

玉米蛋白粉中反式叶黄素及主要顺式异构体的分离鉴定

李秀霞^{1,2,3} 韩鲁佳^{1,2}

(1. 中国农业大学 工学院,北京 100083; 2. 现代精细农业系统集成研究教育部重点实验室,北京 100083;
3. 皖西学院 化学与生命科学系,安徽 六安 237012)

摘要 使用反相高效液相色谱和二极阵列检测及大气压化学电离质谱技术对玉米蛋白粉中叶黄素、玉米黄质和隐黄质及其主要顺式异构体进行分离和鉴定。以体积分数 95% 的乙醇和四氢呋喃按体积比 1:1 混合为提取溶剂,采用 Carotenoid C₃₀ 色谱柱(250.0 mm ×4.6 mm, 5 μm) 分离,甲醇和丙酮为流动相,流速 0.5 mL/min,检测波长 450 nm,采用 DAD 和 APcFMS 技术对叶黄素、玉米黄质和隐黄质的主要顺式异构体进行鉴定。结果表明:叶黄素、玉米黄质和隐黄质及这 3 种色素的异构体在 60 min 内较好分离,其质量浓度为 5.0~150.0、2.7~80.1 和 0.6~18.0 μg/mL 时与峰面积线性关系良好,相关系数分别为 0.999 7、0.999 3 和 0.999 5;该检测方法精密度的相对标准偏差(RSD)为 0.11%~0.39%,回收率为 95.95%~101.78%。HPLC 检测方法适用于玉米蛋白粉等干植物原料中叶黄素类色素的精确定量。

关键词 玉米蛋白粉;反式叶黄素;反式玉米黄质;反式隐黄质;顺式异构体

中图分类号 TS 219

文章编号 1007-4333(2007)04-0061-06

文献标识码 A

Separation and identification of trans-xanthophylls and cis isomers in corn gluten meal

Li Xiuxia^{1,2,3}, Han Lujia^{1,2}

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Modern Precision Agriculture System Integration, Ministry of Education, Beijing 100083, China;
3. Department of Chemistry and Life Science, West Anhui University, Liuan 237012, China)

Abstract A gradient reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with UV-vis photodiode array detection (DAD) and APcFMS was developed for separation of lutein, zeaxanthin, -cryptoxanthin, and their isomers from pigment extracts of corn gluten meal. The pigments were extracted using the solvent mixture of 95% ethanol (by volume) and THF by volume ratio of 1/1. Chromatographic separation was performed in Carotenoid C₃₀ column (250 mm ×4.6 mm ID., 5 μm) at ambient temperature with an eluent consisting of methanol and acetone at a flow rate of 0.5 mL/min, the eluate was monitored at 450 nm. The result showed that separation and identification of lutein, zeaxanthin, -cryptoxanthin and their isomers were completed in 60 min. The linear ranges of lutein, zeaxanthin and -cryptoxanthin were 5~150 μg/mL ($R^2 = 0.999 7$), 2.7~80.1 μg/mL ($R^2 = 0.999 3$) and 0.6~18.0 μg/mL ($R^2 = 0.999 5$), respectively. This method is precise and accurate (RSD 0.11%~0.39%), the average recoveries ranged from 95.95% to 101.78% and can be used for the precise quantification of lutein and other pigments of dry plant material such as corn gluten meal.

Key words corn gluten meal; trans-lutein; trans-zeaxanthin; trans- -cryptoxanthin; cis isomers

叶黄素类色素(xanthophylls)是胡萝卜素的含氧衍生物,包括叶黄素(lutein)、玉米黄质(zeaxanthin)、隐黄质(-cryptoxanthin)和辣椒红素(capsanthin)等,在自然界中广泛存在,具有保护视力、抗

收稿日期:2007-03-25

基金项目:北京市科技计划项目课题(Y0704003040511)

作者简介:李秀霞,博士研究生,E-mail:lixuixiaxxx@163.com;韩鲁佳,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事生物质资源开发与利用的研究,E-mail:hanlj@cau.edu.cn

癌、抗心血管疾病等独特的生理功能。在我国叶黄素已经作为饲料添加剂用于家禽皮肤和蛋黄等的着色,虽然少数叶黄素会在肝脏中降解,但大部分都沉积于皮肤、喙等特异组织中,着色效果良好^[1-2]。玉米蛋白粉(CGM)是湿法生产玉米淀粉的副产物,叶黄素、玉米黄质和隐黄质是其中主要含有的3种叶黄素类色素^[3]。从玉米蛋白粉中提取叶黄素、玉米黄质等天然色素作为食品或饲料添加剂,对于提高玉米加工产品的附加值,发展我国农副产品深加工工业具有重要意义。

HPLC方法由于其灵敏、准确等优点,已经成为叶黄素定性定量检测的主要方法^[4]。色谱柱的类型对于分离结果的影响很大,迄今为止,用于类胡萝卜素HPLC分离检测的色谱柱固定相主要有硅胶、C₁₈及C₃₀等,其中,正相硅胶柱不能从其他类胡萝卜素中彻底分离叶黄素^[5];反向C₁₈色谱柱在类胡萝卜素的色谱分离中应用广泛,但不能彻底分离玉米或玉米蛋白粉中叶黄素和玉米黄质及其各种顺式异构体^[6-7]。C₃₀固定相是20世纪90年代研发的一种反相吸附固定相,在类胡萝卜素色谱分离中有良好性能,又称为类胡萝卜素柱。Moros等^[8]报道了一种使用YMC-C₃₀色谱柱分离玉米及商业玉米蛋白粉中叶黄素的方法,使用流动相为甲基叔丁基醚、甲醇和水,叶黄素和玉米黄质基线得到很好的分离,但未对玉米蛋白粉叶黄素各种顺式异构体进行研究。Aman等^[9]使用YMC-C₃₀色谱柱结合DAD检测和APcFMS及NMR方法对甜玉米罐头中叶黄素顺反式异构体进行了分离鉴定,使用流动相为甲基叔丁基醚、甲醇和水,叶黄素及玉米黄质的异构体在80 min内都得到了较好的分离,但洗脱时间较长。研究表明,叶黄素的顺反异构体在稳定性和生理功能等方面存在着明显的差异^[10],国内使用HPLC方法对玉米蛋白粉中叶黄素进行定性定量的研究较少,分离出的组分较少,也没有考虑几种叶黄素顺式异构体的分离^[11]。针对此问题,本研究对玉米蛋白粉中含量最高的叶黄素、玉米黄质和隐黄质HPLC检测方法进行探索,以期找到一种简便、高效的玉米蛋白粉中叶黄素类色素的HPLC检测方法。

1 试验材料与方法

1.1 原料、试剂及仪器

原料:玉米蛋白粉(山西省介休市维群红星淀粉有限公司),于-20℃保存,使用前粉碎,过40

目筛。

主要试剂:叶黄素标准品,纯度97.9%;玉米黄质标准品,纯度93.2%;隐黄质标准品,纯度97.5%。均购自美国Chromadex公司。甲醇和丙酮,色谱纯;95%(体积分数,全文同)乙醇、四氢呋喃、石油醚和丙酮,分析纯。

仪器设备:日立高效液相色谱仪(MODEL L-7200自动进样器,L-7420/L-7420S型紫外可见检测器,MODEL L-7300柱温箱,MODEL L-7100泵,L-7610真空脱气机,日本日立公司);岛津LC-10AT型液相色谱仪(CTO-10Avp柱温箱,SPD-10Avp二极管阵列检测器,DGU-12A真空脱气机,CLASS-10Avp(6.10)色谱工作站,日本岛津公司);1100 Series Agilent LC-MSD-Trap-VL型高效液相色谱-质谱联用仪(APcI离子源(大气压化学电离),干燥气体流速5 mL/min,干燥温度350℃,气化温度400℃,美国安捷伦公司);Carotenoid C₃₀色谱柱(4.6 mm × 250 mm ID., 5 μm,日本YMC公司);RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);s2-12磁力搅拌器(上海司乐仪器厂);SHB-3循环水式多用真空泵(河南郑州长城仪器厂);TU1800SPC紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司)。

1.2 试验方法

叶黄素标准溶液的配制。以丙酮为溶剂配成质量浓度为0.200 mg/mL叶黄素、0.108 mg/mL玉米黄质和0.024 mg/mL隐黄质的混合对照品贮备液,使用时分别稀释,质量浓度(以叶黄素浓度为例)为:0.15、0.07、0.05、0.02和0.005 mg/mL。

待测样品的制备。5.00 g玉米蛋白粉,以95%的乙醇和四氢呋喃按体积比1:1混合作为提取溶剂在磁力搅拌器上室温提取30 min,减压抽滤,滤饼重复提取1次,合并滤液,于50℃蒸干溶剂后加入5 mL 0.1 mg/mL NaCl水溶液和20 mL石油醚重复萃取5次,合并萃取液,于40℃蒸干溶剂,丙酮定容10 mL。

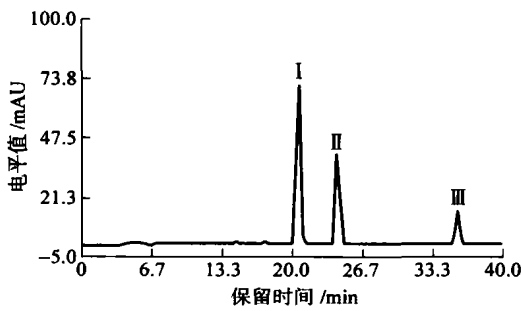
色谱条件。流动相:A,丙酮;B,甲醇;洗脱梯度:75% B(0 min)、40% B(30 min),100% A(60 min),75% B(60.1 min,保持至70 min);流速0.5 mL/min;进样量10 μL;柱温25℃。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离及主要组分的定性

1)各组分分离情况。经紫外可见分光光度计

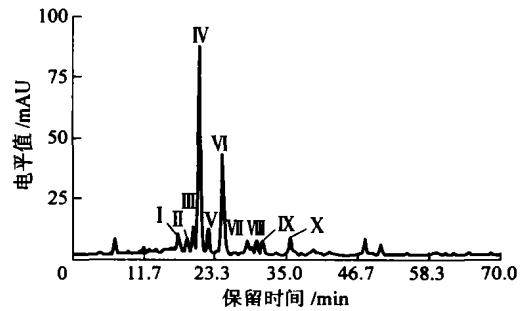
扫描,丙酮溶液中叶黄素、玉米黄质和隐黄质混合标准品最大吸收波长为 450 nm,因此,选择检测波长为 450 nm。玉米蛋白粉中含多种类胡萝卜素,图 1 为叶黄素、玉米黄质和隐黄质混合标样的液相色谱图。采用色谱工作站处理得到数据,以叶黄素质量浓度 $X(\mu\text{g}/\text{mL})$ 为横坐标,相应的峰面积 Y 为纵坐标,得到 3 条标准曲线:叶黄素, $Y = 6.2821X - 0.9957, R^2 = 0.9997$,线性区间为 $5.0 \sim 150.0 \mu\text{g}/\text{mL}$;玉米黄质, $Y = 4.9029X - 0.4591, R^2 = 0.9993$,线性区间为 $2.7 \sim 81.0 \mu\text{g}/\text{mL}$;隐黄质, $Y = 3.5003X - 0.1537, R^2 = 0.9995$,线性区间为 $0.6 \sim 18.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。本试验条件下,3 种叶黄素的质量浓度与峰面积响应值的线性关系良好。按 3 倍信噪比计算,各组分的检出限分别为:叶黄素 $79.20 \mu\text{g}/\text{L}$,玉米黄质 $42.02 \mu\text{g}/\text{L}$,隐黄质 $26.78 \mu\text{g}/\text{L}$ 。



. 反式叶黄素; . 反式玉米黄质; . 反式隐黄质

图 1 叶黄素、玉米黄质和隐黄质标准品色谱图
Fig. 1 Chromatogram of lutein, zeaxanthin, and -cryptoxanthin standards

图 2 为玉米蛋白粉样品提取液色谱图。在 450 nm 波长下,提取液中有光吸收的物质很多,主要色谱峰有 13 个,根据每个峰的保留时间与对照品 HPLC 图比较,确定中间峰 ~ 为叶黄素、玉米黄质和隐黄质及其异构体,其中峰、和 分别判定为反式叶黄素、反式玉米黄质及反式隐黄质(图 3),其最大吸收波长分别为 445、450 和 451 nm,保留时间分别为 20.5、24.2 和 35.6 min;4.5 min 出峰的物质可能为极性较强的叶黄素类物质,如紫黄质等,45 min 后出峰的物质应该是番茄红素或胡萝卜素等物质,含量较低。由于试验条件所限,不能获得所有组分的对照品,所以本试验只对峰 ~ 色谱峰进行初步研究。



. 顺式叶黄素; . 13 或 13-顺式叶黄素; . 13 或 13-顺式玉米黄质; . 反式叶黄素; . 未知物质; . 反式玉米黄质; . 顺式隐黄质; . -隐黄质; . 9 或 9-顺式玉米黄质; . 反式隐黄质

图 2 玉米蛋白粉提取液色谱图

Fig. 2 Chromatogram of extraction of CGM

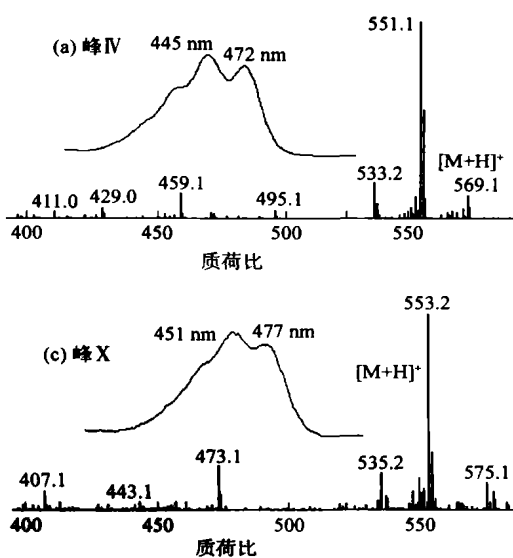


图 3 玉米蛋白粉提取液中峰 IV (a)、VI (b) 和 X (c) 的紫外-可见光谱图及质谱图

Fig. 3 UV/visible spectra and Mass spectrometry of peak IV (a), peak VI (b) and peak X (c) from CGM extract

在类胡萝卜素 HPLC 分离检测 (采用 Carotenoid C₃₀ 色谱柱) 的报道中, 大多采用 MTBE 和甲醇作为流动相^[5-7,12], 如样品中除叶黄素类极性较强的类胡萝卜素外, 还含有 β -胡萝卜素、 γ -胡萝卜素等极性较弱的色素, 洗脱时间通常超过 100 min, HPLC 分离检测时间过长。因此, 在 MTBE 作为流动相的基础上, 本试验尝试用极性相对较低的丙酮代替 MTBE 为流动相, 取得了较好的分离效果 (图 2)。在 60 min 内, 包括微量的叶黄素酯等极性较低的组分可全部洗脱出来, 平衡 10 min 后可连续测量, 是洗脱效率较高的快捷的分离测定方法。

2) 主要组分的定性。玉米蛋白粉中含有多种类胡萝卜素, 包括紫黄质、叶黄素、玉米黄质、隐黄质、番茄红素、胡萝卜素、叶黄素酯及胡萝卜酯等, 其中 90% 以上为叶黄素类物质, 主要包括反式叶黄素、反式玉米黄质、反式 β -隐黄质和反式 γ -隐黄质 (即隐黄质) 及它们的顺式异构体。在类胡萝卜素结构的研究中, 常使用 Q 值或 $V/V_{\text{肩}} \times 100\%$ 对各个顺

式叶黄素组分进行初步定性: Q 值即为 330 ~ 400 nm 的吸光度与最大吸收峰处的吸光度的比值 $\times 100$ ^[4,13], 当类胡萝卜素由反式结构转变为顺式结构时, 分子的对称性发生改变, 分子能级跃迁, 在 330 nm 左右出现顺式结构的特征吸收峰。将两峰之间的最小吸光度为基线或零值, 最大吸收峰 (右峰) 最大吸收波长处的吸光度定义为 V , 肩峰 (中间吸收峰) 的最大吸收波长处的吸光度定义为 $V_{\text{肩}}$, 将光谱精细结构表示为吸光度比 $V/V_{\text{肩}} \times 100\%$ ^[4,14]。由于不能获得 3 种叶黄素的顺式异构体对照品, 所以试验中采用二极管阵列检测器在 300 ~ 600 nm 范围进行光谱扫描, 从而根据组分特征吸光度、 Q 值及 $V/V_{\text{肩}} \times 100\%$ 对各个类胡萝卜素组分进行初步定性。

采用 DAD 检测器对每个色谱峰特征波长扫描, 参考其他研究结果^[5-6,14-21], 对 ~ 色谱峰进行初步分析结果见表 1。由于仪器差异、所采用的流动相、定容溶剂及样品来源的不同 (为对照品溶液或

表 1 玉米蛋白粉 HPLC 图中叶黄素主要成分的 HPLC-DAD 分析结果

Table 1 Result of HPLC-DAD on the major ingredient of xanthophylls in CGM

色谱峰	保留时间 / min	峰面积比 例 / %	色谱峰 识别	吸光值		Q 值		$V/V_{\text{肩}} \times 100\%$	
				测量值	报道值	测量值	报道值	测量值	报道值
	17.32	3.17	顺式叶黄素	331,425,445	339,429,447 ^[15]	0.35	0.35 ^[15]	21	未见报道
	18.73	2.00	13 或 13-顺式叶黄素	331,439,466	330,439,466 ^[5] , 331,438,465 ^[16]	0.44	0.42 ^[17] , 0.44 ^[18] , 0.38 ^[18] , 0.44 ^[19]	32	31 ^[6]
	19.73	4.59	13 或 13-顺式玉米黄质	331,444,473	338,444,470 ^[6]	0.43	0.49 ^[6]	32.3	10 ^[6]
	20.70	40.24	全反式叶黄素	331,445,472	331,444,473 ^[5] , 332,444,472 ^[6]	0.09	0.05 ^[6]	51.4	65 ^[6] , 50 ^[14] , 64 ^[20] , 60 ^[20]
	22.20	4.92	未知	427,452	未见报道	—	未见报道	—	未见报道
	24.15	21.57	全反式玉米黄质	427,450,477	339,450,477 ^[6] , 425,450,477 ^[19]	—	0.11 ^[18] , 0.06 ^[17]	25	33 ^[6] , 25 ^[14] , 28 ^[14]
	28.57	2.61	顺式隐黄质	337,441,469	未见报道	0.28	未见报道	43	未见报道
	30.08	2.71	β -隐黄质	424,445,473	425,447,477 ^[14]	—	未见报道	58	59.1 ^[20]
	31.04	2.81	9 或 9-顺式玉米黄质	337,445,473	338,445,472 ^[6,19]	0.21	0.14 ^[6] , 0.10 ^[19]	24	32 ^[6]
	35.59	3.93	隐黄质	425,451,477	344,452,478 ^[18] , 428,454,480 ^[16]	—	0.4 ^[18]	22	28.8 ^[14] , 29 ^[20] , 18 ^[21]

注: 相应峰面积与总峰面积的比值; 300 ~ 400 nm 的吸光度与最大吸收峰处吸光度的比值 $\times 100$ ^[13]; 最大吸收峰 (V) 和肩峰 ($V_{\text{肩}}$) 之间的最小吸光度为基线, 减掉基线吸光度后 2 峰吸光度的比值^[14]; — 为未检出。

为提取液), 试验结果与其他研究结果在光谱数据上存在差异, 3 种叶黄素的主要顺式异构体都得到了分离, 叶黄素、玉米黄质和隐黄质顺式异构体的含量约占这 3 种叶黄素总含量的 18.8%。

2.2 精密度及回收率测定

将叶黄素(质量浓度已知)混合标准品溶液重复进样 6 次, 计算保留时间和峰面积的相对标准偏差(表 2)。取同样的提取液样品 3 份, 分别加入已知量的叶黄素、玉米黄质和隐黄质标准品, 按照 1.4 中待测样品处理方法处理并测定其平均回收率(表 3), 从保留时间和峰面积的 RSD 值及平均回收率的结果说明 HPLC 分离检测方法用于玉米蛋白粉叶黄素类色素的精确定量是可靠的。

表 2 HPLC 检测方法的精密度 ($n=6$)

Table 2 Precision of the HPLC method ($n=6$)

组分	保留时间/min		峰面积/ 10^5	
	($t_R \pm S$)	RSD / %	($\bar{A} \pm S$)	RSD / %
叶黄素	20.71 \pm 0.02	0.11	234.91 \pm 0.38	0.39
玉米黄质	24.46 \pm 0.03	0.12	123.52 \pm 0.13	0.11
隐黄质	35.51 \pm 0.03	0.23	20.41 \pm 0.06	0.27

注: 检测值的相对标准偏差, 下表同。

表 3 HPLC 检测方法得到的叶黄素、玉米黄质和隐黄质的回收率 ($n=3$)

Table 3 Determination of recovery of lutein, zeaxanthin, and -cryptoxanthin by the HPLC method ($n=3$)

对照组	样品质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加入量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率/ %	RSD/ %
叶黄素	13.62	30.0	30.35 \pm 0.39	101.78 \pm 1.29	2.24
玉米黄质	5.64	16.2	15.79 \pm 0.08	97.49 \pm 0.48	0.84
隐黄质	0.60	3.6	3.45 \pm 0.04	95.93 \pm 1.04	1.81

2.3 稳定性试验结果

由于叶黄素类色素易受光照、温度等的影响而发生降解或异构化, 故研究了在该试验条件下样品的稳定性。各处理精确移取叶黄素提取液 5 mL, 于棕色容量瓶中 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 充氮气密封避光保存 12、24、48、72、96 和 120 h, 测定各组分含量, 计算各组分含量在不同保存时间的变化值(表 4)。结果表明: 在保存 96 h 内, 各种组分含量变化均在 $\pm 3\%$ 内; 在保存 120 h 内各组分含量变化均在 $\pm 5\%$ 范围内。所

以, 在此保存条件下, 标样和样品溶液可以在保存 120 h 后用 HPLC 方法测定玉米蛋白粉中叶黄素类色素的含量。

2.4 玉米蛋白粉叶黄素含量的测定

使用 HPLC 检测方法对玉米蛋白粉中叶黄素含量进行测定, 叶黄素可占到类胡萝卜素总量的 88.55%, 而胡萝卜素的含量很低, 几乎检测不到叶黄素和胡萝卜素酯, 可检测到微量的高极性叶黄素类物质。使用该提取和定量方法, 玉米蛋白粉中反式叶黄素含量约为 45.82 $\mu\text{g}/\text{g}$, 反式玉米黄质含量约为 19.6 $\mu\text{g}/\text{g}$, 反式隐黄质含量约为 2.6 $\mu\text{g}/\text{g}$, 3 种反式叶黄素含量占类胡萝卜素总量的 65.74%。

表 4 提取液样品中各组分含量随保存时间的变化 ($n=3$)

Table 4 Changes of xanthophylls contents in extraction samples during storage ($n=3$) $\mu\text{g}/\text{mL}$

组分	保存时间/h						
	0	12	24	48	72	96	120
叶黄素	17.28	17.27	17.23	17.15	16.95	16.84	16.73
玉米黄质	8.66	8.63	8.62	8.62	8.57	8.43	8.38
隐黄质	1.90	1.89	1.89	1.89	1.87	1.85	1.83

3 结 论

1) 使用 YMC-C₃₀ 色谱柱分离玉米蛋白粉中叶黄素, 流动相为甲醇和丙酮, 采用 HPLC 检测方法其精密度的标准偏差为 0.11% ~ 0.39%, 回收率为 95.95% ~ 101.78%, HPLC 分离检测方法适合于玉米蛋白粉等干植物原料中叶黄素类色素的精确定量。

2) 使用 DAD 检测和 APcFMS 技术对玉米蛋白粉叶黄素提取液中主要组分进行初步鉴定, 玉米蛋白粉中叶黄素的主要顺式异构体为 13 或 13 顺式异构体, 玉米黄质的 13 或 13 顺式异构体及 9 或 9 顺式异构体都有检出, 叶黄素、玉米黄质和隐黄质的顺式异构体含量约为 3 种叶黄素总含量的 18.8%。

3) 采用 HPLC 检测方法对玉米蛋白粉中叶黄素含量进行分析, 反式叶黄素含量约为 45.82 $\mu\text{g}/\text{g}$, 反式玉米黄质含量约 19.60 $\mu\text{g}/\text{g}$, 反式隐黄质含量约 2.60 $\mu\text{g}/\text{g}$, 这 3 种反式叶黄素量占类胡萝卜素总量的 65.74%。

参 考 文 献

- [1] Fletcher D L, Papa C M. Utilization and yolk coloring capability of dietary xanthophylls from yellow corn, corn gluten meal, alfalfa, and coastal Bermuda grass[J]. Journal of Poultry Science, 1985, 64: 1458-1462
- [2] Dua P N, Day E J, Hill J, et al. Utilization of xanthophylls from natural sources by the chick[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1967, 15(2): 324-328
- [3] Blessin C W, Brecher J D, Daimler R J. Carotenoids of corn and sorghum. V. Distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow dent corn[J]. Cereal Chemistry, 1963, 40: 582-586
- [4] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 258
- [5] Weber E J. Carotenoids and tocopherols of corn grain determined by HPLC [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1987, 64: 1129-1134
- [6] Updike A A, Schwartz S J. Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51(21): 6184-6190
- [7] Scott C E, Eldridge A L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18(66): 551-559
- [8] Moros E E, Darnoko D, Cheryan M, et al. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(5): 5787-5790
- [9] Aman R, Beihl J, Carle R, et al. Application of HPLC coupled with DAD, APcFMS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables[J]. Food Chemistry, 2005, 92(44): 753-763
- [10] Bohm V, Puspitasari-Nienaber N L, Ferruzzi M G, et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of β -carotene, α -carotene, lycopene, and zeaxanthin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50(1): 221-226
- [11] 王薇, 韩鲁佳. 玉米蛋白粉中叶黄素提取及皂化工艺的研究[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(4): 25-30
- [12] Emenhiser C, Sander L C, Schwartz S J. Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1995, 707(2): 205-216
- [13] Salen M H, Tan B. Separation and identification of cis-trans isomers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39: 1438-1443
- [14] Lee H S, Castle W S, Coates G A. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 913(1): 371-377
- [15] Chen J P, Tai C Y, Chen B H. Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.) [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1054(1-2): 261-268
- [16] Khachik F, Bernstein P S, Garland D L. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum[J]. Analytical Chemistry, 1997, 69(10): 1873-1881
- [17] Craft N E, Soares J H. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1992, 40(3): 431-434
- [18] Inbaraj B S, Chien J T, Chen B H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1102(1-2): 193-199
- [19] Bohm V, Puspitasari-Nienaber N L, Ferruzzi M G, et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of β -carotene, α -carotene, lycopene, and zeaxanthin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50(1): 221-226
- [20] Hamano P S, Mercadante A Z. Composition of carotenoids from commercial products of Caja (*Spondias lutea*) [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2001, 14(4): 335-343
- [21] Zanatta C F, Mercadante A Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) [J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1526-1532