

叶黄素、 β -隐黄质及其异构体检测方法的研究

肖亚冬^{1,2}, 李大婧^{1,2}, 刘春泉^{1,2}, 张钟元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: 应用 C_{30} -HPLC-DAD 技术, 建立一种同时分离全反式叶黄素、全反式 β -隐黄质及其异构体的检测方法。采用 APCI-MS 和光谱技术对分离出化合物进行定性分析。最佳色谱条件: 1.5% 乙酸铵水-甲基叔丁基醚 (MTBE) - 甲醇 (5:25:70, V/V/V) 为流动相 A, 1.5% 乙酸铵水-甲基叔丁基醚 (MTBE) - 甲醇 (5:85:10, V/V/V) 为流动相 B, 线性梯度洗脱; 流速: 0.6 mL/min; 洗脱时间: 24 min; 进样量: 20 μ L; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。混合物中的全反式叶黄素及其 15-顺式、13/13'-顺式、9-顺式、9'-顺式异构体, 全反式 β -隐黄质及其 15-顺式、13-和 13'-顺式、9-顺式、9'-顺式异构体均得到较好分离。全反式叶黄素、全反式 β -隐黄质分别在 2~150 ng 和 5~250 ng 范围内峰面积与进样量呈良好线性关系。该方法能够快速、准确地同时分离全反式叶黄素、全反式 β -隐黄质及它们的异构体, 可用于果蔬中全反式叶黄素和全反式 β -隐黄质及其异构体混合物的定性定量分析。

关键词: 叶黄素; β -隐黄质; 立体异构体; 分析

文章编号: 1673-9078(2016)2-330-335

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.048

Separation and Identification of Lutein, β -Cryptoxanthin and Their Isomers

XIAO Ya-dong^{1,2}, LI Da-jing^{1,2}, LIU Chun-quan^{1,2}, ZHANG Zhong-yuan²

(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: A method to simultaneously detect all-*trans*-Lutein, all-*trans*- β -cryptoxanthin and their stereoisomers was developed using C_{30} -column, high-performance liquid chromatography, diode array (C_{30} -HPLC-DAD) technique. The structures of isolated compounds were elucidated by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS) and ultraviolet/visible (UV/Vis) spectroscopy. The optimal chromatographic condition was as follows: mobile phase A: 1.5% ammonium acetate:water:methyl *tert*-butyl ether (MTBE)-MeOH (5:25:70, V/V/V), mobile phase B: 1.5% ammonium acetate:water:MTBE-MeOH (5:85:10, V/V/V); flow rate: 0.6 mL/min; elution time: 24 min; injection volume: 20 μ L; column temperature: 25 $^{\circ}$ C. Using this novel method, 15-*cis*-lutein, 13/13'-*cis*-lutein, 9-*cis*-lutein, 9'-*cis*-lutein, 15-*cis*- β -cryptoxanthin, 13- and 13'-*cis*- β -cryptoxanthin, 9-*cis*- β -cryptoxanthin and 9'-*cis*- β -cryptoxanthin were successfully separated from the mixture. The peak areas of all-*trans* lutein and all-*trans* β -cryptoxanthin showed a good linear relationship with their injection volumes in the range of 2 to 150 ng and 5 to 250 ng, respectively. The proposed method accurately and rapidly separated all-*trans* lutein, all-*trans* β -cryptoxanthin, and their *cis*-isomers simultaneously. This method has potential applications in qualitative and quantitative analysis of all-*trans* lutein, all-*trans* β -cryptoxanthin, and their stereoisomers in fruits and vegetables.

Key words: lutein; β -cryptoxanthin; stereoisomers; analysis

类胡萝卜素 (Carotenoids) 是一类存在于花卉、果蔬等植物中的萜萜类天然化合物, 颜色多呈黄色。自然界中常见的叶黄素存在于菠菜、莴苣、羽衣甘蓝等绿叶蔬菜中, β -隐黄质存在于柑橘、玉米和南瓜等果蔬中。叶黄素和 β -隐黄质分别含有独特的紫罗酮环二羟基和单羟基结构 (如图 1 所示), 使其可作为强抗

氧化剂淬灭单线态氧, 同时能保护机体免受损伤, 对预防和治疗心血管疾病、老年性黄斑变性症 (AMD) 和癌症等^[1-3]具有特殊功效。

自然界中的类胡萝卜素主要以全反式结构存在, 因化学结构的不稳定, 光、热等条件下它们容易发生异构化和降解反应, 引起色素的损失和氧化。在不同加工方式下, 如干燥、微波加热、罐装、烘焙、蒸煮等, 或在不同的贮藏条件下, 如温度、光照等, 存在于食品中的全反式结构类胡萝卜素同样会发生异构化。异构化产生的顺式结构类胡萝卜素在物化性质和生理功能上与全反式构象相差较大, 限制了其在食品、

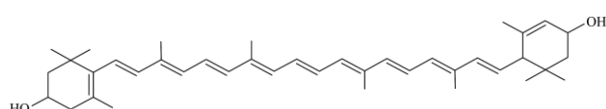
收稿日期: 2015-04-24

基金项目: 江苏省农业科学院基本科研业务专项经费 (ZX (15) 1008)

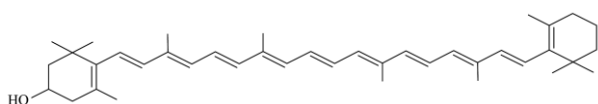
作者简介: 肖亚冬 (1988-), 女, 硕士, 主要从事农产品加工

通讯作者: 李大婧 (1976-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为果蔬加工与综合利用

药品等领域的应用。因此建立一种准确的检测方法可以实时监测类胡萝卜素异构化反应,为其高效应用提供参考。



叶黄素 ($C_{40}H_{56}O_2$, $M_r=568.88$)



β -隐黄质 ($C_{40}H_{56}O$, $M_r=552.88$)

图1 全反式叶黄素和 β -隐黄质的结构式

Fig.1 The structures of all-E lutein and all-E β -cryptoxanthin

目前,关于分离叶黄素和 β -隐黄质及其异构体的报道较多,但关于具体化合物的鉴定及分析的报道尚不多见,检测方法也有缺陷。李大婧等^[4]采用甲醇和水对全反式叶黄素及其异构体进行分离,洗脱时间长,且只分离出叶黄素的几种常见顺式异构体。Kao等^[5]使用的分离方法也存在洗脱时间长、未分离出不常见的15-顺式异构体问题。Prateek Gupta等^[6]虽在较短时间内分离出多种类胡萝卜素,但他只对单一类胡萝卜素顺式异构体的分离做了报道,并没有对同时分离两种全反式结构和顺式异构体混合物进行分析。因此,本实验通过流动相选择、流动相比比例和洗脱时间调整,建立一种快速、准确分离全反式叶黄素、 β -隐黄质及其顺式异构体的HPLC检测方法,缩短洗脱时间的同时分离出含有全反式叶黄素、全反式 β -隐黄质及其多种顺式异构体的混合物,并在质谱和光谱技术的基础上鉴定这些异构体,为进一步研究富含叶黄素和 β -隐黄质的果蔬及它们在复杂食品基质中的应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

全反式叶黄素标准品(97%)、全反式 β -隐黄质标准品(95%),美国Sigma公司;碘、正己烷、无水硫酸钠、硫代硫酸钠(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;甲基叔丁基醚(MTBE)、甲醇(色谱纯),美国天地公司;乙酸铵(色谱级),天津市科密欧化学试剂有限公司;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 仪器与设备

101A-2型数显电热鼓风干燥箱,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;BS224S电子分析天平,北京赛多

利斯科学仪器公司;D10氮气吹扫仪,杭州奥盛仪器有限公司;KQ-300DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;恒温摇床THC-C-1,太仓市实验设备厂;TES数位式照度计,泰仕电子工业股份有限公司;HPLC1200高效液相色谱仪,美国Agilent科技有限公司;色谱柱YMC-C₃₀;安捷伦6530精确质量数四级杆-飞行时间质谱仪(6530 Q-TOF)(APCI源),美国Agilent科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 叶黄素、 β -隐黄质及其异构体的制备

全反式叶黄素、全反式 β -隐黄质异构体的制备参照惠伯棣等使用的异构化方法^[7]。将1.00 mg全反式叶黄素和1.00 mg全反式 β -隐黄质标准品分别用甲醇溶解,混合二者溶液并定容于25 mL棕色容量瓶中,置于超低温冰箱中待用。取5份2 mL叶黄素和 β -隐黄质的混合溶液于试管中,用氮吹仪吹干其中的溶剂,然后加入1 mL碘-正己烷(1.8 μ g/mL)和4 mL正己烷溶液,使碘含量为二者质量的1%~2%。将试管放在距恒温摇床中日光灯10 cm处(温度25 $^{\circ}$ C,光照强度2000 lux),照射1 h后取出处理。用硫代硫酸钠溶液(1×10^3 mol/L)洗涤去除多余的碘,氮气吹干后用2 mL甲醇复溶,经0.45 μ m滤膜过滤后进样检测。

1.3.2 液相色谱及质谱条件

C₃₀-HPLC条件:色谱柱C₃₀(4.6 mm \times 250 mm i.d., 5 μ m);流动相:A:1.5%乙酸铵水/MTBE/甲醇=5/25/70,B:1.5%乙酸铵水/MTBE/甲醇=5/85/10;流速:0.6 mL/min;进样量:20 μ L;柱温25 $^{\circ}$ C。

MS条件:MS系统:Agilent 6530 Q-TOF;离子源:APCI⁺;毛细管电压:2500 V;干燥气体:5 L;雾化气体:20 psi;汽化温度:350 $^{\circ}$ C;蒸汽温度:400 $^{\circ}$ C;电晕电流:4 μ A。

1.3.3 标准曲线的制作

准确称取1.00 mg全反式叶黄素标准品,用甲醇溶解并定容至50 mL棕色容量瓶中,混匀,制成质量浓度为20 μ g/mL的标准液。分别取一定量标准液于5 mL容量瓶中,用甲醇定容并混匀,制成浓度为0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1、2、4、6 μ g/mL的系列标准溶液,每个系列浓度进样3次,以进样量为横坐标、相应吸收峰面积为纵坐标绘制叶黄素标准曲线。

准确称取1.00 mg全反式 β -隐黄质标准品,用甲醇溶解并定容至50 mL棕色容量瓶中,混匀,制成质量浓度为20 μ g/mL的标准液。分别取0.0125、0.025、0.05、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL标准液置于5 mL容量瓶中,用甲醇定容并混匀,制成浓度为0.05、

0.1、0.2、1、2、4、6、8、10 μg/mL 的系列标准溶液，每个系列浓度进样 3 次，以进样量为横坐标、相应吸收峰面积为纵坐标绘制 β-隐黄质标准曲线。

1.4 数据分析

实验数据结果采用 Origin 8.5 软件处理。

2 结果与分析

2.1 全反式叶黄素和全反式 β-隐黄质及其异构体检测方法的建立

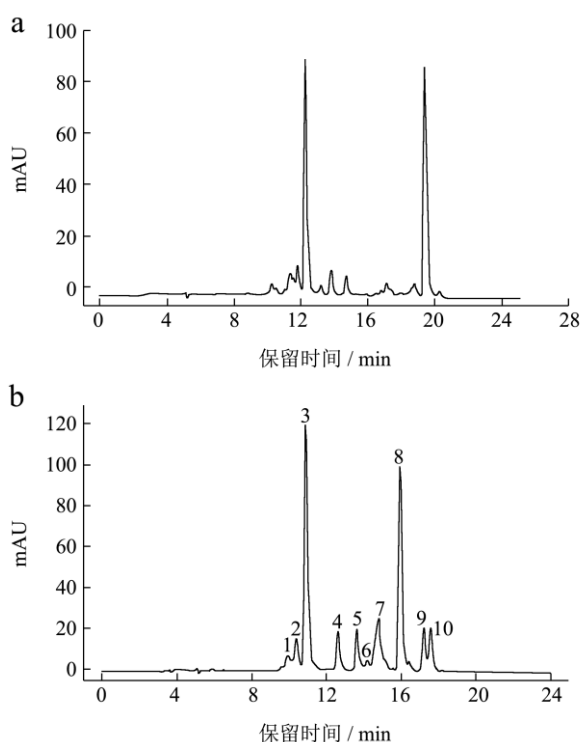


图 2 不同流动相下全反式叶黄素、全反式 β-隐黄质及其异构体色谱图

Fig.2 Chemical structures of all-E lutein and all-E β-cryptoxanthin

C₃₀ 柱能够成功分离出叶黄素、玉米黄质、胡萝卜素和番茄红素等类胡萝卜素及其异构体^[7,8]，甲醇、MTBE 和水在分离类胡萝卜素和它们顺式异构体方面也有特殊能力。Lacker 等^[9]利用甲醇和 MTBE 作流动相不仅检测到 β-胡萝卜素的多种单顺式异构体，且分离出很难得到的双顺式异构体。Kurz 等^[10]采用不同比例甲醇、MTBE 和水为混合流动相，通过梯度洗脱将叶黄素、玉米黄质等类胡萝卜素与其异构体共同洗脱出。因此，我们采用 C₃₀ 色谱柱，甲醇、MTBE 和水为流动相对全反式叶黄素、β-隐黄质及其顺式异构体的混合物进行分离。首先使用流动相 A：甲醇、流动相 B：MTBE 和流动相 C：水的三个单一流动相分离

叶黄素、β-隐黄质及其异构体，结果如图 2a 所示，由图可知，全反式和顺式异构体能够得到分离，但异构体并不能分离开来，尤其是 β-隐黄质，经多次不同比例调整，仍不能将异构体分开。通过试验，将三种流动相进行不同比例混合得到两种混合流动相，即流动相 A：水-MTBE-甲醇（5:25:70，V/V/V）和流动相 B：水-MTBE-甲醇（5:85:10，V/V/V）对它们进行分离，发现能使叶黄素、β-隐黄质及其异构体在较短时间内得到很好分离，经过洗脱时间调整且加入一定比例乙酸铵后，峰形得到改善，如图 2b 所示。流动相洗脱时间如表 1 所示。

表 1 分离全反式叶黄素、全反式 β-隐黄质及其异构体的流动相组成和洗脱时间

Table 1 Mobile-phase composition and elution time for the separation of all-E lutein, all-E β-cryptoxanthin, and their isomers

时间 /min	溶剂组成/%	
	1.5% 乙水:MTBE: 甲醇=5:25:70	1.5% 乙酸水:MTBE: 甲醇=5:85:10
0	95	5
4.5	80	20
12.5	50	50
18	25	75
24	5	95

2.2 全反式叶黄素和全反式 β-隐黄质及其异构体的定性分析

根据色谱图我们只能确定全反式的叶黄素和 β-隐黄质，为确定色谱图中其他峰的归属，通过 HPLC-MS 联用对全反式叶黄素和 β-隐黄质异构化样品的混合物进行分析。我们利用它们的吸收波长（表 2）、紫外-可见光谱特性（图 4）、质谱离子碎片特性（图 5）、顺式吸收强度（Q 值，顺式吸收峰“高度值”与最大吸收峰“高度值”之比）及文献中有关报道对全反式叶黄素和 β-隐黄质及它们的顺式异构体进行鉴定。全反式结构通过与标准品（图 3）进行洗脱时间的对比即可确定，通过质谱分析也得到了验证，峰 3、峰 8 的主离子峰为 551.4[M+H]⁺和 535.4[M+H]⁺，与全反式叶黄素、全反式 β-隐黄质标准品—主离子峰 551.4[M+H]⁺和 535.4[M+H]⁺一致，因此峰 3 和峰 8 分别为全反式叶黄素和全反式 β-隐黄质。

因单顺式异构体没有标准品可用，我们通过以下程序对其进行分析：（1）单顺式异构体的最大吸收波长相对全反式有 4~6 nm 的蓝移；（2）在 330-340 nm

之间有一个新的吸收，顺式双键越靠近分子中心顺式吸收越强；(3) 9-顺式、13-顺式类胡萝卜素是最稳定的单顺式异构体；(4) 叶黄素、 β -隐黄质与 β -胡萝卜素均为类胡萝卜素，有相同的异戊二烯结构主链性质^[11]，因此在相同流动相中其相应位置异构体的洗脱顺序与 β -类胡萝卜素应有一致性。根据上述方法，我们可以确定混合物中的顺式异构体。

叶黄素的顺式异构体有相同的主离子峰，即 m/z 551.4[M+H]⁺ (见图 5)。峰 2、4 和 5 的最大吸收波长为 438、440 和 440 nm，与全反式结构分别有 6、4 和 4 nm 的蓝移，符合单顺式异构体特征，其顺式吸收强度分别为 0.45、0.05 和 0.05，与 Bylka 等^[12] 报道的叶黄素顺式异构体最大吸收波长及顺式吸收强度同全反式的关系一致，即最大吸收波长：全反式>9/9'-顺式>13/13'-顺式，顺式吸收峰强度：13/13'-顺式>9/9'-顺式>全反式，并且 Bylka 等利用最大吸收波长、电子吸收光谱及 NMR 技术鉴定出 13-、13'-、9-和 9'-顺式叶黄素，洗脱顺序为 13-、13'-、9-和 9'-顺式。因此，

由吸收波长、Q 值和图 2-(2) 中洗脱顺序可确定峰 2、4 和 5 分别为 13/13'-、9-和 9'-顺式叶黄素。由表 2 知，峰 1 最大吸收波长为 438 nm，相对全反式有 6 nm 蓝移，Q 值为 0.27，相对较高，应为单顺式异构体，且在 13/13'-顺式叶黄素之前洗脱出，通过表 2 中实测值与报道值比较，确定峰 1 应为 15-顺式叶黄

素。

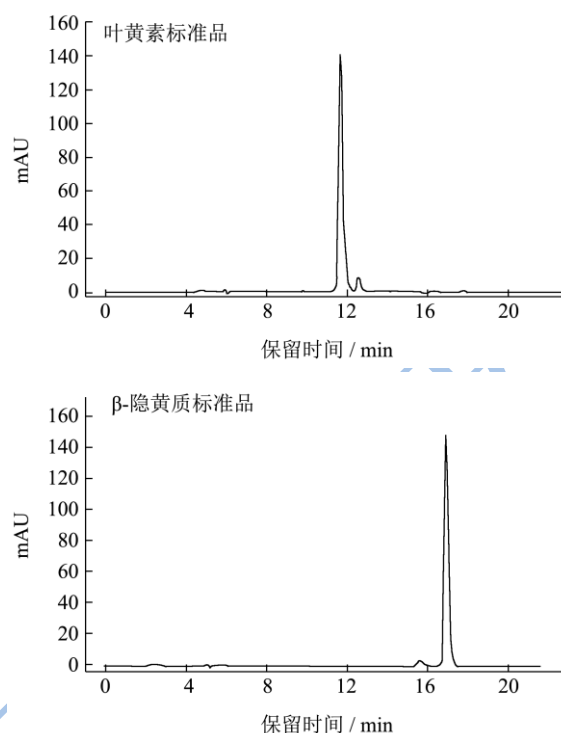


图 3 全反式叶黄素、 β -隐黄质标准品的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of all-E lutein, all-E β -cryptoxanthin and their isomers using different mobile phases

表 2 全反式叶黄素、 β -隐黄质及其顺式异构体的鉴定

Table 2 Identification of all-E lutein, all-E β -cryptoxanthin, and their cis-isomers

峰编号	化合物	λ /nm		Q 值		M/Z
		实测值	报道值	计算值	报道值	实测值
1	15-顺式叶黄素	328,438,466	329,416,438,465 ^a	0.27		551.4[M+H-18] ⁺
2	13/13'-顺式叶黄素	330,418,438,466	329,416,437,465 ^a	0.45	0.41 ^a	551.4[M+H-18] ⁺ , 533.4[M+H-18-18] ⁺
3	全反式叶黄素	422,444,472	421,444,472 ^a			551.4[M+H-18] ⁺ , 533.4[M+H-18-18] ⁺
4	9-顺式叶黄素	332,418,440,466	329,416,439,467 ^a	0.05	0.06 ^a	551.4[M+H-18] ⁺
5	9'-顺式叶黄素	330,422,440,468	330,417,440,467 ^a	0.05	0.05 ^a	551.4[M+H-18] ⁺
6	15-顺式 β -隐黄质	336,417,446,466	336,445 ^c	0.39	0.47 ^c	553.4[M+H] ⁺ , 535.4[M+H-18] ⁺
7	13-和 13'-顺式 β -隐黄质	338,424,444,468	337,444,469 ^c	0.33	0.43 ^c	553.4[M+H] ⁺ , 535.4[M+H-18] ⁺
8	全反式 β -隐黄质	338,428,450,478	424,452,478 ^b			553.4[M+H] ⁺ , 535.4[M+H-18] ⁺
9	9-顺式 β -隐黄质	342,424,446,474	339,445,472 ^c	0.08	0.07 ^c	553.4[M+H] ⁺ , 535.4[M+H-18] ⁺ , 473.4[M+H-18-62] ⁺
10	9'-顺式 β -隐黄质	342,423,448,472	339,446,472 ^c	0.10	0.07 ^c	553.4[M+H] ⁺ , 535.4[M+H-18] ⁺ , 473.4[M+H-18-62] ⁺

注: 峰编号与图 1-(2) 中一致; 粗体数字为化合物最大吸收波长; a: 流动相为甲醇和 MTBE, 65 min 内由 100:0 到 30:70 的线性梯度洗脱^[5]; b: 流动相为甲醇/乙腈/水 (79:14:7, v/v/v) 和二氯甲烷, 66 min 内由 95:5 到 66:34 的线性梯度洗脱^[14]; c: 流动相为甲醇和甲基叔丁基醚 (从 95:5 到 50:50) 的线性梯度洗脱^[15]。

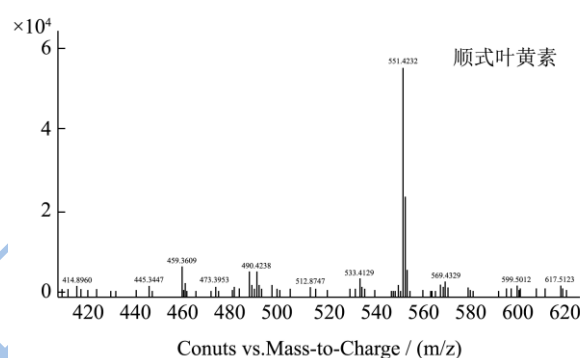
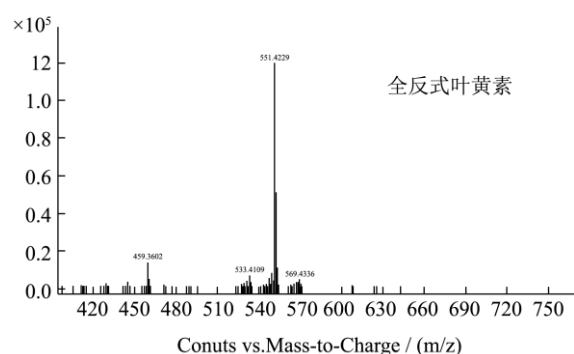
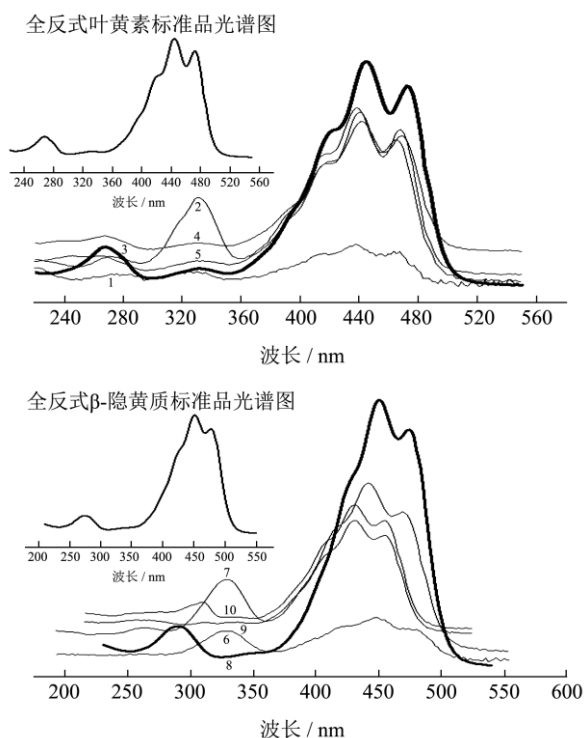


图 4 全反式叶黄素、全反式 β -隐黄质及它们顺式异构体的紫外-可见光谱

Fig.4 HPLC chromatograms of standard all-E lutein and all-E β -cryptoxanthin

β -隐黄质顺式异构体的主离子峰为 $553.4[M+H]^+$ (图 5)。峰 6、7、9 和 10 的最大吸收波长分别为 446、444、446 和 448 nm, 与全反式有 2-6 nm 蓝移, Q 值分别为 0.39、0.33、0.08 和 0.10, 相对较大, 因此这几种化合物应为 β -隐黄质的单顺式异构体。由 Q 值知, 峰 6 的顺式吸收强度是几个顺式异构体中最大的, 因此应为中心异构体, 即 15-顺式- β -隐黄质。同全反式叶黄素一样, 全反式 β -隐黄质结构为非对称性, 故其单顺式异构体中, 除稳定的 13-、9-顺式外, 还有 13'-顺式和 9'-顺式异构体, 洗脱顺序应与其一致。色谱图 1-(2) 显示峰 7 可能是两个没有分开的峰, 它在 15-顺式之后和全反式之前洗脱出, 因此应为 13-和 13'-顺式- β -隐黄质混合物。而峰 9、峰 10 在全反式之后洗脱出, 且 Q 值相对较小, 所以分别为 9-和 9'-顺式- β -隐黄质。

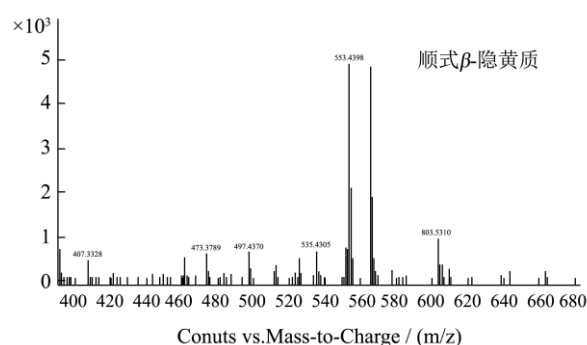
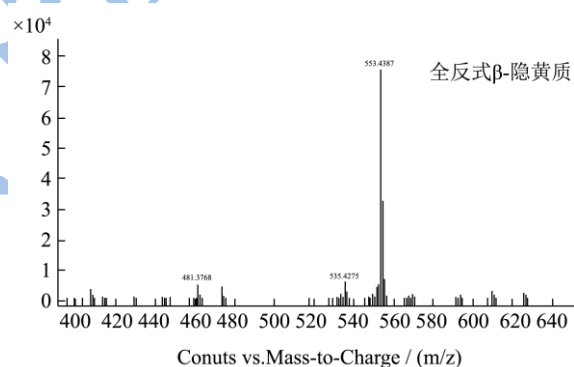


图 5 全反式叶黄素、全反式 β -隐黄质及其异构体的质谱特征
Fig.5 UV-Vis spectra of all-E lutein (1), all-E β -cryptoxanthin (2), and their cis-isomers

2.3 全反式叶黄素和全反式 β -隐黄质及其异构体的定量分析

自然界中类胡萝卜素的顺式异构体目前都没有标准品, 因此二者的顺式异构体也依据全反式叶黄素、

全反式 β -隐黄质的标准曲线进行定量分析。按照 1.3.3 中标准曲线制作方法,得到叶黄素和 β -隐黄质的线性回归方程分别为 $Y=55.27X-25.35$ ($R^2=0.9993$, 图 6-(1))、 $Y=12.45X-4.09$ ($R^2=0.9995$, 图 6-(2)), 结果表明全反式叶黄素、 β -隐黄质含量在 2~150 ng 和 5~250 ng 范围内峰面积和进样量呈良好线性关系。

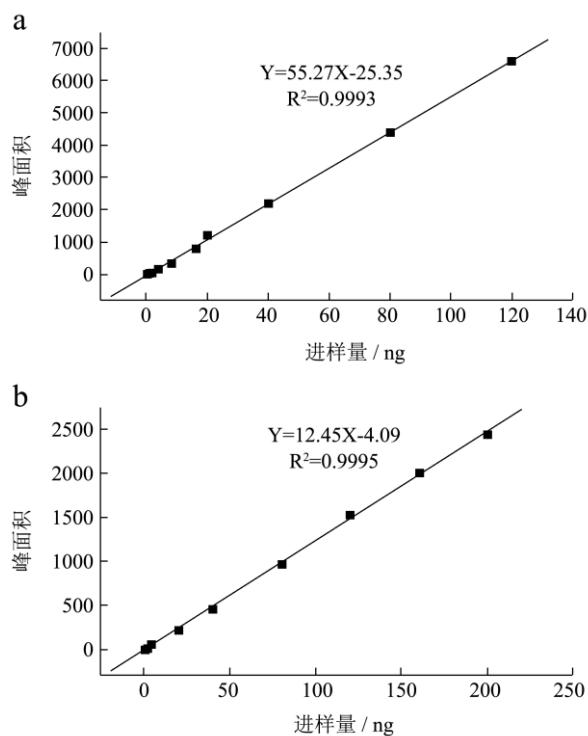


图 6 全反式叶黄素 (a) 和全反式 β -隐黄质 (b) 标准曲线

Fig.6 Positive ion APCI mass spectra of all-E lutein, all-E β -cryptoxanthin, and their isomers

2.4 精密度、稳定性和回收率测定

取 2 份供试样品溶液,并使上样液中含全反式叶黄素和全反式 β -隐黄质含量在 2~150 ng 和 5~250 ng 之间,按照上述色谱条件重复进样 6 次,得到叶黄素和 β -隐黄质的峰面积,经计算叶黄素峰面积积分值的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为 0.88%、0.21%, β -隐黄质峰面积积分值的 RSD 分别为 1.20%、0.65%,均小于 5%,说明该方法具有较好的精密度。

取供试样品溶液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存分别在 0、2、4、6、8、10 h 后按照 2.3.2 色谱条件进样测定,经计算叶黄素和 β -隐黄质峰面积积分值的 RSD 值分别为 1.77%、2.10%,小于 5%,表明该方法具有较好的稳定性。

分别精密称取 3 份相同的供试样品溶液,添加相同体积的叶黄素、 β -隐黄质标准品溶液,加标水平分为 2、4、8 $\mu\text{g/mL}$,使上样液中含全反式叶黄素和 β -隐黄

质含量分别在 2~150 ng 和 5~250 ng 之间,按照 2.3.2 色谱条件进样分析,每份样液重复进样三次,经计算样液的加标回收率分别为 95.30%、96.10%、96.46%,在 95%~97%之间,且 RSD 分别为 3.49%、2.01%、1.13%,都小于 5%,表明本方法具有良好的回收率,测定结果准确、可信。

3 结论

通过流动相的选择、流动相比比例和洗脱时间的调整,建立了以 1.5% 乙酸铵水-MTBE-甲醇 (5:25:70, V/V/V) 为流动相 A, 1.5% 乙酸铵水-MTBE-甲醇 (5:85:10, V/V/V) 为流动相 B 的 C_{30} -HPLC 分析方法。采用 HPLC-APCI-MS 和 DAD 能准确地对叶黄素和 β -隐黄质的顺、反异构体进行定性分析。绘制出全反式叶黄素和 β -隐黄质的标准曲线分别为 $Y=55.27X-25.35$ ($R^2=0.9993$)、 $Y=12.45X-4.09$ ($R^2=0.9995$),二者在 2~150 ng 和 5~250 ng 范围内峰面积与进样量呈良好线性关系,具有较高的准确度和良好的重现性。该方法准确、可靠,可为监测加工贮藏含有叶黄素、 β -隐黄质制品中二者顺反异构体的变化提供理论依据。

参考文献

- [1] Collera-Zúñiga O, Jiménez F G, Gordillo R M. Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annum* L [J]. Food Chemistry, 2005, 90(1): 109-114
- [2] Liu C, Bronson R T, Russell R M, et al. β -Cryptoxanthin supplementation prevents cigarette smoke-induced lung inflammation, oxidative damage, and squamous metaplasia in ferrets [J]. Cancer Prevention Research, 2011, 4(8): 1255-1266
- [3] Wu C, Han L, Riaz H, et al. The chemopreventive effect of β -cryptoxanthin from mandarin on human stomach cells (BGC-823) [J]. Food Chemistry, 2013, 136(3): 1122-1129
- [4] 李大婧,王闯,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
LI Da-jing, WANG Chuang, et al. Determination of lutein stereoisomers by HPLC [J]. Food Science, 2012, 33(22): 186-190
- [5] Kao T, Loh C, Inbaraj B S, et al. Determination of carotenoids in *Taraxacum formosanum* by HPLC-DAD-APCI-MS and preparation by column chromatography [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 66:144-153
- [6] P Gupta, Y Sreelakshmi, et al. A rapid and sensitive method

- for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography [J]. *Plant Method*, 2015, 11(5)
- [7] 惠伯棣,张西,等.反相 C₃₀ 柱在 HPLC 分析类胡萝卜素中的应用[J].*食品科学*,2005,26(1):264-270
HUI Bo-di, ZHANG Xi, WEN Jing. Reverse-phase C₃₀ HPLC used in analysis of carotenoids [J]. *Food science*, 2005, 26(1): 264-270
- [8] 惠伯棣,李京,等.应用 C₃₀-HPLC-PDA 分离与鉴定番茄红素几何异构体[J].*食品工业科技*,2006,27(7):49-51
HUI Bo-di, LI Jing, et al. Separation and identification of lycopene and its geometric isomers with C₃₀-HPLC-PDA [J]. *Food Industry Technology*, 2006, 27(7): 49-51
- [9] Lacker T, Strohschein S, Albert K. Separation and identification of various carotenoids by C₃₀ reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 854(1): 37-44
- [10] Kurz C, Carle R, Schieber A. HPLC-DAD-MS characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity [J]. *Food Chemistry*, 2008, 110(2): 522-530
- [11] 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,2005:248-255
HUI Bo-di. *Chemistry and biochemistry of carotenoids*[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005: 248-255.
- [12] Bialek-Bylka G E, Sakano Y, 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
- [13] Mortensen A. Analysis of a complex mixture of carotenes from oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit extract [J]. *Food Research International*, 2005, 38(8): 847-853.
- [6] Aman R, Schieber A, Carle R. Effects of heating and illumination on *trans-cis* isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(24): 9512-9518