

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2016

Е. И. Финкельштейн

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА КАРОТИНОИДОВ (ОБЗОР)

Издательский дом Фолиум, Москва, Россия; e-mail: evgfink@yandex.ru

В обзоре рассмотрены методы качественного и количественного определения каротиноидов, используемые при анализе лекарственных средств, биологически активных добавок и пищевых продуктов. Обсуждаются спектрофотометрия в УФ и видимой областях спектра и хроматографические методы — тонкослойная (ТСХ), высокоэффективная жидкостная (ВЭЖХ) и сверхкритическая флюидная (СФХ) хроматография. Показана важность применения в хроматографии гибридных методов с использованием ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопических детекторов. Впервые продемонстрирована зависимость параметров хроматографического разделения каротиноидов от полярности (дипольного момента) сорбата в ТСХ, ВЭЖХ и СФХ.

Ключевые слова: каротиноиды; спектроскопия; ТСХ; ВЭЖХ; СФХ; полярность.

Прошло уже 43 года после выхода в свет классической монографии [1], в которой излагались все известные в то время сведения о свойствах, методах выделения и анализа, биологических функциях, методах синтеза, биосинтезе и метаболизме каротиноидов. В то время было известно более 300 соединений этого класса. К 1987 г. это число достигло значения 563 [2], в дальнейших публикациях говорится уже о 600 (не считая *E/Z* изомеров) [3] и даже более, чем о 750 [4] соединениях.

Каротиноиды — это полиеновые соединения, которые делятся на 2 группы, — углеводороды (каротины) и их кислородсодержащие производные (ксантофиллы). Первоначально их выделяли из растений, однако

сегодня разработаны методы синтеза более 200 соединений этого класса и налажено промышленное производство по крайней мере 6 продуктов — β -каротина, кантаксантина, астаксантина, β -апо-8'-каротинала, этилового эфира β -апо-8'-каротиновой кислоты и цитранаксантина (рис. 1, см. также [3], pp. 13 – 26).

Практическое использование каротиноидов в медицине предусматривает не только применение соответствующих лекарственных средств (ЛС) или биологически активных добавок (БАД), но и употребление в пищу богатых этими соединениями фруктов и овощей. Поэтому разработаны и продолжают интенсивно разрабатываться методы определения каротиноидов как в ЛС, так и в пищевых продуктах. Структуры получае-

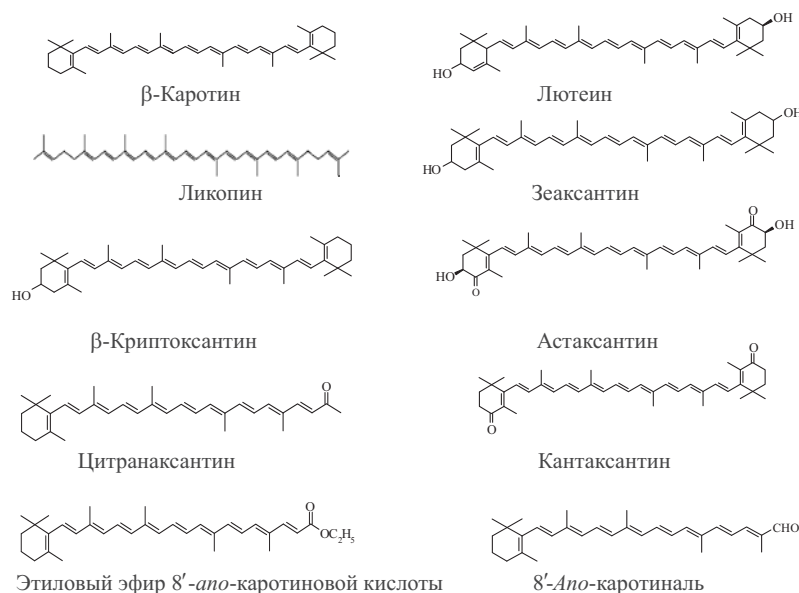


Рис. 1. Структуры каротиноидов.

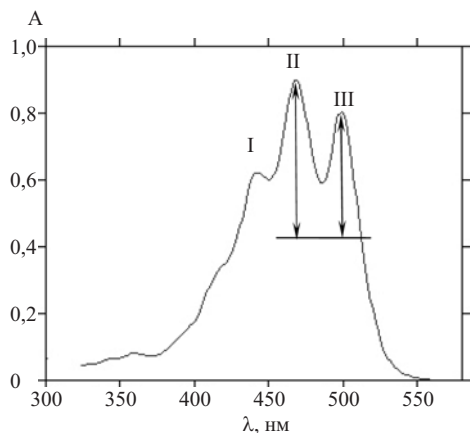


Рис. 2. УФ-спектр ликопина в *n*-гексане ($C = 2,6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл).

мых промышленным путём и наиболее распространённых в пищевых продуктах каротиноидов приведены на рис. 1.

Недавно опубликован обзор методов определения каротиноидов, в котором рассмотрены методы, используемые при анализе пищевых продуктов и образцов крови человека [5]. Авторы ограничиваются перечислением лишь тех работ, в которых применяется только ВЭЖХ со спектрофотометрическими (в том числе диодно-матричными) и масс-спектрометрическими детекторами. В настоящем обзоре рассмотрены все современные методы качественного и количественного анализа каротиноидов в ЛС, БАДах и пищевых продуктах.

Основные принципы

В подавляющем большинстве каротиноиды (во всяком случае, все, имеющие промышленное и медицинское применение и обладающие пищевой ценностью) характеризуются интенсивным поглощением в видимой области спектра в интервале 350 – 550 нм, которое обусловлено присутствием в их молекулах протяженной системы сопряженных двойных связей. Это свойство позволило широко использовать видимую спектроскопию (как регистрацию спектров, так и просто измерение оптической плотности при длинах волн, соответствующих максимумам полос поглощения анализируемых соединений) для качественного и количественного анализа каротиноидов и родственных соединений (в т.ч. соединений ряда витамина А) [1].

Особенности спектров каротиноидов в этой области подробно рассмотрены в монографиях [1, 4], наиболее детально в [4], так что авторы более поздних монографий (см., например, [6 – 8]), а также многочисленных статей в периодических изданиях используют приведенные там данные и закономерности.

В [4] достаточно подробно рассмотрено применение методов ИК-, резонансной КР-, ЯМР-, масс-спектрологии и оптического кругового дихроизма для установления структуры каротиноидов. Необходимо однако отметить, что хотя монография [4] и представляет собой ценное справочное руководство по перечисленным методам исследования, она, к сожалению, не лишена серьёзных погрешностей. А именно, в главе 4 (pp. 117 – 146) во всех приведенных ИК-спектрах различных каротиноидов, не содержащих гидроксильных (β -каротина, ликопина, дегидроретина, кантаксантина, β -анто-12'-каротиналя и др.), присутствует интенсивная широкая полоса в области $3600 - 3200 \text{ см}^{-1}$, соответствующая поглощению связанных водородными связями ОН-групп. Поскольку все спектры получены для дисков с КВг, то очевидно, что авторы применяли недостаточно качественный КВг, не вычитая спектр чистого КВг, и полосы поглощения воды (в том числе деформационных колебаний Н-О-Н в области $1500 - 1600 \text{ см}^{-1}$) присутствуют во всех приведенных спектрах. Поэтому использовать эти спектры можно лишь с определённой осторожностью. Однако применение всех перечисленных методов для анализа содержащих каротиноиды образцов наиболее эффективно при их комбинации с хроматографическими методами разделения с использованием так называемых гибридных систем [9].

Спектроскопия в УФ и видимой области

Спектроскопия в УФ и видимой области (электронная спектроскопия), будучи с точки зрения проведения эксперимента наиболее простым физико-химическим методом, в то же время достаточно информативна с учетом особенности спектров индивидуальных каротиноидов [1, 4]. Появление в середине прошлого века спектрофотометров сначала с ручным управлением, а затем и регистрирующих способствовало быстрому накоплению качественных и количественных данных о спектрах соединений этого класса [1].

Таблица 1

Параметры фармакопейных спектрофотометрических методов определения β -каротина

Объект	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Литература
Поливитаминовые препараты	<i>n</i> -Гексан	450	2592	[10]
Поливитаминовые препараты ^{1, 2}	Циклогексан	452	2230	[11]
Капсулы β -каротина	Циклогексан	452	—	[11]
Субстанция β -каротина	Циклогексан	455	2500	[12]
Субстанция β -каротина	Циклогексан	455	2500	[13, 14]

¹ Капсулы и таблетки с жирорастворимыми или жиро- и водорастворимыми витаминами, не содержащие или содержащие минеральные добавки.

² Согласно [11], испытуемые растворы при подготовке к анализу обрабатываются йодом, по-видимому, для превращения возможно присутствующих *цис*-изомеров полностью в *транс*- β -каротин.

Основные закономерности электронных спектров каротиноидов, иллюстрированные подробными таблицами, изложены, как упомянуто выше, в [4]. Основная особенность формы спектров каротиноидов — присутствие 3 максимумов поглощения. Это удобно продемонстрировать на спектре ликопина (рис. 2).

Значения отношения III/II, выраженные в %, табулированы в [4] для значительного числа соединений. И поскольку это отношение вместе с положением максимумов является характеристикой структуры, соответствующие данные можно эффективно использовать для качественного анализа.

Чаще всего в ЛС используют β -каротин. Его определяют спектрофотометрически либо при 450 нм в гексане после экстракции из препарата [10], либо в циклогексане [11 – 14] при контроле качества как фармацевтической субстанции, так и ЛС (в этом случае также после экстракции). Некоторые фармакопейные параметры определения β -каротина согласно [10 – 14] сопоставлены в табл. 1.

Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют о значительном расхождении между методами, использовавшимися в Фармакопее США (USP), с одной стороны, и Европейской фармакопее (EP) и Британской фармакопее (BP), с другой. Возможно, это связано с тем, что в [4, с. 57] для β -каротина в циклогексане указано значение $\lambda_{\text{макс}} = 452$ нм, причём там же приведено значение $A_{1\text{см}}^{1\%} = 2505$. Однако, по имеющимся данным, для *all-trans*- β -каротина в циклогексане $\lambda_{\text{макс}} = 455$ нм и $A_{1\text{см}}^{1\%} = 2500$ [15, 16], в то время, как для 9-цис-изомера соответствующие значения равны 450 и 2230 нм [15]. Эти ошибки в USP были в дальнейшем исправлены [12]. Согласно [10], как и в соответствии с другими руководствами [17, 18], при анализе β -каротина используется *n*-гексан, т.к. соответствующие значения $\lambda_{\text{макс}}$ и $A_{1\text{см}}^{1\%}$ для растворов β -каротина в гексане определены в значительно большем числе работ и поэтому являются общепринятыми.

В табл. 2 приведен состав некоторых отечественных и импортных препаратов, содержащих каротиноиды.

Из табл. 2 видно, что в 4 из приведенных 7 отечественных препаратов содержится только β -каротин, так что, в принципе, его можно определять спектрофотометрически в соответствии с [10]. Действительно, этот метод, позволяющий надёжно определять β -каротин ($\epsilon_{\text{ср}} < 1,2\%$), включён в нормативную документацию (НД) на веторон и веторон Е. Что же касается БАД Алфавит “Косметик” и Алфавит “Мамино здоровье”, то таблетки, в состав которых входит этот каротиноид, содержат красители, и поэтому для его определения требуется предварительное хроматографическое разделение анализируемых компонентов так же, как для “Витрум вижн”.

Несмотря на то, что обычно для определения каротиноидов используется хроматография, значительное число публикаций посвящено чисто спектрофотометрическим методам, связанным, в подавляющем большинстве, с анализом растительных пищевых продуктов. Как правило, спектрофотометрически оценивают суммарное содержание каротиноидов, рассчитывая его как эквивалент β -каротина, исходя из стандартного выражение закона Бугера — Ламберта — Бера:

$$A_{450} = A_{1\text{см}}^{1\%} C, \quad (1)$$

где A_{450} — измеренная оптическая плотность анализируемого раствора; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения β -каротина в гексане, равный 2592; C — концентрация анализируемого раствора, %; если β -каротин является преобладающим компонентом в анализируемой смеси каротиноидов. Если преобладающим компонентом является какой-либо другой каротиноид, то в уравнение (1) подставляют значение $A_{1\text{см}}^{1\%}$ для этого каротиноида. Связанные с решением возникающих при этом проблем подходы рассмотрены в ра-

Таблица 2

Состав некоторых поливитаминных препаратов, содержащих каротиноиды

№№ п/п	Препарат	Каротиноид**
Отечественные препараты		
1	Алфавит косметик*	β -Каротин
2	Алфавит мамино здоровье*	β -Каротин
3	Алфавит 50+*	β -Каротин, ликопин, лютеин
4	Алфавит оптикум*	β -Каротин, ликопин, лютеин
5	Фокус*	β -Каротин (3 мг), лютеин (2 мг), ликопин (1 мг)
6	Веторон ЛСР-008019/10-060611	β -Каротин 20 мг/мл
7	Веторон Е ЛСР-008019/10	β -Каротин 20 мг/мл
Импортные препараты		
1	Витрум ВИЖН	β -Каротин 1,52 мг, лютеин 2,5 мг, зеаксантин 0,5 мг
2	Джунгли с минералами	β -Каротин, 1,5 мг
3	Перфектил	β -Каротин, 5 мг
4	Центрум сильвер	β -Каротин 3000 МЕ (1,82 мг)
5	Витрум	Витамин А ацетат и β -каротин 5000 МЕ

* БАД. ** Приведено содержание в 1 таблетке или 1 капсуле.

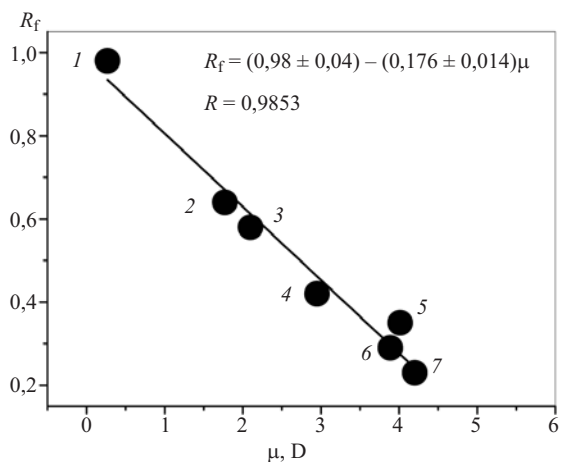


Рис. 3. Зависимость R_f от дипольного момента каротиноида для ТСХ на силикагеле, элюент ацетон — петролейный эфир (1:1) [32]: 1 — β -каротин; 2 — β -криптоксантин; 3 — зеаксантин; 4 — антраксантин; 5 — виолаксантин; 6 — капсантин; 7 — капсорубин.

ботах [17, 19]. Так, в [17] отмечается, что при присутствии в анализируемом образце 2 или более каротиноидов (а это может иметь место не только в случае экстрактов продуктов растительного происхождения, но и при анализе ЛС, см. табл. 2) можно использовать найденное значение A_{450} и величину $A_{1\text{см}}^{1\%}$ для β -каротина, считая полученный результат оценкой эквивалента общего содержания β -каротина. Если же используется $A_{1\text{см}}^{1\%}$ другого каротиноида, то таким образом оценивается общее содержание, эквивалентное этому каротиноиду. Авторы [19], на основании данных [20], полагают, что в пищевых продуктах и поэтому в организме человека содержатся, в основном, β -каротин, β -криптоксантин, лютеин, ликопин и зеаксантин. Исходя из этого, они рассчитывают среднее значение $\lambda_{\text{макс}}$ ($449 \pm 2,7$) нм для этих соединений (для β -каротина, ликопина и зеаксантина в качестве растворителя

Таблица 3
Спектральные характеристики пищевых каротиноидов [4, 5]

Каротиноид	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Δ , %
β -Каротин	Гексан, петролейный эфир	450	2592	1,0
	Этанол	450	2620	
β -Криптоксантин	Гексан	450	2450	3,1
	Петролейный эфир	449	2386	
Лютеин	Этанол	445	2550	
Ликопин*	Петролейный эфир	450	2284	
Зеаксантин	Петролейный эфир	449	2348	5,6
	Этанол	450	2480	
$\lambda_{\text{макс, ср}}$		449	2464	
SD		1,7	120	
RSD, %		0,4	4,8	

* Значение $A_{1\text{см}}^{1\% 450}$ рассчитано по экспериментальному спектру ликопина: $A_{450}/A_{470} = A_{1\text{см}}^{1\% 450}/A_{1\text{см}}^{1\% 470} = 0,519/0,784 = 0,662$; $A_{1\text{см}}^{1\% 450} = 3450 \cdot 0,662 = 2284$, где 3450 — $A_{1\text{см}}^{1\%}$ ликопина при 470 нм [4].

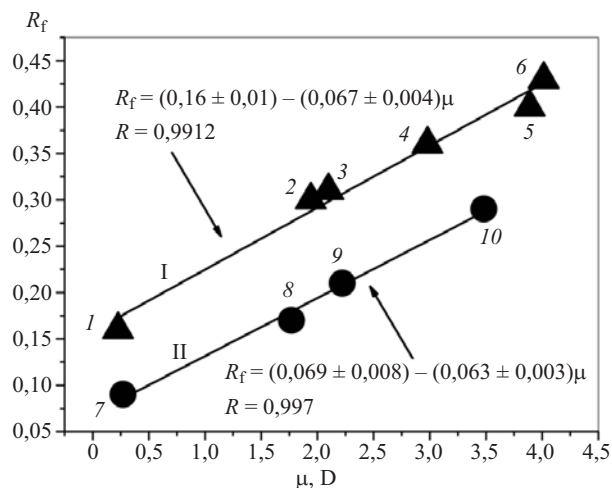


Рис. 4. Зависимость R_f от дипольного момента для разделения каротиноидов на обращённо-фазных пластинках RP-18 (Merck, Art. 15423). Элюент: петролейный эфир — ацетонитрил — метанол (10:60:30) [30]. 1 — Ликопин; 2 — лютеин; 3 — зеаксантин; 4 — антраксантин; 5 — капсантин; 6 — виолаксантин; 7 — β -каротин; 8 — β -криптоксантин; 9 — газаниаксантин; 10 — кантаксантин.

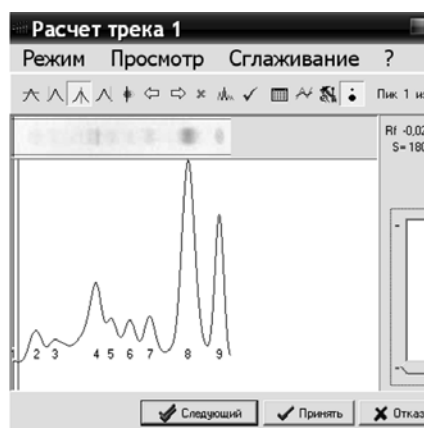
указан ацетон), средний молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon = (135310 \pm 7979)$ и среднюю молекулярную массу $M = (548 \pm 14)$. Отсюда находим соответствующее значение удельного показателя поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%} = 2469$. Используя приведенные величины, авторы показывают, что этот “метод среднего” даёт результаты, удовлетворительно согласующиеся с данными, полученными методом ВЭЖХ при анализе значительного числа фруктов и овощей. Есть все основания полагать, что этот метод применим и для анализа содержащих каротиноиды ЛС и БАД. К сожалению, приведенные в [19] данные и расчёты не лишены определённых, хотя и незначительных, погрешностей. А именно, рассчитанное по указанным в [19] (табл. 1) величинам среднее значение ε равно (134239 ± 9322) (см. выше); ε ликопина, рассчитанный по данным [21, р. 885], на которые ссылаются авторы [19], равен 120825 при $\lambda = 446$, а не 120600 при $\lambda = 448$, как указано в [19] и т.д. Соответственно, $A_{1\text{см}}^{1\% \text{ ср}} = 2449$ (а не 2469, если исходить из данных [19], см. выше). В табл. 3 приведены соответствующие данные для тех же каротиноидов в обычно используемых растворителях.

Интересно, что найденные (табл. 3) и приведенные в [19] средние значения $\lambda_{\text{макс}}$ и $A_{1\text{см}}^{1\%}$ практически идентичны. Это связано с заметным разбросом опубликованных экспериментальных данных, на который указано в [4]. Действительно, как видно из табл. 3, различие величин $A_{1\text{см}}^{1\%}$ для β -криптоксантина в гексане и петролейном эфире превышает 3 % при отличающихся $\lambda_{\text{макс}}$, хотя и те и другие должны быть одинаковы [4]. Можно поэтому полагать, что для оценки суммарного количества каротиноидов в ЛС и БАД спектрофотометрическим методом допустимо проводить измерения при $\lambda = 450$ нм, используя для расчёта

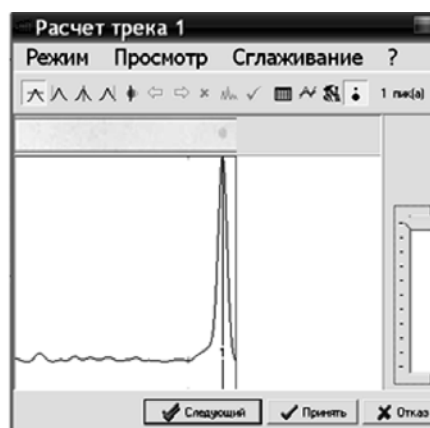
Структура и дипольные моменты некоторых каротиноидов

№ п/п	Каротиноид	Структура	μ, D
1	α -Каротин		0,48
2	β -Каротин		0,27
3	13-цис- β -Каротин		0,32
4	β -Криптоксантин		1,77
5	β -апo-8'-Каротиналь		4,85
6	γ -Каротин		0,70
7	Антраксантин		2,98
8	Астаксантин		5,16
9	Виолаксантин		4,02
10	Газаниаксантин		2,22
11	Зеаксантин		1,71
12	Изозеаксантин		2,50
13	Изокриптоксантин		2,05
14	Кантаксантин		3,48
15	Капсантин		3,89
16	Капсорубин		4,20
17	Крустаксантин		2,78
18	Ликопин		0,23
19	Лютеин		2,10

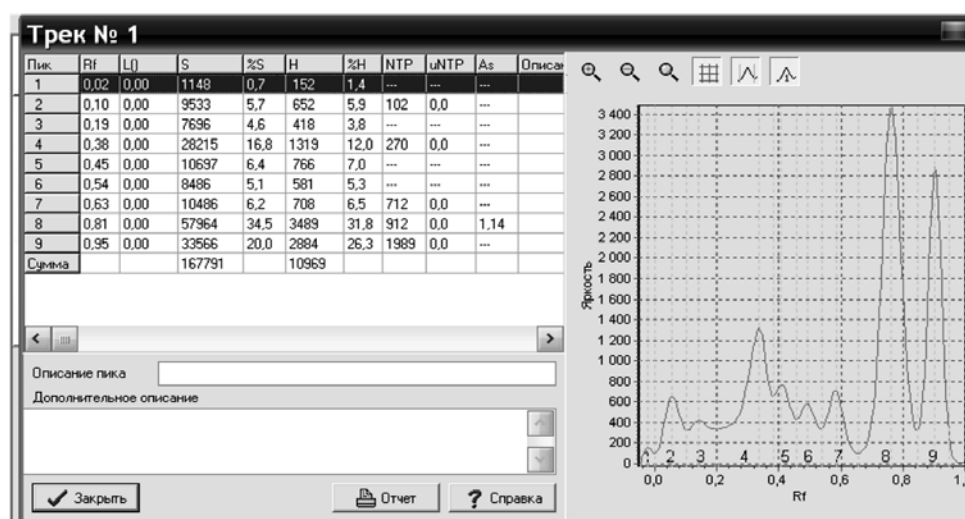
№ п/п	Каротиноид	Структура	μ, D
20	Торулин		0,78
21	Эхиноенон		3,70



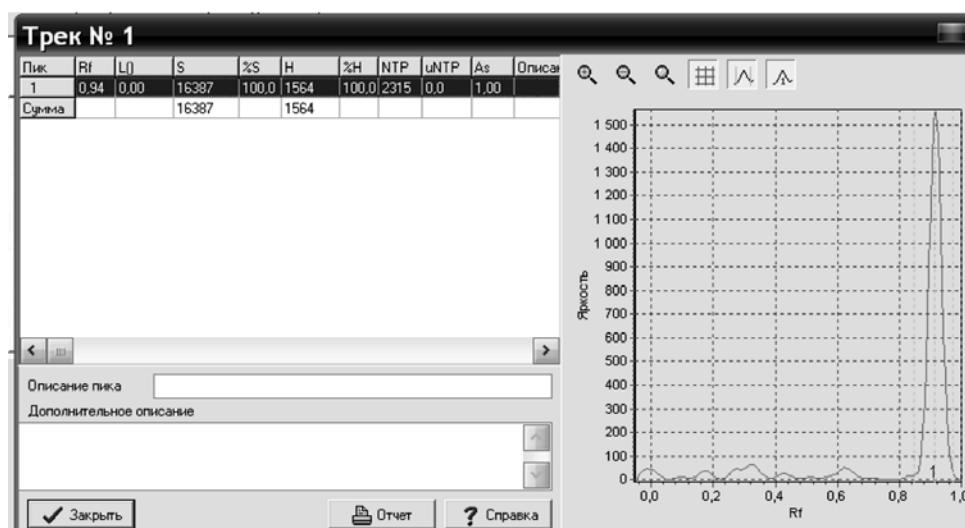
1



2



3



4

Рис. 5. Обработка изображения хроматограммы программой "Сорбфил денситометр". 1 и 2 — хроматограммы анализируемой смеси и стандарта, 3 и 4 — результаты расчетов, соответственно.

$A_{1\text{см}}^{1\%} = 2464$. Аналогичная рекомендация дана в [17], а именно предлагается использовать длину волны 450 нм и $A_{1\text{см}}^{1\%} = 2500$. Учитывая оценочный характер этих измерений, все 3 метода представляются одинаково разумными.

В работе [22] предложен метод спектрофотометрического определения β -каротина в плазме крови и в препарате “Каровит”, содержащем 6 мг β -каротина в 1 таблетке. Анализ проведен 3 способами — просто по спектрам поглощения и по первым и вторым производным. Судя по полученным авторами количественным результатам, использование производных в данном случае нецелесообразно, поскольку не повышает точность анализа.

Тонкослойная хроматография

В течение многих лет тонкослойная хроматография (ТСХ) являлась эффективным аналитическим методом анализа каротиноидов и сохраняет это положение в настоящее время. До 70-х гг. прошлого века ТСХ оставалась качественным и полуквантитативным методом. Однако к настоящему времени она превратилась в эффективный инструмент количественного анализа, не лишенный некоторых недостатков, но имеющий и определенные преимущества перед более широко используемой ВЭЖХ. Такой прогресс ТСХ — результат разработки и применения сканирующих денситометров, видеоденситометров и программ обработки изображений хроматограмм, позволяющих проводить их количественный анализ. Анализ каротиноидов этим методом в том или ином объеме рассмотрен в ряде монографий [23 – 28] и в периодической литературе [29 – 36].

Следует отметить, что, согласно большинству авторов, ТСХ является эффективным методом качественного и количественного анализа каротиноидов. Однако некоторые полагают, что она служит просто дополнением к ВЭЖХ, позволяя проводить лишь быстрый качественный анализ [23], так как возможность окисления кислородом воздуха на открытых пластинках препятствует получению достоверных количественных данных [37]. При этом совершенно не учитывается развитие современных методов проведения ТСХ (автоматизации нанесения образцов на пластинки, методов элюирования, в том числе многоступенчатого изократического или градиентного, а также двухмерного), регистрации и количественной обработки хроматограмм) [27, 28, 38], которые привели к превращению ТСХ и, особенно, высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) в эффективный метод качественного и количественного анализа [32, 39]. Сегодня этот метод характеризуется возможностью одновременного анализа значительного количества образцов (например, до 72 на 1 пластинке [28, с. 18]), быстротой, высокой чувствительностью для большинства каротиноидов [27, 28, 32] и широкими возможностями качественного и количественного определения, обеспечиваемыми сочетанием с диодно-матричной спектрофотометрией, ИК-Фурье-, ЯМР- и масс-спектрометрией [39 – 42].

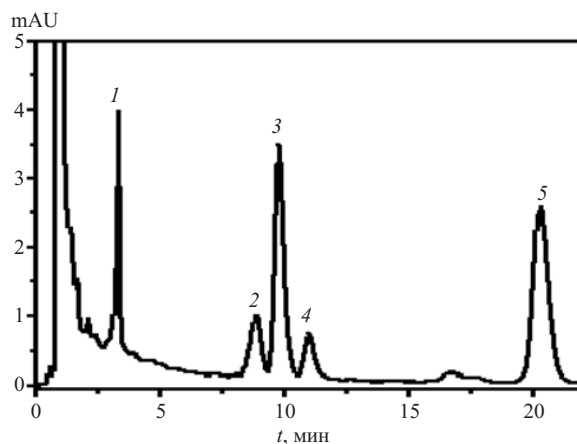


Рис. 6. Хроматограмма раствора “Лютеин Форте” серии 091011. Элюент ацетонитрил — диоксан — вода (88:7:5), $\lambda = 285$ нм, колонка Сепарон C_{18} 5 мкм, $100 \times 4,6$ мм. 1 — ретинилацетат, 2 — β -криптоксантин, 3 — лютеин, 4 — зеаксантин, 5 — токоферилацетат.

В литературе приведены подробные сведения о неподвижных фазах (НФ) и составе элюентов для разделения каротинов и ксантофиллов. Свойства различных НФ детально рассмотрены в [28]. В [27] суммируются сведения о разделении каротиноидов различного строения на силикагеле и на основных сорбентах (MgO , $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$, и $ZnCO_3$), в том числе перечислены рекомендуемые элюенты для различных каротиноидов. В [42, 43] описаны методы разделения каротиноидов на C_{18} -ВЭТСХ пластинках и приведен состав элюентов: метанол — гексан, метанол — ацетон, метанол — ацетон — тетрагидрофуран (ТГФ). Рекомендуется проводить предварительное элюирование смесью метанол — дихлорметан (1:1) с добавкой антиоксиданта и для предотвращения окислительной деструкции каротиноидов использовать основной элюент, также содержащий антиоксиданты (бутилоксилолуол или *трет*-бутилгидрохинон). В этой связи необходимо указать, что по нашим данным [44] наиболее эффективно окислительную деструкцию плёнок полиенов (0,2 – 0,5 мкм [44, 45]) тормозит синергическая смесь *трет*-бутилоксилолуол (БОТ) — *трет*-бутилоксианизол (БОА) с мольной долей БОА около 0,6. Можно полагать поэтому, что при ТСХ-анализе каротиноидов не в инертной атмосфере наиболее эффективной будет такая смесь антиоксидантов БОТ и БОА.

В [27] приведены данные о порядке увеличения адсорбционного сродства и, соответственно, уменьшения R_f на силикагеле G для различных соединений от каротинов (углеводородов) до гликозидов каротиноидов. Это увеличение адсорбционного сродства (уменьшение R_f) происходит в ряду каротины (углеводороды) — моноэпоксиды — диэпоксиды ... — моно- и диметокси-... — монокето-... — альдегиды ... — моногидрокси-... — дикето-... — дигидрокси-, три- и тетрагидроксикаротиноиды и гликозиды каротиноидов; кратко обсуждается ТСХ на обращенной фазе, в том числе упоминается отсутствие прямой зависимости между полярностью каротиноида и значением R_f .

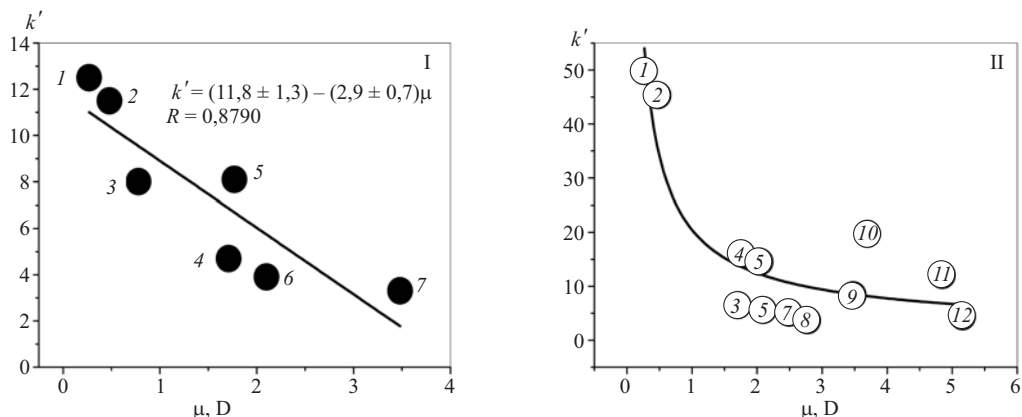


Рис. 7. Зависимости коэффициента ёмкости от дипольного момента при разделении каротиноидов. I [54] — колонка Zorbax ODS $250 \times 4,6$ мм, 7 мкм. Элюент $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (80:20). 1 — β -Каротин; 2 — α -каротин; 3 — торулин; 4 — зеаксантин; 5 — β -криптоксантин; 6 — лютеин; 7 — кантаксантин. II [72] — колонка Nova-Pak C_{18} $300 \times 3,9$ мм, 4 мкм. Элюент $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (71:22:4:2:1). 1 — β -Каротин; 2 — α -каротин; 3 — зеаксантин; 4 — β -криптоксантин; 5 — изокриптоксантин; 6 — лютеин; 7 — изозеаксантин; 8 — крустаксантин; 9 — кантаксантин; 10 — эхиненон; 11 — β -*ано*-8'-каротин; 12 — астаксантин.

Между тем легко показать, что такая зависимость существует для ТСХ каротиноидов как на полярных, так и на неполярных (C_{18}) сорбентах. Получены линейные зависимости R_f на силикагеле (рис. 3) и обращённой фазе (рис. 4) от дипольных моментов разделяемых каротиноидов, значения R_f — из [32 и 30], соответственно. Дипольные моменты рассчитаны в приближении AM1 по программе HyperChem v. 7.52 (табл. 4).

Видно, что при хроматографировании как на прямой, так и на обращённой фазе соблюдается линейная

зависимость R_f от дипольного момента сорбата. При этом, однако, на R_f влияют и особенности структуры сорбата [27], что наглядно иллюстрируют данные рис. 4.

А именно, на прямую I (большие значения R_f) ложатся точки, соответствующие соединениям с 2 ОН-группами, а на прямую II — с одной (см. табл. 4; точки 1 и 7 соответствуют неполярным соединениям, входящим в общий список [30]). Это разделение на 2 группы объяснимо, т.к. использован полярный элюент, содержащий CH_3OH .

Таблица 5

Элюенты при ВЭЖХ-анализе каротиноидов в различных режимах

№ п/п	Каротиноиды	Колонка	Режим элюирования	Элюент	Литература
1	α - и β -каротин и ксантофиллы	Zorbax ODS	Изократика	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (70:20:10)	[54]
2	α - и β -каротин, лютеин, зеаксантин, β -криптоксантин	Vydac C_{18}		$\text{CH}_3\text{CN}:1,2\text{-C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (60: 5: 35)	[55]
3	кантаксантин, β -криптоксантин, α -каротин, β -каротин, γ -каротин	Vydac 201TP54 (C_{18})		$\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (90:10)	[56]
4	9-, 9'-, 13-, 13'- <i>цис</i> - и <i>all-транс</i> -лютеин 9- и 13- <i>цис</i> - и <i>all-транс</i> -зеаксантин	YMC C_{30}		$(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{H}_2\text{O}$ (82:18)	[57]
5	β -каротин, кантаксантин, зеаксантин	Nucleosil 100 – 5		$\text{C}_6\text{H}_{14}:(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (4:1)	[50]
6	Изомеры кантаксантина	CPMicrospher Si		$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (99,55:0,45)	[58]
7	Изомеры зеаксантина	Spherisorb S5W silica B		$\text{CH}_2\text{Cl}_2:(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{OH}):(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{NC}_2\text{H}_5$ (90,9:6,5:2,5:0,1)	[59]
8	α - и β -каротин, β -крипто- и зеаксантин, ликопин, лютеин, эхиненон	Supelco LC PAN C_{18}	Градиент	$\text{CH}_3\text{OH}; \text{CH}_3\text{CN}; \text{CH}_3\text{CN}:\text{ТГФ}$ или $\text{CH}_3\text{OH}:\text{ТГФ}$	[60]
9	25 каротиноидов	YMC C_{30}		А — $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (84:14:2), В — CH_2Cl_2	[61]
10	34 каротиноида	YMC C_{30} 17 °С		$\text{CH}_3\text{OH}:(\text{CH}_3)_3\text{COCH}_3:\text{H}_2\text{O}$ линейный градиент	[62]
11	Лютеин, зеаксантин, β -криптоксантин, 13- <i>цис</i> -лютеин, 9- <i>цис</i> -лютеин, 9'- <i>цис</i> -лютеин и др., всего 44 каротиноида	ProntoSIL C_{30} 19 °С		А — CH_3OH , В — $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{OH}):\text{C}_6\text{H}_{14}$ (50:50)	[63]
12	12 каротиноидов, в том числе 9 и 13- <i>цис</i> -изомеры ликопина и β -каротина	Nucleodur ISIS C_{18} , 1,8 мкм, $50 \times 4,6$ мм или Nucleosil C_{18} , 3 мкм, $250 \times 4,6$ мм		$\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ или $(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{H}_2\text{O}$	[64]

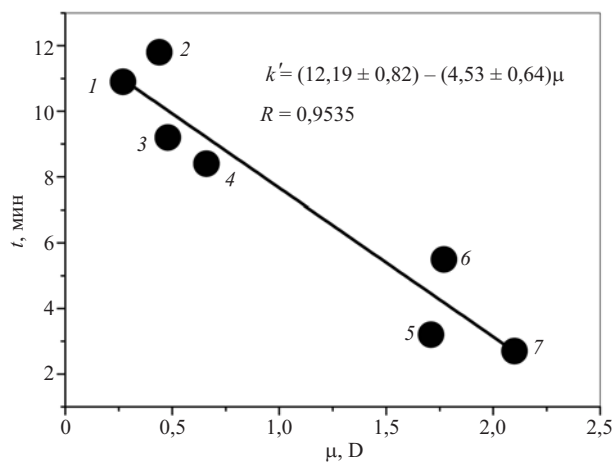


Рис. 8. Зависимость времени удерживания от дипольного момента сорбата при СФХ каротиноидов (по данным [74]). Колонка Ultrabase UB 225 (ODS) 250 × 4,6 мм, 5 мкм. Элюент CH₃CN:CH₃OH:CO₂ (33,25:1,75:65), 25 °С, P = 15 МПа. 1 — β-Каротин; 2 — α-каротин; 3 — γ-каротин; 4 — 13-цис-β-каротин; 5 — зеаксантин; 6 — лютеин; 7 — β-криптоксантин.

Что касается детектирования, то большинство каротиноидов легко детектируется без проявления благодаря интенсивной окраске. Это позволяет использовать для их анализа наиболее простой, но достаточно точный метод программной обработки изображений хроматограмм, полученных на обычных сканерах [38]. Такая обработка может быть проведена на любых изображениях хроматограмм.

Для иллюстрации возможностей такой обработки, которая может быть проведена через произвольный промежуток времени после получения хроматограммы, на рис. 5 приведены результаты обработки хроматограммы каротиноидов красного перца [32, рис. 2]. Очевидно, что этот метод позволяет проводить качественный и количественный анализ каротиноидов при наличии соответствующих стандартов. Особенно привлекательны простота и дешевизна этого метода, не требующего использования после получения хроматограммы никакого специального оборудования. Конечно, для решения сложных задач идентификации и количественного определения используются другие эффективные методы. Применение вместо сканирующих денситометров диодно-матричной денситометрии хроматограмм резко снижает продолжительность анализа (30 с и менее на трек [46]). Кроме того, такие сканеры в сочетании с оптоволоконной оптикой позволяют одновременно с хроматограммой регистрировать спектры обнаруженных соединений в диапазоне 191 – 1033 нм [39, 40] и проводить сравнение этих спектров с библиотечными, обеспечивая надёжность идентификации и количественного определения. При этом возможна регистрация трехмерных изображений хроматограмм, облегчающих анализ и интерпретацию полученных данных.

Помимо детекторов, использующих УФ и видимую область спектра, в ТСХ всё шире применяются ИК-Фурье [39, 47, 48], ЯМР [39] и масс-спектроскопи-

ческие [40] детекторы. С использованием всех этих методов ТСХ позволяет решать самые сложные задачи в области анализа, в том числе образцов, содержащих каротиноиды.

Наконец, интересные возможности открывает применение в ТСХ пламенно-ионизационных детекторов (ПИД). В серийно выпускаемых приборах Иатроскан (Iatroskan) различных модификаций разделение компонентов анализируемых образцов происходит в тонком слое сорбента (силикагеля или окиси алюминия) на поверхности кварцевого стержня (Chromarod). Возможно одновременное получение 10 хроматограмм (на 10 стержнях). После проявления и сушки стержни протягиваются через ПИД, полученные сигналы регистрируются и обрабатываются компьютером. Стержни Chromarod регенерируются и могут быть повторно использованы до 150 раз. Результаты применения этого метода для разделения смеси 5 каротиноидов (β-каротина, кантаксантина, лютеина, виолаксантина и неоксантина) приведены в [49].

ВЭЖХ

Несмотря на значительные успехи в совершенствовании ТСХ, основным методом анализа (качественного и количественного) каротиноидов в сложных системах в настоящее время является ВЭЖХ. Опубликованные в литературе соответствующие сведения также получены этим методом. Это в значительной мере объясняется тем, что основными объектами исследования в этой области были и по-прежнему остаются природные источники, сложный состав которых требует применения наиболее эффективных и разработанных методов анализа. Этим требованиям в наибольшей степени удовлетворяет ВЭЖХ, так как все перечисленные выше возможности применения диодно-матричных, ИК-Фурье-, ЯМР и масс-спектрометрических методов в ТСХ разработаны недавно и ещё недостаточно широко распространены.

В обзоре [50] приведено подробное обсуждение условий разделения различных каротиноидов (каротинов и ксантофиллов) на прямой и обращённой фазах с использованием изократического и градиентного элюирования. Интересно отметить, что, если ранее значительная часть анализов проводилась с применением изократики, то в дальнейшем стал использоваться только градиент. В этом отношении показательно сравнение литературы, цитированной в обзорах [5, 50 – 52].

При обсуждении ВЭЖХ-анализа каротиноидов необходимо иметь в виду, что конечной целью создания практически всех методик всегда был и остаётся анализ сложных природных объектов. При анализе содержащих каротиноиды ЛС и БАД задача существенно упрощается, так как нет необходимости в специальной обработке исходного материала (см. [5] и др.), и для её решения, безусловно, целесообразно воспользоваться уже существующими разработками. Как справедливо отмечено в [50], системы, разработанные для разделения близких по строению каротинов, ксантофиллов лютеина и зеаксантина, геометрических и оптических

изомеров, применимы для анализа самых различных смесей каротиноидов и экстрактов из природных образцов. Возможно, конечно, и применение нестандартных систем [53]. В опубликованных таблицах [5, 50–52] перечислены многочисленные примеры ВЭЖХ-анализа каротиноидов с применением изократического и градиентного режимов на прямой и обращённой фазе. Представляет однако несомненный интерес разделение имеющихся данных по способам элюирования и сравнение полученных результатов. В табл. 5 приведены некоторые примеры состава элюентов, использованных при анализе смесей каротиноидов отдельно в изократическом и градиентном режимах на прямой и обращённой фазах.

Приведенные в табл. 5 примеры показывают, что на современном оборудовании возможны разделение и идентификация практически всех каротиноидов как в градиентном, так и в изократическом режимах. При этом состав элюента не играет особой роли и, по нашему мнению, определяется, главным образом, предпочтениями экспериментатора. Это подтверждают полученные нами результаты анализа препарата под названием “Лютеин Форте” (рис. 6) [53].

Видно, что даже при использовании нестандартного состава элюента (диоксан) удаётся эффективно разделить пики близких по структуре каротиноидов в изократическом режиме.

Подробное обсуждение состава элюентов, используемых при ВЭЖХ-анализе каротиноидов, приводится в обзорах [37, 50]. Как отмечено в [37], большинство анализов проведено на колонках размером $250 \times 4,6$ мм с сорбентом C_{18} (см. также [50]), хотя в последнее время всё чаще используется сорбент C_{30} [5]. Применяются также сшитые (полимерные) фазы C_{18} , более короткие колонки (см. [53]), укороченные колонки с внутренним диаметром $< 4,6$ мм, в том числе ультра-ВЭЖХ колонки [5]. В [60] показано, что на полимерном C_{18} -сорбенте достигается разделение лютеина и зеаксантина в изократическом режиме. На C_{30} эффективно разделяются *транс*- и *цис*-изомеры ксантофиллов как в изократическом, так и в градиентном режимах [57, 65, 66].

В большинстве опубликованных работ использованы спектрофотометрические детекторы, в том числе диодно-матричные [5, 37, 50, 66]. Однако для подтверждения структуры компонентов анализируемых смесей и их детального структурного анализа широко используют ЯМР- [67–70] и масс-спектроскопические (МС) детекторы [5, 37, 51, 71].

Как и в ТСХ, параметры удерживания зависят от полярности сорбата. Конечно, соответствующие зависимости могут быть построены только по данным, полученным для хроматографирования в изократическом режиме. На рис. 7 приведены зависимости коэффициента ёмкости от дипольного момента для обращённофазного изократического разделения каротиноидов на сорбентах C_{18} с использованием принципиально различных элюентов.

Видно, что при использовании элюента, не образующего Н-связей с сорбатом (рис. 7, I), k' линейно уменьшается с ростом полярности сорбата. Когда же элюент содержит соединения, способные образовывать прочные Н-связи с гидроксил- и карбонилсодержащими молекулами сорбата (рис. 7, II), зависимость k' от μ становится более сложной, хотя общая тенденция сохраняется.

Сверхкритическая флюидная хроматография

Согласно [73], первая работа по сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) каротиноидов была опубликована в 1968 г. С тех пор этот метод, несмотря на его многие положительные стороны, не пользовался достаточным вниманием аналитиков, занимающихся анализом каротиноидов. Тем не менее опубликован ряд работ, демонстрирующих возможность более быстрого и эффективного разделения и анализа каротиноидов, ксантофиллов и их смесей с помощью СФХ, чем при использовании ВЭЖХ [74–78].

Как и следовало ожидать, при разделении каротиноидов методом СФХ, полярность сорбата также влияет на параметры разделения (рис. 8)

Зависимости, приведенные на рис. 3, 4, 7 и 8, несомненно, выражают определённые закономерности и представляют интерес с точки зрения эмпирической оценки возможности разделения и анализа смесей различных каротиноидов, в том числе при разработке конкретных методик. К сожалению, найденные ранее теоретические зависимости k' от μ получены на основе сильно упрощённых моделей [79–81], а в более поздних фундаментальных работах [82] эта проблема просто не рассматривается.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Carotenoids*, O. Isler (ed.), Springer, Basel (1971).
2. O. Straub, *Key to Carotenoids*, Birkhäuser, Basel (1987).
3. C. H. Eugster, *History: 175 years of carotenoid chemistry; in: Carotenoids*, v. 1A: *Isolation and Analysis*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.), Birkhäuser, Basel, Switzerland (1995), pp. 1–12.
4. G. Britton, *UV / Visible Spectroscopy*, in: *Carotenoids*, v. 1B: *Spectroscopy*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.), Birkhäuser, Basel (1995), pp. 13–62.
5. K. T. Amorim-Carrilho, A. Cepeda, C. Fente, P. Regal, *Trends Anal. Chem.*, **56**, 49–73 (2014).
6. D. B. Rodriguez-Amaya, *A guide to carotenoid analysis in foods*, ILSI PRESS, Washington, D. C. (2001).
7. D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura, *Harvest Plus Handbook for Carotenoid Analysis*, ILSI PRESS, Washington, D. C. (2004).
8. R. E. Kopeck, J.L. Cooperstone, M. J. Cichen, S. G. Schwartz, *Analysis Methods of Carotenoids*, in: *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*, Z. Xu, L. R. Howard (eds.), John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate (2012), pp. 105–148.
9. *Аналитическая химия. Проблемы и подходы*, т. 2, Р. Кельнер, Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г. М. Видмер (ред.), перевод под редакцией Ю. А. Золотова, Мир, Москва (2004), сс. 596–638.
10. ОФС.1.2.3.00017.15. Методы количественного определения витаминов (проект), Государственная фармакопея РФ, XIII изд., т. 1, Москва (2015), сс. 798–811.
11. USP 32-NF27

12. Beta_Carotene, Revision Bulletin, Official December, 1 (2012).
13. Betacarotene, in: EP 6.0, v. 2, 1290 (2008).
14. Betacarotene, in: BP (2009).
15. D. Horn, E. Luddecke, *Preparation and characterization of nano-sized carotenoid hydrosols*, in: *Fine Particles Science and Technology: From Micro to Nanoparticles*, Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, Acquafredda di Maratea, Italy, July 15 – 21 (1995); E. Pelizzetti (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London (1996), pp. 761 – 775.
16. A. N. Macpherson, T. Gillbro, *J. Phys. Chem. A*, **102**(26), 5049 – 5058 (1998).
17. K. J. Scott, *Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry*, F2.2.1-F2.2.10, in: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons (2001), p. 740.
18. B. D. Ribeiro, R. G. de Oliveira. *Carotenoids as Colorants*, in: *Natural Products Phytochemistry. Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, K. G. Ramawat, J.-M. Mérillon (eds.), Springer, NY (2013), pp. 4017 – 4036.
19. E. Biehler, F. E. Mayer, L. Hoffmann, et al., *J. Food Sci.*, **75**(1), 55 – 61 (2010).
20. A. V. Rao, L. G. Rao, *Pharmacol. Res.*, **55**, 207 – 216 (2007).
21. *The MERCK Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman (eds.), 11th Ed., Rahway, Merck Co., Inc., N. J. (1996).
22. F. Demirkaya, Y. Kadioglu, O. Senol, *Reviews in Analytical Chemistry, Special Issue*, **29**(3 – 4), 149 – 168 (2010).
23. A. B. Barua, H. C. Furr, J. A. Olson, R. B. van Breemen, *Vitamin A and Carotenoids*, in: *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, A. P. De Leenheer, W. E. Lambert, J. F. Van Bocxlaer (eds.), Marcel Dekker, NY (2000), pp. 13 – 86.
24. G. W. Francis, Ø. M. Andersen, *Natural Pigments. Carotenoids*, in: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 3rd ed., Marcel Dekker, NY (2003), pp. 708 – 714.
25. B. Fried, J. Sherma, *Thin-Layer Chromatography*, Fourth Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, NY (1999).
26. K. Schiedt, *Chromatography*, Part III, *Thin-Layer Chromatography*, in: *Carotenoids*, v. 1A, *Isolation and Analysis*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.), Birkhäuser, Basel (1995), pp. 131 – 144.
27. G. Britton, *TLC of Carotenoids*, in: *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, M. Waksmondzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (eds.), CRC Press, NY (2008), pp. 543 – 573.
28. В. Д. Красиков, *Основы планарной хроматографии*, Химиздат, Санкт-Петербург (2005).
29. S. W. Jeffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 271 – 285 (1968). (Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae).
30. M. Isaksen, G. W. Francis, *J. Chromatogr.*, **355**, 358 – 362 (1986).
31. G. W. Francis, M. Isaksen, *J. Food Sci.*, **53**(3), 979 – 980 (1988).
32. A. Zeb, M. Murkovic, *J. Planar Chromatogr.*, **23**(2), 94 – 103 (2010).
33. A. Zeb, M. Murkovic, *J. Planar Chromatogr.*, **23**(1), 35 – 39 (2010).
34. M. Isaksen, G. W. Francis, *Chromatographia*, **29**(7/8), 363 – 365 (1990).
35. A. J. R. Romero, J. C. Herrera, E. M. De Aparicio, E. A. M. Cuevad, *J. Chromatogr. A*, **667**, 361 – 366 (1994).
36. B. Yuangsoi, O. Jintasatoporn, N. Areechon, et al., *J. Sci. Technol.*, **30**(6), 693 – 700 (2008).
37. Machmudah M. Goto, *Methods for Extraction and Analysis of Carotenoids*, in: *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, K. G. Ramawat, J.-M. Mérillon (eds.), Springer, NY (2013), pp. 3367 – 3411.
38. A. V. I. Hess, *J. Chem. Educ.*, **84**(5), 842 – 847 (2007).
39. T. Tuzimski, *Basic Principles of Planar Chromatography and Its Potential for Hyphenated Techniques*, in: *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, M. M. Srivastava (ed.), Springer, Berlin (2011), pp. 247 – 310.
40. T. Tuzimski, *Advanced Spectroscopic Detectors for Identification and Quantification: UV-Visible, Fluorescence, and Infrared Spectroscopy*, in: *Instrumental Thin-Layer Chromatography*, C. F. Poole (ed.), Elsevier, Amsterdam, London (2015), pp. 239 – 248.
41. S. Cheng, J. Shiea, *Advanced Spectroscopic Detectors for Identification and Quantification: Mass Spectrometry*, in: *Instrumental Thin-Layer Chromatography* / C. F. Poole (ed.), Elsevier Amsterdam, London (2015), pp. 249 – 277.
42. I. Vovk, V. Glavnik, *Analysis of Dietary Supplements*, in: *Instrumental Thin-Layer Chromatography*, C. F. Poole (ed.), Elsevier Amsterdam, London (2015), pp. 606 – 610.
43. Z. Rodić, B. Simonovska, A. Albreht, I. Vovk, *J. Chromatogr. A*, **1231**, 59 – 65 (2012).
44. Е. И. Финкельштейн, Н. А. Медникова, Э. В. Алексеев, Э. И. Козлов, *Хим.-фарм. журн.*, **11**(1), 106 – 111 (1977); *Pharm. Chem. J.*, **11**(1), 100 – 104 (1977).
45. I. S. Krasnokutskaya, E. I. Finkelshtein, *J. Molec. Struct.*, **349**, 313 – 316 (1995).
46. B. Spangenberg, K.-F. Klein, *J. Chromatogr. A*, **898**, 265 – 269 (2000).
47. S. A. Stahlmann, *J. Planar Chromatogr. — Mod. TLC*, **12**(1), 5 – 12 (1999).
48. C. Cimpoiu, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **28**(7 – 8), 1203 – 1213 (2005).
49. A. J. R. Romero, J. C. Herrera, E. M. De Aparicio, E. A. M. Cuevas, *J. Chromatogr. A*, **667**, 361 – 366 (1999).
50. H. Pfander, R. Riesen, *Chromatography*, Part IV, *High-Performance Liquid Chromatography*, in: *Carotenoids*, V. 1A, *Isolation and Analysis*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.), Birkhäuser, Basel, Switzerland (1995), pp. 145 – 190.
51. R. F. Taylor, P. E. Farrow, L. M. Yelle, et al., *Advances in HPLC and HPLC-MS of Carotenoids and Retinoids*, in: *Carotenoids. Chemistry and biology*, N. I. Krinsky, M. M. Mathews-Roth, R. F. Taylor (eds.), Plenum Press, NY (1990), pp. 105 – 123.
52. S. M. Rivera, R. Canela-Garayoa, *J. Chromatogr. A*, **1224**, 1 – 10 (2012).
53. Е. И. Финкельштейн, Е. А. Белозерцева, Е. В. Трифонова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **47**(6), 39 – 43 (2013); *Pharm. Chem. J.*, **47**(6), 325 – 329 (2013).
54. H. J. C. F. Nells, A. P. De Leenhee, *Anal. Chem.*, **55**(2), 270 – 275 (1983).
55. A. M. Pupin, M. J. Dennis, M. C. F. Toledo, *Food Chem.*, **64**, 269 – 275 (1999).
56. R. J. Bushway, *J. Liquid Chromatogr.*, **8**(8), 1527 – 1547 (1985).
57. R. Aman, J. Biehl, R. Carle, et al., *Food Chem.*, **92**, 753 – 763 (2005).
58. H. J. C. F. Nelis, M. M. Z. van Steenberge, M. F. Lefevere, A. P. de Leenheer, *J. Chromatogr.*, **353**, 295 – 302 (1986).
59. G. Englert, K. Noack, E. A. Broger, et al., *Helv. Chim. Acta*, **74**, 969 – 982 (1991).
60. K. S. Epler, L. C. Sander, R. G. Ziegler, et al., *J. Chromatogr.*, **595**, 89 – 101 (1992).
61. T. H. Kao, C. H. Loh, B. S. Inbaraj, B. H. Chen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **66**, 144 – 153 (2012).
62. A. J. Meléndez-Martínez, M. L. Escudero-Gilete, I. M. Vicario, F. J. Heredia, *Food Res. Int.*, **43**, 1289 – 1296 (2010).
63. A. Gentili, F. Caretti, S. Ventura, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **63**(33), 7428 – 7439 (2015).
64. H. G. Daood, G. Bencze, G. Palotés, et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **52**(9), 985 – 991 (2014).
65. L. C. Sander, K. E. Sharpless, M. Pursch, *J. Chromatogr. A*, **880**, 189 – 202 (2000).
66. I. F. Strati, V. J. Sinanoglou, L. Kora, et al., *Foods*, **1**, 52 – 65 (2012).
67. T. Glaser, K. Albert, *Hyphenation of Modern Extraction Techniques to LC-NMR for the Analysis of Geometrical Carotenoids*

- Isomers in Functional Food and Biological Tissues*, in: *On-Line LC-NMR and Related Techniques*, Wiley, Atrium (2002), pp. 129 – 140.
68. M. Dachtler, T. Glaser, K. Kohler, K. Albert, *Anal. Chem.*, **73**(3), 667 – 674 (2001).
69. C. Tode, T. Maoka, M. Sugiura, *J. Sep. Sci.*, **32**(21), 3659 – 3663 (2009).
70. C. Tode, M. Sugiura, *LC-NMR for the Analysis of Carotenoids in Foods*, in: *Vitamin A and Carotenoids Chemistry, Analysis, Function and Effects*, V. R. Preedy (ed.), RSC, Cambridge (2012), pp. 250 – 260.
71. C. Tode, M. Sugiura, *LC-NMR for the Analysis of Carotenoids in Foods*, in: *Vitamin A and Carotenoids Chemistry, Analysis, Function and Effects*, V. R. Preedy (ed.), RSC, Cambridge (2012), pp. 269 – 281 и 282 – 302.
72. A. Guillou, G. Chouberff, J. de la Nolle, *Food Chem.*, **476**, 93 – 99 (1993).
73. H. Pfander, U. Niggli, *Chromatography, Part V, Supercritical-Fluid Chromatography*, in: *Carotenoids*, v. 1A, *Isolation and Analysis*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, Pfander, H., (eds.), Birkhäuser, Basel, Switzerland (1995), pp. 191 – 198.
74. E. Lesellier, *J. Chromatogr. A*, **936**, 201 – 214 (2001).
75. V. Abrahamsson, I. Rodriguez-Meizoso, C. Turner, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 63 – 68 (2012).
76. J. L. Bernal, M. T. Martín, L. Toribio, *J. Chromatogr. A*, **1313**, 24 – 36 (2013).
77. A. Matsubara, T. Uchikata, M. Shinohara, et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **113**(6), 782 – 787 (2012).
78. Y. Wada, A. Matsubara, T. Uchikata, et al., *J. Sep. Sci.*, **34**, 3546 – 3552 (2011).
79. C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **1**, 129 – 156 (1976).
80. C. Horvath, W. Melander, *J. Chromatogr. Sci.*, **15**(9), 393 – 404 (1977).
81. C. Horvath, W. Melander, I. Molnar. *Anal. Chem.*, **49**(1), 142 – 154 (1977).
82. J. Cazes, R. P. W. Scott, *Chromatography Theory*, Marcel Dekker, NY (2002), pp. x+475.

Поступила 22.10.15

MODERN METHODS OF ANALYSIS OF CAROTENOIDS

E. I. Finkelshtein

Folium Press, Moscow, 127238 Russia;
e-mail: evgfink@yandex.ru

Qualitative and quantitative methods used for determining carotenoids in medicinal preparations, dietary supplements, and food products are reviewed and discussed. The use of UV-Vis spectrophotometry, thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), and supercritical fluid chromatography (SFC) for this purpose is considered and the importance of combined techniques employing IR, NMR and mass-spectrometric detectors is emphasized. Dependence of the parameters of chromatographic separation of carotenoids on the polarity (dipole moment) of sorbate in TLC, HPLC, and SFC is demonstrated for the first time.

Keywords: carotenoids; spectroscopy; TLC; HPLC; SFC; sorbate polarity.