

玉米黄质及其异构体的测定方法研究

刘春菊, 肖亚冬, 张钟元, 刘春泉, 李大婧

(江苏省农业科学院农产品加工研究所, 国家蔬菜加工技术研发专业分中心, 江苏南京 210014)

摘要: 为了建立准确、高效的玉米黄质及其异构体的检测方法, 通过比较不同流动相、流动相比率和洗脱时间对玉米黄质碘催化-光异构化样品分离效果, 采用光谱、色谱、质谱多种方法对玉米黄质及其异构体进行定性定量分析。结果表明: 玉米黄质及其异构体最佳的检测条件是流动相 A: 甲醇、MTBE 和水, 流动相 B: 甲醇和 MTBE, 流动相比率 A 为 80/15/5, B 为 1/10, 洗脱时间为 24 min; 通过对各个峰最大吸收波长、Q 值、质谱离子碎片和与相关报道比对, 在玉米黄质碘催化-光异构化样品中鉴定出了 15/15'-顺式、13/13'-顺式和 9/9'-顺式三种玉米黄质顺式异构体; 全反式玉米黄质在 5~250 ng 范围内峰面积与进样量呈良好线性关系。该方法具有重现性好、准确度高、检测快速等优势, 可用于玉米黄质及其异构体的检测。

关键词: 玉米黄质; 异构体; 检测方法

文章编号: 1673-9078(2015)11-313-318

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.047

A Method for Detection of Zeaxanthin and Its Stereoisomers

LIU Chun-ju, XIAO Ya-dong, ZHANG Zhong-yuan, LIU Chun-quan, LI Da-jing

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

Abstract: In order to establish a method to accurately and effectively detect zeaxanthin and its stereoisomers, the zeaxanthin products formed by iodine-catalyzed photoisomerization were separated using different mobile phases, ratios of the mobile phase, and elution times. The qualitative and quantitative analyses of zeaxanthin and its stereoisomers were conducted using spectroscopy, chromatography and mass spectrometry. The results indicated that the optimum conditions for the detection of zeaxanthin and its stereoisomers were as follows: mobile phase A: methanol, methyl *tert*-butyl ether (MTBE), and water (ratio, 80/15/5); mobile phase B: methanol and MTBE (ratio, 1/10); elution time: 24 minutes. In the zeaxanthin products from the iodine-catalyzed photoisomerization, 15,15', 13,13', and 9,9'-mono-cis-zeaxanthin isomers were identified by comparing the maximum absorption wavelength for each peak, Q value, and ion fragments in mass spectra with those in related reports. Peak area and injection volume of all-*trans*-zeaxanthin showed a good linear relationship in the range of 5–250 ng. The proposed method showed advantages including good reproducibility, high accuracy, and rapid detection, which is suitable for the detection of zeaxanthin and its stereoisomers.

Key words: zeaxanthin; stereoisomers; detection method

玉米黄质又称玉米黄素, 是一种油溶性天然色素, 广泛存在于绿色叶类蔬菜、花卉、水果、枸杞和玉米中^[1]。玉米黄质化学结构中有 11 个共轭双键, 并且尾端基团上带有羟基, 这种特定结构使它具有较强淬灭单线态氧、清除氧自由基的能力, 可以有效预防和减少人体视网膜的氧化损伤和老年黄斑变性症, 对眼睛起到保护作用^[2,3]。另外, 玉米黄质在减少心血管疾病发病率、增强免疫功能和减少癌症的发生和发展等

收稿日期: 2015-02-10

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (GX (14) 2055)

作者简介: 刘春菊 (1979-), 女, 助理研究员, 主要从事果蔬加工与质量控制研究

通信作者: 李大婧 (1976-), 女, 博士, 研究员, 主要从事果蔬加工与综合利用研究

方面具有显著的生理功效^[4,5]。在体内玉米黄质不能转化为 VA, 保留了原始结构, 需要通过食物摄入来补充^[6]。

自然界中的玉米黄质主要是全反式结构, 由于分子中存在不饱和双键, 其在光照、加热和加工等条件下容易发生顺式异构化反应。Milanowska 等^[7]发现玉米黄质在热诱导和光诱导处理下会发生异构化反应, 产生玉米黄质异构化产物。Aman 等^[8]报道了甜玉米玉米黄质经过 121 °C、2 min 加热后其总含量下降 29%, 玉米黄质异构体含量有所升高。玉米黄质全反式构象的稳定性和生理活性最强, 顺式结构在理化性质和生理功能上与全反式构象相比变化较大, 限制了玉米黄质在医学和食品中的应用。建立一种准确、高效的玉米黄质单顺式异构体的检测方法可以监测玉米黄质在

不同反应条件及不同食品基质中的异构化反应, 辅助研究其异构化机理, 利于提出控制玉米黄质稳定性的有效措施。

类胡萝卜素的测定方法主要有分光光度法^[9-12]、薄层色谱法^[13,14]等, 存在着操作过程复杂、灵敏度和准确度差等问题。而液质联用 HPLC-MS 技术结合了液相色谱高效的分离化合物能力与质谱极强的组分鉴定能力, 能够使类胡萝卜素样品的分离、定性、定量一次完成, 成为类胡萝卜素分析中主要的技术手段。但实际操作中由于类胡萝卜素分子结构相似, 极性相近, 且在不同的基质中变化复杂, 准确分离和鉴定的难度较大。因此选择最佳的色谱条件对实现类胡萝卜素最理想分离和鉴定至关重要。本研究分析了流动相、洗脱时间、流动相比对玉米黄质及其异构体的分离效果, 并采用光谱、色谱、质谱等方法对玉米黄质及其异构体进行定性分析, 建立一种稳定、准确的玉米黄质及其异构体的检测方法, 对玉米黄质稳定性研究及生产应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

全反式玉米黄质标准品(纯度 97%), 购自美国 Sigma 公司; 分析级碘、正己烷、硫代硫酸钠, 购自国药集团化学试剂有限公司; 色谱级甲基叔丁基醚(MTBE)、甲醇, 购自美国天地公司; 娃哈哈纯净水, 购自苏果超市。

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; 台式冷冻恒温摇床 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; BS224S 电子分析天平, 北京赛多利斯科学仪器公司; HPLC1200 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 科技有限公司, 主要包括在线真空脱气机、四元梯度洗脱泵、柱温箱、二极管阵列检测器(diode array detector, DAD); 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 试验方法

1.3.1 玉米黄质及其异构体的制备

将 1.0 mg 全反式玉米黄质标准品用甲醇溶解并定容于 25 mL 棕色容量瓶, 置于超低温冰箱中待用。

取 6 份 2 mL 玉米黄质甲醇溶液于 6 支试管中, 氮气吹干后分别加入 2 mL 正己烷和 1 mL 碘-正己烷溶液(1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 使碘含量为玉米黄质质量的 1%~2%。将试管放在距恒温摇床中日光灯 10 cm 处(温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 1800 lux), 分别照射 1 h 后取出处理。用硫代硫酸钠溶液($1 \times 10^3 \text{ mol}/\text{L}$)洗涤去除多余的碘, 氮气吹干后用 2 mL 甲醇复溶, 经 0.45 μm 滤膜过滤后置于超低温冰箱中待测。

1.3.2 色谱及质谱条件

C_{30} -HPLC 分析条件: 色谱柱 YMC Carotenoid C_{30} (4.6 \times 250 mm, 5 μm), 二极管阵列检测器, 流动相为甲醇/MTBE/水=80/15/5 和甲醇/MTBE=1/10 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL , 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

MS 分析条件: 色谱柱流出组分进入质谱仪的流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 离子源 APCI+, 扫描范围 80~1000 m/z, 毛细管电压 2500 V, 干燥气体 5 L, 雾化气体 20 psi, 汽化温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 蒸汽温度 400 $^{\circ}\text{C}$, 电晕电流 4 μA 。

1.3.3 制作全反式玉米黄质标准曲线

准确称取 1.0 mg 全反式玉米黄质标准品, 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液。分别取 0.0125、0.075、0.15、0.25、0.5、0.75、1.0、1.4、2.0、2.5 mL 标准液于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇定容并混匀, 制成质量浓度为 0.05、0.3、0.6、1、2、3、4、6、8、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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进行线性回归分析, 绘制全反式玉米黄质标准曲线。

1.4 数据分析

试验数据结果均采用 Origin 9.0 软件处理。

2 结果与分析

2.1 玉米黄质及其异构体检测条件的建立

有关类胡萝卜素分离检测的报道, 常见的流动相为甲醇、乙腈和 MTBE。惠伯棣等^[15]采用含有甲醇和 MTBE 的流动相分离出番茄红素的几种顺式异构体。Schierle 等^[16]同样采用有 MTBE 参与的流动相将 β -和 α -胡萝卜素的几种单顺式和双顺式异构体分离。为能使玉米黄质及其异构体快速且完全分离, 我们同样选择两种常见洗脱溶剂-甲醇和 MTBE 对异构体进行分离。首先, 根据参照文献中流动相之间的比例及洗脱时间进行试验, 如图 1 中 (a)、(b) 和 (c) 所示, 其中 (a) 的流动相 A 为甲醇/MTBE/1.5% 乙酸铵水

=70/25/5 和 B 为甲醇/MTBE/1.5% 乙酸铵水=10/85/5, 洗脱时间为 24 min, (b) 流动相 A 为甲醇/MTBE/1.5% 乙酸铵水=70/25/5 和 B 为甲醇/MTBE/1.5% 乙酸铵水=10/85/5^[17], 洗脱时间为 30 min, (a) 和 (b) 的洗脱梯度不同, 但分析效果都较差。(c) 的流动相 A 为甲醇/MTBE/1.5% 乙酸铵水=70/25/5 和 B 为甲醇/MTBE=1/10, 对流动相的比例进行了改变, 分离效果仍然不佳。经过多次 (20 次左右) 调整, 确定流动相比例 A 为甲醇/MTBE/水=80/15/5 和 B 为甲醇/MTBE=1/10。然后又对洗脱时间进行优化, 如图 1 中 (d) 和 (e) 所示, (d) 的洗脱时间为 40 min, 分离时间太长, 分离效果较差。(e) 的洗脱时间为 25 min, 洗脱梯度为 0~4 min, 100%A/0%B; 4~24 min, 70%A/30%B; 24 min, 50%A/50%B, 虽然玉米黄质及其异构体峰的分时间变短, 但分离效果较差。最后确定洗脱时间为 24 min, 洗脱梯度为 0~10 min, 100%A/0%B; 10~24 min, 70%A/30%B; 24 min, 50%A/50%B, 各个洗脱峰能够很好的分离, 如图 1 中 (f) 所示。经过以上多次试验探索, 最后获得一种快速、准确分离玉米黄质及其异构体的色谱条件如表 1 所示。

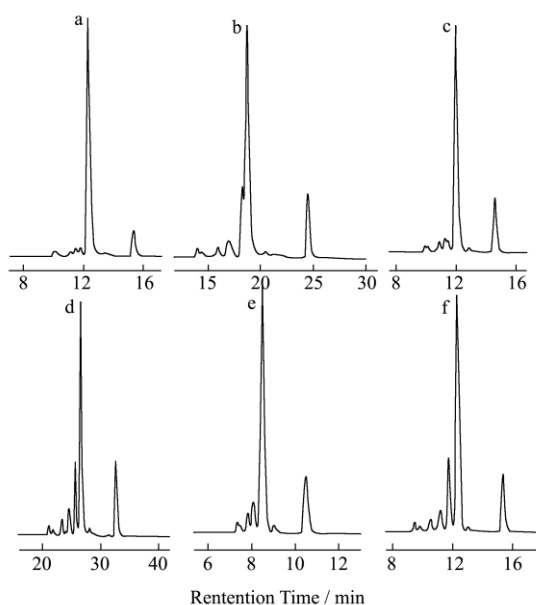


图 1 不同流动相所得玉米黄质及其异构体的 HPLC 色谱图:

Fig.1 HPLC results for zeaxanthin and its isomers

注: (a) 和 (b) 均为 1.5% 乙酸铵水/MTBE/甲醇=5/25/70 和 1.5% 乙酸铵水/MTBE/甲醇=5/85/10; (c) 1.5% 乙酸铵水/MTBE/甲醇=5/25/70 和 MTBE/甲醇=10/1; (d)、(e) 和 (f) 均为水/MTBE/甲醇=5/15/80 和 MTBE/甲醇=10/1。

2.2 玉米黄质及其异构体的定性分析

通过优化的质谱条件对全反式玉米黄质碘催化-

光异构化样品进行正离子模式的 HPLC-APCI-MS 和电子吸收光谱分析, 以此确定图中各个峰的归属。检测结果如图 2 至图 4 所示, 通过最大吸收波长、Q 值、质谱离子碎片及文献有关报道鉴定分离所得化合物。由表 2 知, 峰 3 的主离子峰为 569.4[M+H]⁺, 最大吸收波长 450 nm, 与全反式玉米黄质标准品的主离子峰和最大吸收波长分别为 569.4[M+H]⁺、452 nm 一致, 又通过与图 2a 玉米黄质标准品色谱图比较保留时间, 可确定图 2b 中的峰 3 为全反式玉米黄质。因玉米黄质的顺式异构体同样没有可利用的标准品, 需通过异构体相应吸收波长、顺式吸收强度、质谱和光谱来确定其单顺式异构体。

表 1 玉米黄质及其异构体最佳梯度洗脱程序

Table 1 Optimal gradient elution program for zeaxanthin and its isomers

时间/min	流动相组成/%	
	水:MTBE:甲醇=5:15:80	MTBE:甲醇=10:1
0	100	0
10	70	30
24	50	50

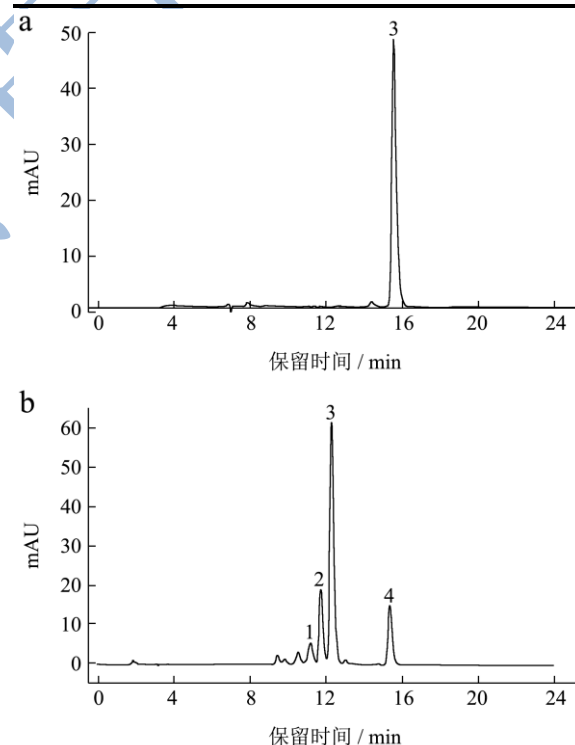


图 2 全反式玉米黄质标准品 (a) 和碘催化-光异构化形成异构体 (b) 的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC results of all-E zeaxanthin (a) and the isomers obtained by iodine-catalyzed photoisomerization (b)

玉米黄质的单顺式异构体与全反式结构相比, 其电子吸收光谱发生变化, 同时遵循一定规律。首先, 相对全反式结构, 单顺式异构体的最大吸收波长有

4~6 nm 蓝移; 其次, 单顺式异构体在 330~340 nm 之间的顺式吸收强度; 最后, 一般 13-和 9-顺式相对比较稳定。由表 2 可知, 峰 1、峰 2 和峰 4 的主离子峰均为 569.4[M+H]⁺, 最大吸收波长分别为 445、444 和 446 nm, 与全反式玉米黄质相差 4~6 nm, 应为单顺式异构体; Q 值分别为 0.29、0.47 和 0.11, 且由 β-胡萝卜素几种顺式异构体的洗脱顺序^[18~20]可知, 玉米黄质

异构体的洗脱顺序应为 15-顺式先洗脱出来, 之后为 13-顺式, 最后为 9-顺式异构体。Aman 等^[8]采用 HPLC-MS-NMR 技术分离鉴定出 13-顺式和 9-顺式玉米黄质, 洗脱顺序分别在全反式之前和之后。因此, 我们确定峰 1、2、4 分别为 15/15'-顺式、13/13'-顺式和 9/9'-顺式玉米黄质。

表 2 全反式玉米黄质及其异构体的鉴定

Table 2 Identification of all-E zeaxanthin and its isomers

峰 编号	玉米黄质 异构体	λ/nm		Q 值		M/Z	
		实测值 ^a	报道值	计算值 ^a	报道值	实测值 ^a	报道值
1	15/15'-cis	337,421,445,	338,422,446,	0.29		569.4[M+H] ⁺ ,	569.4[M+H] ⁺ ^b
		472	470 ^b			551.4[M+H-18] ⁺	551.4[M+H-18] ⁺
2	13/13'-cis	336,421,444,	338,424,446,	0.47		569.4[M+H] ⁺ ,	569.4[M+H] ⁺ ,
		468	472 ^b			551.4[M+H-18] ⁺	551.4[M+H-18] ⁺ ^b
3	All-trans	428,450,478	450,476 ^b			569.4[M+H] ⁺ ,	569.4[M+H] ⁺ ,
						551.4[M+H-18] ⁺	551.4[M+H-18] ⁺ ^b
4	9/9'-cis	340,422,446,	338,422,446,	0.11	0.12 ^c	569.4[M+H] ⁺ ,	569.4[M+H] ⁺ ,
		468	474 ^b			551.4[M+H-18] ⁺	551.4[M+H-18] ⁺ ^b

注: 粗体数字为化合物最大吸收波长; a: 文中使用的流动相; b: 流动相为甲醇和MTBE的线性梯度洗脱^[21]。

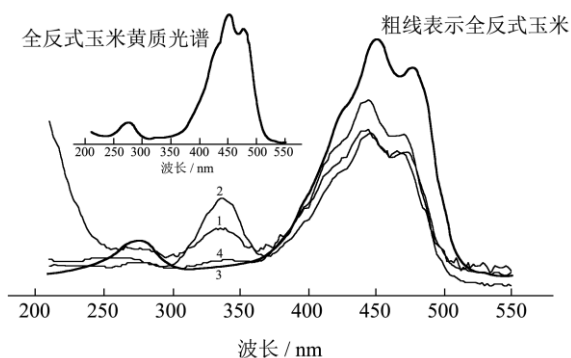


图 3 全反式玉米黄质及其异构体的光谱特征

Fig.3 Spectral characteristics of all-E zeaxanthin and its cis-isomers

2.3 玉米黄质及其单顺式异构体的定量分析

由于自然界中的单顺式玉米黄质含量低, 分离困难, 至今没有标准品, 单顺式异构体也依据全反式玉米黄质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全反式玉米黄质拟合标准曲线为 $Y=5.96X-4.79$ ($R^2=0.9998$, 见图 5), 结果表明全反式玉米黄质在 5~250 ng 范围内峰面积与进样量呈良好线性关系。使用二极管阵列检测器的绝对检出量为 120 ng, 最低检出限为 6 μg/mL。

2.4 回收率及精密度测定

供试样品溶液按照上述色谱条件重复进样 6 次,

全反式玉米黄质峰面积 RSD 值为 2.7%, 稳定性试验结果显示全反式玉米黄质峰面积 RSD 值为 2.07%, 样液的加标回收率在 96.2~100% 之间, 平均回收率 97.65%。

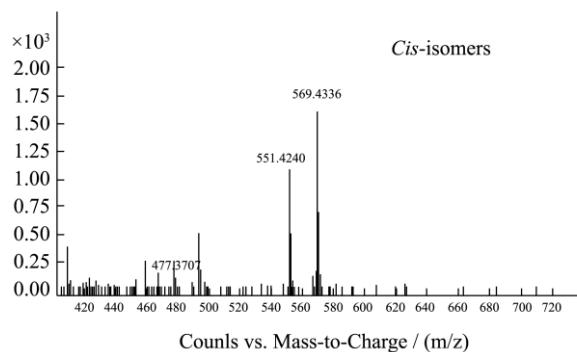
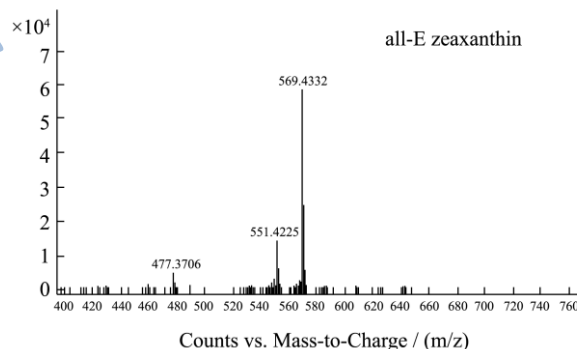


图 4 全反式玉米黄质和其异构体的质谱特征

Fig.4 Mass spectra of all-E zeaxanthin and its isomers

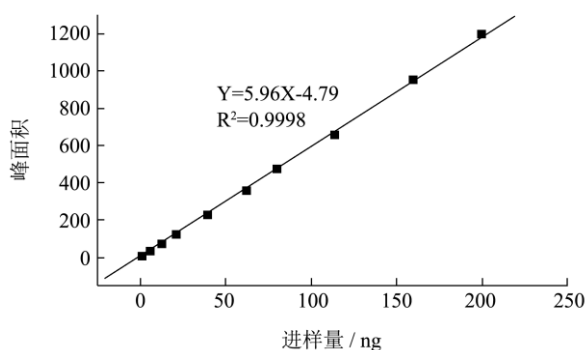


图5 全反式玉米黄质标准曲线

Fig.5 Calibration curve of all-E zeaxanthin

3 结论

通过分析流动相、洗脱时间和流动相比对玉米黄质异构化样品分离效果,选择流动相 A: 甲醇、MTBE 和水,流动相 B: 甲醇和 MTBE,流动相比对 A 为甲醇/MTBE/水=80/15/5 和 B 为甲醇/MTBE=1/10,洗脱时间为 24 min,建立了一种有效分离玉米黄质及其异构体的 C₃₀-HPLC 方法;绘制出全反式玉米黄质标准曲线 $Y=5.96X-4.79$ ($R^2=0.9998$),全反式玉米黄质在 5~250 ng 范围内峰面积与进样量呈良好线性关系,可实现对玉米黄质及其顺式异构体的定性和定量分析。该方法可准确、稳定地鉴定和检测出玉米黄质制品中的玉米黄质及其顺式异构体,为量化加工制品中玉米黄质及其顺式异构体的变化提供理论依据。

参考文献

- [1] 徐秀红,卢华兵,吕桂华,等.玉米黄质的研究进展及展望[J].中国农学通报,2011,27(2):333-339
XU Xiu-hong, LU Hua-bing, LV Gui-hua, et al. research progress and prospects of zeaxanthin [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(2): 333-339
- [2] 杨程芳,郑建仙.玉米胚乳中玉米黄质的研究进展[J].粮食与饲料工业,2005,7:19-20
YANG Cheng-fang, ZHENG Jian-xian. Progress of research on zeaxanthin in corn embryosperm [J]. Cereal And Feed Industry, 2005, 7: 19-20
- [3] BREITHAUPT D E, SCHLATTERER J. Lutein and zeaxanthin in new dietary supplements-analysis and quantification [J]. European Food Research and Technology, 2005, 220(5-6): 648-652
- [4] 徐秀红,吕桂华,陈坚剑,等.鲜食玉米灌浆过程中籽粒玉米黄质含量的累积动态变化 [J].浙江农业学报,2013,25(4):685-688
XU Xiu-hong, Lv Gui-hua, CHEN Jian-jian, et al. Accumulated dynamic change of zeaxanthin content in fresh corn grains during its filling stage [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2013, 25(4): 685-688
- [5] WANG M, TSAO R, ZHANG S, et al. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers [J]. Food And Chemical Toxicology, 2006, 44(9): 1522-1529
- [6] CAMPBELL E A, MEDWID R D, ORNDORFF S A. Zeaxanthin producing strains of neosporangium excentricum [M]. Google Patents. 1994
- [7] MILANOWSKA J, GRUSZECKI W I. Heat-induced and light-induced isomerization of the xanthophyll pigment zeaxanthin [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2005, 80(3): 178-186
- [8] 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
- [9] 刘云,王保健,林亲雄,等.油菜籽中天然类胡萝卜素的提取工艺研究[J].食品工业科技,2009,2:234-236
LIU Yun, WANG Bao-jian, LIN Qin-xiong, et al. Study on the extraction technology of carotenoid from rapeseed [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 2: 234-236
- [10] 杨万政,曹秀君,李金淑,等.紫外分光光度法测定沙棘油中总类胡萝卜素方法改进[J].中央民族大学学报(自然科学版),2009,18(3):5-8
YANG Wan-zheng, CAO Xiu-jun, LI Jin-shu, et al. Improvement of determination of total carotenoids in seabuckthorn oil by UV spectrophotometry [J]. Journal of MUC (Natural Sciences Edition), 2009, 18(3): 5-8
- [11] 贺小贤,刘昌蒙.杏皮渣中类胡萝卜素的提取工艺研究[J].现代食品科技,2013,29(3):587-590
HE Xiao-xian, LIU Chang-meng. Study on extraction of carotenoids from skin residue of apricot [J]. Modern Food Science and Technolog, 2013, 29(3): 587-590
- [12] 吴晓娟,刘海燕,顾继锐,等.小球藻优良藻种的选育与特性研究[J].现代食品科技,2013,29(3):576-578,567
WU Xiao-juan, LIU Hai-yan, GU Ji-rui, et al. Selection, breeding and characteristics of chlorella strains [J]. Modern Food Science and Technolog, 2013, 29(3): 576-578,567
- [13] 徐仲溪,王坤波,简伯华.沱茶中叶绿素和类胡萝卜素组分的高效薄层色谱分析[J].云南农业大学学报, 2005, 20(3): 384-387
XU Zhong-xi, WANG Kun-bo, JIAN Bo-hua. Analysis of chlorophylls and carotenoids in tuo cha by high performance

- thin-layer chromatography [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2005, 20(3): 384-387
- [14] 彭光华,李忠,张声华.薄层色谱法分离鉴定枸杞子中的类胡萝卜素[J].营养学报,1998,20(1):76-78
PENG Guang-hua, LI Zhong, ZHANG Sheng-hua. Separation and identification of carotenoids in fructus lycii by thin-layer chromatography [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 1998, 20(1): 76-78
- [15] 惠伯棣,李京,裴凌鹏,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, PEI Ling-peng, et al. The separation and identification of lycopene geometrical isomers by C₃₀-HPLC-PDA [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(7): 49-51
- [16] SCHIERLE J, PIETSCH B, et al. Method for the determination of β -carotene in supplements and raw materials by reversed-phase liquid chromatography: single laboratory validation [J]. Journal of AOAC International, 2004, 87(5): 1070
- [17] MARX M, SCHIEBER A, CARLE R. Quantitative determination of carotene stereoisomers in carrot juices and vitamin supplemented (ATBC) drinks [J]. Food Chemistry, 2000, 70(3): 403-8
- [18] 仇丹,陈志荣,李浩然. β -胡萝卜素异构体的定性分析[J].食品科学,2008,29(4):50-53
- [19] SABINE S M P, HEIDRUN H K A. Structure elucidation of β -carotene isomers by HPLC-NMR coupling using a C₃₀ bonded phase [J]. Fresenius J. Anal. Chem., 1997(357): 498-502
- [20] KIYOSHI T, KAYOKO S. Separation and determination of Cis/trans- β -carotenes by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography, 1982(245): 359-364
- [21] CHEN B, HUANG J. Degradation and isomerization of chlorophyll and β -carotene as affected by various heating and illumination treatments [J]. Food Chemistry, 1998, 62(3): 299-307