

УДК 541.143

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАТУРАЛЬНЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ КАРОТИНОИДОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

© 2004 г. О.Б. Рудаков, Л.И. Перикова, В.М. Болотов, Г.А. Сташина*

*Воронежская государственная технологическая академия
Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Москва

Разработан алгоритм экспрессного хроматографического определения каротиноидов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ. Методика опробована на различных пищевых продуктах и растительном сырье.

По предложению М. С. Цвета к каротиноидам относят полиеновые углеводороды ряда тетратерпенов (C_{40} -соединения) со структурой из изопреновых единиц. Благодаря большому числу сопряженных двойных связей эти соединения поглощают свет в видимой области спектра и имеют окраску от желтого до красного цвета с интенсивной величиной молярного поглощения. Каротиноиды называются также липохромными красящими веществами, так как они жирорастворимы и содержатся в животных и растительных жирах. В зависимости от степени окисления каротиноиды делятся на каротины – ненасыщенные углеводороды и фитоксантины или ксантофиллы – кислородсодержащие каротиноиды. Фитоксантины содержат в своем составе гидрокси-, метокси-, карбокси-, кето- и эпокси группы. В растительном мире широко распространены углеводородные каротиноиды типа $C_{40}H_{56}$ (α -, β -, γ - каротины, ликопин), и фитоксантины с одной гидроксильной группой $C_{40}H_{56}O$ (криптоксантин), с двумя гидроксильными группами $C_{40}H_{56}O_2$ (зеаксантин, лютеин), с альдегидной группой $C_{30}H_{40}O_2$ (β -цитраин) и др. [1,2]. Ниже приведены типичные структуры каротиноидов (табл. 1).

Натуральный β -каротин ($C_{40}H_{56}$) в последнее время активно используется в качестве пищевой добавки, обладающей полезной биологической активностью и улучшающей внешний вид продуктов питания – соков, маргаринов, кондитерских и кулинарных изделий, придавая им приятную желтую или оранжевую окраску. Другие природные кислородсодержащие каротиноиды – ксантофиллы, также являются экологически безопасными пищевыми красителями, например, зеаксантин и лютеин ($C_{40}H_{56}O_2$), обуславливающие окраску кукурузы, яичного желтка и апельсинового сока. На кафедре органической химии ВГТА разработан способ модификации каротинсодержащих пигментов [8,9], заключающийся в частичном окислении в мягких условиях каротина или природных каротиноидов и получения красителя, состоящего на

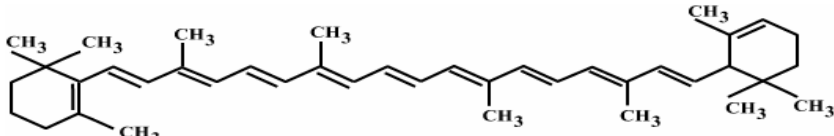
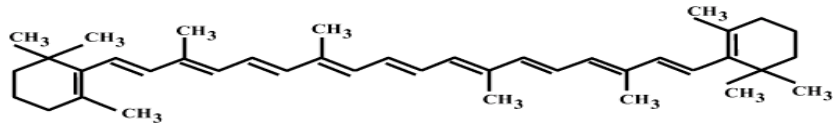
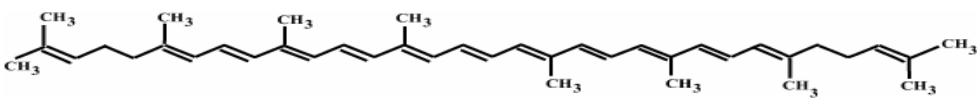
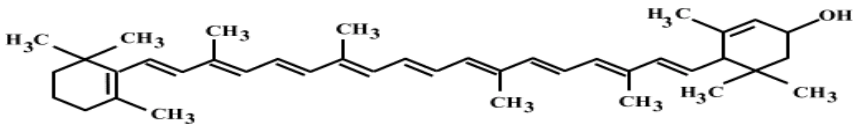
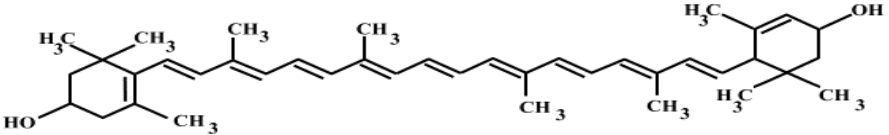
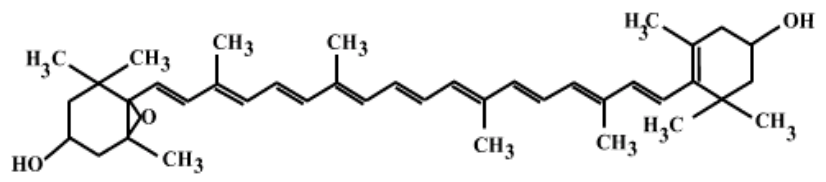
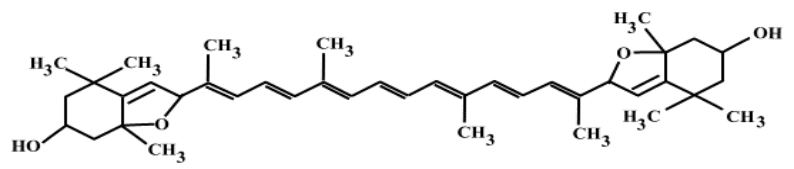
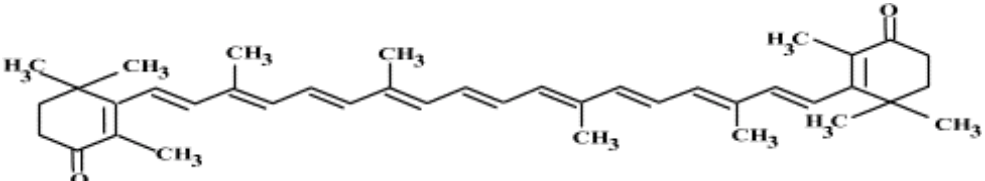
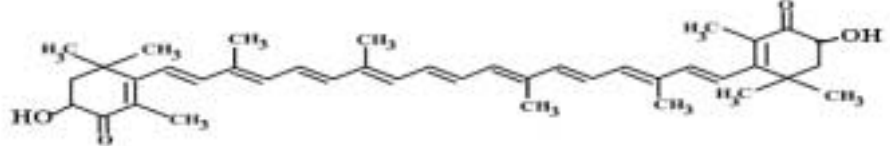
80-90% из исходных или изомеризовавшихся каротиноидов и на 10-20% из ксантофиллов, содержащих 1-4 атома кислорода ($C_{40}H_mO_n$, $m=52-56$, $n=1-4$), который обладает тем же набором потребительских свойств, как и природные ксантофиллы. Однако он более гидрофилен, чем β -каротин, что позволяет использовать его не только в непрозрачных соках, но и в винных напитках, ликеро-водочных изделиях, успешно прошли испытания этого красителя как добавки в мороженое. Модифицированный каротин получен экстракцией спиртом из измельченной моркови, или тыквы, подвергшихся сушке и аэрации при повышенной температуре. Процесс термоокислительной гидрофилизации необходимо контролировать методом ВЭЖХ. Применение спектрофотометрических методов не достаточно эффективно.

Поскольку каротин и продукты его окисления термически нестабильны, интенсивно поглощают в видимой области спектра, являются смесями сложного состава, их необходимо анализировать методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором. В связи с тем, что они плохо растворяются в водосодержащих растворителях (табл. 2), наиболее удобным является метод нормально-фазовой ВЭЖХ, так как и экстрагент, и подвижная фаза могут состоять из одинаковых растворителей, что упрощает пробоподготовку [3,4].

Каротиноидные соединения имеют электронные спектры поглощения с максимумами при 422-428, 444-450 и 472-484 нм (рис. 1) [1,5-7], поэтому контроль над суммарным содержанием каротиноидов принято осуществлять с помощью спектрофотометров. ВЭЖХ совмещает в себе преимущества хроматографического разделения и спектрофотометрического определения содержания различных фракций каротиноидов.

Нами разработана экспресс-методика, позволяющая быстро оценить содержание каротиноидов в растительных экстрактах и пищевых продуктах, основанная на методе ВЭЖХ. Актуальность разработки быстрой методики определения степени окисле-

Структура и гидрофобные свойства каротиноидов

Каротиноид, гидрофобность	Структура
α-каротин, H=40.0 logP=10.84	
β-каротин H=40.0 logP=10.68	
ликопин H=40.0 logP=11.11	
изокриптоксантин H=36.0 logP=9.74	
лютеин H=34.3 logP=8.51	
антраксантин H=33.1 logP=7.39	
ауроксантин H=32.0	
кантаксантин H=34.3 logP=8.16	
астаксантин H=32.0 logP=6.57	

Растворимость каротиноидов

(Р – растворимы; МР – малорастворимы, растворимы при нагревании; НР – нерастворимы)

Растворитель	Гексан	Бензол	Хлороформ	Этилацетат	Диоксан	Изопропанол	Ацетонирил	Метанол	Этанол - вода (4:6)	Вода
Каротины	Р	Р	Р	Р	Р	МР	МР	МР	НР	НР
Ксантофиллы	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	МР	МР	НР

ния каротина или доли ксантофиллов в каротинсодержащих продуктах обусловлена следующим: а) натуральные или искусственные каротиноиды – перспективные пищевые желтые красители и важной частью технологий их получения из экстрактов растений является аналитический контроль степени экстракции каротиноидов, или степени окисления каротина при его искусственном обогащении ксантофиллами; б) препараты β -каротина, как отмечалось выше, стали широко использоваться в качестве пищевых красителей с признаками БАД, однако в пищевых средах при хранении и горячей готовке отмечается его высокая чувствительность к кислороду и окислителям; в) в рамках гигиенического контроля над применением пищевых добавок при экспертизе и сертификации продуктов питания, в част-

ности при идентификации пищевых продуктов и продовольственного сырья нередко вскрываются факты фальсификации, вместо декларируемых относительно дорогих натуральных красителей, имеющих положительную биологическую активность и пищевую ценность, могут быть использованы синтетические красители, например, тартразин вместо каротина; дорогое облепиховое масло фальсифицируют дешевым масляным экстрактом термически обработанной моркови, и т.п. Для идентификации каротиноидов в настоящее время используют грубую и неточную методику – каротинсодержащий продукт кипятят со щелочью, если желтая окраска исчезла, раствор стал бурым, это означает, что продукт не фальсифицирован, т. е. в нем содержится натуральный желтый краситель.

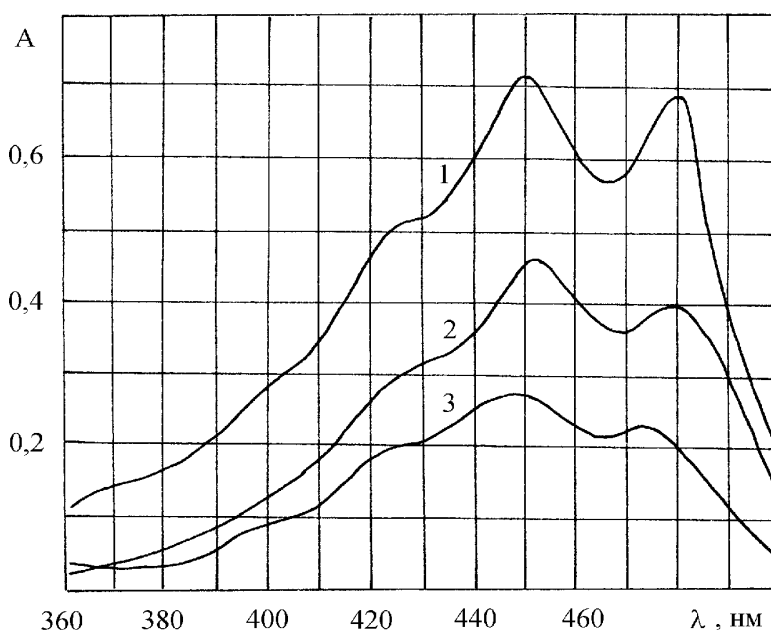


Рис. 1. Электронные спектры поглощения каротиноидных соединений корнеплодов моркови в различных органических растворителях: 1 – раствор природных гидрофильных каротиноидов в этаноле; 2 – раствор природных гидрофобных каротиноидов в этилацетате; 3 – раствор каротиноидов в этаноле после реакции термоокисления при $t = 100$ °С и времени реакции $\tau = 0,5$ ч.

Методики анализа и контроля качества пищевой продукции должны быть экспрессивными, селективно чувствительными и информативными, иметь по возможности простую пробоподготовку, выполняться на стандартном оборудовании, рекомендуемом Международной организацией по стандартизации (ИСО). Этим требованиям может отвечать методика анализа с использованием метода ВЭЖХ. Этот метод за последние 15 лет основательно внедрен в практику биотехнологических, биохимических, фармацевтических исследований. Он применяется при сертификации продукции за рубежом, появляется все большее число отечественных аттестованных и включенных в ТУ и ГОСТ методик. ВЭЖХ позволяет анализировать до 80% природных и синтетических органических соединений.

Оптимизацию методики проводили на хроматографе фирмы "Лабораторни пржистрое" (Чехия) со стеклянными колонками диаметром 3.3 мм, длиной 150 мм, заполненными сорбентом Сепарон CN и Сепарон SGX (размер частиц 5-7.5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали смеси растворителей изопропанол – гептан (соотношение объемов 2:98), изопропанол – гексан (0.1:99.9 или 1:99). Растворители для подвижной фазы предварительно перегоняли, фильтровали через мелкопористый фильтр Шотта для удаления механических примесей. Оптимальный расход подвижной фазы составлял 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы – 5 мкл, аналитическая длина волны – 436 нм, скорость движения диаграммы самописца – 0.3 см/мин. Если спектрофотометрический детектор хроматографа позволяет регистрировать поглощение при 450 или 480 нм, предпочтительнее использовать эти максимумы поглощения в качестве аналитических. Пробоподготовка заключалась в следующем. Жидкие продукты (соки, напитки), содержащие каротиноиды, помещали в делительную воронку (20 мл), трижды экстрагировали гексаном по 10 мл, тщательно встряхивая. В объединенный экстракт добавляли 3 кристаллика ионола для предотвращения возможного окисления каротиноидов в процессе пробоподготовки. Полученный гексановый раствор фильтровали через воронку с бумажным складчатым фильтром или центрифугировали (3000 об/мин, 5 мин), выливали в чашку Петри, упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и анализировали. Экстракцию каротиноидов из твердых продуктов проводили так: 5 г измельченного продукта трижды заливали по 10 мл подвижной фазы, встряхивали, затем объединенную пробу центрифугировали и из верхнего слоя отбирали 5 мкл для анализа. Отфильтрованные экстракты каротиноидов в орга-

нических растворителях продували в течение 2-5 минут азотом в чашке Петри до полного испарения растворителя, затем сухой экстракт растворяли в подвижной фазе до слабой желтой окраски раствора, центрифугировали и отбирали пробу. Образцы облепихового и "морковного" масла непосредственно разбавляли подвижной фазой также до слабой желтой окраски (растительное масло не мешает детектированию при 430-480 нм, так как триглицериды и жирные кислоты поглощают в УФ-области с максимумом при 210-226 нм). Образцы сгущенного молока обрабатывали следующим образом. 2.5 мл продукта помещали в 10 мл метанола для осаждения белка и центрифугировали. Полученный раствор упаривали досуха в токе азота, сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и хроматографировали. Водорастворимые гидрофильные красители, в частности синтетический тартразин, натуральные желтые пигменты типа кверцетина, лутеолина и других флавонолов и флавонов при такой пробоподготовке не попадают в пробу и не мешают анализу. Слабогидрофобные желтые красители некаротиноидного строения или более короткие молекулы типа кроцетина хроматографируются существенно позже основной массы каротиноидов.

При интерпретации хроматограмм использовали значения упрощенного критерия гидрофобности Шатца Н и расчетные величины логарифма распределения в системе 1-октанол – вода ($\log P$ и $\text{Clog} P$) [8]. Например, для β -каротина $N=40$, $\log P=10.84$ и $\text{Clog} P=15.0$, а для ксантофиллов в зависимости от числа кислородсодержащих полярных групп $N=32-36$, $\log P=6.50-8.8$ и $\text{Clog} P=8.8-12.0$. Чем выше указанные величины гидрофобности, тем меньше время удерживания каротиноида в хроматографической колонке в выбранных условиях ВЭЖХ. Учитывая, что величины экстинции в максимумах поглощения каротиноидов примерно одинаковы, концентрацию отдельных фракций каротиноидов можно определять методом нормализации по площади или высоте хроматографических пиков. Неокисленные изомеры или имеющие одинаковую полярность ксантофиллы в условиях нормально-фазовой ВЭЖХ, по всей видимости, практически не разделяются, т.е. β -каротин и α -каротин, к примеру, регистрируются сдвоенным хроматографическим пиком с плохим разрешением или одним пиком, что нам не представляется существенным. Основное достоинство данных условий анализа – экспрессивность (общее время регистрации хроматограммы, как правило, не превышает 15 мин) и достаточно хорошая селективность пиков каротиноидов с различной степенью окисления. Проведение полной идентификации хроматографических пиков с помощью

набора стандартных веществ – не целесообразная, дорогая и трудоемкая процедура. Нами для установления порядка удерживания фракций с различной гидрофобностью использовались в качестве метчиков синтетический β -каротин (E160), криптоксантин (E161a) и кантаксантин (E161g). Аутентичность каротиноидных смесей определяли методом “отпечатка пальцев”. Каждому продукту соответствует свой профиль хроматограммы, отличающийся временами удерживания отдельных пиков и соотношением высот. Например, по хроматограмме облепихового сока, можно определить из какого сорта он получен. В более поздних сортах в ягодах облепихи накапливаются ксантофиллы. Кстати, мягкое окисление каротиноидов моркови и тыквы при нагревании сухого измельченного растительного сырья с последующей экстрак-

цией каротиноидов приводит к образованию ксантофиллов, которые по своему фракционному составу весьма близки к составу каротиноидов облепихи. В масляных экстрактах термически обработанной моркови, фальсифицирующих облепиховое масло, содержится большое количество глубоко окисленных каротиноидов, содержание каротина и ксантофиллов с 1-2 атомами кислорода ниже, чем в настоящем продукте. На рис.2-6 приведены хроматограммы разных каротиноидных смесей. Пик β -каротина помечен звездочкой. Если сопоставить хроматограмму (рис.4) каротиноидов ягод облепихи с детальной идентификацией их состава (см. табл.2), становится очевидным, что три десятка каротиноидов на хроматограмме группируются на несколько фракций содержащих от 0 до 4 кислородсодержащих групп. Чем больше полярных

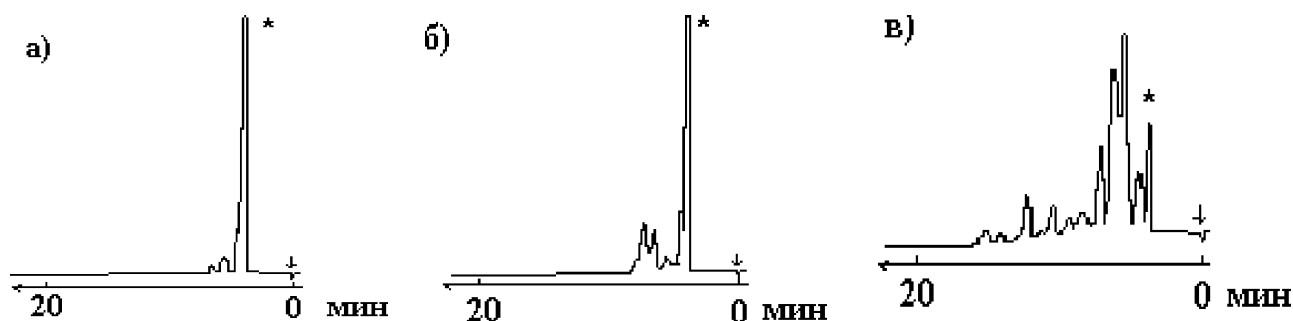


Рис. 2. Примеры хроматограмм каротиноидов: а) свежего морковного сока; б) экстракта облепихи в подсолнечном масле; в) экстракта каротина моркови после глубокой термоокислительной деструкции. Сепарон CN (3x150 мм), гептан – изопропанол (98:2), 436 нм, 0.5 мл/мин. Объем пробы 5 мкл.

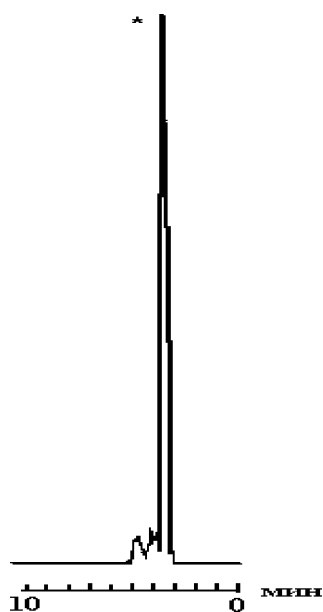


Рис. 3. Хроматограмма пигментов этанольного экстракта тыквы. Неподвижная фаза – Сепарон SGX, подвижная фаза гептан – изопропанол (99.9:0.1); $\lambda = 436 \text{ нм}$, расход элюента $0,5 \text{ см}^3/\text{мин}$

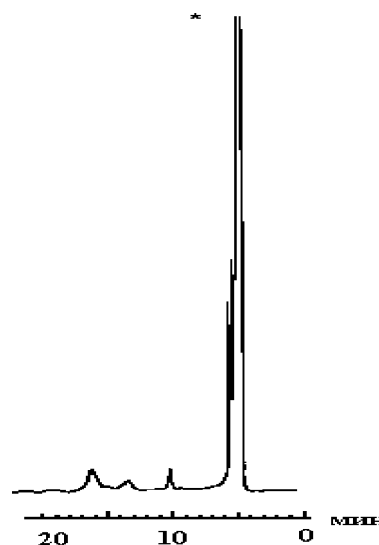


Рис. 4. Хроматограмма экстракта пигментов свежих ягод облепихи “Десертная”. Неподвижная фаза – Сепарон SGX, подвижная фаза гептан – изопропанол (99.9:0.1); $\lambda = 436 \text{ нм}$, расход элюента $0,5 \text{ см}^3/\text{мин}$

Каротиноидный состав плодов облепихи (в % от их массы) [1]

№ п.п.	Наименование каротиноида	Молекулярная формула	Содержание, %
1	б - Каротин	$C_{40}H_{56}$	0.7 - 0.8
2	в - Каротин	$C_{40}H_{56}$	5.1 - 23.3
3	Нео - в - Каротин	$C_{40}H_{56}$	0 - 3.7
4	Про - г - Каротин	$C_{40}H_{56}$	0 - 12.8
5	Нейроспорин	$C_{40}H_{58}$	0 - 9.1
6	Мутатохром (цитроксантин)	$C_{40}H_{56}O$	0 - 3.0
7	Проликопин	$C_{40}H_{56}$	0 - 2.4
8	Ликопин	$C_{40}H_{56}$	0 - 7.5
9	Гидрокси - б - каротин	$C_{40}H_{56}O$	0 - 2.0
10	в - Апо - 10' - каротиналь	$C_{27}H_{36}O$	0 - 3.3
11	Криптоксантин	$C_{40}H_{56}O$	1.8 - 7.5
12	Тараксантин	$C_{40}H_{56}O_2$	0 - 0.9
13	Синтаксантин	$C_{31}H_{42}O$	0.3 - 3.2
14	Газаилаксантин		0 - 3.1
15	Рубиксантин	$C_{40}H_{56}O$	0 - 9.3
16	Лютеин	$C_{40}H_{56}O_2$	0 - 7.6
17	Эшшольцксантин	$C_{40}H_{54}O_2$	0 - 11.5
18	Цитранаксантин	$C_{33}H_{44}O$	0 - 12.9
19	β-Цитраурин	$C_{30}H_{40}O_2$	0 - 0.6
20	Зеаксантин	$C_{40}H_{56}O_2$	0 - 19.4
21	Танжераксантин	$C_{34}H_{44}O_2$	0 - 2.5
22	Лютеинэпоксид	$C_{40}H_{56}O_2$	0 - 26.8
23	цис - Антераксантин	$C_{40}H_{56}O_3$	0 - 2.2
24	Ликоксантин	$C_{40}H_{56}O$	0 - 17.2
25	Флавоксантин	$C_{40}H_{56}O_3$	0 - 14.7
26	Виолаксантин	$C_{40}H_{56}O_4$	0 - 11.5
27	цис - Виолаксантин	$C_{40}H_{56}O_4$	0 - 2.5
28	Апо - 10' - виолаксанталь	$C_{27}H_{36}O_3$	0 - 5.2
29	Капсантин	$C_{40}H_{56}O_3$	0 - 1.4
30	Протетгидроликопин		0 - 0.3
31	Лютеоксантин	$C_{40}H_{56}O_4$	0 - 8.8
32	цис - Лютеоксантин	$C_{40}H_{56}O_4$	0 - 0.1
33	Тролликсантин (неоксантин)	$C_{40}H_{56}O_4$	0 - 2.1
34	Троллихром	$C_{40}H_{56}O_4$	0 - 8.6

групп, тем сильнее специфическое взаимодействие молекулы сорбата с активными центрами сорбента, тем дольше удерживание. Следует отметить, что колонка с Сепароном CN в отличие от колонок с силикагелем, не имеющим химически привитых групп, показывает более стабильное воспроизведение параметров удерживания, дольше служит.

Таким образом, имея банк хроматограмм сертифицированных каротинсодержащих продуктов питания, полученных по предлагаемой методике, можно легко установить, фальсифицирован или нет анализируемый образец, определить как отразился срок и режим хранения или готовки продукта на сохранность ценной пищевой добавки и т.п.

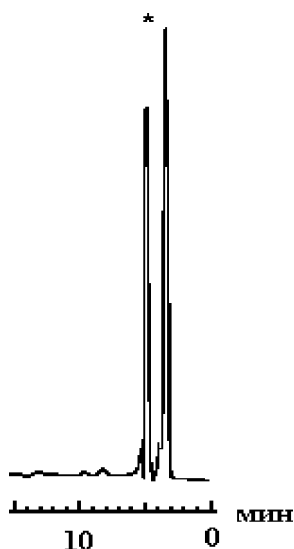


Рис. 5. Хроматограмма экстракта цветов одуванчика. Неподвижная фаза – Сепарон CN, подвижная фаза гептан – изопропанол (96:4); $\lambda=436$ нм, расход элюента 0.4 см³/мин.

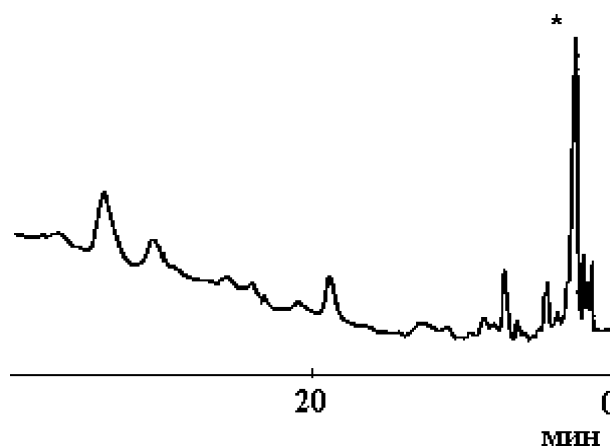


Рис. 6. Хроматограмма экстракта пигментов цветков корзинки подсолнечника. Сепарон SGX, гептан : изопропанол (99.9:0.1); 436 нм; 0.5 см³/мин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болотов В.М. Модифицированные пищевые красители растительного сырья: получение, состав, свойства и области применения. Дисс. ... докт. наук. Воронеж. 2000. 380 с.

2. Нечаев А.П., Кочеткова А.А., Зайцев А.Н. Пищевые добавки. М. Колос, Колос-Пресс, 2002. 256 с.

3. Рудаков О.Б., Болотов В.М., Шершинева Е.В. и др. // Вестник ВГТА. – 1997. – № 2. – С. 56

4. Рудаков О.Б., Болотов В.М. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1998. – № 5. – С. 26.

5. Рудаков О.Б., Голубева Л.В., Пономарев А.Н. и др. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001. – №9. – С. 37.

6. Болотов В.М. Рудаков О.Б., Шершинева Е.В. // Изв. вузов. Пищевая технология. – 1997. – № 4-5. – С. 21.

7. Рудаков О.Б. Шершинева Е.В., Болотов В.М. // Изв. вузов. Пищевая технология. – 1998. – Вып. 4. – С. 41.

8. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. – Воронеж: ВГУ, 2003. – 300 с.

9. Болотов В.М., Магомедов Г.О., Рудаков О.Б., Комарова Е.В. Пат. 2139306 РФ //Изобретения. – 1999. – №28. – С. 272.

10. Перикова Л.И., Болотов В.М., Рудаков О.Б. Пат. 2221829 РФ//Изобретения. – 2004. – №2. – С.732.