



Методи високоефективної рідинної хроматографії для визначення каротиноїдів

I. Ф. Дуйон ^{id}A,C,D,F, I. М. Кейтлін ^{id}B,C,D, Г. В. Мазулін ^{id}A,C,E

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті;
F – остаточне затвердження статті

Актуальним напрямом сучасних фармацевтичних досліджень є пошук нових сполук, що можуть ефективно пригнічувати процеси вільнорадикального окиснення на різних стадіях патологічного процесу. Зважаючи на перспективи практичного застосування, особливу увагу науковців привертають каротиноїди – природні біоантиоксиданти, що характеризуються високою біологічною активністю та мінімальною токсичністю. Основна функція каротиноїдів полягає у захисті клітинних мембран та інших структурних компонентів клітини від ушкоджувальної дії активних форм кисню, що обґрунтовує їхню важливу роль у підтриманні клітинного гомеостазу та профілактиці оксидативного стресу. У зв'язку з цим доцільним є поглиблене вивчення методів аналітичного контролю якості, зокрема визначення чистоти найбільш поширених груп каротиноїдів.

Мета роботи – узагальнення та систематизація наукових даних щодо методів аналізу біологічно активних каротиноїдів із використанням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з перспективою подальшого застосування отриманих результатів для оптимізації лабораторних аналітичних методик.

Матеріали і методи. Здійснено інформаційний пошук у наукометричних базах даних Scopus, Web of Science та PubMed. Для досягнення поставленої мети використано аналітичний, описовий та узагальнювальний методи дослідження. Матеріали для дослідження – дані сучасної наукової літератури, що присвячена визначенню чистоти, ідентифікації та структурному аналізу біологічно активних каротиноїдів методом ВЕРХ.

Результати. Здійснили аналіз доступних джерел фахової літератури, у яких висвітлено підходи до оцінювання чистоти та структурних особливостей біоактивних каротиноїдів із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії. Розглянуто основні хроматографічні параметри, що впливають на селективність і чутливість методу, а також особливості підготовки зразків для аналізу.

Висновки. На підставі аналізу сучасних джерел фахової літератури наведено приклади методик якісного та кількісного визначення методом ВЕРХ двох основних груп каротиноїдів – каротинів і ксантофілів. Здійснили порівняльний аналіз цих методик, враховуючи хроматографічні умови, типи нерухомих і рухомих фаз і детекційні підходи. У результаті обґрунтовано вибір оптимальних умов аналізу для подальших наукових і практичних досліджень.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, рідинний хроматограф, каротиноїди.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2026. Т. 19, № 2(51). С. 216-226

High-performance liquid chromatography methods for carotenoid determination

I. F. Duiun, I. M. Keitlin, G. V. Mazulin

A relevant area of pharmaceutical research is the search for new compounds capable of inhibiting free radical oxidation at various stages of the pathological process. Taking into account the prospects for practical application, particular attention of researchers is focused on carotenoids as natural bioantioxidants characterized by high biological activity and minimal toxicity. The primary function of carotenoids is to protect cellular membranes and other structural components of the cell from the damaging effects of reactive oxygen species, which determines their important role in maintaining cellular homeostasis and preventing oxidative stress. In this context, an in-depth study of analytical quality control methods, particularly the determination of the purity of the most common groups of carotenoids, is of significant interest.

Aim of the study. The aim of this study was to generalize and systematize scientific data on the methods of analysis of biologically active carotenoids using high-performance liquid chromatography (HPLC), with the prospect of further application of the obtained results for the optimization of laboratory analytical methods.

Materials and methods. An information search was conducted using the following scientometric databases: Scopus, Web of Science, and PubMed. Analytical, descriptive, and generalization methods were applied to achieve the objectives of the study. The research materials

ARTICLE INFO

UDC 615.32:547.979.8:543.544.5.068.7
DOI: [10.14739/2409-2932.2026.2.355779](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2026.2.355779)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice. 2026;19(2):216-226

Keywords: high-performance liquid chromatography, liquid chromatograph, carotenoids.

Received: 30.03.2026 // Revised: 21.05.2026 // Accepted: 27.05.2026

© The Author(s) 2026. This is an open access article under the [Creative Commons CC BY 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

included data from contemporary scientific literature sources addressing the determination of purity, identification, and structural analysis of biologically active carotenoids by HPLC.

Results. An analysis of available scientific literature sources was performed, focusing on approaches to the assessment of purity and structural characteristics of bioactive carotenoids using high-performance liquid chromatography. The main chromatographic parameters influencing the selectivity and sensitivity of the method, as well as sample preparation features, were considered.

Conclusions. Based on the analysis of current scientific literature, examples of qualitative and quantitative determination methods for two major groups of carotenoids – carotenes and xanthophylls – using HPLC were identified. A comparative analysis of these methods was carried out, taking into account chromatographic conditions, types of stationary and mobile phases, and detection approaches, which substantiates the selection of optimal analytical conditions for further scientific and practical research.

Keywords: high-performance liquid chromatography, liquid chromatograph, carotenoids.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice. 2026;19(2):216-226

Каротиноїди – велика та структурно різноманітна група природних пігментів ліпофільної природи, що належать до класу тетратерпенів і за хімічною будовою є C_{40} -ізопреновими сполуками. Вони дуже поширені у природі та синтезуються переважно рослинами, водоростями, ціанобактеріями, а також окремими видами бактерій і грибів. У вищих рослин каротиноїди локалізуються переважно у хлоропластах і хромопластах, де виконують важливі біологічні та фізіологічні функції [1,2].

Хімічна структура каротиноїдів складається з восьми ізопренових одиниць, які формують подовжений полієновий ланцюг із великою кількістю спряжених подвійних зв'язків. Саме наявність цієї системи подвійних зв'язків зумовлює характерні спектральні властивості каротиноїдів і забезпечує їхнє інтенсивне забарвлення в жовті, помаранчеві або червоні тони. Водночас така структура визначає високу реакційну здатність каротиноїдів, зокрема їхні антиоксидантні властивості та чутливість до дії світла, кисню й підвищених температур [3].

Залежно від елементного складу молекул каротиноїдів їх класифікують як каротини, тобто ациклічні або циклічні вуглеводні (β -каротин, лікопін, α -каротин, λ -каротин), та ксантофіли – кисневмісні похідні, що включають гідроксильні, епоксидні або кетонні функціональні групи (лютеїн, зеаксантин, астаксантин тощо).

Біологічно активні каротиноїди є структурними компонентами фотосинтетичного апарату та беруть участь у поглинанні світлової енергії з подальшою передачею її на хлорофіли. Крім того, вони виконують захисну функцію, запобігаючи фотодеструкції хлорофілу та інших клітинних компонентів за умов надмірного освітлення. Завдяки здатності ефективно знешкоджувати активні форми кисню, зокрема синглетний кисень і вільні радикали, каротиноїди мають виражені антиоксидантні властивості. Наявність кисню підвищує полярність ксантофілів, що суттєво впливає на їхню інтеграцію в біологічні мембрани [4,5].

Окремі каротиноїди (насамперед β -каротин) мають статус провітамінів А. У результаті ферментативного розщеплення вони трансформуються в ретинол, необхідний для підтримання зорової функції, процесів проліферації та диференціації епітелію, а також імунної резистентності [6].

До групи каротиноїдів належать такі сполуки, як β -каротин, α -каротин, γ -каротин, δ -каротин, ζ -каротин та ϵ -каротин. Найбільш вивченим і біологічно значущим є β -каротин, який характеризується найвищою провітамінною активністю. Лікопін, хоча й не виявляє властивостей провітаміну А, є потужним антиоксидантом і зумовлює інтенсивне червоне забарвлення плодів томатів, кавуна та деяких інших рослинних продуктів [6,7].

Ксантофіли, що містять молекулу кисню, характеризуються вищою полярністю порівняно з вуглеводневими каротинами. Наявність гідроксильних (лютеїн, зеаксантин), епоксидних (віолаксантин) або кетогруп (астаксантин, кантаксантин) суттєво змінює їхні фізико-хімічні властивості, зокрема розчинність та амфільність. Ці структурні особливості суттєво впливають на потенціал клітинних мембран: на відміну від каротинів, ксантофіли переважно орієнтуються трансмембранно, що підвищує стабільність мембран і модулює їхню проникність [7].

До специфічних представників ксантофілів належать лютеїн і зеаксантин (дигідроксикаротини), що відіграють критичну роль у функціонуванні зорового аналізатора. Ці сполуки, вибірково накопичуючись у макулярній ділянці сітківки (*macula lutea*), утворюють макулярний пігмент. Їхня функція полягає у фільтрації високоенергетичного синього світла та прямій антиоксидантній нейтралізації активних форм кисню, що запобігає розвитку вікової макулярної дегенерації та фотохімічному ушкодженню фоторецепторів [8].

Похідні ксантофілів астаксантин (3,3'-дигідрокси-4,4'-дикето- β -каротин) характеризується вираженим антиоксидантним потенціалом, який за певними показниками перевищує такий у β -каротин та α -токоферолу. Завдяки унікальній будові він може одночасно нейтралізувати вільні радикали і в гідрофільній, і в гідрофобній зонах мембрани. У гідробіонтів (ряд ракоподібних, лососеві риби) астаксантин не лише зумовлює специфічне червоно-рожеве забарвлення м'язової тканини й екзоскелета, але й бере участь у забезпеченні стресостійкості організму [7,8].

Специфічні ксантофіли, притаманні рослинам роду *Capsicum*, капсантин і капсорубін визначають інтенсивну червону пігментацію плодів, їх визначають як перспективні біоактивні компоненти з ліпотропною та антиканцерогенною діями.

Антиоксидантна дія каротиноїдів базується на інгібуванні пероксидного окиснення ліпідів та елімінації активних форм кисню. Зменшення інтенсивності оксидативного стресу під впливом каротиноїдів є важливим чинником у профілактиці хронічних дегенеративних і серцево-судинних захворювань – однієї з основних причин передчасної смерті та інвалідності населення [9,10]. Крім того, встановлено їхню здатність до синергічної взаємодії з токоферолами та аскорбіновою кислотою, що модулює активність ендогенних ферментативних систем захисту.

Зважаючи на високу терапевтичну значущість і перспективність каротиноїдів як джерел для розробки нових лікарських засобів, актуальним завданням сучасної фармацевтичної науки є вдосконалення методів стандартизації та контролю чистоти цих сполук.

Мета роботи

Узагальнення та систематизація наукових даних щодо методів аналізу біологічно активних каротиноїдів із використанням методу високоефективної рідинної хроматографії з перспективою подальшого застосування отриманих результатів для оптимізації лабораторних аналітичних методик.

Матеріали і методи дослідження

Як завдання наукового дослідження визначили аналіз методів кількісного аналізу каротиноїдів шляхом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Здійснили інформаційний пошук у наукометричних базах Scopus, Web of Science, PubMed; під час роботи використали аналітичний та описовий методи, виконали систематизацію та узагальнення відомостей фахової літератури, що опублікована за останні 5–7 років. Матеріал для дослідження – відомості сучасних джерел наукової літератури щодо результатів досліджень біологічно активних каротиноїдів методом ВЕРХ. Пошук здійснено за такими ключовими словами: high-performance liquid chromatography, liquid chromatograph, carotenoids.

Результати

У сучасній фаховій літературі визначення та кількісний аналіз основних груп каротиноїдів, зокрема β -каротину, α -каротину, лікопіну, лютеїну та зеаксантину, здійснюють із застосуванням методу ВЕРХ. Ефективність впровадження сучасного фізико-хімічного методу дослідження в аналізі каротиноїдів ґрунтується на специфічних міжмолекулярних взаємодіях між аналітами, стаціонарною та рухомою фазами [11].

Вибір конкретного варіанта хроматографічного розділення – нормально-фазної (NP-HPLC) або обернено-фазної (RP-HPLC) ВЕРХ – детермінується хімічною структурою досліджуваних сполук та особливостями матриці, до яких належать лікарські форми, рослинна сировина, біологічні рідини, дієтичні добавки та косметичні засоби [11,12]. Підготовка аналітів до хроматографічного

визначення – вкрай важливий етап, що передбачає багаторазову екстракцію з використанням таких органічних розчинників, як ацетон, гексан, ацетонітрил або метанол, часто – у комбінаціях [12].

За даними наукових джерел, зважаючи на високу лабільність полієнових структур та їхню схильність до фотоокиснення, на етапі підготовки зразків доцільним є додавання антиоксидантів (наприклад, бутилгідрокситолуолу). У разі аналізу складних матриць, що містять ліпіди або хлорофіли, проводять процедуру сапоніфікації шляхом обробки екстракту спиртовим розчином луку (KOH у метанолі) з наступною фільтрацією та концентруванням отриманого розчину [12,13,14].

Оскільки каротиноїди є високоліпофільними сполуками, провідним механізмом в обернено-фазному варіанті (RP-HPLC) є дисперсійна взаємодія (сили ван дер Ваальса) між довгим полієновим ланцюгом молекули та алкільними ланцюгами нерухомої фази. При використанні найбільш поширених стаціонарних фаз типу C18 (октадецилсиліл), розділення відбувається внаслідок гідрофобної адсорбції.

Відомо, що каротиноїди з більшою кількістю подвійних зв'язків та без полярних функціональних груп (наприклад, лікопін або β -каротин) мають вищу спорідненість до неполярної фази, що зумовлює їх триваліше утримування порівняно з ксантофілами [14].

Наявність гідроксильних або кетогруп у структурі ксантофілів (лютеїну, зеаксантину) створює умови для слабких диполь-дипольних взаємодій із залишковими силанольними групами силікагелю або компонентами рухомої фази, що підвищує їхню полярність і пришвидшує елюювання. Особливе значення в аналізі каротиноїдів має застосування стаціонарних фаз C30 (тріаконтил) [12,14].

Фізико-хімічною основою переваги C30 є висока щільність і значна довжина вуглеводневих ланцюгів, що формують товстий гідрофобний шар. Це створює умови для «стеричного розпізнавання» геометрії молекул. Зокрема, лінійні транс-ізмери каротиноїдів здатні глибше інтегруватися в структуру C30-фази порівняно з об'ємними цис-ізомерами, що мають «злам» у вуглецевому скелеті. Таке розрізнення за просторовою конфігурацією дає змогу досягти високої роздільної здатності між геометричними ізомерами, що є критичним для оцінювання біологічної цінності сировини, оскільки транс-форми зазвичай характеризуються вищою біодоступністю [15].

Науковці обґрунтовано доводять, що в нормально-фазному варіанті (NP-HPLC) механізм розділення докорінно змінюється: провідну роль відіграють адсорбційні взаємодії та водневі зв'язки між полярними групами ксантофілів та активними центрами стаціонарної фази (силікагель, аміно- або ціаногрупи) [15,16]. У цьому разі каротини елюються першими через мінімальну взаємодію з полярною поверхнею, а ксантофіли утримуються міцніше залежно від кількості та природи окисгенованих замісників. Розуміння цих термодинамічних і кінетичних аспектів взаємодії дає змогу прецизійно обирати склад

1

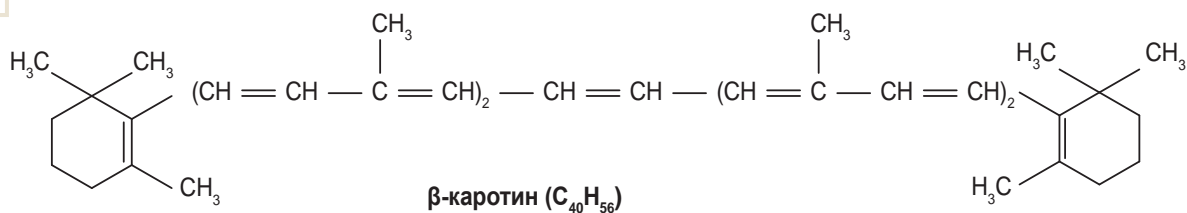


Рис. 1. Формула β-каротину.

Таблиця 1. Характеристика валідаційних параметрів β-каротину

Показник	Типові значення
Лінійність	$r^2 > 0,999$ у діапазоні 1–20 мкг/мл
Межа виявлення	~0,1 мкг/мл
Межа кількісного визначення	~0,3 мкг/мл
Прецизійність	RSD ≤2 %
Правильність	95–105 %

елюентів для досягнення максимальної селективності аналізу [16].

Аналітичне розділення каротиноїдів найчастіше реалізується в умовах обернено-фазної хроматографії з використанням стаціонарних фаз C18 або спеціалізованих колонок C30, що забезпечують вищу селективність щодо геометричних ізомерів. Температурний режим колонки зазвичай підтримують у діапазоні 25–30 °C при швидкості потоку рухомої фази 0,5–1,0 мл/хв. Детектування здійснюють за допомогою УФ-видимих детекторів (DAD або PDA) у діапазоні довжин хвиль 200–500 нм [15].

Специфічне кількісне визначення здійснюють при максимумах поглинання, характерних для окремих сполук: для β-каротину цей показник становить 450–470 нм, для лютеїну та зеаксантину – 445–450 нм, для лікопіну – 470–480 нм. Розроблені методики потребують обов'язкової валідації за параметрами специфічності, правильності, прецизійності (збіжність і внутрішньолaboratorна відтворюваність), лінійності, діапазону застосування, робасності, а також визначення меж виявлення (DL) та кількісного визначення (QL) [16].

Оскільки водні системи мають обмежену здатність до елюювання щодо таких гідрофобних аналітів, у RP-HPLC використовують суміші ацетонітрилу, метанолу та тетрагідрофурану (ТГФ). Ацетонітрил забезпечує низьку в'язкість системи та стабільність базової лінії, проте для посилення сили елюювання та покращення розчинності часто додають метанол або ТГФ. Застосування ТГФ є особливо важливим для розділення лікопіну, оскільки він запобігає агрегації молекул і забезпечує симетрію хроматографічних піків. Оптимізація складу елюенту (ізократичний або градієнтний режими) дає змогу досягти чіткого розділення таких структурних ізомерів, як α- та β-каротину, що є необхідною умовою для відповідності

вимогам провідних фармакопей (Ph. Eur., USP) щодо контролю якості препаратів каротиноїдів [17].

Методологічні аспекти хроматографічного визначення вмісту β-каротину. β-каротин (рис. 1) за хімічною природою є ліпофільним каротиноїдом із вираженими неполярними властивостями. Ключовою структурною особливістю молекули є розгалужена система з одинадцяти спряжених подвійних зв'язків, що зумовлює її здатність до інтенсивного поглинання світла у видимій області спектра з максимумом приблизно при 450 нм [18,19].

Саме ці фізико-хімічні характеристики лежать в основі вибору аналітичних методів його ідентифікації та кількісного визначення, серед яких провідне місце посідає ВЕРХ із застосуванням УФ-видимого або діодно-матричного детектування (DAD). Процес хроматографічного розділення β-каротину ґрунтується на механізмах класичної гідрофобної взаємодії [19,20].

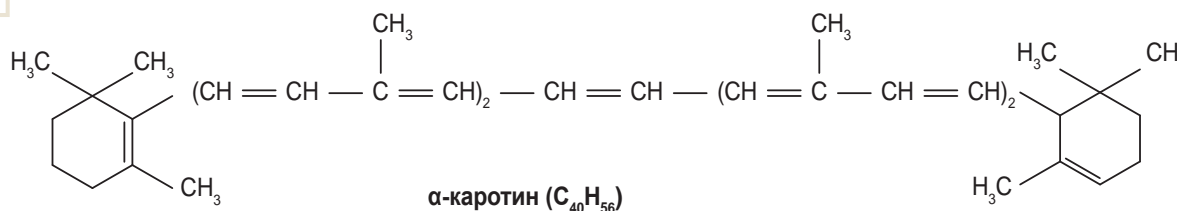
Як «золотий стандарт» для рутинних аналізів визначено нерухомі фази типу C18. Вибір колонок цього типу зумовлений високим ступенем неполярності аналіту, що забезпечує стабільне утримування на сорбенті та відтворюваність результатів в ізократичному режимі елюювання.

Фази C18 мають певні обмеження при необхідності розділення геометричних ізомерів (транс-, 9-цис-, 13-цис- тощо) з подібною полярністю. У таких випадках альтернативним рішенням є використання фази C30, що характеризується довшими алкільними ланцюгами та вищою гідрофобністю. Завдяки специфічній впорядкованості поверхні, фаза C30 має просторову (стеричну) селективність, що дає змогу ефективніше розрізнити ізомери за формою їхніх молекул [20,21,22].

Особливу увагу під час розроблення методики аналізу слід приділяти стабільності сполуки. Оскільки β-каротин є чутливим до впливу світла, кисню та термічного фактора, що призводить до його окиснення та ізомеризації, підготовку проб та екстракцію гексаном необхідно здійснювати в умовах мінімальної освітленості та, за можливості, в інертному середовищі.

У численних наукових публікаціях показано: для стабілізації аналіту до екстракційної суміші доцільно додавати антиоксиданти, зокрема бутилгідрокситолуол (БГТ). Стандартизована процедура кількісного визначення передбачає використання методу зовнішнього стандарту або побудову калібрувальної кривої за площею піка у визначеному діапазоні концентрацій [23,24].

2

Рис. 2. Формула α -каротину.

Валідаційні параметри підтверджують високу аналітичну надійність методу ВЕРХ у контролі якості фармацевтичної та харчової продукції, що містить каротиноїди (табл. 1) [25].

Методологічні аспекти хроматографічного визначення α -каротину. Подальший аналіз каротиноїдного складу потребує детального розгляду методик визначення α -каротину (рис. 2). Оскільки α - та β -каротини є структурними ізомерами, загальні принципи їх розділення методом RP-HPLC мають чимало спільних рис, проте є критичні відмінності, зумовлені особливостями їхньої молекулярної будови.

Відомо, що головна структурна розбіжність полягає у конфігурації іононових кілець: якщо молекула β -каротину містить дві β -іононові групи, то α -каротин характеризується наявністю однієї β -та однієї α -іононової групи [26]. Ця, на перший погляд, незначна зміна суттєво впливає на просторову форму молекули, її взаємодію з нерухомою фазою колонки та спектральні характеристики. Зокрема, максимуми поглинання α -каротину зміщені в короткохвильову область (444–448 нм) порівняно з β -ізомером (450–452 нм), що при використанні діодно-матричного детектора (DAD) дає змогу здійснювати додаткову ідентифікацію аналітів за формою їхніх спектрів.

У хроматографічній практиці вибір нерухомої фази безпосередньо залежить від мети дослідження. Для індивідуального визначення β -каротину як основного компонента зазвичай достатньо використання колонок типу C18.

За сучасними даними, під час аналізу складних сумішей, де містяться обидва ізомери, виникає ризик часткового перекривання піків через близьку гідрофобність сполук. У таких випадках пріоритет віддають колонкам із фазою C30, що завдяки вищій стеричній селективності забезпечують чітке розділення α - та β - фракцій [27,28].

Методика кількісного визначення передбачає окреме калібрування для кожного ізомеру, оскільки вони мають різні коефіцієнти молярної екстинкції. Типові умови хроматографування включають використання суміші ацетонітрилу, метанолу та тетрагідрофурану як рухомої фази в ізократичному або градієнтному режимах [29,30].

Результати сучасних досліджень, наведені у фаховій літературі, обґрунтовують такі параметри методики (табл. 2) [31]:

Таблиця 2. Характеристика валідаційних параметрів α -каротину

Показник	Типові значення
Лінійність	$r^2 > 0,999$ у діапазоні 1–20 мкг/мл
Межа виявлення	~0,1 мкг/мл
Межа кількісного визначення	~0,3 мкг/мл
Прецизійність	RSD ≤ 2 %
Правильність	95–105 %

1. Апаратура та матеріали: система ВЕРХ із DAD/ PDA або УФ-детектором; колонка C18 (наприклад, 250 × 4,6 мм, 5 мкм); мембранні фільтри (0,45 мкм); аналітичні ваги, вортекс, центрифуга;

2. Реактиви та рухома фаза: метанол, ацетонітрил, ТГФ – HPLC grade; гексан – для екстракції; стандарт α -каротину (чистота ≥ 95 %);

3. Хроматографічні умови: колонка – C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм; температура колонки – 25–30 °C (кімнатна); рухома фаза – ацетонітрил : метанол : тетрагідрофуран (60:30:10); режим – ізократичний або градієнтний; швидкість потоку – 1,0 мл/хв. Детектор – PDA або УФ; довжина хвилі для α -каротину є максимум поглинання ≈ 444 нм; об'єм ін'єкції – 20 мкл.

Фахівці акцентують увагу на дотриманні протоколів підготовки проб, що включає такі етапи:

1. Гомогенізація – подрібнена проба (1–2 г);
2. Екстракція – суміш гексан : ацетон : етанол (2:1:1), 10–15 мл із додаванням БГТ;
3. Струшування, ультразвук або нагрівання (до 40 °C);
4. Центрифугування та відбір надосадової рідини;
5. Повторна екстракція (2–3 рази), об'єднання екстрактів;
6. Сушіння екстракту над безводним сульфатом натрію;
7. Упарювання досуха на роторному випарнику (T ≤ 40 °C);
8. Розчинення залишку в рухомій фазі (або ацетонітрилі);
9. Фільтрація через мембрану 0,45 мкм.

Отже, незважаючи на єдиний методологічний підхід, визначення α -каротину потребує вищої селективності системи. У разі аналізу окремих ізомерів доцільним є застосування стандартних фаз C18, проте для прецизійного розділення суміші ізомерів оптимальним є викори-

Таблиця 3. Порівняльна характеристика хроматографічних умов аналізу каротиноїдів

Параметр та умови	β -каротин	α -каротин
Визначення окремо	Просте	Рідко роблять окремо
У суміші	Легко	Потребує кращого розділення
Колонка	C18 достатньо	Часто C30
Ризик перекривання	Невеликий	Вищий

3

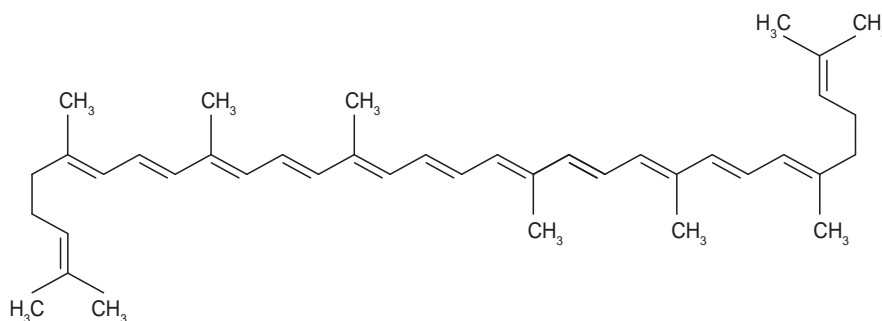


Рис. 3. Формула лікопіну.

Таблиця 4. Характеристика валідаційних параметрів лікопіну

Параметр	Типові значення
Лінійність	$r^2 > 0,999$ у діапазоні 1–20 мкг/мл
Межа виявлення	~0,05–0,1 мкг/мл
Межа кількісного визначення	~0,15–0,3 мкг/мл
Прецизійність (RSD)	≤ 2 %
Правильність	95–105 %

стання спеціалізованих колонок із фазою C30 (табл. 3) [31,32,33].

Методологічні аспекти хроматографічного визначення лікопіну методом ВЕРХ. Відомо, що визначення лікопіну (рис. 3) в об'єктах рослинного походження та фармацевтичних препаратах ґрунтується на застосуванні методу RP-HPLC у поєднанні з високоселективним спектрофотометричним детектуванням [16,34].

Лікопін є ациклічним каротиноїдом, структура якого повністю представлена вуглеводневим ланцюгом без кисневмісних функціональних груп. Така будова зумовлює його екстремальну ліпофільність і наявність унікальної системи з 11 спряжених подвійних зв'язків, що є фізико-хімічним базисом для його ідентифікації. Процес хроматографічного розділення реалізується завдяки гідрофобним взаємодіям між молекулою лікопіну та алкільними ланцюгами нерухомої фази (зазвичай октадецилсилан, C18) [34,35,36].

Внаслідок високої гідрофобності лікопін характеризується значним часом утримування, елююючись пізніше за більш полярні каротиноїди. Детектування аналіту ґрунтується на явищі інтенсивного світлопоглинання у видимій області спектра, зумовленого $\pi \rightarrow \pi^*$ елек-

тронними переходами в системі спряжених полієнів. Максимум поглинання лікопіну визначають у діапазоні 470–475 нм, що забезпечує високу селективність методу: більшість супутніх матричних компонентів у цій області спектра не поглинають [36].

Використання діодно-матричного детектора (PDA/DAD) дає змогу додатково контролювати спектральну чистоту піка та диференціювати лікопін від β -каротину, що має відмінний спектральний профіль [36].

Практична реалізація методики потребує суворого контролю умов екстракції та аналізу через високу схильність лікопіну до окиснення, фотодеградації та термоіндукованої транс-цис ізомеризації.

Хроматографічні умови: колонка – C18, 250 \times 4,6 мм, 5 мкм; температура – 25–30 $^{\circ}$ C; рухома фаза – ацетонітрил : метанол : тетрагідрофуран (60:30:10) або ацетонітрил : метанол (70:30); режим елюювання – ізократичний або градієнтний; швидкість потоку – 1,0 мл/хв; детектор – PDA/DAD [37].

У результаті аналізу відомостей наукової літератури визначено параметри протоколів підготовки проб, що передбачає гомогенізацію зразка з наступною багатоетапною екстракцією сумішшю гексану, ацетону та етанолу. Для забезпечення стабільності аналіту екстракцію здійснюють при мінімальному освітленні, використовуючи дегазовані розчинники та додаючи антиоксиданти (наприклад, БГТ) [38,39]. Процедура включає такі етапи:

1. Екстракція – суміш гексан : ацетон : етанол (2:1:1), струшування 10–15 хв, можливе використання УЗД;
2. Центрифугування – 10 хв при 4000 об./хв;
3. Відбір верхнього (гексанового) шару;
4. Повторна екстракція (2–3 рази), об'єднання гексанових шарів;

4

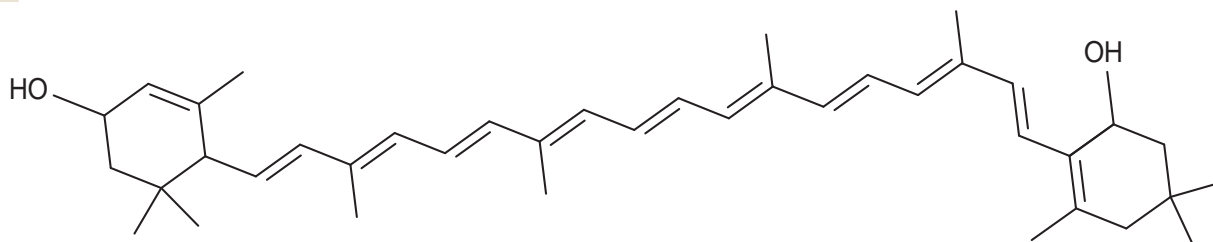


Рис. 4. Формула лютеїну.

5. Промивання дистильованою водою для видалення ацетону та етанолу;

6. Сушіння екстракту над безводним сульфатом натрію;

7. Випаровування досуха під азотом або у вакуумі при ≤ 40 °С;

8. Розчинення сухого залишку в 2 мл рухомої фази;

9. Фільтрація через мембранний фільтр 0,45 мкм.

Отриманий гексановий екстракт промивають водою, сушать над безводним натрію сульфатом та упарюють у вакуумі або в струмені азоту при температурі, що не перевищує 40 °С. Кількісне визначення здійснюють шляхом побудови калібрувальної кривої за площею піка стандартних розчинів лікопіну (концентраційний діапазон 1–20 мкг/мл).

Встановлено, що використання рухомої фази ацетонітрил : метанол : тетрагідрофуран (60:30:10) забезпечує оптимальну роздільну здатність і відтворюваність результатів. Застосування цього методу дає змогу здійснювати прецизійний моніторинг вмісту лікопіну, що є критично важливим для стандартизації сировини й оцінювання якості готових лікарських форм (табл. 4) [39,40].

Для точного розділення цис-/транс-ізомерів лікопіну доцільно використовувати колонку C30, що забезпечує кращу селективність для каротиноїдів.

Методологічні аспекти визначення лютеїну методом ВЕРХ. Для визначення лютеїну (рис. 4) методом ВЕРХ найчастіше застосовують обернено-фазову колонку (C18), оскільки вона забезпечує ефективне розділення каротиноїдів, зокрема лютеїну та зеаксантину, що мають дуже подібну хімічну структуру [41,42].

Визначення вмісту лютеїну в рослинній сировині та фармацевтичних препаратах потребує застосування високоселективних методів аналізу, серед них провідне місце посідає RP-HPLC. Лютеїн належить до групи ксантофілів – оксигенованих каротиноїдів, молекула яких містить дві гідроксильні групи (-OH) на кінцях іононових кілець [42].

Наявність цих полярних замісників зумовлює специфіку його хроматографічної поведінки: незважаючи на загальну ліпофільність молекули, лютеїн має вищу полярність порівняно з вуглеводневими каротиноїдами, як-от α - і β -каротином. Ця властивість є ключовою під час вибору складу рухомої фази та прогнозуванні часу утримування сорбентом.

В основі механізму хроматографічного розділення – розподільний механізм між неполярною нерухомою фазою (традиційно – алкільні ланцюги C18 або спеціалізовані C30) та полярною рухомою фазою. Через наявність гідроксильних груп лютеїн утримується на колонці менш інтенсивно, ніж лікопін або β -каротин, що дає змогу досягти оптимальної селективності шляхом прецизійного налаштування складу елюенту [43,44].

Ефективність розділення ґрунтується на поєднанні двох факторів: гідрофобної взаємодії, що забезпечується розподілом молекули між фазами залежно від її помірної полярності, та спектральних характеристик, оскільки завдяки розгалуженій системі спряжених подвійних зв'язків лютеїн має характерний спектр поглинання із максимумом у діапазоні 445–450 нм. Це дає змогу використовувати діодно-матричні (PDA/DAD) або UV-Vis детектори для селективної ідентифікації речовини навіть у складних багатокомпонентних сумішах каротиноїдів.

Процес підготовки проб – ключовий етап, оскільки каротиноїди характеризуються високою фото- та термолабільністю. Процедура зазвичай включає екстракцію органічними розчинниками (суміші ацетону, метанолу та гексану) протягом 15–30 хв у захищеному від світла місці [44].

Особливу увагу слід приділити стадії омилення (saponification). Оскільки в рослинних об'єктах лютеїн часто перебуває в етерифікованій формі (ефіри жирних кислот), лужний гідроліз дає змогу вивільнити вільний лютеїн для коректного кількісного аналізу. Фінальний етап підготовки передбачає обов'язкову фільтрацію через мембранні фільтри з розміром пор 0,22 мкм для захисту хроматографічної системи [45].

Для досягнення високої роздільної здатності при хроматографуванні використовують обернено-фазові колонки. Стандартні фази C18 (наприклад, Waters Symmetry або Phenomenex Luna) дають змогу отримати хороші результати, для аналізу складних сумішей ізомерів (зокрема, розділення лютеїну та зеаксантину) пріоритетним є використання колонок YMC Carotenoid C30. Довші алкільні ланцюги фази C30 сприяють кращому розпізнаванню геометричних цис-/транс-ізомерів [43,46].

Типові системи рухомих фаз включають градієнтні або ізократичні умови та суміші метанолу, ацетонітрилу та

ТГФ. Додавання ТГФ часто необхідне для покращення розчинності каротиноїдів у системі. Для запобігання деградації аналітів безпосередньо в елюент рекомендують додавати антиоксиданти, наприклад, 0,1 % БГТ. Оптимальна швидкість потоку становить 0,5–1,0 мл/хв при температурі термостата колонок 25–30 °С.

Нерухома фаза: колонка C18 (RP-HPLC) – Waters Symmetry C18, розмір частинок 5 мкм, розмір $4,6 \times 250$ мм; YMC Carotenoid C30 (якщо потрібне якісніше розділення з зеаксантином та іншими каротиноїдами) – спеціалізована колонка C30 (з довголанцюговою фазою), розмір $4,6 \times 250$ мм, частинки 3–5 мкм, забезпечує краще розділення ізомерів (наприклад, цис-/транс-форм, лютеїн / зеаксантин); Phenomenex Luna C18(2), розмір $4,6 \times 150$ або 250 мм, частинки 5 мкм; Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Кількісний аналіз здійснюють методом зовнішнього стандарту з використанням сертифікованих еталонних зразків високої чистоти. Концентрацію обраховують на основі побудови калібрувальної залежності площі піка від концентрації розчину [46].

Відповідно до міжнародних стандартів (ICH, настанови фармакопей), розроблена методика потребує обов'язкової валідації за такими параметрами: специфічність – здатність методу чітко розділяти лютеїн і його найближчий структурний ізомер зеаксантин; лінійність – коефіцієнт кореляції (r^2) має бути не менше ніж 0,999 у робочому діапазоні концентрацій; чутливість – визначення межі виявлення та межі кількісного визначення; прецизійність – відтворюваність результатів у межах однієї серії та в різні дні аналізу.

Отже, дійшли висновку, що використання методу RP-HPLC із застосуванням колонок C18 або C30 є найбільш обґрунтованим підходом для стандартизації лютеїновмісних об'єктів. Завдяки врахуванню полярності гідроксильних груп і специфічних спектральних властивостей ксантофілів цей метод характеризується високою точністю, надійністю та відтворюваністю результатів аналізу [46,47].

Обмеження методу ВЕРХ (HPLC) при аналізі каротиноїдів зумовлені і властивостями сполук, й особливостями методу. По-перше, каротиноїди є нестабільними: вони чутливі до світла, легко окиснюються (O_2) та ізомеризуються (транс \rightarrow цис), що призводить до втрат під час пробопідготовки, зміни складу зразка та викривлення результатів. По-друге, пробопідготовка є складною й часто включає екстракцію (часто багатоступеневу), сапоніфікацію (хоч і не завжди, але доволі часто потрібна), очищення та концентрування. Ці чинники зумовлюють трудомісткість процесу, підвищують ризик втрат аналітів і варіабельність результатів. По-третє, додаткові труднощі виникають під час розділення: через подібність структур і наявність ізомерів можливе перекриття піків і помилки ідентифікації; застосування колонок C30 покращує ситуацію, але збільшує тривалість аналізу та його вартість. По-четверте, селективність детекції обмежена (переважно використовують UV-Vis/DAD), оскільки каротиноїди мають подібні спектри й часто потребують стандартів

для надійної ідентифікації. Метод також є витратним (дорогі колонки, розчинники, стандарти) і тривалим (довгі градієнти, складна пробопідготовка). Важливим обмеженням є й вимоги до розчинників: через гідрофобність каротиноїдів використовують специфічні системи (гексан, МТВЕ, ацетон), не завжди сумісні з ВЕРХ без додаткових етапів.

У підсумку метод не є універсальним: різні матриці потребують різних методик, і єдиного рішення для всіх випадків досі немає.

Обговорення

Аналіз сучасних джерел наукової літератури дав змогу навести приклади методів аналізу каротиноїдів з використанням ВЕРХ [11,12,13,14]. Аналіз публікацій щодо методик визначення чистоти каротиноїдів дав підстави зробити висновок, що сучасні підходи є науково обґрунтованими та мають спільні методологічні засади. Це дає змогу їх узагальнити, систематизувати та використовувати надалі для оптимізації аналітичного контролю якості каротиноїдовмісних сполук.

Сильно гідрофобні сполуки, що не мають або майже не мають у структурі полярних функціональних груп, аналізують методом нормально-фазної ВЕРХ із неполярними розчинниками у складі рухомої фази (ацетон, гексан) [12,13,14]. Більш полярні сполуки аналізують методом обернено-фазної ВЕРХ із більш полярними розчинниками у складі рухомої фази (ацетонітрил, метанол, ТГФ). Аналітичні довжини хвиль мають бути більшими, ніж величини UV-cut off застосовуваних розчинників. Зауважимо, що каротиноїди здебільшого є речовинами, що легко окиснюються, тому під час аналізу застосовують консервант БГТ [20,21].

Процес пробопідготовки передбачає екстракцію цільової речовини (чи речовин) органічними розчинниками, у яких буде розчинятися цільова речовина (чи речовини) [21].

Щодо вибору нерухомих фаз, то узагальнення цього питання є ускладненим у зв'язку зі значною різноманітністю хімічної будови речовин, зокрема йдеться про мінливість їхньої молекулярної структури, полярність, ступінь кон'югації та наявність різних функціональних груп. Ці структурні відмінності зумовлюють відмінний характер міжмолекулярних взаємодій з нерухомою фазою, що потребує індивідуального підходу до її вибору для забезпечення оптимальної селективності, роздільної здатності та відтворюваності аналітичних результатів.

Біологічно активні каротини, що є джерелом потенційних лікарських засобів (вуглеводневі каротиноїди), як-от α -каротин, β -каротин, лікопін і лютеїн, є суто гідрофобними сполуками, без жодної полярної групи в хімічній структурі. Їх утримування на гідрофобній поверхні нерухомої фази є «класичною» обернено-фазною взаємодією і здійснюється за допомогою безводних розчинників: ацетонітрилу, метанолу та ТГФ (останній застосовують саме для розділення особливо гідрофобних сполук). Для

Таблиця 5. Оптимальні умови ВЕРХ-аналізу каротиноїдів

Параметр	Умови для рутинного аналізу каротиноїдів	Умови для розділення ізомерів каротиноїдів
Нерухома фаза	Октадецилсиліл (C18), 250 × 4,6 мм, 5 мкм	C30-колонки або октатріаконтисилікагель (C30 bonded phase) 250 × 4,6 мм, 5 мкм
Рухома фаза	Ацетонітрил : метанол : ТГФ (60:30:10)	Ацетонітрил : метанол : ТГФ (в ізократичному або градієнтному режимі)
Швидкість потоку	0,5–1,0 мл/хв	1,0 мл/хв
Температура	25–30 °С	25–30 °С
Детектування	DAD / PDA / УФ (200–500 нм)	DAD / PDA / УФ (200–500 нм), додатково контроль спектральної чистоти піка

Таблиця 6. Стандартизований протокол підготовки зразків

Етап	Умови пробопідготовки	Мета етапу
Гомогенізація	подрібнення наважки (1–2 г)	– подрібнення та руйнування клітинної структури зразка; – збільшення площі контакту з розчинником; – підвищення ефективності та повноти екстракції каротиноїдів; – забезпечення однорідності проби
Екстракція	суміш гексан : ацетон : етанол (2:1:1) + антиоксидант (БГТ)	– вилучення каротиноїдів із матриці зразка за допомогою суміші розчинників різної полярності; – забезпечення повного вилучення і неполярних, і більш полярних каротиноїдів; – запобігання окисненню та деградації каротиноїдів (завдяки антиоксиданту БГТ)
Сапоніфікація	обробка спиртовим розчином КОН	гідроліз ефірів каротиноїдів (перехід у вільні форми); видалення ліпідів (омилення тригліцеридів); руйнування / поляризація хлорофілів для їх наступного видалення
Очищення	промивання водою, сушіння над Na ₂ SO ₄	– видалення полярних домішок і залишків водорозчинних компонентів шляхом промивання водою; – видалення залишкової вологи з органічної фази (сушіння над Na ₂ SO ₄); – отримання очищеного екстракту, придатного для аналізу методом ВЕРХ
Концентрування	упарювання при T ≤40 °С у вакуумі або струмені азоту	– видалення екстракційних розчинників; – підвищення концентрації каротиноїдів у пробі; – підготовка до розчинення у рухомій фазі або сумісному розчиннику для ВЕРХ
Фільтрація	мембранні фільтри 0,45 мкм, PTFE або PVDF мембрани	– видалення механічних домішок і завислих частинок; – захист хроматографічної колонки та системи ВЕРХ; – забезпечення стабільності та відтворюваності аналізу

вилучення цільової речовини з матриці застосовують тільки гексан із наступним випаровуванням [22,23,24,25].

Ксантофіли (кисневмісні каротиноїди), як-от лютеїн, містять кілька полярних гідроксогруп, що «пом'якшує» їхні гідрофобні властивості. У методах визначення методом ВЕРХ це помітно одразу: екстракцію з матриці можна здійснювати, крім гексану, і більш поширеними розчинниками, наприклад, ацетоном чи метанолом. У складі рухомої фази, крім безводних полярних розчинників (метанол, ТГФ), може бути вода, що свідчить про більш «м'які» обернено-фазні умови поділу [16,33,34,35].

Щодо хроматографічних колонок, то жодних переваг для різних фаз C18 не виявлено. Разом із тим, є рекомендації застосовувати спеціальні фази Carotenoid C30 – спеціалізовані колонки C30 (з довголанцюговою фазою), що можуть забезпечити краще розділення ізомерів (наприклад, цис-/транс-форм, лютеїн / зеаксантин) [15,16].

Наведені валідаційні показники показують оптимальні результати в лінійній регресії ($r^2 > 0,999$), високу чут-

ливість (близько 0,05–0,10 мкг/мл) і досить низькі межі кількісного визначення (0,15–0,30 мкг/мл), а також низькі значення RSD для показника повторюваності ($\leq 2\%$) та високі значення відсотка відновлення (95–105%). Усе це свідчить про стабільність і надійність методик [44,45,46,47].

Узагальнені та систематизовані результати аналізу відомостей наукової літератури щодо ВЕРХ-методів визначення каротиноїдів наведено у таблицях 5, 6.

Висновки

1. На основі аналізу сучасних джерел фахової літератури систематизовано дані щодо фізико-хімічних властивостей і біологічної активності ключових представників каротиноїдів – каротинів і ксантофілів. Високий терапевтичний потенціал цих сполук як антиоксидантів із мультимодальним механізмом дії зумовлює необхідність впровадження стандартизованих високоселективних методів аналізу для використання у фармацевтичній практиці.

2. Наведено методологічні аспекти ВЕРХ-аналізу: здійснено порівняльний аналіз сучасних методик визначення каротиноїдів методом ВЕРХ та обґрунтовано оптимальні параметри хроматографування.

3. Наведено та систематизовано ключові валідаційні характеристики аналітичних методик (лінійність, специфічність, прецизійність, межі виявлення та кількісного визначення).

4. Підтверджено відтворюваність і придатність обраних умов ВЕРХ, що дає змогу рекомендувати їх для стандартизації рослинної сировини та контролю якості каротиноїдовмісних лікарських засобів.

Перспективи подальших досліджень полягають у здійсненні подібних оглядів для інших груп біологічно активних сполук природного походження та порівнянні методик ВЕРХ, що використовують під час аналізу різних груп природних сполук.

Фінансування

Дослідження виконано в рамках спільної комплексної роботи кафедри клінічної фармації, фармакотерапії, фармакогнозії та фармацевтичної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Дуюн І. Ф., PhD, старший викладач каф. клінічної фармації, фармакотерапії, фармакогнозії та фармацевтичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0003-1134-2543

Кейтлін І. М., канд. фарм. наук, викладач каф. клінічної фармації, фармакотерапії, фармакогнозії та фармацевтичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0009-0006-6684-6860

Мазулін Г. В., канд. фарм. наук, старший викладач каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-4227-7388

Information about the authors:

Duiun I. F., PhD, Senior Lecturer of the Department of Clinical Pharmacy, Pharmacotherapy, Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Keitlin I. M., PhD, Lecturer of the Department of Clinical Pharmacy, Pharmacotherapy, Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Mazulin G. V., PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.



Ірина Дуюн (Iryna Duiun)
duyun77@ukr.net

References

- Li Y, Zhao Y, Zhang H, Ding Z, Han J. The Application of Natural Carotenoids in Multiple Fields and Their Encapsulation Technology: A Review. *Molecules*. 2024;29(5):967. doi: 10.3390/molecules29050967
- Sun T, Rao S, Zhou X, Li L. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Mol Hort*. 2022;2(1):3. doi: 10.1186/s43897-022-00023-2
- González-Peña MA, Ortega-Regules AE, Anaya de Parrodi C, Lozada-Ramírez JD. Chemistry, Occurrence, Properties, Applications, and Encapsulation of Carotenoids-A Review. *Plants (Basel)*. 2023;12(2):313. doi: 10.3390/plants12020313
- Takaichi S. Distribution, biosynthesis, and function of carotenoids in oxygenic phototrophic algae. *Mar Drugs*. 2025;23(2):62. doi: 10.3390/md23020062
- Malyugina EA, Mazulin AV, Mazulin GV, Smoylovskaya GP, Logvin PA. [The study of the carotenoid content in the inflorescences of the spreading marigold]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2013;(3):89-91. Ukrainian.
- Tufail T, Bader UI Ain H, Noreen S, Ikram A, Arshad MT, Abdullahi MA. Nutritional Benefits of Lycopene and Beta-Carotene: A Comprehensive Overview. *Food Sci Nutr*. 2024;12(11):8715-41. doi: 10.1002/fsn3.4502
- Jurja S, Negreanu-Pirjol T, Vasile M, Hincu MM, Coviltir V, Negreanu-Pirjol BS. Xanthophyll pigments dietary supplements administration and retinal health in the context of increasing life expectancy trend. *Front Nutr*. 2023; 10:1226686. doi: 10.3389/fnut.2023.1226686
- Gholipour-Varnami K, Mohamadnia S, Tavakoli O, Faramarzi MA. A review on the biological activities of key carotenoids: Structures, sources, market, economical features, and stability. *Food Biosci*. 2025;68(106529):106529. doi: 10.1016/j.fbio.2025.106529
- Varynskyi BO, Kaplaushenko AG. The development and validation of HPLC-DMD method for intermediate products impurities determination of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridine-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate in bulk drug. *Zaporozhye Medical Journal*. 2017;19(3):373-80. doi: 10.14739/2310-1210.2017.3.100947
- Singh A, Omer K. Recent advancement in therapeutic activity of carotenoids. In: *Physiology*. IntechOpen; 2024. Available from: 10.5772/intechopen.112580
- Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends Analyt Chem*. 2014;56:49-73. doi: 10.1016/j.trac.2013.12.011
- Vendruscolo RG, Fernandes AS, Fagundes MB, Zepka LQ, de Menezes CR, Jacob-Lopes E, et al. Development of a new method for simultaneous extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgal biomass. *J Appl Phycol*. 2021;33(4):1987-97. doi: 10.1007/s10811-021-02470-8
- Kurek MA, Aktaş H, Pokorski P, Pogorzelska-Nowicka E, Custodio-Mendoza JA. A comprehensive review of analytical approaches for carotenoids assessment in plant-based foods: Advances, applications, and future directions. *Appl Sci (Basel)*. 2025;15(7):3506. doi: 10.3390/app15073506
- Enggi CK, Mahardika F, Devara DM, Saputra MD, Wafiah N, Raihan M, et al. HPLC-UV method validation for quantification of β -carotene in the development of sustained release supplement formulation containing solid dispersion-floating gel in situ. *J Pharm Biomed Anal*. 2022; 221:115041. doi: 10.1016/j.jpba.2022.115041
- Meléndez-Martínez AJ, Mandić AI, Bantis F, Böhm V, Borge G, Brnčić M, et al. A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: *status quo*, applications, patents, and research needs. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(8):1999-2049. doi: 10.1080/10408398.2020.1867959
- Xu J, Lin J, Peng S, Zhao H, Wang Y, Rao L, et al. Development of an HPLC-PDA Method for the Determination of Capsanthin, Zeaxanthin, Lutein, β -Cryptoxanthin and β -Carotene Simultaneously in Chili Peppers and Products. *Molecules*. 2023;28(5):2362. doi: 10.3390/molecules28052362
- European Pharmacopoeia Commission (EDQM). *European Pharmacopoeia, monograph of Betacarotene*. 11th ed. Strasbourg; 2024.
- Mazurets SI, Kovalov SV, Rudnyk AM. Fitokhimichne vyyvchennia lipofilnoi fraktsii z lystia khmeliu zvychainoho. *Zaporozhye Medical Journal*. 2012;(3): 96-9. Ukrainian.
- Dincel D, Kepekci-Tekkeli SE, Önal C, Önal A, Sagirli O. Liquid chromatographic analysis of carotenoids in foods. *J Chil Chem Soc*. 2019;64(2):4492-5. Available from: <https://jccchems.com/index.php/JCCHEMS/article/view/1220/323>
- Saini RK, Prasad P, Lokesh V, Shang X, Shin J, Keum YS, et al. Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits-A Review of Recent Advancements. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(4):795. doi: 10.3390/antiox11040795
- Lyu X, Ying D, Zhang P, Fang Z. Effect of whole tomato powder or tomato peel powder incorporation on the color, nutritional, and textural properties of extruded high moisture meat analogues. *Food Bioprocess Technol*. 2024;17(1):231-44. doi: 10.1007/s11947-023-03133-x
- Yu ZW, Wang J, Lin FH, He FM, Li HS, Wang SS, et al. A comprehensive study on solvent effect and establishment of n-hexane solvent system based normal-phase liquid chromatography \times reversed-phase liquid chromatography for isolation of natural products. *J Chromatogr A*. 2024;1733:465278. doi: 10.1016/j.chroma.2024.465278

23. Hsu BY, Lin CH, Kao TH. Development of a Rapid UPLC Method for Analysis of Carotenoids in Goji Berry Extract and Evaluation of Their Transformation Affected by Saponification. *Molecules*. 2024;29(23):5684. doi: [10.3390/molecules29235684](https://doi.org/10.3390/molecules29235684)
24. Papapostolou H, Kachrimanidou V, Alexandri M, Plessas S, Papadaki A, Kopsahelis N. Natural Carotenoids: Recent Advances on Separation from Microbial Biomass and Methods of Analysis. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(5):1030. doi: [10.3390/antiox12051030](https://doi.org/10.3390/antiox12051030)
25. Dordai L. A fast HPLC method for the determination of beta-carotene and lycopene from *Daucus carota*. *Nat Resour Sustain Dev*. 2023;13(1):195-202. doi: [10.31924/nrsd.v13i1.128](https://doi.org/10.31924/nrsd.v13i1.128)
26. De Luca C, Buratti A, Krauke Y, Stephan S, Monks K, Brighenti V, et al. Investigating the effect of polarity of stationary and mobile phases on retention of cannabinoids in normal phase liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2022;414(18):5385-95. doi: [10.1007/s00216-021-03862-y](https://doi.org/10.1007/s00216-021-03862-y)
27. Jin H, Lao YM, Zhou J, Zhang HJ, Cai ZH. Simultaneous determination of 13 carotenoids by a simple C18 column-based ultra-high-pressure liquid chromatography method for carotenoid profiling in the astaxanthin-accumulating *Haematococcus pluvialis*. *J Chromatogr A*. 2017; 1488:93-103. doi: [10.1016/j.chroma.2017.01.088](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.088)
28. Lawler T, Liu Z, Nalbandyam M, Liu Y, Hammond B, Wallace RB, et al. Lutein and zeaxanthin supplement use is associated with increased macular pigment density over 15 years and greater contrast sensitivity in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study of older-adult women. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62(8):2950. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2775628>
29. Fraterrigo Garofalo S, Mallen V, Fino D. Extraction of carotenoids from tomato pomace using deep eutectic solvents composed of short and medium-chain fatty acids and menthol. *Food Chem*. 2025;484:144342. doi: [10.1016/j.foodchem.2025.144342](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144342)
30. Bas TG. Bioactivity and Bioavailability of Carotenoids Applied in Human Health: Technological Advances and Innovation. *Int J Mol Sci*. 2024;25(14):7603. doi: [10.3390/ijms25147603](https://doi.org/10.3390/ijms25147603)
31. Schmidt M, Böhm V. Investigating alternative solvents regarding extractability of lipophilic food ingredients in spinach-tomato powder and algae materials. *Food Anal Methods*. 2025;18(8):1850-62. doi: [10.1007/s12161-025-02821-y](https://doi.org/10.1007/s12161-025-02821-y)
32. Jiang Y, Ye J, Hu Y, Zhang J, Li W, Zhou X, et al. Extraction and Synthesis of Typical Carotenoids: Lycopene, β -Carotene, and Astaxanthin. *Molecules*. 2024;29(19):4549. doi: [10.3390/molecules29194549](https://doi.org/10.3390/molecules29194549)
33. Morón-Ortiz A, Mapelli-Brahm P, Meléndez-Martínez AJ. Sustainable Green Extraction of Carotenoid Pigments: Innovative Technologies and Bio-Based Solvents. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(2):239. doi: [10.3390/antiox13020239](https://doi.org/10.3390/antiox13020239)
34. Gebregziabher BS, Zhang S, Qi J, Azam M, Ghosh S, Feng Y, et al. Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls by the HPLC-UV-VIS method in soybean seeds. *Agronomy (Basel)*. 2021;11(4):758. doi: [10.3390/agronomy11040758](https://doi.org/10.3390/agronomy11040758)
35. Hammond BR, Renzi-Hammond L. The influence of the macular carotenoids on women's eye and brain health. *Nutr Neurosci*. 2023;26(8):720-6. doi: [10.1080/1028415X.2022.2084125](https://doi.org/10.1080/1028415X.2022.2084125)
36. Rathi DN, Rashed AA, Noh M. Determination of retinol and carotenoids in selected Malaysian food products using high-performance liquid chromatography (HPLC). *SN Appl Sci*. 2022;4(4). doi: [10.1007/s42452-022-04955-8](https://doi.org/10.1007/s42452-022-04955-8)
37. Singh H, Singh G, Bhatia R. Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of lutein, lycopene, and beta-carotene using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Pharmaspire*. 2020;12(2):55-60. Available from: https://www.isfcpharmaspire.com/uploads/228/13830_pdf.pdf
38. Alnokkari AS. Optimizing analytical methods to determine lycopene levels in Syrian tomatoes from various regions. *Agric Sci Dig – Res J*. 2023;(Of). Available from: [10.18805/ag.df-550](https://doi.org/10.18805/ag.df-550)
39. Przybylska S, Tokarczyk G. Lycopene in the Prevention of Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):1957. doi: [10.3390/ijms23041957](https://doi.org/10.3390/ijms23041957)
40. Arballo J, Amengual J, Erdman JW Jr. Lycopene: A Critical Review of Digestion, Absorption, Metabolism, and Excretion. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(3):342. doi: [10.3390/antiox10030342](https://doi.org/10.3390/antiox10030342)
41. Bhavin SE, Anuradha G. Development and validation of an RP-HPLC method for estimating nutraceutical lutein. *Int J Health Sci (IJHS)*. 2022;6(S1):9039-50. doi: [10.53730/ijhs.v6ns5.9039](https://doi.org/10.53730/ijhs.v6ns5.9039)
42. Sutharsan J, Adler L, Jones A, Arcot J. Quantification of macular carotenoids over a wide dynamic range in plant matrices and Caco-2 cells using a single transferable analytical method. *Foods*. 2026;15(6):981. doi: [10.3390/foods15060981](https://doi.org/10.3390/foods15060981)
43. Melfi MT, Nardiello D, Cicco N, Candido V, Centonze D. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins, lycopene and beta-carotene in tomato samples and pharmaceutical formulations: Double injection single run by reverse-phase liquid chromatography with UV detection. *J Food Compos Anal*. 2018;70:9-17. doi: [10.1016/j.jfca.2018.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.002)
44. Craft NE, Springs DG, Chavan J. Lutein HPLC method comparison and validation. *FASEB J*. 2016;30(S1). doi: [10.1096/fasebj.30.1_supplement.689.5](https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.689.5)
45. Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Castro-Feito J, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Estévez-Santiago R. Bioavailability of Lutein from Marigold Flowers (Free vs. Ester Forms): A Randomised Cross-Over Study to Assess Serum Response and Visual Contrast Threshold in Adults. *Nutrients*. 2024;16(10):1415. doi: [10.3390/nu16101415](https://doi.org/10.3390/nu16101415)
46. Wu B, Li X, Zheng X, Zhao J, Qiao L, Zheng J. A simple and robust HPLC method to analyze lutein in wheat. *Methods X*. 2022; 9:101926. doi: [10.1016/j.mex.2022.101926](https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101926)
47. Anwar S, Nayak JJ, Alagoz Y, Wojtalewicz D, Cazzonelli CI. Purification and use of carotenoid standards to quantify cis-trans geometrical carotenoid isomers in plant tissues. *Methods Enzymol*. 2022;670:57-85. doi: [10.1016/bs.mie.2022.01.005](https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.01.005)