

## Разработка способа экстракции бета-каротина для его определения в комплексных пищевых добавках



Н. В. Рудометова<sup>1,\*</sup>, К. Е. Кулишова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН<sup>ROR</sup>, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Университет ИТМО<sup>ROR</sup>, Санкт-Петербург, Россия

Дата поступления в редакцию: 19.02.2021

Дата принятия в печать: 15.04.2021



\*e-mail: [natrudjob@mail.ru](mailto:natrudjob@mail.ru)

© Н. В. Рудометова, К. Е. Кулишова, 2021

### Аннотация.

**Введение.** Для предотвращения превышения максимально допустимого уровня потребления бета-каротина необходимо контролировать его поступление из всех источников. Пищевой краситель Е160а используется при производстве пищевой продукции в виде комплексных пищевых добавок, содержащих другие пищевые добавки, затрудняющие выделение и количественное определение красителя. В работе изучены способы экстракции бета-каротина из жидких и сухих комплексных пищевых добавок различного состава.

**Объекты и методы исследования.** Коммерческие образцы комплексных пищевых добавок, содержащие пищевой краситель бета-каротин. Краситель из образцов выделяли методами жидкостной экстракции с использованием органических растворителей и их смесей. Экстракцию проводили при постоянном механическом перемешивании или ультразвуковом воздействии. Идентификацию каротинов проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Содержание бета-каротина в полученных экстрактах определяли спектрофотометрическим методом.

**Результаты и их обсуждение.** Интенсивное механическое перемешивание приводит к образованию стойких непрозрачных эмульсий и затрудняет последующее количественное определение бета-каротина. Ультразвуковое воздействие приводит к разрушению эмульсии и ускорению экстракции. Степень извлечения бета-каротина из жидких эмульсионных систем (не менее 95 %) достигается при ультразвуковой экстракции хлороформом или бинарным экстрагентом на основе смесей ацетона с хлороформом, гексаном или петролейным эфиром. Для экстракции бета-каротина из сухих образцов предложен способ, при котором образец при интенсивном перемешивании диспергируется в воде, а экстракция проводится бинарным экстрагентом этанол:хлороформ с объемным соотношением 1:2. Степень экстракции бета-каротина достигает 98 %. Для идентификации бета-каротина подобраны три элюиционные системы гексан:бензол (9,7:0,3); бутанол:метилэтилкетон:аммиак 10 % (9:6:6) и петролейный эфир:бензол:ацетон:уксусная кислота (23,3:5,8:0,6:0,3).

**Выводы.** Разработаны способы экстракции бета-каротина из жидких и сухих комплексных пищевых добавок. Подобраны элюиционные системы для идентификации каротинов. Показана эффективность предложенных способов, обеспечивающих отсутствие деградации и полноту экстракции бета-каротина. Разработанные способы могут быть рекомендованы при подготовке проб комплексных пищевых добавок для идентификации и количественного определения бета-каротина.

**Ключевые слова.** Каротиноиды, пищевые красители, экстракция, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография

**Финансирование.** Работа выполнена на базе Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок (ВНИИПД)<sup>ROR</sup> в рамках НИР 0585-2019-0044 «Исследовать биотехнологические аспекты использования потенциала микроорганизмов различных таксономических групп с учётом применения супрамолекулярных комплексов и наноструктур, эффективного инструментального контроля пищевых матриц для получения новых инновационных ингредиентов пищевого и кормового назначения».

**Для цитирования:** Рудометова Н. В., Кулишова К. Е. Разработка способа экстракции бета-каротина для его определения в комплексных пищевых добавках // Техника и технология пищевых производств. 2021. Т. 51. № 2. С. 374–386. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-374-386>.

## Beta-Carotene Extraction in Complex Food Additives

Natalia V. Rudometova<sup>1,\*</sup>, Kseniia E. Kulishova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute for Food Additives – Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS<sup>ROR</sup>, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> ITMO University<sup>ROR</sup>, St. Petersburg, Russia

Received: February 19, 2021

Accepted: April 15, 2021



\*e-mail: natrudjob@mail.ru

© N.V. Rudometova, K.E. Kulishova, 2021

## Abstract.

**Introduction.** Natural dye beta-carotene E160a (pro-vitamin A) is part of many functional foods. Therefore, the total intake of beta-carotene must not exceed the tolerable upper intake level, i.e. 10 mg/day. E160a is also used in formulations of complex food additives. These products contain antioxidants, emulsifiers, preservatives, carriers, stabilizers, and thickeners, which makes it make difficult to isolate and determine the amount of beta-carotene. Complex food additives vary in composition, which, together with incomplete extraction and degradation of beta-carotene, results in inaccuracy of its determination. The present research reviewed various techniques of beta-carotene extraction from liquid and dry complex food additives.

**Study objects and methods.** The study featured commercial samples of complex food additives containing beta-carotene. It was isolated from the samples by liquid extraction methods using organic solvents and their binary mixtures. The extraction was performed in a stirring device at 120 rpm and in a Bandelin Sonorex ultrasonic bath at 128 W and 35 kHz. The extraction continued until the samples were completely discolored. The list of solvents included chloroform, petroleum ether, hexane, acetone, ethanol, and their mixes. The experiment was based on high performance thin layer chromatography with Sorbfil sheet plates. The optical density was determined by spectrophotometry using a SHIMADZU UV-1800 device.

**Results and discussion.** The extraction of beta-carotene from liquid samples with mechanical stirring at 120 rpm led to the formation of stable opaque emulsions, which made it difficult to determine the amount of beta-carotene. The emulsions were destroyed by ultrasound exposure for 30 min. The degree of extraction of beta-carotene from liquid emulsion systems ( $\geq 95\%$ ) was achieved by ultrasonic extraction with chloroform or a binary extractant based on mixes of acetone with chloroform, hexane, or petroleum ether in volumetric ratios of 1:1. When extracted from dry samples using chloroform or binary extractants, beta-carotene was not isolated or was not completely isolated. As a result, pre-dispersion of dry samples in water with stirring at 120 rpm was proposed. Ultrasonic treatment did not contribute to the dispersion of dry samples due to insufficient cavitation action. Ethanol, which is a solubilizer, increased the extractability of beta-carotene up to 98 %. The optimal results were achieved by adding a binary extractant (ethanol:chloroform in a 1:2 ratio) to an aqueous solution of the dry sample (1:3). The optimal elution systems were hexane:benzene (9.7:0.3), butanol:methyl ethyl ketone:ammonia 10 % (9:6:6), and petroleum ether:benzene:acetone:acetic acid (23.3:5.8:0.6:0.3).

**Conclusion.** The article offers new methods of beta-carotene isolation from liquid and dry complex food additives of various composition and elution systems for carotene identification. The methods caused no degradation of beta-carotene during extraction and can be used to prepare samples of complex food additives for beta-carotene identification and quantitative analysis.

**Keywords.** Carotenoids, food colours, extraction, spectrophotometry, thin layer chromatography

**Funding.** The research was performed on the premises of the All-Russia Research Institute for Food Additives (VNIIPD)<sup>ROR</sup> as a part of research plan No. 0585-2019-0044 “Investigate biotechnological aspects of using the potential of microorganisms of various taxonomic groups, taking into account the use of supramolecular complexes and nanostructures, effective instrumental control of food matrices to obtain new innovative ingredients for food and feed purposes”.

**For citation:** Rudometova NV, Kulishova KE. Beta-Carotene Extraction in Complex Food Additives. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(2):374–386. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-374-386>.

## Введение

Современной тенденцией, стимулирующей рост потребительского спроса, является обогащение пищевой продукции биологически активными и функциональными ингредиентами [1, 2]. Настороженное отношение потребителей к пищевым добавкам и выполнение требований технических регламентов Таможенного союза о необходимости информирования потребителей о возможном отрицательном влиянии на активность и внимание детей некоторых синтетических красителей

способствуют росту производства пищевых продуктов, в состав которых входят красители природного происхождения. Пищевой краситель бета-каротин E160a, являющийся также провитамином А, активно применяется в производстве различной пищевой продукции, в том числе функциональной [3–5]. В соответствии с Методическими рекомендациями МР 2.3.1.2432-08 рекомендованная норма потребления бета-каротина, определяемая физиологической потребностью организма взрослого человека, составляет 5 мг/сут, а верхний допустимый уровень

поступления не должен превышать 10 мг/сут [6]. Для предотвращения избыточного потребления бета-каротина и возникновения побочных эффектов и осложнений необходимо учитывать все источники его поступления в организм человека, в том числе поступления в качестве пищевого красителя E160a. Максимально допустимые уровни (МДУ) красителя E160a в различной пищевой продукции установлены стандартом Кодекса Алиментариуса CODEX STAN 192-1995 ФАО-ВОЗ на основе величины допустимого суточного поступления и массы продукта в пищевом рационе взрослого человека. МДУ зависит от сырьевого источника, способа получения красителя и вида пищевой продукции, в которой предполагается его использование. Например, если краситель получен методами химического или микробного синтеза, то МДУ в креме на основе растительных жиров для всех видов каротина составляет 20 мг/кг, в сладких соусах – 100 мг/кг; если получен из съедобных растений – 20 г/кг. Аналогичные требования предполагается ввести и в новую редакцию Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 029/2012.

Бета-каротин – непредельный углеводород из группы каротиноидов (рис. 1). Он обладает большим промышленным значением из-за довольно широкого спектра экономически выгодных способов его получения. Пищевой краситель E160a может быть получен методом химического синтеза, ферментацией зигомицета *Blakeslea trispora*, экстракцией из съедобных растений или водорослей вида *Dunaliella salina* [7–10].

Каротиноиды в составе пищевых матриц относительно стабильны при термической обработке [11, 12]. Однако в растворах они чрезвычайно чувствительны не только к нагреванию, но и к воздействию кислот, кислорода и света [13]. Подвергаясь окислению, каротиноиды нейтрализуют синглетный кислород, поэтому являются мощными антиоксидантами. Окислительное разложение бета-каротина представляет собой сложный

многостадийный процесс, протекающий через образование промежуточных моно- и бирадикальных форм, апокаротеналей и других соединений [14]. Поэтому при работе с каротиноидами необходимы меры предосторожности, такие как проведение экспериментов в темноте, в атмосфере азота или аргона, хранение при температуре 20 °С и использование стабилизаторов. Химическая структура каротиноидов с их длинной углеродной цепью и конъюгированными двойными связями предопределяет их свойства как нейтрализаторов свободных радикалов и иммуномодуляторов [15, 16]. Обесцвечивание каротиноидов при окислении свидетельствует о том, что антиоксидантное действие каротиноидов связано с наличием в их структуре большого числа ненасыщенных связей [17]. Однако бета-каротин может функционировать и как активатор окислительных процессов [18]. Как соединения с сопряженными двойными связями, каротиноиды имеют характерные спектры поглощения, характеристики которых приведены в таблице 1 [19–21].

Из-за высокой лабильности, нерастворимости в водных средах и сложностей при дозировании кристаллический бета-каротин практически не используется в пищевой промышленности. Перечисленные недостатки могут быть частично устранены при использовании красителя в виде комплексных пищевых добавок. В их состав входят различные пищевые добавки и ингредиенты, чьи действия направлены на стабилизацию или модификацию свойств бета-каротина в результате образования наноэмульсий, липосом, наноструктур, супрамолекулярных комплексов и клатратов [22–33]. Уменьшение деградации лабильных каротиноидов достигается при одновременном использовании щадящих технологических режимов и стабилизированных форм ингредиента [34]. Содержание бета-каротина в комплексных пищевых добавках составляет от 1 до 10 %. По информации производителей в составе комплексных пищевых добавок, кроме бета-каротина, содержатся антиоксиданты (E222, E300, E304, E307, E320, E321), эмульгаторы (E433, E471, E494), консерванты (E202, E211), носители, стабилизаторы и загустители (E414, E420, E422, E551, E1520). Наличие таких добавок, особенно эффективных эмульгаторов, приводит к необходимости разрушения эмульсионной системы для последующего количественного определения бета-каротина.

При извлечении красителя из водорастворимых или содержащих воду матриц экстрагент должен смешиваться с водой [17]. Эффективность экстракции каротиноидов определяется их структурой и свойствами. Поскольку бета-каротин является липофильным соединением, то он хорошо экстрагируется неполярными растворителями.



Рисунок 1. Структурная формула молекулы бета-каротина

Figure 1. Structural formula of beta-carotene molecule

Таблица 1. Спектральные характеристики пищевых красителей каротиноидной природы

Table 1. Spectral characteristics of food dyes of carotenoid nature

Краситель	Показатель		
	Растворитель	$\lambda_{\max}$ , нм	$E_{1\%}^{1\text{см}}$
Бета-каротин E160a (i)	циклогексан	455	2500
	хлороформ	461	2396
	ацетон	453	2550
	этанол	450	2620
Аннато (биксин) E160b	хлороформ	493	2870
Ликопин E160d	гексан	470	3450
	хлороформ	484	–
	этанол	472	–
Бета-апокаротиналь E160e	циклогексан	461	2640
	хлороформ	477	–
	этанол	463	–
Астаксантин E160j	хлороформ	485	–
	ацетон	480	–
	этанол	478	–
Лютеин E161b	хлороформ:этанол 10:90	445	2550

В хорошо исследованных процессах экстракции каротиноидов из различного растительного сырья используется широкий спектр растворителей: этанол, ацетон, петролейный эфир, гексан, бензол, тетрагидрофуран, диэтиловый эфир и хлороформ [35–38]. При этом смеси растворителей, содержащие полярный и неполярный компоненты, например, гексан и ацетон или гексан и этанол, являются лучшими экстрагентами для извлечения каротиноидов [10, 16, 35, 38]. Для выделения бета-каротина из эмульсионных и липосомальных форм также используются многокомпонентные экстрагенты [24, 26]. В целях предотвращения фотохимического распада, сокращения времени анализа и интенсификации процесса предлагается проводить экстракцию бета-каротина диоксидом углерода в до- и сверхкритических условиях и при воздействии ультразвука и микроволн [9, 16, 39–43]. Необходимость дополнительной очистки, деградация и неполное извлечение каротиноидов из эмульсионных сред приводит к серьезным затруднениям при их анализе и большой погрешности определения [44, 45].

В связи с возможной деградацией в процессе производства пищевой продукции содержание бета-каротина, определенное «по закладке», может не соответствовать его действительному содержанию в готовом продукте. Поэтому, чтобы не вводить потребителя в заблуждение, необходимо определять содержание бета-каротина в пищевой продукции с использованием аналитических методов. Наиболее

изучены методы определения каротиноидов в растительном сырье. Для их идентификации и количественного определения применяют методы спектрофотометрии, тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии [7, 9, 10, 16, 20, 21, 26–29, 36, 37, 42–44, 46]. Несмотря на большой объем работ, посвященных изучению свойств каротиноидов и методам их анализа, вопросы определения бета-каротина в комплексных пищевых добавках изучены недостаточно. Мультифункциональный состав комплексных добавок и наличие ингредиентов, обладающих сорбционными и эмульгирующими свойствами, затрудняют количественное определение каротиноидов. Отсутствие информации о качественном и количественном составе комплексных пищевых добавок приводит к необходимости оптимизации или даже разработки нового способа для анализа каждого пищевого матрикса. Действующие национальный ГОСТ Р 54058 и межгосударственный ГОСТ EN 12823-2 не распространяются на комплексные пищевые добавки. Поэтому исследование способов анализа пищевых матриксов, в состав которых входят каротиноиды, а именно наиболее часто применяемый в пищевых производствах бета-каротин, является актуальной задачей.

Целью работы является разработка способа экстракции бета-каротина из комплексных пищевых добавок для его идентификации и количественного определения.

#### Объекты и методы исследования

В работе были использованы химически чистые и особо чистые реактивы, рабочие стандартные образцы (PCO), кристаллический синтетический бета-каротин (Sigma-Aldrich, код 4582), биксин E160b, ликопин E160d, бета-апокаротиналь E160e, лютеин E161b (Allied Biotech Co.) с содержанием красящих веществ, соответствующих требованиям ТР ТС 029/2012. Также коммерческие образцы комплексных пищевых добавок в виде жидких водорастворимых и диспергируемых в воде и маслах эмульсий и сухих порошков с содержанием бета-каротина от 1 до 10 %. Состав комплексных пищевых добавок, по данным производителей, приведен в таблице 2.

Выделение бета-каротина из образцов проводили в защищенном от света месте при температуре  $25 \pm 2$  °C в течение 30 мин при перемешивании стеклянной палочкой (СП) или на термостатированной перемешивающей установке УВМТ-12-250 (ТПУ) со скоростью вращения 120 об/мин, или в ультразвуковой ванне (УЗ) «Sonogex DK 255 P» с частотой ультразвука 35 кГц и мощностью 128 Вт.

Для определения бета-каротина в жидких образцах к 0,1 г анализируемой пробы, взвешенной с точностью до 0,001 г, добавляли от 30 до 60 см<sup>3</sup> растворителя.

Таблица 2. Состав образцов комплексных пищевых добавок

Table 2. Composition of complex food additives

Наименование	Вид	Состав	
		пищевые добавки	бета-каротин E160a, %
Аквабетин 0151В	жидкий, вододиспергируемый	E433, E422, E322, E415, E307, E202	1,5
Аквабетин 0200В	жидкий, вододиспергируемый	E433, E422, E322, E415, E307, E202	2,0
Бета-каротин 1 % натуральный водорастворимый	жидкий, водорастворимый	E433, E300, E386	1,0
Бета-каротин 2 % натуральный водорастворимый	жидкий, водорастворимый	E433, E300, E386	2,0
Бета-каротин 3 % натуральный водорастворимый	жидкий, водорастворимый	E433, E300, E386	3,0
Натуральный краситель порошкообразный Бетанат 10 % CWDC/0	сухой, жирорастворимый	–	10,0
Пищевой краситель E160a	сухой, жирорастворимый	E494, E307	10,0
Бета-каротин Beadlet 10 % CWS-OS	сухой жирорастворимый	E1450, E307	10,0
Натуральный Бета-каротин 10 % Nutrex	сухой, вододиспергируемый	E307c, E304	10,0
Бета-каротин 1 % P-WS E160a	сухой, водорастворимый	E414, E420, E300, E307, E551	1,0

Пробы перемешивали до достижения однородного состояния, после чего определяли массовую долю бета-каротина. В качестве растворителей использовали: хлороформ, петролейный эфир, циклогексан, гексан, ацетон, этиловый спирт квалификации не ниже х. ч., а также смеси этих растворителей.

Выделение бета-каротина из сухих образцов проводили двумя способами. При первом способе к 0,1 г анализируемой пробы, взвешенной с точностью до 0,001 г, добавляли 30 см<sup>3</sup> экстрагента, перемешивали до полного растворения или диспергирования пробы, после чего определяли массовую долю бета-каротина. При втором способе к 0,1 г анализируемой пробы, взвешенной с точностью до 0,001 г, добавляли 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, затем этанол, хлороформ и перемешивали смесь в течение 10 мин. Затем экстракты переносили в делительную воронку.

После отстаивания и разделения фаз отделяли нижний хлороформный слой и повторяли экстракцию, добавляя к водной фазе этанол и хлороформ.

Выделение бета-каротина из сухих образцов проводили до полного обесцвечивания водной фазы. Хлороформные экстракты объединяли. Суммарное время экстракции не превышало 1 ч. Для подтверждения стабильности бета-каротина в процессе анализа проводили измерения содержания бета-каротина в 1 % растворе рабочего стандартного образца в хлороформе в начале и в конце процесса экстракции.

Содержание бета-каротина в полученных свежеприготовленных растворах и экстрактах определяли по [19] спектрофотометрическим методом, в соответствии с данными таблицы 1, на двухлучевом сканирующем спектрофотометре

Таблица 3. Условия идентификации каротиноидов методом ВЭТСХ

Table 3. Conditions for HPTLC of carotenoids

Краситель	Значения R <sub>f</sub> PCO красителей при разделении в элюентах		
	гексан:бензол (9,7:0,3)	бутанол:метилэтилкетон:аммиак 10 % (9:6:6)	петролейный эфир:бензол:ацетон:уксусная кислота (23,3:5,8:0,6:0,3)
E160a (i)	0,26 ± 0,03	0,89 ± 0,03	0,89 ± 0,02
E160b	–	0,35 ± 0,03	–
E160d	0	0,83 ± 0,03	0,86 ± 0,03 0,53 ± 0,03
E160e	0	0,81 ± 0,05	0,40 ± 0,03
E160j	0	0,83 ± 0,05	0,32 ± 0,03
E161b	–	0,33 ± 0,05	–

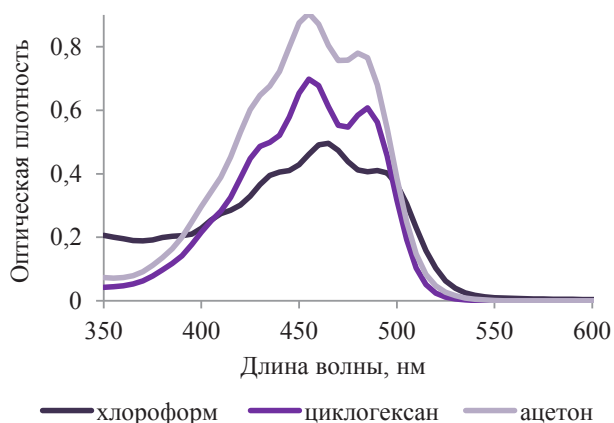


Рисунок 2. Спектры РСО бета-каротина в различных растворителях

Figure 2. Spectra of beta-carotene in various solvents

«SHIMADZU UV-1800» (Япония) в диапазоне длин волн 300–700 нм против растворителя. Эффективность экстракции оценивали путем сопоставления значений содержания бета-каротина в экстрактах с его исходным содержанием, заявленным производителем.

Для идентификации бета-каротина были подобраны условия высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). При них происходит разделение РСО пищевых красителей каротиноидной природы, оцениваемое по величине  $R_f$  с получением компактных пятен на пластине (табл. 3).

Идентификацию проводили на силикагелевых пластинах с полимерной подложкой «Sorbfil» ПТСХ-П-В размером 10×10 см в хроматографической камере и в защищенном от света месте. Для приготовления подвижной фазы необходимые объемы компонентов дозировали в колбу объемом 50 см<sup>3</sup>, закрывали пробкой, перемешивали и вносили в хроматографическую камеру в количестве, которое необходимо для погружения хроматографической пластины на глубину не более 0,5 см от нижнего края. Время насыщения камеры парами элюентов составляло 60 мин. Пробу наносили микрошприцом МШ-10. Объем наносимой пробы 10 мкл. В качестве рабочих стандартных образцов использовали растворы РСО каротиноидов в хлороформе с концентрацией  $0,5 \pm 1,5$  мг/см<sup>3</sup>.

Математическую обработку экспериментальных данных проводили в программах Microsoft Excel 2013. Все измерения проводили в трех повторностях. Доверительные интервалы рассчитывали для доверительной вероятности  $P = 95$  %. Абсолютная погрешность определения не превышает 10 %.

### Результаты и их обсуждение

По результатам спектрофотометрического определения каротиноидов в различных растворителях (табл. 1, рис. 2) можно сделать вывод, что вид растворителя незначительно влияет на характер спектров и положение максимумов светопоглощения бета-каротина.

Неполярные реагенты, такие как хлороформ, ацетон и гексан, являются хорошими растворителями для

Таблица 4. Результаты определения бета-каротина в коммерческих образцах жидких комплексных пищевых добавок

Table 4. Beta-carotene in commercial samples of liquid complex food additives

Образец	Растворитель	Перемешивающее устройство	Содержание бета-каротина (от заявленного производителем), %
Аквабегин 0151В Аквабегин 0200В	хлороформ	СП	0
		ТПУ	30 ± 3
		УЗ	96 ± 5
	хлороформ:ацетон 1:1 ацетон:гексан 1:1	УЗ	95 ± 5
		УЗ	96 ± 5
Бета-каротин 1 % натуральный водорастворимый	хлороформ	УЗ	97 ± 5
		СП	0
		ТПУ	25 ± 3
Бета-каротин 2 % натуральный водорастворимый	хлороформ	УЗ	98 ± 5
		СП	0
		ТПУ	30 ± 3
Бета-каротин 3 % натуральный водорастворимый	хлороформ	УЗ	98 ± 5
		СП	0
		ТПУ	28 ± 3
		УЗ	98 ± 5

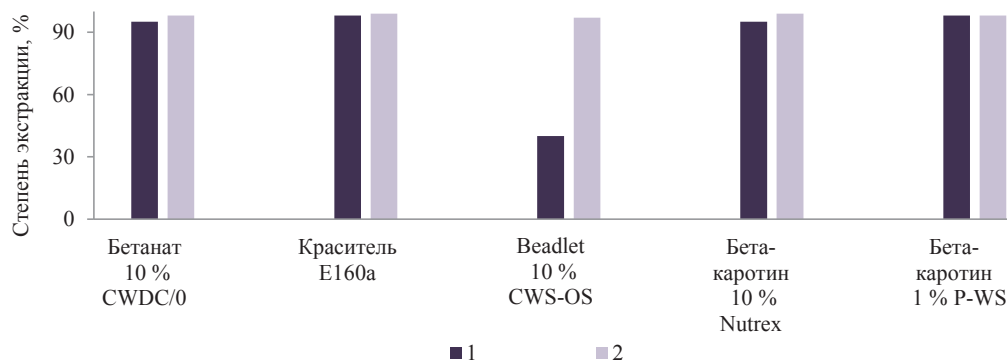


Рисунок 3. Влияние состава экстрагента на степень экстракции бета-каротина из водных растворов сухих образцов комплексных пищевых добавок: 1 – этанол:хлороформ v/v 3:4; 2 – этанол:хлороформ v/v 1:2

Figure 3. Effect of the extractant composition on the degree of beta-carotene extraction from aqueous solutions of dry complex food additives: 1 – ethanol:chloroform, v/v 3:4; 2 – ethanol:chloroform, v/v 1:2

гидрофобного бета-каротина. Однако эксперименты показали, что жидкие эмульсионные образцы плохо смешиваются с хлороформом и циклогексаном при простом перемешивании стеклянной палочкой. Увеличение интенсивности перемешивания при использовании ТПУ приводило к образованию стойких непрозрачных эмульсий. Это затрудняло последующее количественное определение бета-каротина. Полное растворение образцов в хлороформе было достигнуто при УЗ-воздействии. Это можно объяснить нарушением межмолекулярных взаимодействий УЗ-волнами, приводящим к разрушению эмульсии и ускорению растворения образца.

Добавка к неполярному растворителю полярного, который способен образовывать водородные связи, приводит к нарушению гидрофильно-липофильного баланса и разрушению эмульсии. Поэтому для экстракции из жидких эмульсионных образцов были апробированы бинарные системы на основе неполярного и полярного растворителей: ацетон:хлороформ, ацетон:гексан, ацетон:петролейный эфир в объемных соотношениях 1:1. Полученные результаты (табл. 4) показали, что при УЗ-воздействии бета-каротин экстрагируется как хлороформом, так и в бинарными экстрагентами, а его

Таблица 5. Экспериментальные данные по экстракции бета-каротина из коммерческих образцов сухих комплексных пищевых добавок

Table 5. Extraction of beta-carotene from commercial samples of dry complex food additives

Образец	Параметры экстракции						Кратность экстракции	Бета-каротин (от заявленного), %
	Растворитель	Состав экстрагента, см <sup>3</sup>				Перемешивание		
		вода	хлоро-форм	ацетон	этанол			
Натуральный краситель порошкообразный Бетанат 10 % CWDC/0	–	30	–	–	–	СП, ТПУ, УЗ	1	0
	–	–	15	–	15	СП, ТПУ, УЗ	3	20
	10	40	–	30	–	ТПУ	4	95
	10	20	–	10	–	ТПУ	4	98
Пищевой краситель E160a	–	30	–	–	–	ТПУ	4	75
	10	40	–	30	–	ТПУ	3	98
	10	20	–	10	–	ТПУ	3	99
Бета-каротин Beadlet 10 % CWS-OS	–	30	–	–	–	УЗ, ТПУ	1	0
	–	–	15	–	15	СП, ТПУ	3	40
	10	40	–	30	–	ТПУ	3	40
	10	20	–	10	–	ТПУ	4	97
Натуральный Бета-каротин 10 % Nutrex	–	30	–	–	–	УЗ, ТПУ	1	0
	10	20	–	30	–	ТПУ	4	95
	10	20	–	10	–	ТПУ	4	99
Бета-каротин 1 % P-WS E160a	–	30	–	–	–	УЗ, ТПУ	4	17
	10	40	–	30	–	ТПУ	4	98
	10	20	–	10	–	ТПУ	4	98

Таблица 6. Максимумы поглощения хлороформных извлечений, полученных при экстракции бета-каротина из водных растворов образцов сухих комплексных пищевых добавок с использованием бинарного экстрагента этанол:хлороформ v/v 1:2

Table 6. Maximum absorption of chloroform extracts obtained by extraction of beta-carotene from aqueous solutions of dry complex food additives using a binary extractant of ethanol:chloroform, v/v 1: 2

Образец	$\lambda_{\max}$ , нм
Натуральный краситель порошкообразный Бетанат 10 % CWDC/0	461 ± 1
Пищевой краситель E160a	461 ± 1
Бета-каротин Beadlet 10 % CWS-OS	461 ± 1
Натуральный Бета-каротин 10 % Nutrex	460 ± 1
Бета-каротин 1 % P-WS E160a	460 ± 1

содержание соответствует значениям, заявленным производителями.

При экстракции из сухих образцов (табл. 5) с использованием хлороформа и бинарного экстрагента ацетон:петролейный эфир, показавших лучшие результаты для жидких образцов, бета-каротин не извлекался или извлекался не полностью. При этом УЗ-воздействие не способствовало эффективному диспергированию сухих образцов, в отличие от ТПУ, из-за недостаточного кавитационного воздействия. Поэтому было предложено предварительно диспергировать образцы в воде и проводить экстракцию хлороформом в условиях интенсивного перемешивания. В качестве соразтворителя, проявляющего солюбилизующие свойства, использовали этиловый спирт. Предлагаемый способ позволил практически полностью выделить бета-каротин из сухих образцов различного компонентного состава. Лучшие результаты достигнуты при добавлении к одному объему водного раствора сухого образца трех объемов бинарного экстрагента этанол:хлороформ с объемным соотношением 1:2 (рис. 3).

Результаты спектрофотометрического анализа (табл. 6) показали соответствие спектров красителя, выделенного из коммерческих образцов, спектрам РСО бета-каротина. Максимумы поглощения соответствуют характеристической длине волны бета-каротина в хлороформе.

Идентификация бета-каротина, в выбранных по результатам предварительного тестирования трех подвижных фаз (табл. 3), подтвердила результаты спектрофотометрического анализа:  $R_f$  пятен всех образцов соответствует  $R_f$  пятнам РСО бета-каротина, другие каротиноиды не обнаружены. На рисунке 5 в качестве примера представлены результаты ВЭТСХ экстрактов, полученных из образцов сухих комплексных пищевых добавок при разделении

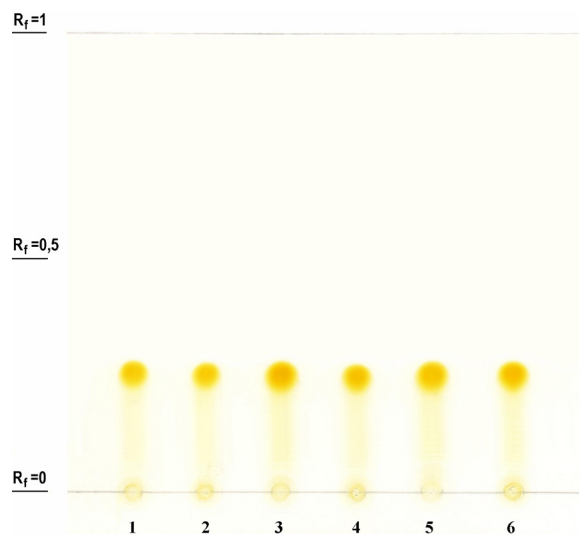


Рисунок 4. Результаты ВЭТСХ идентификации бета-каротина на пластине Sorbfil ПТСХ-П-В в элюенте гексан:бензол (v/v 9,7:0,3): 1 – РСО бета-каротина; 2 – Бетанат 10 % CWDC/0; 3 – Краситель E160a; 4 – Beadlet 10 % CWS-OS; 5 – Бета-каротин 10 % Nutrex; 6 – Бета-каротин 1 % P-WS E160a

Figure 4. HPTLC identification of beta-carotene using a Sorbfil PTSKh-P-V plate in hexane:benzene (v/v 9.7:0.3): 1 – beta-carotene; 2 – Betanate 10% CWDC/0; 3 – E160a; 4 – Beadlet 10% CWS-OS; 5 – Beta-carotene 10% Nutrex; 6 – Beta-carotene 1% P-WS E160a

в элюенте гексан:бензол с объемным соотношением 9,7:0,3.

В результате проведенных экспериментов установлены условия и разработан способ подготовки проб для идентификации и определения содержания бета-каротина в комплексных пищевых добавках.

### Выводы

Показана эффективность ультразвукового воздействия на выделение бета-каротина из жидких комплексных пищевых добавок различного состава. Максимальная степень извлечения бета-каротина (не менее 95 %) из жидких эмульсионных систем достигается при использовании хлороформа и дополнительного ультразвукового воздействия, которое способствует разрушению эмульсионной системы.

При экстракции бета-каротина из сухих образцов предложено предварительно диспергировать образцы в воде в условиях интенсивного перемешивания. Наиболее эффективной признана бинарная экстракционная система с объемным соотношением этанол:хлороформ 1:2. При ее использовании степень экстракции бета-каротина достигает 98 %.

Спектрофотометрический и хроматографический анализ подтвердил отсутствие деградации бета-



каротина в процессе подготовки проб к анализу по разработанному способу.

Для идентификации бета-каротина в пищевых добавках рекомендованы элюционные системы гексан:бензол (9,7:0,3), бутанол:метилэтилкетон:аммиак 10 % (9:6:6) и петролейный эфир:бензол:ацетон:уксусная кислота (23,3:5,8:0,6:0,3).

Разработанный способ экстракции может быть рекомендован как способ подготовки проб комплексных пищевых добавок для определения в них бета-каротина в целях осуществления контроля его использования.

#### Критерии авторства

Н. В. Рудометова – руководство исследованиями, литературный обзор, анализ экспериментальных данных, написание и общая редакция рукописи.

К. Е. Кулишова – проведение экспериментальных исследований, обработка и анализ полученных данных.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Contribution

N.V. Rudometova supervised the research, reviewed the related scientific publications, analyzed the experimental data, and wrote and proofread the manuscript. K.E. Kulishova performed the experimental research, as well as processed and analyzed the obtained data.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

#### Список литературы

1. Grown to be blue – antioxidant properties and health effects of colored vegetables. Part II: Leafy, fruit, and other vegetables / F. D. Gioia [et al.] // *Antioxidants*. 2016. Vol. 9. № 2. <https://doi.org/10.3390/antiox9020097>.
2. Tomato as potential source of natural additives for meat industry. A review / R. Domínguez [et al.] // *Antioxidants*. 2020. Vol. 9. № 1. <https://doi.org/10.3390/antiox9010073>.
3. Биофортификация куриного яйца: витамины и каротиноиды / А. Ш. Кавтарашвили [и др.] // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Т. 52. № 6. С. 1094–1104. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1094rus>.
4. Перспективы применения β-каротина в производстве пищевых продуктов и кормовых добавок / Р. В. Казарян [и др.] // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2018. Т. 365–366. № 5–6. С. 6–9.
5. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry / I. Jaswir [et al.] // *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. Vol. 5. № 33. P. 7119–7131. <https://doi.org/10.5897/JMPRx11.011>.
6. Коденцова В. М. Градации уровней потребления витаминов: возможные риски при чрезмерном потреблении // *Вопросы питания*. 2014. Т. 83. № 3. С. 41–51. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2014-00028>.
7. UPLC-UV-MS<sup>E</sup> analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae / W. Fu [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. Vol. 404. № 10. P. 3145–3154. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6434-4>.
8. Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae / S. Pourkarimi [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020. Vol. 29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101771>.
9. Extraction and analysis of the major carotenoids of agro-industrial waste materials using sequential extraction techniques and high performance liquid chromatography / I. Rubashvili [et al.] // *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 13. № 2. <https://doi.org/10.29333/ejac/82931>.
10. Hiranvarachat B., Devahastin S. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels // *Journal of Food Engineering*. 2012. Vol. 126. P. 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.024>.
11. Carle R., Schweiggert R. Handbook on natural pigments in food and beverages. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016. 538 p.
12. Mérillon J.-M., Ramawat K. G. Bioactive molecules in food. Cham: Springer International Publishing, 2019. 2370 p.
13. Aparicio-Ruiz R., Mínguez-Mosquera M. I., Gandul-Rojas B. Thermal degradation kinetics of lutein, β-carotene and β-cryptoxanthin in virgin olive oils // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011. Vol. 24. № 6. P. 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.009>.
14. Кинетика окисления β-каротина в присутствии высокоактивных форм μ-карбидодимерного тетрафенилпорфирина Fe(IV) / О. Р. Симонова [и др.] // *Журнал физической химии*. 2018. Т. 92. № 11. С. 2128–2134. <https://doi.org/10.1134/S0036024418110390>.
15. Pechinskii S. V., Kuregyan A. G. The impact of carotenoids on immunity (review) // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014. Vol. 47. № 10. P. 509–513. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-0992-z>.

16. Ötles S. Methods of analysis of food components and additives. Boca Raton: CRC Press, 2011. 534 p. <https://doi.org/10.1201/b11218>.
17. Dawidowicz A. L., Olszowy M. Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by  $\beta$ -carotene bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant // European Food Research and Technology. 2010. Vol. 231. № 6. P. 835–840. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1333-4>.
18. Fiedor J., Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease // Nutrients. 2014. Vol. 6. № 2. P. 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
19. Socaciu C. Food colorants: Chemical and functional properties. Boca Raton: CRC Press, 2007. 648 p. <https://doi.org/10.1201/9781420009286>.
20. Курегян А. Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов // Фундаментальные исследования. 2015. Т. 2–23. С. 5166–5172.
21. Finkel'shtein E. I. Modern methods of analysis of carotenoids (review) // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2016. Vol. 50. № 2. P. 96–107. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1405-2>.
22. Development, physical stability and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene-enriched tertiary emulsions / A. Gasa-Falcon [et al.] // Journal of Functional Foods. 2020. Vol. 64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103615>.
23. Niu B., Shao P., Sun P. Ultrasound-assisted emulsion electrosprayed particles for the stabilization of  $\beta$ -carotene and its nutritional supplement potential // Food Hydrocolloids. 2020. Vol. 102. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105634>.
24. Lipid nanoparticles with fats or oils containing  $\beta$ -carotene: Storage stability and *in vitro* digestibility kinetics / L. Salvia-Trujillo [et al.] // Food Chemistry. 2019. Vol. 278. P. 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.039>.
25. Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene nanoemulsions during storage and thermal process / C. M. Borba [et al.] // Food Research International. 2019. Vol. 121. P. 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.045>.
26. Structure, physicochemical stability and *in vitro* simulated gastrointestinal digestion properties of  $\beta$ -carotene loaded zein-propylene glycol alginate composite nanoparticles fabricated by emulsification-evaporation method / Y. Wei [et al.] // Food Hydrocolloids. 2018. Vol. 81. P. 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.042>.
27. Effect of edible antioxidants on chemical stability of  $\beta$ -carotene loaded nanostructured lipid carriers / A. Hejri [et al.] // LWT – Food Science and Technology. 2019. Vol. 113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108272>.
28. Improvement of thermal and UV-light stability of  $\beta$ -carotene-loaded nanoemulsions by water-soluble chitosan coating / E. J. Baek [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 165. P. 1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.008>.
29. Effect of monoglyceride content on the solubility and chemical stability of  $\beta$ -carotene in organogels / M. Cui [et al.] // LWT – Food Science and Technology. 2019. Vol. 106. P. 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.042>.
30. Рудометова Н. В., Кулишова К. Е. Стабилизация красящих веществ в составе инклюзионных наноконплексов на основе продуктов переработки крахмала // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2018. № 4. С. 15–21. <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2018-11-4-15-21>.
31. Bockuviene A., Sereikaite J. Preparation and characterisation of novel water-soluble  $\beta$ -carotene-chitoooligosaccharides complexes // Carbohydrate Polymers. 2019. Vol. 225. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115226>.
32. Bioactive composition and sensory evaluation of innovative spaghetti supplemented with free or  $\alpha$ -cyclodextrin chlatrated pumpkin oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> / M. Durante [et al.] // Food Chemistry. 2019. Vol. 294. P. 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.032>.
33. Рудометова Н. В., Кулишова К. Е., Ким И. С. Исследование влияния циклодекстринов и модифицированных крахмалов на светостойкость бета-каротина в инклюзионных комплексах // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2018. № 3. С. 3–11. <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2018-11-3-3-11>.
34. Advantages of electric resistance method for baking bread and flour confectionery products of functional purpose / B. Kulishov [et al.] // Agronomy Research. 2020. Vol. 18. № 4. P. 2449–2464. <https://doi.org/10.15159/AR.20.211>.
35. Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry / S. Saha [et al.] // Food Chemistry. 2015. Vol. 177. P. 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.039>.
36. Костина Н. Г., Подлегаева Т. В., Сергеева И. Ю. Экстракция растительных пигментов из местного сырья // Техника и технология пищевых производств. 2019. Т. 49. № 4. С. 522–530. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2019-4-522-530>.
37. Kaur P., Ghoshal G., Jain A. Bio-utilization of fruits and vegetables waste to produce  $\beta$ -carotene in solid state fermentation: Characterization and antioxidant activity // Process Biochemistry. 2019. Vol. 76. P. 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.10.007>.
38. Gong M., Bassi A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments // Biotechnology Advances. 2016. Vol. 34. № 8. P. 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>.

39. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds / M. M. Poojary [et al.] // *Marine Drugs*. 2016. Vol. 14. № 11. <https://doi.org/10.3390/md14110214>.
40. Zúñiga-Moreno A., Arenas-Quevedo M. G., Elizalde-Solis O. Solubility of  $\beta$ -carotene and co-solutes in supercritical carbon dioxide for ternary systems: Experimental data and correlation // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019. Vol. 148. P. 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.005>.
41. Optimization of oil extraction from rowanberry waste in alcoholic beverage production / A. D. Ivakhnov [et al.] // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2019. Vol. 13. № 7. P. 1135–1138. <https://doi.org/10.1134/S1990793119070091>.
42. Extraction and analysis of the major carotenoids of agro-industrial waste materials using sequential extraction techniques and high performance liquid chromatography / I. Rubashvili [et al.] // *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 13. № 2. <https://doi.org/10.29333/ejac/82931>.
43. Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction followed by ultrahigh pressure liquid chromatography for the quantification of major carotenoids in tomato / J. A. Figueira [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017. Vol. 57. P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.022>.
44. Rodriguez-Amaya D. B. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids – A review // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010. Vol. 23. № 7. P. 726–740. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.008>.
45. Rodrigues D. B., Mariutti L. R. B., Mercadante A. Z. Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2016. Vol. 1457. P. 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.039>.
46. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Separation and determination of a mixture of fat-soluble vitamins A, D<sub>2</sub>, and E and  $\beta$ -carotene by gradient thin-layer chromatography // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016. Vol. 50. № 2. P. 120–125. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1408-z>.

## References

1. Gioia FD, Tzortzakis N, Roupheal Y, Kyriacou MC, Sampaio SL, Ferreira ICFR, et al. Grown to be blue – antioxidant properties and health effects of colored vegetables. Part II: Leafy, fruit, and other vegetables. *Antioxidants*. 2016;9(2). <https://doi.org/10.3390/antiox9020097>.
2. Domínguez R, Gullón P, Pateiro M, Munekata PES, Zhang W, Lorenzo JM. Tomato as potential source of natural additives for meat industry. A review. *Antioxidants*. 2020;9(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010073>.
3. Kavtarashvili AS, Kodentsova VM, Mazo VK, Risnik DV, Stefanova IL. Biofortification of hen eggs: vitamins and carotenoids. *Agricultural Biology*. 2017;52(6):1094–1104. (In Russ.). <https://doi.org/10.15389/agrobio.2017.6.1094eng>.
4. Kazaryan RV, Lukyanenko MV, Borodikhin AS, Kalmanovich SA, Viktorova EP. Prospects of using  $\beta$ -carotene in production of food and fodder additives. *News of institutes of higher education. Food technology*. 2018;365–366(5–6):6–9. (In Russ.).
5. Jaswir I, Noviendri D, Hasrini RF, Octavianti F. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(33):7119–7131. <https://doi.org/10.5897/JMPRx11.011>.
6. Kodentsova VM. Gradation in the level of vitamin consumption: possible risk of excessive consumption. *Problems of Nutrition*. 2014;83(3):41–51. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2014-00028>.
7. Fu W, Magnúsdóttir M, Brynjólfson S, Pálsson B, Paglia G. UPLC-UV-MS<sup>E</sup> analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;404(10):3145–3154. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6434-4>.
8. Pourkarimi S, Hallajisani A, Nouralishahi A, Alizadehdakhl A, Golzary A. Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101771>.
9. Rubashvili I, Tsitsagi M, Ebralidze K, Tsitsishvili V, Chkhaidze M, Eprikashv, et al. Extraction and analysis of the major carotenoids of agro-industrial waste materials using sequential extraction techniques and high performance liquid chromatography. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2018;13(2). <https://doi.org/10.29333/ejac/82931>.
10. Hiranvarachat B, Devahastin S. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*. 2012;126:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.024>.
11. Carle R, Schweiggert R. *Handbook on natural pigments in food and beverages*. Cambridge: Woodhead Publishing; 2016. 538 p.
12. Mérillon J-M, Ramawat KG. *Bioactive molecules in food*. Cham: Springer International Publishing; 2019. 2370 p.
13. Aparicio-Ruiz R, Mínguez-Mosquera MI, Gandul-Rojas B. Thermal degradation kinetics of lutein,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin in virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(6):811–820. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.009>.

14. Simonova OR, Zaitseva SV, Tyulyaeva EYu, Zdanovich SA, Koifman OI. Kinetics of  $\beta$ -carotene oxidation in the presence of highly active forms of  $\mu$ -carbido diiron(IV) tetraphenylporphyrinate. Russian Journal of Physical Chemistry A. 2018;92(11):2128–2134. (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0036024418110390>.
15. Pechinskii SV, Kuregyan AG. The impact of carotenoids on immunity (review). Pharmaceutical Chemistry Journal. 2014;47(10):509–513. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-0992-z>.
16. Ötles S. Methods of analysis of food components and additives. Boca Raton: CRC Press; 2011. 534 p. <https://doi.org/10.1201/b11218>.
17. Dawidowicz AL, Olszowy M. Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by  $\beta$ -carotene bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. European Food Research and Technology. 2010;231(6):835–840. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1333-4>.
18. Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients. 2014;6(2):466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
19. Socaciu C. Food colorants: Chemical and functional properties. Boca Raton: CRC Press; 2007. 648 p. <https://doi.org/10.1201/9781420009286>.
20. Kuregyan AG. The spectrophotometry in analysis of carotenoids. Fundamental research. 2015;2–23:5166–5172. (In Russ.).
21. Finkel'shtein EI. Modern methods of analysis of carotenoids (review). Pharmaceutical Chemistry Journal. 2016;50(2):96–107. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1405-2>.
22. Gasa-Falcon A, Acevedo-Fani A, Oms-Oliu G, Odriozola-Serrano I, Martín-Belloso O. Development, physical stability and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene-enriched tertiary emulsions. Journal of Functional Foods. 2020;64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103615>.
23. Niu B, Shao P, Sun P. Ultrasound-assisted emulsion electrosprayed particles for the stabilization of  $\beta$ -carotene and its nutritional supplement potential. Food Hydrocolloids. 2020;102. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105634>.
24. Salvia-Trujillo L, Verkempinck S, Rijal SK, Van Loey A, Grauwet T, Hendrickx M. Lipid nanoparticles with fats or oils containing  $\beta$ -carotene: Storage stability and *in vitro* digestibility kinetics. Food Chemistry. 2019;278:396–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.039>.
25. Borba CM, Tavares MN, Macedo LP, Araújo GS, Furlong EB, Dora CL. Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene nanoemulsions during storage and thermal process. Food Research International. 2019;121:229–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.045>.
26. Wei Y, Sun C, Dai L, Zhan X, Gao Y. Structure, physicochemical stability and *in vitro* simulated gastrointestinal digestion properties of  $\beta$ -carotene loaded zein-propylene glycol alginate composite nanoparticles fabricated by emulsification-evaporation method. Food Hydrocolloids. 2018;81:149–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.042>.
27. Hejri A, Khosravi A, Gharanjig K, Davarani MM. Effect of edible antioxidants on chemical stability of  $\beta$ -carotene loaded nanostructured lipid carriers. LWT – Food Science and Technology. 2019;113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108272>.
28. Baek EJ, Garcia CV, Shin GH, Kim JT. Improvement of thermal and UV-light stability of  $\beta$ -carotene-loaded nanoemulsions by water-soluble chitosan coating. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;165:1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.008>.
29. Cui M, Mao L, Lu Y, Yuan F, Gao Y. Effect of monoglyceride content on the solubility and chemical stability of  $\beta$ -carotene in organogels. LWT – Food Science and Technology. 2019;106:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.042>.
30. Rudometova NV, Kulishova KE. Stabilization of coloring substances in the composition of inclusive nanocomplexes based on starch products. Scientific Journal NRU ITMO. Processes and Food Production Equipment. 2018;(4):15–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2018-11-4-15-21>.
31. Bockuviene A, Sereikaite J. Preparation and characterisation of novel water-soluble  $\beta$ -carotene-chitoooligosaccharides complexes. Carbohydrate Polymers. 2019;225. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115226>.
32. Durante M, Lenucci MS, Gazza L, Taddei F, Nocente F, De Benedetto GE, et al. Bioactive composition and sensory evaluation of innovative spaghetti supplemented with free or  $\alpha$ -cyclodextrin chlated pumpkin oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub>. Food Chemistry. 2019;294:112–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.032>.
33. Rudometova NV, Kulishova KE, Kim IS. The influence of cyclodextrin and modified starches on the beta-carotene lightfastness in inclusion complexes. Scientific Journal NRU ITMO. Processes and Food Production Equipment. 2018;(3):3–11. (In Russ.). <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2018-11-3-3-11>.
34. Kulishov B, Kulishova K, Rudometova N, Fedorov A, Novoselov A. Advantages of electric resistance method for baking bread and flour confectionery products of functional purpose. Agronomy Research. 2020;18(4):2449–2464. <https://doi.org/10.15159/AR.20.211>.
35. Saha S, Walia S, Kundu A, Sharma K, Paul RK. Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Food Chemistry. 2015;177:369–375. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.039>.

36. Kostina NG, Podlegaeva TV, Sergeeva IYu. Extraction of plant pigments from local raw materials. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2019;49(4):522–530. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2019-4-522-530>.
37. Kaur P, Ghoshal G, Jain A. Bio-utilization of fruits and vegetables waste to produce  $\beta$ -carotene in solid state fermentation: Characterization and antioxidant activity. *Process Biochemistry*. 2019;76:155–164. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.10.007>.
38. Gong M, Bassi A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*. 2016;34(8):1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>.
39. Poojary MM, Barba FJ, Aliakbarian B, Donsi F, Pataro G, Dias DA. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs*. 2016;14(11). <https://doi.org/10.3390/md14110214>.
40. Zúñiga-Moreno A, Arenas-Quevedo MG, Elizalde-Solis O. Solubility of  $\beta$ -carotene and co-solutes in supercritical carbon dioxide for ternary systems: Experimental data and correlation. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019;148:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.005>.
41. Ivakhnov AD, Sadkova KS, Sobashnikova AS, Skrebets TE. Optimization of oil extraction from rowanberry waste in alcoholic beverage production. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2019;13(7):1135–1138. <https://doi.org/10.1134/S1990793119070091>.
42. Rubashvili I, Tsitsagi M, Ebralidze K, Tsitsishvili V, Eprikashvili L, Chkhaidze M, et al. Extraction and analysis of the major carotenoids of agro-industrial waste materials using sequential extraction techniques and high performance liquid chromatography. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2018;13(2). <https://doi.org/10.29333/ejac/82931>.
43. Figueira JA, Pereira JAM, Porto-Figueira P, Câmara JS. Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction followed by ultrahigh pressure liquid chromatography for the quantification of major carotenoids in tomato. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017;57:87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.022>.
44. Rodriguez-Amaya DB. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids – A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010;23(7):726–740. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.008>.
45. Rodrigues DB, Mariutti LRB, Mercadante AZ. Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2016;1457:116–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.039>.
46. Trineeva OV, Safonova EF, Slivkin AI. Separation and determination of a mixture of fat-soluble vitamins A, D<sub>2</sub>, and E and  $\beta$ -carotene by gradient thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(2):120–125. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1408-z>.