб, в основном вследствие нарушения коллоидной стойкости пива (брак потребительской тары не брался в расчет), что имеет отношение, как показали физико-химические и математические исследования, к влиянию фитостеринов на органолептическую нестабильность пива.

Таблица 41 – Экономический расчет для пивоваренного предприятия

Показатель	Значение
Объем выпускаемой продукции в год, тыс. дал	1 000
Объем выпускаемой продукции в месяц, тыс. дал	83
Объем выпускаемой продукции за месяц в бутылках объемом 0,5 л, млн бутылок	1,66
Средняя стоимость* бутылки пива, руб.	100
Стоимость продажи бутылочного пива заказчику в месяц, млн руб.	166
Расход от покупки газового хроматографа в месяц, тыс. руб.	208,3
Расход от покупки расходных материалов для определения содержания фитостеринов в месяц, тыс. руб	8,3
Расход от поверки и содержания хроматографа в месяц, тыс. руб	3,34
Расход общий на проведение анализа содержания фитостеринов в месяц, тыс. рублей	219,94
Убытки компании при возврате продукции в месяц, тыс. руб.**	550
Итого стоимость проданного товара, млн руб.	$166 - 0,55 = 165,45$
Стоимость проданного товара компании с учетом расхода на определение содержания фитостеринов, млн руб., в месяц	$166 - 0,22 = 165,8$

* - средняя стоимость рассчитывалась как среднее стоимости бутылки пива отечественного производства – 50 руб., и импортного - 150 руб. за бутылку

** - по данным Союза российских производителей пивобезалкогольной продукции

Экономический эффект в месяц составил, млн руб. в год:

$$(165,8 - 165,45) \cdot 12 = 4,2 \text{ млн руб. в год}$$

Таким образом, расчет показал экономическую целесообразность применения метода определения содержания фитостеринов как для крупных пивоваренных предприятий, так и для компаний малого бизнеса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным результатом работы является разработка метода прогнозирования стойкости готового пива на основе исследования влияния вклада фитостеринов на качество этого напитка брожения при окислительных процессах в течение хранения до реализации в торговой сети, а также по составу фитостеринов выявлена возможность определения соответствия применяемого сырья заявленному на этикетке пива.

При разработке метода определения фитостеринов в пиве получены следующие основные результаты:

1. Разработан метод выделения фитостеринов из пивоваренного солода и хмеля, метод ВЭЖХ с градиентной подачей ацетонитрила в качестве жидкой фазы и масс-детектированием позволил достоверно определить в сырье β -ситостерина, стигмостерина и кампестерина.
2. Разработан метод выделения фитостеринов из пива с применением растворителя дихлорметана в сочетании с кислотным гидролизом соляной кислотой и их дальнейшего количественного определения методом ГХ.
3. Установлено, что в пиве основными фитостеринами являются кампестерин и стигмостерин, причем их содержание зависит от применяемого в технологии пива сырья: применение 100% солода при затирании обеспечивает уровень фитостеринов около 30 мкг/дм³, включение несоложенного сырья приводит к снижению уровня фитостеринов до 7 мкг/дм³. Обоснована возможность применения фитостеринов с целью идентификации и сопоставления указанного на этикетке производителем состава сырья готовой продукции фактическому.
4. Разработан метод прогнозирования стойкости пива, на основе определения степени окисления фитостеринов в период хранения и реализации напитка.
5. Изучено влияние скорости протекания процессов старения пива на физико-химические и органолептические показатели пива, в зависимости от применяемого сырья и

выявлено влияние фитостеринов на процесс старения пива, вклад фитостеринов в органолептическую стабильность пива.

6. Установлена зависимость скорости протекания процессов старения пива от применяемого сырья с помощью математического анализа данных: наличие несоложенного сырья в засыпи при затирании приводит к ускорению окисления основных соединений, отвечающих за стабильность вкуса и сохранения коллоидной системы в равновесии. Впервые показана линейная зависимость изменения содержания полифенолов, кислотности, изогумулона и параболическая зависимость изменения мутности от изменения ТБЧ. Сильную корреляционную связь выявил проведенный корреляционно-регрессионный анализ, что показывает влияние липидной фракции фитостеринов на процессы старения пива.

7. Экономическая эффективность от определения фитостеринов на производстве и прогнозирования их влияния на стабильность пива для крупного пивоваренного производства с годовым выпуском продукции 1 млн дал составит 4,2 млн руб. в год.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- SE – фитостерины, объединенные с жирными кислотами;
- SG – фитостерины в форме соединений с гликозидами;
- CC – свободные стеринны;
- ВНБ – водонасыщенный п-бутанол;
- БЭС – Бюро эталонов Европейского сообщества;
- ТФЭ – твердофазная экстракция;
- ЭУ – электронный удар;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
- ТМС – триметилсилиловые эфиры;
- МСГФБА – N-метил-п-триметилсилильный гептафторбутырамид;
- НФ-ВЭЖХ – нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
- МС – масс-спектрометрия;
- БЦ – боковая цепь;
- ИДСР – испарительный детектор светорассеивания;
- SPHE – фитостерины в форме сложных эфиров с фенольными кислотами;
- ASG – фитостерины в форме соединений с ацилированными гликозидами;
- SFE – фитостерины в форме сложных эфиров с ферулатами;
- СФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция;
- ТСХ – тонкослойная хроматография;
- ГХ – газовая хроматография;
- ПВД – пламенно-ионизационная детекция;
- ОДС – октадецил-силоновая колонка;
- БСТФБА – N,O-Бис (триметилсилиловый) трифторацетамид;
- ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
- СЖХ – сверхкритическая жидкостная хроматография;
- ХИАД – химическая ионизация при атомном давлении

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баташов, Б. Э. Влияние режима затирания солода на содержание транс-2-ноненаля в пиве / Б. Э. Баташов, А. Т. Дедегкаев, Д. В. Афонин // Пищевая промышленность - 2006. - № 4. – 56с.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. // – учебник – 3-е издание. – М. : Медицина, 1998. – 704 с.
3. Беспалов, В. Г. Питание и рак. Диетическая профилактика онкологических заболеваний / В. Г. Беспалов // – М. : 2008. – 210 с.
4. Борисенко, В. А. Разработка технологии пива с повышенной коллоидной стойкостью и вкусовой стабильностью / В. А. Борисенко : автореф. дисс. ... канд. техн. наук, Кемерово. – 2006. – 26 с.
5. Гмурман, В. Е. Теория вероятностей и математическая статистика / В. Е. Гмурман. Учебное пособие для ВУЗов. - М. : Изд-во «Высшая школа», 1997. – 368 с.
6. Джафаров, М. Х. Стероиды. Строение, получение, свойства и биологическое значение, применение в медицине и ветеринарии / М. Х. Джафаров, С. Ю. Зайцев, В. И. Максимов // – СПб. : «Лань», 2010. – 288 с.
7. Ермолаева, Г. А. Технология и оборудование производства пива и безалкогольных напитков / Г. А. Ермолаева, Р. А. Колчева // – М., «Академия», 2000. – 416 с.
8. Каленичина, Е. В. Эстрогеноподобные вещества CO₂-экстракта хмеля / Е. В. Каленичина, Т. В. Пелипенко // Конференция молодых ученых Кубанского государственного технологического университета : тезисы доклада - Краснодар, 2014. – 768с.
9. Кунце, В. Технология солода и пива /Л. Кунце. - СПб. : Изд-во «Профессия», 2001 – 367с.

10. Меледина, Т. В. Сырье и вспомогательные материалы в пивоварении / Т. В. Меледина. – СПб. : Изд-во «Профессия», 2003. – 304 с.
11. Меледина, Т. В. Физиологическое состояние дрожжей / Т. В. Меледина, С. Г. Давыденко, Л. М. Васильева // Учеб. пособие. – СПб. : НИУ ИТМО, ИХиБТ, 2013. – 48 с.
12. Меледина, Т. В. Качество пива. Стабильность вкуса и аромата. Коллоидная стойкость. Дегустация / Т. В. Меледина, А. Т. Дедегкаев, Д. В. Афонин. – СПб. : Изд-во «Профессия» - 2011. – 220 с.
13. Мехтиев, А. Р. Биологическая активность фитостеринов и их производных / А. Р. Мехтиев, А. Ю. Мишарин // Биомедицинская химия. – 2007. – т. 53. - вып. 5. – 123с.
14. Нарцисс, Л. Краткий курс пивоварения / Л. Нарцисс. – СПб. : Изд-во «Профессия», 2007. – 580 с.
15. Нарцисс, Л. Пивоварение. Технология приготовления суслу / Л. Нарцисс. – М. : НПО «Элевар», 1992. - т. 2. – 308 с.
16. Покровская, Н. В. Биологическая и коллоидная стойкость пива / Н. В. Покровская, Я. Д. Каданер. – М. : Изд-во «Пищевая промышленность», 1978. – 272 с.
17. Рапота М.О. Выделение общих липидов из сырья для производства пива и разработка методики определения в них фитостеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)/ Рапота М.О., Тырсин Ю.А.// Инновации и инвестиции—2014.—№5.— 97с.
18. Рапота, М. О. Влияние фитостеринов на сенсорную стабильность пива / М. О. Рапота, Ю. А. Тырсин // Перспективы науки. - 2015. - № 5. – 140с.
19. Рапота, М. О. Влияние фитостеринов на сенсорную стабильность пива / М. О. Рапота, М. Н. Елисеев // Успехи современной науки и образования. - 2016. - № 8. – 185с.
20. Третьяк, Л. Н. Технология производства пива с заданными свойствами /

- Л. Н. Третьяк. – СПб. : Изд-во «Профессия», 2012. – 463 с.
21. Ферстер, Э. Методы корреляционного и регрессионного анализа / Э. Ферстер, Б. Ренц. – М. : Изд-во «Статистика», 1987. – 405 с.
 22. Шютц, М. Возможность аналитических методов контроля для оптимизации технологического процесса / М. Шютц, К. Хартманн, М. Херманн // Мир пива – 2007. - № 1.- 42с.
 23. Харрис, М. О. Вопросы идентификации зернового состава пива / М. О. Харрис, М. Н. Елисеев // Пиво и напитки. 2018. - № 2. – 40с.
 24. Хашимото, Н. Пути образования летучих альдегидов во время хранения бутылочного пива / Н. Хашимото // Научно-исследовательский отчет лаборатории фирмы Kirin Brew. – 1975. - №18. – 92с.
 25. Abidi, S. L. Effect of genetic modification on the distribution of minor constituents in canola oil / S. L. Abidi, G. R. List, K. A.Rennick // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1999 - V. 76. –128s.
 26. Agren, J. J. Divergent changes in serum sterols during a strict uncooked vegan diet in patients with rheumatoid arthritis / J. J. Agren, E. Tvrzicka, M. T. Nenonen, T. Helve // B. J. Nutr. – 2001. - V. 85. – 112s.
 27. Akihisa, T. Sterol composition of seeds and mature plants of family Cucurbitaceae / T. Akihisa, P. Ghosh, S. Thakur, F. U. Rosenstein, T. Matsumoto // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1986. - V. 63. – 104s.
 28. Akihisa, T. Sterols of the Cucurbitaceae / T. Akihisa, N. Shimizu, P. Ghosh P., S. Thakur // Phytochemistry – 1987. - V. 26. – 274s.
 29. Albi, T. Microwave and conventional heating effects on some physical and chemical parameters of edible fat / T. Albi, A. Lanzorn, A. Guinda , M.C. Perrez-Camino // J. Agric. Food Chem. – 1997 - V. 45. – 541s.
 30. Alonso, L. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of

- sterol fraction by gas chromatography / L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M. Juarez // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1997. - V. 74. – 105s.
31. Amelio, M. Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques / M. Amelio, R. Rizzo, F. Varazini // *J. Chromatogr.* – 1992. – V. 606. – 210s.
32. Awad, A. B. Peanuts as source of h-sitosterol, a-sterol with anticancer properties / A. B. Awad, K. C. Chan, A. C. Downie, C. S. Fink // *Nutr. Cancer* – 2000. - V. 36. – 112s.
33. Bartley, I. M. Changes in sterol and phospholipid composition of apples during storage at low temperature and low oxygen concentration / I. M. Barley // *J. Sci. Food Agric.* – 1986. - V. 37. – 96s.
34. Bello, A. C. Rapid isolation of the sterol fraction in edible oils using a silica cartridge / A. C. Bello // *JAOAC Int.* – 1992. - V. 75. – 134s.
35. Bamforth, C. M. *Brewing. New technologies* / C. M. Bamforth. - Cambridge, England : Woodhead Publishing Limited, 2006. – 500s.
36. Bryngelsson, S. Plant sterols in cereal products in Sweden / S. Bryngelsson: diploma thesis in food chemistry, Department of Food Science, Chalmers University of Technology. – Chalmers, 1997. – 35 s.
37. Cadenas, E. *Handbook of antioxidants* / E. Cadenas, L. Paker. - New York : Marcel Dekker Inc., 1996. – 704s.
38. Cert, A. Formation of stigmasta-3,5-diene in vegetable oils/ A. Cert, A. Lanzorn, A. A. Carelli // *Food Chem.* – 1994. - V. 49 – 113s.
39. Chryssafidis, D. Composition of total and esterified 4a-monomethylsterols and triterpene alcohols in virgin olive oil / D. Chryssafidis, P. Maggos, V. Kiosseoglou // *J. Sci. Food Agric.* – 1992. - V. 58 – 45s.
40. Chung, O. K. *Cereal lipids* / O. K. Chung, J-B. Ohm // *Handbook of Cereal Science*

- and Technology - New York : Marcel Dekker, 2000. – 808s.
41. Cole, G. New sunflower and soybean cultivars for novel vegetable oil types / G. Cole, S. Coughlan, N. Frey, J. Hazebroek J. // *Fett/Lipid* – 1998. - V. 100. – 85s.
 42. Conforti, F. D. High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector / F. D. Conforti, C. H. Harris, J. T. Rinehart // *J. Chromatogr.* – 1993. - V. 645. – 200s.
 43. Department, U. S. of Agriculture. USDA Nutrient Data Base, Release 13. Washington, DC, 2000. – 65 s.
 44. Drumm, T. D. Variability in the major lipid components of four market classes of dry edible beans / T. D. Drumm, J. I. Gray, G. L. Hosfield // *J. Sci Food Agric.* – 1990. - V. 50 – 37s.
 45. Dunford, N. T. Phytosterol enrichment of rice bran oil by a supercritical carbon dioxide fractionation technique / N. T. Dunford, J. W. King // *J. Food Sci.* – 2000. - V. 65 – 138s.
 46. Dutta, P. C. Saturated sterols (stanols) in unhydrogenated and hydrogenated edible vegetable oils and in cereal lipids / P. C. Dutta, L. - A. Appelqvist // *J. Sci. Food Agric.* – 1996. - V. 71 – 122s.
 47. Dutta, P. C. Formation and content of phytosterol oxidation products in foods / P. C. Dutta, G. P. Savage // *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects.* - Champaign, IL : AOAC Press, 2002. - 450s.
 48. Ellegard, L. Will recommended changes in fat and fibre intake affect cholesterol absorption and sterol excretion? An ileostomy study / L. Ellegard, I. Bosaeus, H. Andersson // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2000. - V. 54 – 210s.
 49. Evershed, R. P., Spooner N., Prescott M. C., Goad L. J. Isolation and characterization of intact steryl ferulates from seeds // *J. Chromatogr.*, 1988. - V. 440. – 536s.

50. Farrington, W. H. H. Changes in the carotenoids and sterol fractions during the prolonged storage of wheat flour / W. H. H. Farrington, M. J. Warwick, G. Shearer // *J. Sci. Food Agric.* – 1981. - V. 32. – 101s.
51. Ferrari, R. A. Alteration of steryl ester content and positional distribution of fatty acids in triacylglycerols by chemical and enzymatic interesterification of plant oils / R. A. Ferrari, W. Esteves, K. D. Mukherjee // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 1997. - V. 74 – 106s.
52. Ferrari, R.A.P. Minor constituents of vegetable oils during industrial processing / R.A.P. Ferrari, E. Schulte, W. Esteves, L. Bruehl // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 1996. - V.73 – 56s.
53. Fur, Y. Le Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening / Y. Le Fur, C. Hory, M.-H. Bard, A. Olsson // *Vitis.* – 1994. - V. 33. – 68s.
54. Garg, V. K. Occurrence of D5-sterols in plants producing predominantly D7-sterols: studies on the sterol compositions of six Cucurbitaceae seeds / V. K. Garg, W. R. Nes // *Phytochemistry* – 1986. - V. 25. – 270s.
55. Ghavami, M. Effect of heating at deep-fat frying temperature on the sterol content of soya bean oil / M. Ghavami, I. D. Morton // *J. Sci. Food Agric.* - 1984. - V. 35 – 119s.
56. Gopala, Krishna A. G. Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil / A. G. Krishna Gopala, S. Khatoon, P. M. Shiela // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2001. - V. 78 – 111s.
57. Gordon, M. H. A comparison of the steryl esters of coconut and palm kernel oils / M. H. Gordon, R.E. Griffith // *Fat Sci. Technol.* - 1992. - V. 94 – 153s.
58. Grob, K. Determination of raffination of edible oils and fats by olefinic degradation products of sterols and squalene, using coupled LC-GC/ K. Grob, A. Artho, C. Mariani // *Fat Sci. Technol.* – 1992. - V. 94 – 175s.

59. Hakala, P. Steryl phenolic acid esters in cereals and their milling fractions / P. Hakala, A.-M. Lampi, V. Ollilainen, U. Werner // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. - V. 50 – 147s.
60. Homberg, E. Sterinzusammensetzung und Steringehalt in 41 verschiedenen pflanzlichen und tierischen Fetten / E. Homberg, B. Bielefeld // *Fat Sci. Technol.* - 1989. - V. 91 – 110s.
61. Howell, T. J. Phytosterols partially explain differences in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding / T. J. Howell, D. E. MacDougall, P. J. H. Jones // *J. Lipid Res.* – 1998. - V. 39 – 239s.
62. Indyk H. E. Simultaneous liquid chromatographic determination of cholesterol, phytosterols and tocopherols in foods / H. E. Indyk // *Analyst* – 1990. - V.115 – 118s.
63. Izzo, R. Lipid evolution during development and ripening of peach fruits / R. Izzo, A. Scartazza, A.Masia // *Phytochemistry* - 1995. - V.39 – 237s.
64. Jawad, I. M. The physical refining of edible oils. 2. Effect on unsaponifiable components / I. M. Jawad, S. P. Kochhar, B. J. F.Hudson // *Lebensm. Wiss Technol.* - 1984. - V.17 – 88s.
65. Jilian, A. Assessment of genetically diverse international barley germplasm for development of food product applications / A.Jilian // *Thesis of Southern Cross University* - Lismore, 2011 – 212s.
66. Johansson-Kornfeld, A. Sterols in vegetable oils: aspects of biological variation, influence of technological treatment, and the use of sterols to identify vegetable oils / A. Johansson-Kornfeld // *Doctoral thesis* - Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, 1979. – 45 s.
67. Jonker, D. Combined determination of free, esterified and glycosylated plant sterols in foods / D. Jonker, G. D. Van der Hoek, J. F. C. Glatz, C. Homan // *Nutr. Rep. Int.* – 1985. - V. 32 – 183s.
68. Kamal-Eldin, A. Variations in the composition of sterols, tocopherols and lignans in

- seed oils from four *Sesamum* species / A. Kamal-Eldin, L-A. Appelqvist // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1994. - V. 71 – 72s.
69. Kesselmeier, J. High performance liquid chromatography of molecular species from free sterols and sterylglucosides isolated from oat leaves and seeds / J.Kesselmeier, W.Eichenberger, B. Urban // *Plant Cell Physiol.* - 1985. - V. 26 - 217s.
70. King, J. W. Phytosterol-enriched triglyceride fractions from vegetable oil deodorizer distillates utilizing supercritical fluid fractionation technology / J. W. King, N. T. Dunford // *Sep. Sci. Technol.* - 2002.- V. 37 – 250s.
71. Kim, J. -S. Inhibition of cholesterol autoxidation by the nonsaponifiable fraction in rice bran in an aqueous model system / J. -S. Kim, J. S. Godber, J. M. King, W. Prinyawiwatkul // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 2001. - V. 78. – 98s.
72. Kochhar, S. P. Influence of processing on sterols of edible vegetable oils / S. P. Kochhar // *Prog. Lipid Res.* - 1983. - V. 22. – 72s.
73. Koponen, J. Plant sterols in Finnish blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idea* L.) seed oils / J. Koponen, H. Kallio, R. Tahvonen // *Biologically-Active Phytochemicals in Food.* - Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2001. – 237s.
74. Koski, A. Occurrence and Levels of Phytosterols in Foods 29 Antioxidant properties of phenolic acids esterified with h-sitosterol / A. Koski, W. Wahala, A. Hopia, V. Piironen V // *XXth International Conference on Polyphenols, Freising-Weihenstephan.* - Munchen, Germany, Technische Universitat , 2000. - 175s.
75. Kuroda, N. Sterol lipids in rice bran / N. Kuroda, M. Ohnishi, Y. Fujino // *Cereal Chem.* - 1977. - V. 54 – 137s.
76. Lampi, A. -M. Determination of thermooxidation products of plant sterols / A. M. Lampi, L. Juntunen, J. Toivo, V. Piironen // *J. Chromatogr.* – 2002. - V. 777. – 314s.
77. Lampi, A. M. By-products of food industry: possible sources of plant sterols. Stability

- of plant sterols in foods and model systems. Bioactive compounds in plant foods / A. M. Lampi, R. Puupponen-Pimia, J. Toivo, V. Piironen // COST Action 916 : bioactive compounds in plant foods, Tenerife, Canary Island, 2001. – 234s.
78. Lampi, A. M. Stability of plant sterols and formation of oxidation products in oils during heating / A. M. Lampi, J. Toivo, R. L. Hovi, V. Piironen // Czech. J. Food Sci. - 2000. - V. 18. – 46s.
79. Lozano, Y. F. Unsaponifiable matter, total sterol and tocopherol contents of avocado oil varieties / Y. F. Lozano, C. D. Mayer, C. Bannon, E. M. Gaydou // J. Am. Oil Chem. Soc. - 1993. - V. 70. – 114s.
80. Maatta, K. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden / K. Maatta, A.-M. Lampi, J. Petterson, D. M. Fogelfors // J. Sci. Food Agric. – 1999. - V. 79. – 81s.
81. Mandl, A. Detection of adulteration of pumpkin seed oil by analysis of content and composition of specific D7-phytosterols / A. Mandl, G. Reich, W. Lindner // Eur. Food Res. Technol. – 1999. - V. 209 – 65s.
82. McDonald, R. E. Heat treatment of mature-green tomatoes. Occurrence and Levels of Phytosterols in Foods: differential effects of ethylene and partial ripening / R. E. McDonald, T. G. McCollum, E. A. Baldwin // J. Am. Soc. Hort. Sci. - 1998. - V. 123. – 132s.
83. McDonald, R. E. Prestorage heat treatments influence free sterols and flavor volatiles of tomatoes stored at chilling temperature / R. E. McDonald, T. G. McCollum, E. A. Baldwin // J. Am. Soc. Hort. Sci. - 1996. - V. 121. – 242s.
84. Moreau, R. A. Effect of pretreatment on the yield and composition of oil extracted from corn fiber / R. A. Moreau, K. B. Hicks, M. J. Powell // J. Agric. Food Chem. – 1999. - V. 47. – 480s.
85. Moreau, R. A. Extraction and quantitative analysis of oil from commercial corn fiber / R. A. Moreau, M. J. Powell, K. B. Hicks // J. Agric. Food Chem. – 1996. - V. 44 –

- 493s.
86. Moreau, R. A. A comparison of the levels of ferulate phytosterol esters in corn and other seeds / R. A. Moreau, M. J. Powell, K. B. Hicks, R. A. Norton // *Adv. Plant Lipid Res.* – 1998. - V.5. – 370s.
 87. Moreau, R. A. Comparison of yield and composition of oil extracted from corn fiber and corn bran / R. A. Moreau, V. Singh, S. R. Eckhoff, M. J. Powell // *Cereal Chem.* – 1999. - V. 76. – 139s.
 88. Moreau, R. A. Comparison of oil and phytosterol levels in germplasm accessions of corn, teosinte, and Job's tears / R. A. Moreau, V. Singh, K. B. Hicks // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. - V. 49. – 543s.
 89. Moreau, R. A. Phytosterols in the aleurone layer of corn kernels / R. A. Moreau, V. Singh, A. Nun˜ez, K. B. Hicks // *Biochem. Soc. Trans.* - 2000. - V. 28 – 247s.
 90. Moreau, R. A. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses / R. A. Moreau, B. D. Whitaker, K. B. Hicks // *Progr. Lipid Res.* - 2002. - V. 41. – 87s.
 91. Morton, G. M. Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet / G. M. Morton, S. M. Lee, D. H. Buss, P. Lawrance // *J. Hum. Nutr. Dietet* – 1995. - V. 8 – 79s.
 92. Mounts, T. L. Effect of genetic modification on the content and composition of bioactive constituents in soybean oil / T. L. Mounts, S. L. Abidi, K. A. Rennick // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1996. - V. 73. – 138s.
 93. Nair, P. P. Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, h-sitosterol, and stigmasterol / P. P. Nair, N. Turjman, G. Kessie, B. Calkins // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1984. - V. 40. – 304s.
 94. Normern, A. L. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer / A. L. Normern, H. A. M. Brants, L. E. Voorrips // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. - V. 74.- 486s.

95. Normern, L. Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden / L. Normern, M. Johnsson, H. Andersson, Y. van Gameren // *Eur. J. Nutr.* - 1999. - V. 38 – 115s.
96. Norton, R. A. Isolation and identification of steryl cinnamic acid derivatives from corn bran / R.A. Norton // *Cereal Chem.* - 1994. - V.71 – 145s.
97. Norton, R. A. Quantitation of steryl ferulate and p-coumarate esters from corn and rice / R. A. Norton // *Lipids.* - 1995. - V. 30 – 501s.
98. Oehrl, L. L. Oxidation of phytosterols in a test food system / L. L. Oehrl, A. P.Hansen, C. A. Rohrer, G. P. Fenner, L. C. Boyd // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 2001. - V. 78 – 90s.
99. Ohnishi, M. Composition and molecular species of waxy lipids in wheat grain / M. Ohnishi, S. Obata, S. Ito, Y. Fujino // *Cereal Chem.* - 1986. - V. 63. – 132s.
100. Ostlund, R. E. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans / R. E. Ostlund, S. B. Racette, A. Okeke, W. F. Stenson // *Am. J. Clin. Nutr.* - 2002. - V. 75 – 182s.
101. Palmer, M. A. The pentacyclic triterpene esters and the free, esterified and glycosylated sterols of *Sorghum vulgare* grain / M. A. Palmer, B. N. Bowden // *Phytochem.* - 1975. - V. 14 – 215s.
102. Pennington, J. A. T. Food composition databases for bioactive food components / J. A. T. Pennington // *J. Food Comp. Anal.* - 2002. - V. 15 – 187s.
103. Picchioni, G. A. Phospholipid, galactolipid, and steryl lipid composition of apple fruit cortical tissue following postharvest CaCl_2 infiltration / G. A. Picchioni, A. E.Watada, W. S.Conway, B. D. Whitaker // *Phytochemistry* - 1995. - V. 39 – 220s.
104. Picchioni, G. A. Calcium delays senescence- related membrane lipid changes and increases net synthesis of membrane lipid components in shredded carrots / G. A. Picchioni, A. E. Watada, B. D. Whitaker, A. Reyes // *Postharvest Biol. Technol.* - 1996. - V. 9 – 132s.

105. Piironen, V. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition / V. Piironen, D. Lindsay, T. A. Miettinen, J. Toivo // *J. Sci. Food Agric.* - 2000. - V. 80 – 345s.
106. Piironen, V. Stability of plant sterols in foods and model systems. Bioactive compounds in plant foods / V. Piironen, R. Puupponen-Pimia, J. Toivo, A.-M. Lampi // *COST Action : Bioactive compounds in plant foods*, Tenerife, Canary Island, 2001 - 2002. – 234s.
107. Piironen, V. Natural sources of dietary plant sterols / V. Piironen, J. Toivo, A.-M. Lampi // *J. Food Comp. Anal.* - 2000. - V. 13 – 279s.
108. Piironen, V. Plant sterols in cereals and cereal products / V. Piironen, J. Toivo, A. M. Lampi // *Cereal Chem.* - 2002. - V. 79, – 166s.
109. Piironen, V. Plant sterols in vegetables, fruits and berries / V. Piironen, J. Toivo, R. Puupponen-Pimia, A.-M. Lampi // *J. Sci. Food Agric.* – 2003. - V. 83 – 118s.
110. Pillow, P. C., Duphorne C. M., Chang S, Contois J. H., Strom S. S., Spitz M. R., SD Hursting M. R. Development of a database for assessing dietary phytoestrogen intake / P. C. Pillow, C. M. Duphorne, S. Chang, J. H. Contois // *Nutr. Cancer* – 1999. – V. 33 – 116s.
111. Phillips, K. M. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats / K. M. Phillips, D. M. Ruggio, J. I. Toivo, M. A. Swank, A. H. Simpkins // *J. Food Comp. Anal.* – 2002. - V. 15 – 92s.
112. Phillips, K. M. Phytosterol content of experimental diets differing in fatty acid composition / K. M. Phillips, M. T. Tarragor -Tani, K. K. Stewart // *Food Chem.* – 1999. - V. 64 – 159s.
113. Prior, E. M. Effect of heat treatments on canola press oils. 1. Non-triglyceride components / E. M. Prior, V. S. Vadke, F. W. Sosulski // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 1991. - V. 68 – 48s.
114. Puupponen-Pimia, R. Blanching and longterm freezing affect differently on various

- bioactive compounds of vegetables / R. Puupponen-Pimia, S. Salonvaara, M. Aarni, A. M. Nuutila // *J. Sci. Food Agric.* - 2013 - V. 45 – 272s.
115. Ramamurthi, S. Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols / S. Ramamurthi, A. McCurdy // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1993. - V. 70 – 114s.
116. Reina, R. J. Sterol and triterpene diol contents of vegetable oils by high-resolution capillary gas chromatography / R. J.Reina, K. D.White, D. Firestone // *JAOAC Int.* - 1999. - V.82 – 201s.
117. Reina, R. J. Validated method for quantitation and identification of 4,4-desmethylsterols and triterpene diols in plant oils by thinlayer chromatography–high resolution gas chromatography–mass spectrometry / R. J. Reina, K .D. White, E. G. E. Jahngen // *JAOAC Int.* – 1997. - V. 80 – 183s.
118. Rochester, C. P. Lipid composition of PLASMA membranes from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences / C. P. Rochester, P. Kjellbom, C. Larsson // *Physiol. Plant* - 1987. - V. 71 – 220s.
119. Rogers, E. J. Identification and quantitation of g-oryzanol components and simultaneous assessment of tocols in rice bran oil / E. J. Rogers, S. M. Rice, R. J. Nicolosi, D. R. Carpenter // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 1993.- V. 70 – 108s.
120. Rong, N. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters / N. Rong, L. M. Ausman, R. J. Nicolosi // *Lipids* – 1997. - V. 32 – 153s.
121. Rudzinska, M. The content of phytosterols and their oxidized derivatives in heated plant oils / M. Rudzinska, H. Jelenr, E. Wasowicz // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* - 2002. - V. 11/52 – 77s.
122. Saska, M. Recovery of g-oryzanol from rice bran oil with silicabased continuous chromatography / M. Saska, G. J. Rossiter // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 1998. - V. 75 – 152s.
123. Savel, J. Study of amino asidc level change in beer during storage / J. Savel, D. Zdihalova // *Thesyse of Proc. 27th EBC, Cannes, 1999.* – 112s.

124. Scherz, H. Food Composition and Nutrition Tables / H. Scherz, F. Senger, Souci-Fachmann-Kraut // 6th revised and compiled edition, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 2000. – 254s.
125. Schothorst, R. C. Oral sterol intake in the Netherlands: evaluation of the results obtained by GC analysis of duplicate 24-h diet samples collected in 1994 / R. C. Schothorst, A. A. Jekel // Food Chem. - 1999. - V. 64 – 131s.
126. Schulte, E. Determination of edible fat refining by HPLC of D 3,5-steradienes / E. Schulte // Fat Sci. Technol. - 1994.- V. 96 – 132s.
127. Seetharamaiah, G. S. Studies in hypocholesterolemic activity of rice bran oil / G.S.Seetharamaiah, N. Chandrasekhara // Atherosclerosis - 1989 - V. 78 – 240s.
128. Seitz, L. M. Sitostanyl ferulate as an indicator of mechanical damage to corn kernels / L. M. Seitz // Cereal Chem. - 1990. - V. 67 – 175s.
129. Seitz, L. M. Stanol and sterol esters of ferulic and p-coumaric acids in wheat, corn, rye and triticale / L. M. Seitz // J. Agric. Food Chem. - 1989. - V. 37 – 117s.
130. Singh, V. Effect of corn milling practices on aleurone layer cells and their unique phytosterols / V. Singh, R. A. Moreau, Ph. Cooke // Cereal Chem. - 2001. - V. 78 – 124s.
131. Singh, V. Recovery of fiber in the corn dry-grind ethanol process: a feedstock for valuable coproducts / V. Singh, R. A. Moreau, L. W. Doner, S. R. Eckhoff, K. B. Hicks // Cereal Chem. - 1999. - V. 76 – 145s.
132. Singh, V. Hybrid variability and effect of growth location on corn fiber yields and corn fiber oil composition / V. Singh, R. A. Moreau, A. E. Haken, S. R. Eckhoff, K. B. Hicks // Cereal Chem. – 2000. - V. 77 – 170s.
133. Singh, V. Effect of various acids and sulfites in steep solution on yields and composition of corn fiber and corn fiber oil / V. Singh, R. A. Moreau, A. E. Haken, K. B. Hicks, S. R. Eckhoff // Cereal Chem. - 2000. - V. 77 – 170s.
134. Singh, V. Effect of alternative milling techniques on the yield and composition of

- corn germ oil and corn fiber oil / V. Singh, R. A. Moreau, K. B. Hicks, S. R. Eckhoff // *Cereal Chem.* – 2001. - V. 78 – 104s.
135. Singh, V. Effect of harvest moisture content and ambient air drying on maize fiber oil yield and its phytosterol composition / V. Singh, P. Yang, R. A. Moreau, K. B. Hicks, S. R. Eckhoff // *Starch/Starke.* – 2001. - V. 53 – 238s.
 136. Shen, Z. Pilot scale extraction of rice bran oil with dense carbon dioxide / Z. Shen, M. V. Palmer, S. S. T. Ting, R. J. Fairclough // *J. Agric. Food Chem.* – 1996. - V. 44 – 471s.
 137. Shin, T. S. Hydrolytic stability and changes in E vitamers and oryzanol of extruded rice bran during storage / T. S. Shin, J. S. Godber, D. E. Martin, J. H. Wells // *J. Food Sci.* – 1997. - V. 62 – 270s.
 138. Slover, H. T. Lipids in margarines and margarine-like foods / H. T. Slover, R. H. Thompson, C. S. Davis, G. V. Merola // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1985. - V. 62 – 254s.
 139. Soupas, L. Distribution of oxidation products of stigmaterol heated in saturated and unsaturated lipid matrices / L. Soupas, L. Juntunen, A. - M. Lampi, V. Piironen // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* – 2002. - V. 11/52 – 104s.
 140. Stefani, de E. Plant sterols and risk of stomach cancer: a casecontrol study in Uruguay / E. Stefani de, P. Boffetta, A. L. Ronco, P. Brennan // *Nutr. Cancer* – 2000. - V. 37 – 43s.
 141. Strocchi, A. Structural modifications of 4,4'-dimethyl sterols during the hydrogenation of edible vegetable oils / A. Strocchi, G. Marascio // *Fat Sci. Technol.* - 1993. - V. 95 – 115s.
 142. Taylor, S. L. Enrichment of ferulate phytosterol esters from corn fiber oil using supercritical fluid extraction and chromatography / S. L. Taylor, J. W. King // *J. Am. Oil Chem.Soc.* – 2002. - V. 77 – 117s.
 143. Taylor, S. L. Optimization of the extraction and fractionation of corn bran oil using

- analytical supercritical fluid instrumentation / S. L. Taylor, J. W. King // *J. Chromatogr.* – 2000. - V. 38 – 146s.
144. Toivo, J. Free, esterified, and glycosylated sterols in Finnish cereals / J. Toivo, K. Maatta, A. - M. Lampi, V. Piironen // *Proceedings of Euro Food Chem X : Functional Foods. A New Challenge for the Food Chemists, FECS-Event, Hungary : Budapest, 1999.* - № 234 – 254s.
 145. Toivo, J. Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation / J. Toivo, V. Piironen, P. Kalo, P. Varo // *Chromatographia* - 1998. - V. 48 – 117s.
 146. Valsta, L. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake / L.Valsta, A.Lemstrom, M. - L. Ovaskainen, A. - M. Lampi // *Br. J. Nutr.* - 2010. – 120s.
 147. Verleyen, T. Factors determining the steradiene formation in bleaching and deodorization / T. Verleyen, E. Cortes, R. Verhe, K. Dewettinck, A. Hyghebaert, W. De Greyt // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2002. - V. 104 – 61s.
 148. Verleyen, T. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils / T. Verleyen, M. Forcades, R. Verhe, K. Dewettinck // *J. Am. Oil Chem.Soc.* - 2002. - V. 79 – 87s.
 149. Verleyen, T. Comparison of steradiene analysis between GC and HPLC / T. Verleyen, A. Szulczewska, R. Verhe, K. Dewettinck // *Food Chem.* – 2002. - V. 78 – 129s.
 150. Vlahakis, C. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature / C. Vlahakis, J. Hazebroek // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2000. - V. 77 – 109s.
 151. Vries, de J. H. M. The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged men in seven countries / J. H. M. deVries, A. Jansen, D. Kromhout, P van de Bovenkamp // *J. Food Comp. Anal.* - 1997. - V. 10 – 85s.

152. Weihrauch, J. L. Sterol content of foods of plant origin / J. L. Weihrauch, J. M. Gardner // *J. Am. Dietet Assoc.* – 1978. - V. 73 – 126s.
153. Weststrate, J. A. Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total-and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subject / J. A. Weststrate, G. W. Meijer // *Eur. J. Clin. Nutr.* - 1998. - V. 52 – 162s.
154. Whitaker, B. D. A reassessment of heat treatment as a means of reducing chilling injury in tomato fruit / B. D. Whitaker // *Postharvest Biol. Technol.* - 1994. - V. 4 – 192s.
155. Whitaker, B. D. Changes in lipids of tomato fruit stored at chilling and nonchilling temperatures / B. D. Whitaker // *Phytochemistry* - 1991. - V. 30 – 329s.
156. Whitaker, B. D. Changes in the sterol lipid content and composition of tomato fruit during ripening / B. D. Whitaker // *Phytochemistry* - 1988. - V. 27 – 375s.
157. Whitaker, B. D. Lipid changes in mature-green bell pepper fruit during chilling at 2°C and after transfer to 20°C subsequent to chilling / B. D. Whitaker // *Physiol. Plant* - 1995. - V. 93 – 154s.
158. Whitaker, B. D. Lipid changes in mature-green tomatoes during ripening, during chilling, and after rewarming subsequent to chilling / B. D. Whitaker // *J. Am. Soc. Hort Sci.* - 1994. - V. 119 – 237s.
159. Whitaker, B. D. Influence of prestorage heat and calcium treatments on lipid metabolism in “golden delicious” apples / B. D. Whitaker, J. D. Klein, W.S. Conway, C. E. Sams // *Phytochemistry* – 1997. - V. 45 – 163s.
160. Whitaker, B. D. Sterol lipid content and composition in bell pepper fruit at three stages of ripening / B. D. Whitaker, W. R. Lusby // *J. Am. Soc. Hort Sci.* – 1989. - V. 114. – 238s.
161. Worthington, R. E. A method for the separation of seed oil sterol esters and free sterols: application to peanut and corn oils / R. E. Worthington, H. L. Hitchcock // *J. Am.*

- Oil Chem. Soc. – 1984. – V. 61. – 138 s.
162. Xu, Z. Antioxidant activities of major components of g-oryzanol from rice bran using a linoleic acid model / Z. Xu, J. S. Godber // J. Am. Oil Chem. Soc. – 2001. – V. 78. – 152 s.
 163. Xu, Z. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting g-oryzanol from rice bran / Z. Xu, J. S. Godber // J. Am. Oil Chem. Soc. – 2000. - V. 77. – 150 s.
 164. Xu, Z. Purification and identification of components of g-oryzanol in rice bran oil / Z. Xu, S. Godber // J. Agric. Food Chem. – 1999. – V. 47. – 435 s.
 165. Xu, Z. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and g-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2V-azobis (2-methylpropinamidine) / Z. Xu, N. Hua, J. S. Godber // J. Agric. Food Chem. – 2001. – V. 49. – 437 s.
 166. Yang, B. Phytosterols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries: identification and effects of different origins and harvesting times / B. Yang, R. M. Karlsson, P. H. Oksman, H. P. Kallio // J. Agric. Food Chem. – 2001. – V. 49. – 381 s.
 167. Yasukawa, K. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in twostage carcinogenesis in mouse skin / K. Yasukawa, T. Akihisa, Y. Kimura, T. Tamura, M. Takido // Biol. Pharm. Bull. - 1998. - V. 21. – 152 s.
 168. Yoon, H. S. Oxidative stability of high-fatty acid rice bran oil at different stages of refining / H. S. Yoon, S. K. Kim // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1994. - V. 71. – 72 s.
 169. Zambiasi, R. C. Changes in lipid composition in oats with elevated fat content / R. C. Zambiasi, R. Przybylski // Adv. Plant Lipid Res. - 1998. – 717 s.
 170. Zlatanov, M. D. Lipid composition of Bulgarian chokeberry, black currant and rose hip seed oils / M. D. Zlatanov // J. Sci. Food Agric. – 1999. - V. 79. – 196 s.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(обязательное)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ЭКОНОМИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Г.В.ПЛЕХА-
НОВА
(РЭУ имени Г.В.Плеханова)»

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научной работе
ФИО
«__» _____ 2019г.

Инструкция контроля
содержания фитостерина в пиве

ИК 9184- - 02068686 - 2019

Впервые

Москва
2018

Настоящая инструкция распространяется на пиво и устанавливает метод определения фитостеринов в пиве методом газовой хроматографией.

Сущность метода заключается в кислотном гидролизе пробы пива, осаждения белковой фракции насыщенным раствором сульфата аммония и экстракцией фитостеринов хлористым метиленом из гидролизованной пробы пива и их последующим газохроматографическим определением.

Метод позволяет провести определение трех основных структурных видов фитостеринов: β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин.

Предел обнаружения массовых долей фитостеринов в пиве составляет от 0,1 до 5,0 мкг/дм³.

1 Аппаратура, материалы и реактивы

Колонка газохроматографическая, внутренний диаметр колонки 0,25 мм, длинна – 30 м, толщина фазы – 0,25 мкм, капиллярная, твердый носитель – (5%-фенил)-метилполисилокосан, поперечно-связанный и молекулярно сшитый, жидкая фаза – ацетонитрил-вода с градиентной подачей;

хроматограф газовый, оснащенный масс-детектором (ГМ/МС/МС) и записывающим устройством;

весы лабораторные общего назначения высокого или специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 и 210 г ценой деления 0,1 мг по ГОСТ 24104;

испаритель ротационный любой марки;

виалы

мешалка магнитная любой марки, оборудованная нагревателем с диапазоном температур от 20 до 100°C;

встряхиватель любой марки;
центрифуга настольная любой марки;
колба мерная 2-100-2 и 2-250-2 по ГОСТ 25336;
стаканы для взвешивания (бюксы) по ГОСТ 25336;
пипетка градуированная 1-100-2 по ГОСТ 29228;
микрошприц вместимостью $5 \cdot 10^{-3}$ или $10 \cdot 10^{-3}$ см³;
воронка фильтрующая В-25-38, В-36-50 ХС по ГОСТ 25336;
ацетонитрил по ТУ 2636-092-44493179-04;
водород по ГОСТ 14022;
азот газообразный по ГОСТ 9293, особой чистоты;
сульфат аммония по ГОСТ 9097;
кислота соляная по ГОСТ 3118;
метилен хлористый по ГОСТ 9968;
кальций хлористый по ГОСТ 450;
метанол по ГОСТ 2222;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300;
вода дистиллированная по ГОСТ 6709;
бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

2 Проведение испытания

2.1 Отбор проб

Отбор проб - по ГОСТ 12876.

2.2 Подготовка к испытанию

2.2.1 Приготовление исходных растворов фитостеринов

В бюксы отвешивают по $(100 \pm 0,1)$ мг холестерина, β -ситостерина и кампестерина. Навески количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см^3 , затем добавляют смесь 50 см^3 и 15 см^3 дихлорметана, перемешивают и доводят объем до метки тем же раствором.

Полученные растворы имеют молярную концентрацию 1 мг/см^3 . Растворы хранят плотно закрытыми в темном холодном месте не более 3 месяцев.

2.2.2 Приготовление рабочих растворов фитостеринов

Из мерных колб с растворами по 3.2.1 отбирают по 1 см^3 каждого фитостерина в мерную колбу вместимостью 100 см^3 , добавляют 50 см^3 этанола, 15 см^3 дихлорметана и 35 см^3 дистиллированной воды.

Полученный раствор имеет массовую концентрацию 10 мкг/см^3 . Рабочий раствор допускается хранить плотно закрытым в темном месте при температуре $4-6^\circ\text{C}$ не более 1 мес.

2.2.3 Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа выполняют, используя градуировочный раствор, полученный по п. 2.2.2.

В условиях, позволяющих разделить все составные вещества калибровочной смеси, записывают не менее 3-х хроматограмм. Время удержания (мин) компонентов градуировочного раствора следующее:

- холестерин – $8,5 \pm 0,5$;
- β -ситостерин – $10,0 \pm 0,5$;
- кампестерин – $9,5 \pm 0,5$.

2.3 Проведение испытания

В качестве внутреннего стандарта используют раствор холестерина в метаноле концентрацией 1 мг/см^3 , подготовленного по п.2.2.1.

2.3.1 Выделение фитостеринов из пива

В мерную колбу вместимостью 250 см^3 вносят $100 - 400 \text{ см}^3$ подготовленного по п. 3.1 пива, раствор внутреннего стандарта объемом 200 мкл , затем добавляют 15 см^3 соляной кислоты (HCl , 1N). После чего колбы подогревают на водяной бане в течение 30 минут. Затем колбы охлаждают. Далее каждую колбу добавляют по 60 г насыщенного раствора сульфата аммония, колбы встряхивают 15 минут на шейкере для встряхивания. Далее в колбы добавляют по 40 см^3 дихлорметана, и так же встряхивают 15 минут. После разделения фаз отбрасывают верхний слой. Отфильтровывают нижний слой через складчатый фильтр, с добавлением хлорида кальция, для обезвоживания

раствора, в конические колбы. Затем из колб, на роторном испарителе, отгоняют растворитель. После чего, остаток смывают со стенок колб 1 мл дихлорметана. Далее автоматической пипеткой с наконечником отбирают содержимое колб и помещают в 3 виалы. Виалы закрывают и подогревают в течение 30 минут на магнитной мешалке с подогревом, при температуре 80 °С. После в каждую виалу добавляют по 2 см³ дихлорметана, встряхивают в течение 5 минут. Полученные образцы хроматографируют.

2.3.2 Определение содержания фитостеринов методом ГХ

2.3.2.1 Условия хроматографирования

Устанавливают следующие условия анализа на хроматографе: капиллярная колонка HP-5MS общего назначения, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, внешний диаметр 0,30 мм. Скорость потока газа-носителя 60-100 см³/мин. Температура термостата колонки 250-270 °С, инжектора 300 °С, детекторов 280 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода в следующем соотношении, таблица А.1

Таблица А.1 – Схема градиентной подачи раствора жидкой фазы

Время иллюирования, мин	Содержание ацетонитрила (А) и воды (В) в подвижной фазе, %
0	A=70, B=30
10	A=100, B=0
20	A=100, B=0
21	A=70, B=30

Объем вводимой пробы 3 мкл.

2.3.3 Проведение измерений

Пробу пива и пробу контрольного опыта хроматографируют дважды и рассчитывают среднеарифметические значения площади пиков анализируемых стероидов, включая внутренний стандарт.

2.4 Обработка результатов испытаний

Если на хроматограмме наблюдается сначала пик внутреннего стандарта (Рисунок А.1) и далее пики со временем удерживания от 18 мин до 22 мин (Рисунок А.2), то это подтверждает наличие фитостероидов в анализируемой пробе, и дает основание к их расчету.

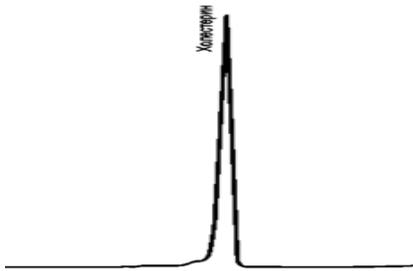


Рисунок А.1 – Хроматограмма холестерина

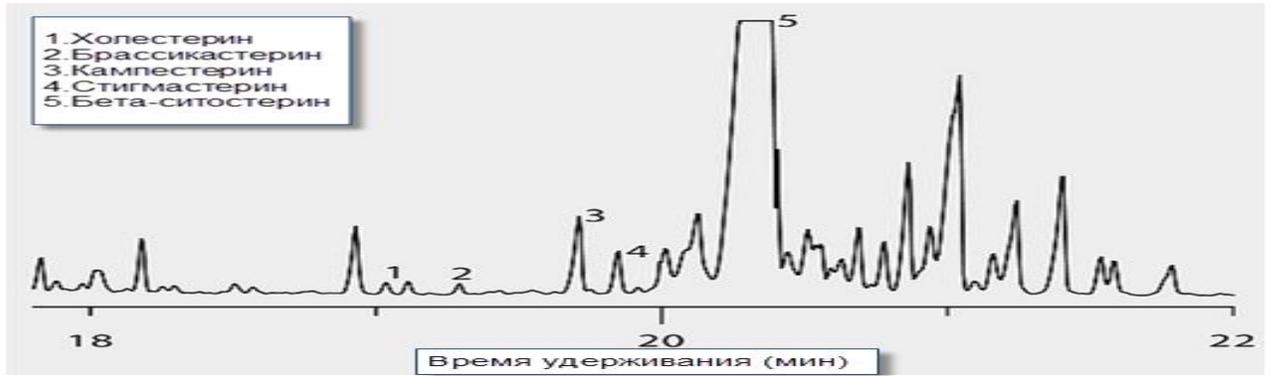


Рисунок А.2 – Пики индивидуальных фитостеринов

Далее переходят к вычислению градуировочного коэффициента K по формуле (А.1)

$$K = \frac{M_1 \cdot S_2}{M_2 \cdot S_1}, \quad (\text{А.1})$$

где M_1 – масса введенного индивидуального фитостерина, мкг;

M_2 – масса внутреннего стандарта, мкг;

S_1 – площадь пика индивидуального фитостерина;

S_2 – площадь пика внутреннего стандарта.

Массовую концентрацию индивидуального фитостерина, X_ϕ , мг/дм³, вычисляют по формуле (А.2):

$$X_\phi = \frac{h \cdot M_{\text{вн}} \cdot 1000}{h_{\text{вн}} \cdot V_0}, \quad (\text{А.2})$$

где h – высота пика индивидуального фитостерина;

$M_{\text{вн}}$ – масса внутреннего стандарта, мкг;

$h_{\text{вн}}$ – высота пика внутреннего стандарта;

V_0 – объем образца пива, взятого на анализ, см³;

1000 – коэффициент пересчета см³ в дм³.

Результат анализа представляют в виде $(X \pm 0,2)$, мг/дм³ при $p=0,95$, где X – среднеарифметическое двух параллельных определений.

3 Метрологические характеристики

Наименьший предел измерений метода - не менее 0,5 % массовой доли фитостероидов в образце.

Нормативные ссылки

ГОСТ 450-77 Кальций хлористый технический. Технические условия

ГОСТ 2222-95 Метанол технический. Технические условия

ГОСТ 3118-77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9097-82 Сульфат аммония. Технические условия

ГОСТ 9293-74 (ИСО 2435-73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 9968-86 Метилен хлористый технический. Технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 14022-88 Водород фтористый безводный. Технические условия

ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29228-91 Посуда лабораторная стеклянная. Часть 2. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ OIML R 76-1-2011 Весы неавтоматического действия. Часть I. Общие технические условия

ТУ 2636-092-44493179-04 Ацетонитрил чистый для анализа. Технические условия

РАЗРАБОТАНО

Зав. кафедрой Товароведения и товарной экспертизы

ФГБОУ ВО РЭУ им. Г.В. Плеханова, д.т.н., проф.

Аспирант

А.А. Щербина

М.О. Харрис