

叶黄素及其顺式异构体的快速检测

李大婧^{1,2}, 刘春菊^{1,2}, 肖亚冬¹, 庞慧丽¹, 刘春泉^{1,2,*}
(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014;
2.国家蔬菜加工技术研发专业分中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了建立分离度好、分离效率高的叶黄素顺、反异构体检测方法。通过对检测波长、流动相、流动相比例和流速等色谱条件的摸索和优化, 确定最佳色谱条件, 并采用光谱、高效液相色谱、质谱等方法对叶黄素顺、反异构体进行定性定量分析。结果表明: 该方法流动相为二氯甲烷-乙腈-甲醇(20:30:50, V/V), 流速为1.0 mL/min, 叶黄素热异构化样品中各物质在12 min内达到有效分离, 无拖尾现象, 峰形较好; 在叶黄素热异构化样品中鉴定出15-顺式、13/13'-顺式和9/9'-顺式叶黄素顺式异构体及全反式叶黄素, 全反式叶黄素在4~260 ng范围内峰面积与进样量呈良好线性关系, 回收率在95%以上, 精密度和稳定性相对标准偏差均小于2%。该方法分离度好、准确性高、重现性好。

关键词: 叶黄素; 顺、反异构体; 检测方法

A Method for Rapid Determination of Lutein and Its Stereoisomers

LI Dajing^{1,2}, LIU Chunju^{1,2}, XIAO Yadong¹, PANG Huili¹, LIU Chunquan^{1,2,*}

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
2. National Vegetable Processing Technology R&D Sub-centers, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study aimed to establish a rapid method for the determination of lutein stereoisomers by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) combined with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS). Using a mobile phase composed of dichloromethane, acetonitrile and carbinol (20:30:50, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min, lutein and its stereoisomers were separated effectively with good shape and without tailing phenomenon. Lutein generated 15-, 13,13'- and 9,9'-mono-*cis*-lutein during thermal isomerization as identified based on the maximum absorption wavelength, Q value, mass spectral characteristics and relevant literature data. Peak area and injection amount of lutein showed a good linear relationship in the range of 4–260 ng. The recovery rate was higher than 95%, and the relative standard deviations (RSDs) of both precision and stability were lower than 2%. The method has the advantage of good separation, high accuracy and repeatability.

Key words: lutein; stereoisomers; measurement

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201604037

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2016)04-0206-06

引文格式:

李大婧, 刘春菊, 肖亚冬, 等. 叶黄素及其顺式异构体的快速检测[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 206-211. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201604037. <http://www.spkx.net.cn>

LI Dajing, LIU Chunju, XIAO Yadong, et al. A method for rapid determination of lutein and its stereoisomers[J]. Food Science, 2016, 37(4): 206-211. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201604037. <http://www.spkx.net.cn>

叶黄素具有抗氧化、抗癌、抗心脑血管疾病等生理功能, 尤其是对眼部疾病有很好的防治作用, 受到人们的日益关注, 是国际公认具有防病、抗病生理功能的重

要活性物质^[1-2]。叶黄素作为食品添加剂和营养增补剂被广泛应用于食品、保健品、医药、化妆品、烟草和畜禽类饲料等多个领域。

收稿日期: 2015-06-04

基金项目: 江苏省农业科学院基本科研业务专项(ZX(15)1008)

作者简介: 李大婧(1976—), 女, 研究员, 博士, 主要从事果蔬加工与综合利用研究。E-mail: lidajing@163.com

*通信作者: 刘春泉(1959—), 男, 研究员, 硕士, 主要从事农产品精深加工与产业化开发研究。E-mail: liuchunquan2009@163.com

叶黄素分子结构中含有多个共轭双键结构,在自然界以多种异构体形式存在^[3]。在叶黄素制剂化或食品加工过程中,叶黄素会不可避免地受到加热、空气等影响,发生异构化反应,甚至裂解为环氧化物、含醛基或酮基的衍生物等^[4]。目前很少有人监测在叶黄素提取、制剂过程中顺式异构体的变化,产品的质量难以保障,因此建立叶黄素高效、可行的检测方法对叶黄素异构体的研究和应用具有重要的意义。

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)方法能够很好地分离样品中的天然色素,具有分离效果好、检测灵敏度高、分离效率高等优点,现在已经成为应用于类胡萝卜素分析中非常活跃的技术之一,也是叶黄素定性定量检测的主要技术。Rodriguez等^[5]运用HPLC结合二级阵列质谱和低场核磁(HPLC-diode array detection-mass spectrometer-nuclear magnetic resonance, HPLC-DAD-MS-NMR)方法分离和鉴定出叶黄素和玉米黄质异构体;Dachtler等^[6]通过HPLC-MS、HPLC-NMR技术分析了菠菜和肠胃中叶黄素和玉米黄质的立体异构体;陈万勤等^[3]采用冷皂化-HPLC方法测定乳制品中的叶黄素的顺反异构体;李秀霞等^[7]使用反相液谱结合二级阵列和大气压化学电离质谱(HPLC-DAD-atmospheric pressure chemical ionization-MS, HPLC-DAD-APCI-MS)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了分离和鉴定。这些检测方法都存在着检测耗时长、分离效果较差等问题,是限制HPLC技术实现快速检测的瓶颈。因此,建立一种快速、分离度高、准确度高的叶黄素检测方法成为当今亟需解决的问题。

本实验通过对色谱条件的多次优化和筛选,并通过MS、光谱、HPLC等方法对叶黄素顺、反异构体进行定性定量分析,旨在建立一种对叶黄素行之有效的HPLC检测方法,为更好地控制叶黄素产品的质量提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

反式叶黄素标准品(97%) 美国Fluka公司;棕榈油 泰国巴吞油厂有限公司;甲醇、乙腈二氯甲烷(分析纯) 美国天地公司;正己烷(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;丙酮(分析纯) 南京宁试化学试剂有限公司;氮气(纯度99.99%) 南京文达特种气体有限公司。

1.2 仪器与设备

85-2A数显测速恒温磁力搅拌器 江苏金坛市金华仪器厂;D10氮气吹扫仪 杭州奥盛仪器有限公司;数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;BS224S电子分析天平 北京赛多利斯科学仪器公司;1200

HPLC仪(主要包括在线真空脱气机、四元梯度洗脱泵、柱温箱、DAD)、色谱柱YMC-C₃₀、6530精确质量数四级杆-飞行时间质谱仪(APCI源) 美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 叶黄素顺式异构体的制备

吸取棕榈油4.6 mL于具塞刻度试管中,在170 °C条件下,于恒温油浴锅中避光加热。称取10 mg全反式叶黄素晶体于另一支试管中并加入400 μL正己烷,超声溶解30 s,频率为40 kHz。将正己烷-叶黄素溶液注入相应油脂中,制成工作溶液,这一过程需在1 min内完成。热处理2 h时,移取200 μL样品于小试管中,与2 mL丙酮混合均匀后,迅速置于-20 °C冰箱保存24 h,使油脂中的三酰甘油酯结晶。通过0.45 μm膜过滤于样品瓶中,进行HPLC-MS分析,整个实验过程中,试管敞口不密封,所有操作均在避光条件下完成。

1.3.2 HPLC方法的建立

参考文献[8-9]方法进行。

HPLC条件:色谱柱为C₃₀(4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温25 °C;进样量20 μL;DAD光谱收集范围250~600 nm。

MS条件:离子源为APCI⁺,毛细管电压2 500 V,电晕电流4 μA,干燥气体5 L,气化温度350 °C,蒸汽温度400 °C,雾化气体20 psi。

1.3.3 叶黄素标准曲线的绘制

准确称取1 mg全反式叶黄素标准品,用丙酮溶解并定容至25 mL,混匀,制成质量浓度为40 μg/mL的标准溶液。分别取一定量标准液置于5 mL容量瓶中,用丙酮定容并混匀,制成质量浓度为0.2、1、3、5、7、9、11、13 μg/mL的系列标准溶液,采用所建的C₃₀-HPLC方法检测,每个系列质量浓度重复进样3次,根据吸收峰面积对相应进样量进行线性回归分析,绘制全反式叶黄素的标准曲线。

1.3.4 回收率的测定

首先采用HPLC方法对样品溶液进行检测,然后精密移取6份已测的样品溶液2 mL,分别加入相同体积的1、3、9 μg/mL叶黄素标准液,制备加标溶液,溶液中叶黄素含量在4~260 ng,之后进行HPLC检测,将测得的峰面积代入标准曲线方程得到样品液中的叶黄素含量,按下式计算加标回收率。

$$\text{加标回收率}/\% = \frac{\text{加标样品测定值} - \text{样品测定值}}{\text{加标量}} \times 100$$

1.3.5 精密度的测定

精确移取2份叶黄素样品溶液,样液中叶黄素含量在4~260 ng之间,按照上述HPLC条件各重复进样6次,根据峰面积计算样品中相应的叶黄素含量,最终得到叶黄素含量相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.3.6 稳定性实验

取一份样品液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下密封避光保存0、4、8、10 h, 根据峰面积计算样品中相应的反式叶黄素含量, 进而得到10 h内供试样品中叶黄素含量变化情况。

1.4 数据分析

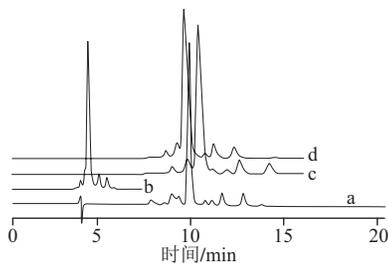
实验数据结果均采用Origin 9.0软件处理。

2 结果与分析

2.1 HPLC法流动相的选择

目前, 国内外用于叶黄素分析的HPLC流动相主要为水、甲基叔丁基醚、甲醇、乙腈、二氯甲烷。如张艳^[10]、Rodriguez^[5]等应用含乙腈、甲醇的流动相分别分离鉴定出叶黄素类化合物、 β -胡萝卜素类化合物, Qiu Dan^[11]、Chen^[12]等采用含二氯甲烷、甲醇的流动相建立了对 β -胡萝卜素异构体有效可行的色谱方法, Lee等^[13]则应用二氯甲烷、乙腈参与的流动相分离检测出番茄红素及其异构体。在另外文献报道^[14-15]中, 研究者分别使用水-甲醇、水-乙腈为流动相对叶黄素顺、反异构体进行分离, 但这两种方法所用时间都较长, 分别为70 min和45 min, 效率较低。

分析所查阅的国内外分离叶黄素的HPLC法后, 首先对文献[6]报道的HPLC法进行了尝试, HPLC分析条件为: 柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 0.8 mL/min , 检测波长 450 nm , 流动相A为水, 流动相B为甲基叔丁基醚, 流动相C为甲醇, 线性梯度洗脱, A的比例始终为5%, B在8 min内由25%增至47%, 之后在19 min内持续增至85%, 最终在1 min内由85%降至30%, 测定结果见图1a。可知, 此方法分离效果很不好, 主峰之前的多种物质未达到基线分离。之后多次调整了线性洗脱过程中流动相的配比, 但分离效果仍然很不好, 与开始图谱相差无几。



a. 线性梯度洗脱。b~d均为等梯度洗脱: b. 水-甲基叔丁基醚-甲醇 (5:45:50, V/V), 流速 0.8 mL/min ; c. 流动相同b, 流速 0.4 mL/min ; d. 水-甲基叔丁基醚-甲醇 (5:50:45, V/V), 流速同c。

图1 不同条件下叶黄素的色谱图

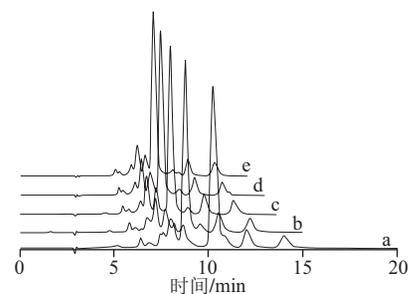
Fig.1 Chromatograms of all-(E)-lutein under different separation conditions

在以上实验的基础上, 将线性梯度洗脱调整为等梯度洗脱, 流动相水-甲基叔丁基醚-甲醇配比为5:45:50 (V/V), 其他条件不变, 分离效果如图1b所示, 可看

出所用的时间明显缩短, 但在主峰上仍存在肩峰。之后将流速由 0.8 mL/min 调整为 0.4 mL/min , 检测结果见图1c, 与图1b相比, 各组分出峰时间延迟, 分离效果稍好, 但仍未达到基线分离, 色谱峰峰形也亟需改善。在流速为 0.4 mL/min 的基础上, 将流动相配比调整为5:50:45 (V/V), 结果如图1d所示, 由图1d可知, 主峰与前一种物质没有完全分离, 而且主峰存在拖尾现象。经过上述调整得出的谱图可知, 此方法不能使叶黄素类物质达到基线分离。为使这些物质达到良好的分离度, 参照Lakshminarayana等^[8]建立的色谱方法, 选取二氯甲烷、乙腈、甲醇为流动相, 通过调整流动相比例、温度、流速、洗脱时间等来增加分离度, 进而达到最佳分离效果。

2.2 HPLC法流动相比例的调整

遴选出流动相A二氯甲烷、流动相B乙腈、流动相C甲醇后, 参照文献[5]中的色谱方法, 考察以下流动相配比对样品测定的影响。A-B-C配比 (V/V): a. 20:60:20; b. 20:50:30; c. 20:40:40; d. 20:30:50; e. 20:20:60, 检测结果见图2。由图2可知, 在由流动相a逐渐调整至流动相e的过程中, 样品中各物质全部洗脱所用的时间是逐渐缩短的, 其中流动相a、b未使样品中各组分较好分离, 流动相c、e得到的色谱峰对称性稍差, 峰形欠满意, 流动相d使样品中各物质达到有效分离, 拖尾现象有明显改善, 峰形较好。



二氯甲烷-乙腈-甲醇体积比分别为: a. 20:60:20; b. 20:50:30; c. 20:40:40; d. 20:30:50; e. 20:20:60。

图2 不同流动相配比条件下叶黄素的色谱图

Fig.2 Chromatograms of all-(E)-lutein using different mobile phase compositions

2.3 流速的选择

实验比较了 0.6 、 0.8 、 1.0 mL/min 3种流速条件下样品中叶黄素的分离情况, 结果发现, 流速为 1.0 mL/min 时, 样品中不同组分可达到有效分离, 而流速为 0.6 、 0.8 mL/min 时, 各组分出峰时间延后, 效率较低, 检测成本增加。

2.4 叶黄素热异构化产物结构的鉴定

改进后的HPLC条件: 色谱柱 C_{30} ($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 检测波长 450 nm ; 时间 13 min ; 流速 1.0 mL/min ; 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$;

DAD光谱收集范围250~600 nm; 流动相为二氯甲烷-乙腈-甲醇(20:30:50, V/V)。

分别对叶黄素标准品和叶黄素顺式异构体样品进行检测, C₃₀-HPLC色谱图分别见图3~5。根据色谱图只能鉴定峰4为全反式叶黄素, 为确定色谱图中其他峰的归属, 对样品进行MS分析。分析可知图中峰1、2、3、5、6的质谱图与峰4的质谱图类似, 它们具有共同的特征分子离子峰: [M+H-H₂O](m/z 551), 从而可以判断峰1、2、3、5、6皆为叶黄素异构体。此外, 各物质峰的m/z在大于570范围内还含有较多的离子碎片, 这可能是由于在制取的叶黄素样品溶液中含有少量的棕榈油。

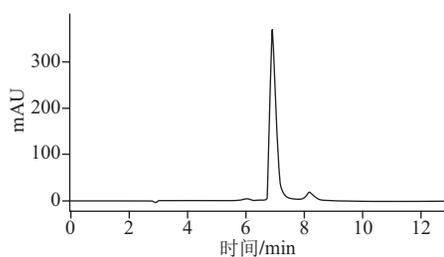


图3 全反式叶黄素的色谱图

Fig.3 Chromatogram of all-(E)-lutein

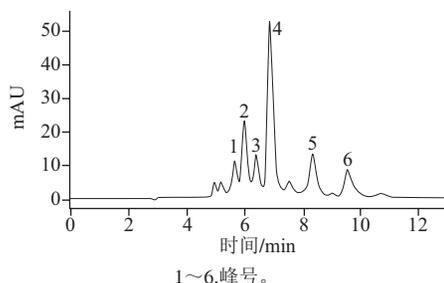


图4 在170 °C棕榈油中加热120 min后叶黄素的色谱图

Fig.4 Chromatogram of lutein in palm oil heated at 170 °C for 120 min

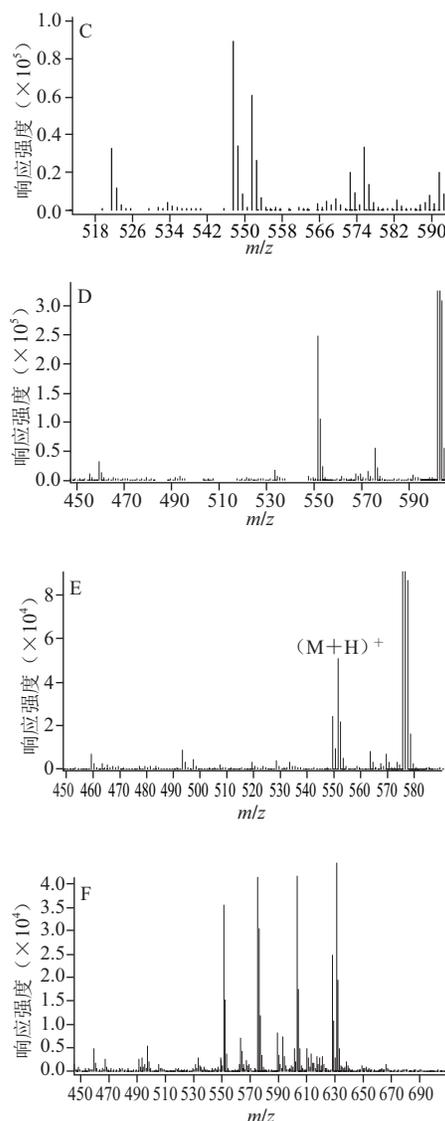
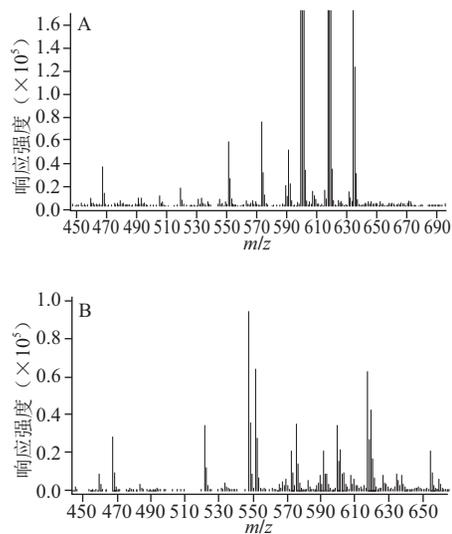


图5 全反式叶黄素及其顺式异构体质谱图

Fig.5 Mass spectra of all-(E)-lutein and its (Z)-isomers

仅通过质谱图不能鉴定叶黄素异构体的种类, 还需要结合这些化合物的紫外-可见光谱特性(图6)、Q值、III/II等参数及相应的文献值对其进行一一鉴定。

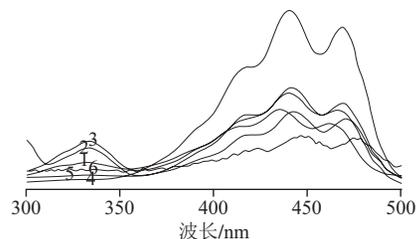


图6 高温异构化得到的全反式叶黄素及其顺式异构体的的光谱图

Fig.6 Spectra of all-(E)-lutein and (Z)-isomers

从图3、4及峰4的光谱特性可确定, 峰4为全反式叶黄素。通过以下程序对其顺式异构体进行初步的鉴定: 首先, 与全反式叶黄素相比, 单顺式异构体的最大吸收波长通常有4~6 nm的蓝移, 双顺式异构体则有8~12 nm的蓝移^[16]; 其次, 单顺式异构体在330~340 nm间有顺式吸收, 且顺式双键越靠近分子的中心, 其顺式吸收越大(通常用 Q 值来表示顺式吸收峰的强度); 最后, 叶黄素和 β -胡萝卜素均为类胡萝卜素, 都具有共同的异戊二烯结构, 故它们相应位置异构体的洗脱顺序具有一致性。据此, 根据图6和表1中物质的光谱特性初步鉴定峰1、2、3、5、6为单顺式异构体。

表1 样品中叶黄素异构体的鉴定

Table 1 Identification of all-(*E*)-lutein and its (*Z*)-isomers

峰标号	叶黄素异构体	吸收峰/nm		III/II/%		Q 值		m/z 测定值
		测定值	文献值	测定值	文献值	测定值	文献值	
1	15-顺式	330,414,442,471	329,416,438,465	39	30	0.31	0.50	459,491,533,551
2	13-顺式	334,414,440,466	330,417,436,463	28	31	0.46	0.44	459,533,551
3	13'-顺式	334,418,441,466	331,417,438,465	41	43	0.45	0.41	521,547,551
4	全反式	422,448,474	423,444,472	63	65	0.05	0.09	459,493,533,551
5	9-顺式	333,418,442,470	334,420,442,470	64	67	0.11	0.12	459,493,551
6	9'-顺式	334,418,442,470	332,420,444,472	47	50	0.35	0.14	459,551

注: 参考文献[19,20-24]。

为进一步确定各个峰的归属, 计算整理了各物质的最大吸收波长、III/II和 Q 值, 并与相关报道进行对照。Koyama等^[17]在分离全反式 β -胡萝卜素及其顺式异构体时发现: 1) 它们最大吸收波长的大小顺序依次为全反式 β -胡萝卜素>15-顺式- β -胡萝卜素>13-顺式- β -胡萝卜素; 2) 顺式吸收峰强度依次为15-顺式- β -胡萝卜素>13-顺式- β -胡萝卜素>全反式 β -胡萝卜素。Aman等^[18]采用DAD-HPLC-APCI-MS和NMR技术对13-顺式、13'-顺式、9-顺式和9'-顺式叶黄素进行鉴定。Bialek-Bylka等^[19]分离鉴定了全反式叶黄素及其顺式异构体, 发现它们最大吸收波长的变化规律为全反式叶黄素>9-顺式/9'-顺式叶黄素>13-顺式/13'-顺式叶黄素, 而顺式峰吸收强度则呈现相反的顺序。将得出的数据与上述文献报道比较后发现结果具有高度的一致性, 故可以确定峰1、2、3、5、6分别为15-顺式叶黄素、13-顺式叶黄素、13'-顺式叶黄素、9-顺式叶黄素和9'-顺式叶黄素, 它们的结构见图7。

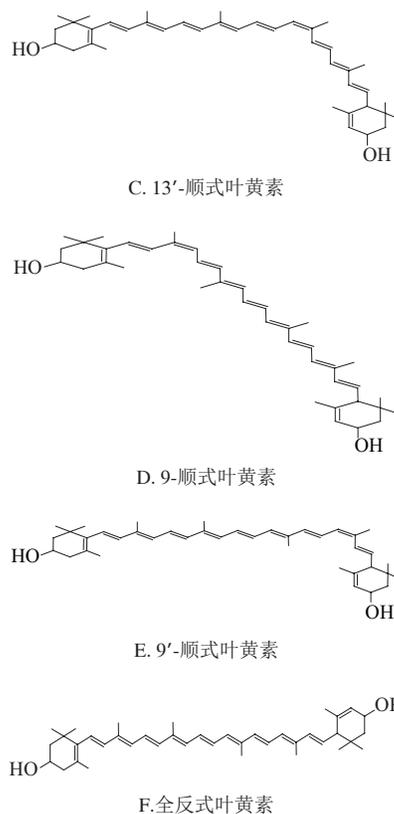
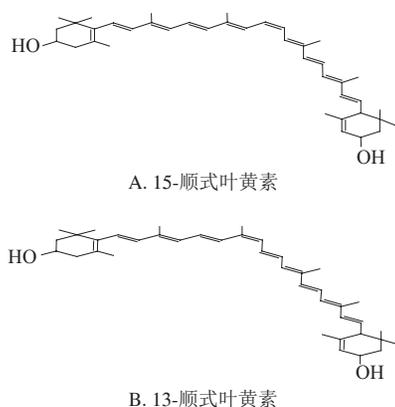


图7 鉴定出的全反式叶黄素及其异构体的化学结构

Fig.7 Chemical structures of all-(*E*)-lutein and its isomers identified from sample

2.5 反式叶黄素的定量分析

分别取质量浓度为0.2、1、3、5、7、9、11、13 $\mu\text{g/mL}$ 的反式叶黄素标准液, 采用建立的HPLC法检测, 每个系列质量浓度进样3次, 以进样量 (ng) 为横坐标、相应的吸收峰面积为纵坐标进行线性回归分析, 得到反式叶黄素的标准曲线回归方程为 $Y=9.4207X-10.1277$ ($R^2=0.9997$)。反式叶黄素溶液质量浓度在0.2~13 $\mu\text{g/mL}$ 范围内(即含量在4~260 ng之间), 其峰面积和进样量呈良好的线性关系。在3倍信噪比的条件下, 使用二极管阵列检测器的最低检出限为2.4 ng。

2.6 加标回收率及精密度

计算得到的加标回收率良好, 均在95%以上, 其RSD小于3.1%, 结果如表2所示。

表2 加标回收率和RSD ($n=6$)Table 2 Recoveries and relative standard deviations ($n=6$) from spiked sample

序号	样品含量	叶黄素含量/ng			回收率/%	RSD/%
		加标量	加标样品含量	回收量		
1	78.59	10	87.73	9.54	95.40	2.53
2	78.59	30	107.38	28.79	95.97	2.94
3	78.59	90	165.11	86.52	96.13	3.07

叶黄素样品溶液中叶黄素含量RSD分别为0.94%、1.05%和0.57%，均小于2%，结果表明此方法的精密性很高。

2.7 稳定性

在-18℃条件下密封避光保存10 h内样品溶液中叶黄素含量RSD为1.39%，小于2%，结果表明在此条件下保存10 h内样品溶液稳定性良好。

3 结论

建立了C₃₀-HPLC-DAD-APCI-MS高效、快速检测叶黄素异构体方法，叶黄素热异构化样品中各物质在12 min内达到有效分离；准确地对全反式叶黄素及其异构体进行定性定量分析，确定出5种叶黄素类化合物：15-顺式、13-顺式、13'-顺式、9-顺式、9'-顺式；绘制出全反式叶黄素的标准曲线 $Y=9.4207X-10.1277$ ($R^2=0.9997$)，全反式叶黄素溶液质量浓度在0.2~13 μg/mL范围内（即含量在4~260 ng之间）峰面积和进样量呈良好的线性关系。该方法操作简单、灵敏度高，可用于监测加工、贮藏过程中叶黄素的顺、反异构化反应进程。

参考文献：

- [1] 梁敏慧, 崔亚娟, 何梅, 等. 叶黄素分析检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 390-394. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.08.073.
- [2] 徐丽萍. 红蜜南瓜中叶黄素的超临界CO₂流体萃取分离方法研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(3): 94-97. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2007.03.016.
- [3] 陈万勤, 刘柱, 郑国钢, 等. 冷皂化-高效液相色谱法测定乳制品中叶黄素的5种顺反式异构体[J]. 分析化学, 2015, 43(3): 404-408. DOI:10.11895/j.issn.0253-3820.140931.
- [4] 樊继鹏, 徐振东, 余文静, 等. 乳粉中叶黄素的测定方法及稳定性的影响[J]. 包装与食品机械, 2014, 32(4): 20-23. DOI:10.3969/j.issn.1005-1295.2014.04.005.
- [5] RODRIGUEZ E B, RODRIGUEZ-AMAYA D B. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from β-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 563-572. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.02.015.
- [6] DACHTLER M, GLASER T, KOHLER K, et al. Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(3): 667-674. DOI:10.1021/ac000635g.
- [7] 李秀霞, 韩鲁佳. 玉米蛋白粉中反式叶黄素及主要顺式异构体的分离鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(4): 61-66. DOI:10.3321/j.issn:1007-4333.2007.04.012.
- [8] LAKSHMINARAVANA R, ARUNA G, SANGEETHA R, et al. Possible degradation/biotransformation of lutein *in vitro* and *in vivo*: isolation and structural elucidation of lutein metabolites by HPLC and LC-MS (atmospheric pressure chemical ionization)[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 45: 982-983. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.011.
- [9] MARX M, SCHIEBER A, CARLE R. Quantitative determination of carotene stereoisomers in carrot juices and vitamin supplemented (ATBC) Drinks[J]. Food Chemistry, 2000, 70: 403-408. DOI:10.1016/S0308-8146(00)00096-0.
- [10] 张艳, 惠伯棣, 裴凌鹏, 等. C₃₀柱分离万寿菊花中的叶黄素类化合物初探[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 424-428.
- [11] QIU Dan, CHEN Zhirong, LI Haoran. Effect of heating on solid β-carotene[J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 344-349. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.05.071.
- [12] CHEN B H, HUANG J H. Degradation and isomerization of chlorophyll a and β-carotene as affected by various heating and illumination treatments[J]. Food Chemistry, 1998, 62(3): 299-307. DOI:10.1016/S0308-8146(97)00201-X.
- [13] LEE M T, CHEN B H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system[J]. Food Chemistry, 2002, 78: 425-432.
- [14] 李大婧, 王闯, 徐爱琴, 等. 高效液相色谱法测定叶黄素顺、反异构体[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 186-190.
- [15] BENEVIDES C M J, VELOSO M C C, PAULA PEREIRA P A, et al. A chemical study of β-carotene oxidation by ozone in an organic model system and the identification of the resulting products[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 927-934. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.082.
- [16] REZANKA T, OLSOVSKA J, SOBOTKA M, et al. The use of APCI-MS with HPLC and other separation techniques for identification of carotenoids and related compounds[J]. Current Analytical Chemistry, 2009, 5(1): 1-25.
- [17] KOYAMA Y, KITO M, TAKII T, et al. Configuration of the carotenoid in the reaction centers of photosynthetic bacteria. Comparison of the resonance Raman spectrum of the reaction center of *Rhodospseudomonas sphaeroides* G1C with those of *cis-trans* isomers of β-carotene[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1982, 680(2): 109-118. DOI:10.1016/0005-2728(82)90001-9.
- [18] AMAN R, BIEHL J, CARLE R, et al. Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables[J]. Food Chemistry, 2005, 92(4): 753-763. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.10.031.
- [19] BIALEK-BYLKA G E, SAKANO Y, MIZOGUCHI T, et al. Central-*cis* isomers of lutein found in the major light-harvesting complex of photosystem II (LHC IIb) of higher plants[J]. Photosynthesis Research, 1998, 56(3): 255-264. DOI:10.1023/A:1006090210001.
- [20] KHACHIK F, BERNSTEIN P S, GARLAND D L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas[J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1998, 38(9): 1802-1811. DOI:10.1155/2015/430741.
- [21] LEE H S, CASTLE W S, COATES G A. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (early gold) grown in florida, USA[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 913: 371-377. DOI:10.1016/S0021-9673(00)01029-3.
- [22] MELENDEZ-MARTINEZ A J, STINCO C M, LIU C, et al. A simple HPLC method for the comprehensive analysis of *cis/trans* (*Z/E*) geometrical isomers of carotenoids for nutritional studies[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2): 1341-1350. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.10.067.
- [23] ZEPKA L Q, MERCADANTE A Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice[J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 28-34. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.03.071.
- [24] CRUPI P, MILELLA R A, ANTONACCI D. Simultaneous HPLC-DAD-MS (ESI⁺) determination of structural and geometrical isomers of carotenoids in mature grapes[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2010, 45: 971-980. DOI:10.1002/jms.1794.