

食物中类胡萝卜素的 HPLC 分析

丁靖, 惠伯棣 *

(北京联合大学应用文理学院, 北京 100083)

摘 要: 要想在统计学上建立膳食中类胡萝卜素与人类健康之间的确切关系, 必需详尽地了解在人体内的主要器官和组织中以及食物中这些化合物的定性和定量分布。HPLC 分析技术是完成这一工作的主要手段之一。本文较详细地综述和介绍了不同食物中类胡萝卜素的分析样品制备过程及注意事项、常用固定相和流动相的理化性质、建立色谱条件的方法、各主要类胡萝卜素化合物的 HPLC 行为和定性及定量方法, 并配以无氧类胡萝卜素、含氧类胡萝卜素、类胡萝卜素酯基酯以及几何异构体等不同结构化合物的工作实例。根据自己实验室的工作经验, 作者对这些方法进行了总结。根据这些信息, 可以针对不同的食物发展类胡萝卜素的 HPLC 分析方法。

关键词: 类胡萝卜素; HPLC; C18; C30; 定性分析; 定量分析; 外标法; 内标法

中图分类号: TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006 - 2513(2010)04 - 0256 - 12

HPLC on carotenoids from foods

Jing Ding and Bodi Hui

(College of Applied Arts & Science, Beijing Union University, Beijing 100083)

Abstract: For the purpose to establish a statistically reliable relationship between dietary intake of carotenoids and health requires detailed knowledge on the qualitative and quantitative distribution of these compounds from food supply as well as major organs and tissues in human body. HPLC technique is one of major aids to undertake this work. This article reviews and describes sample preparation from various foodstuffs with attention, the features of most commonly used stationary and mobile phases, chromatographic method development, the chromatographic behaviors of major carotenoids and their qualification and quantification methods. Additionally, working examples on compounds with varied structure, such as carotene, xanthophylls, ester and geometrical isomer, was also given herewith. According to experience from his own laboratory, author summarized those methods. With information from this article, various HPLC methods were able to be properly developed for individual foodstuff.

Key words: Carotenoids; HPLC; C18; C30; qualitative analysis; quantitative analysis; internal and external standard

要想在统计学上建立关于类胡萝卜素和健康之间的确切关系, 需详尽地了解人体血液中主要器官和组织中以及所摄入的食物中这些化合物在定性和定量上的分布。在过去的 20 多年里, 高压

液相色谱 (HPLC) 技术的进步已经使其成为在复杂的混合物中分离类胡萝卜素的最有效方法, 是达到这一目的的首选方法。其良好的重现性和灵敏度为分析人员提供了可靠和稳定的数据, 加

收稿日期: 2010 - 04 - 22

* 通讯作者

“十一五”国家科技支撑计划项目 (编号: 2008BAE5B06)。

作者简介: 惠伯棣, 男, 博士, 教授, 研究方向为类胡萝卜素化学及生物化学。

之其合理的分析时间使得类胡萝卜素在分析中的异构化和降解降到了最小程度。配备有二极管阵列检测器 (PDA) 的 RP - HPLC 已成为各实验室进行了类胡萝卜素分析的首选系统。这种系统可以在线提供每一种成分的光谱图。如果在 HPLC 中又配备质谱 (MS) 检测器, 那还可获得每一种类胡萝卜素的质谱信息。目前, HPLC 和核磁共振 (NMR) 的链接也成为可能, 并显示了巨大的应用前景。在这些系统中, 经过色谱纯化了的类胡萝卜素组分可以通过 UV /VIS、MS 和 NMR 进行鉴定。对于具有光学异构的类胡萝卜素来说, 可以通过 NMR 和圆二色光谱 (CD) 来确定其绝对构象。一旦经过了结构鉴定, 每一种类胡萝卜素的定量分析 (包括其几何异构体) 均可通过 HPLC 来进行。

1 样品制备

从食物对象中制备类胡萝卜素的分析样品可以简单地描述为: 根据化合物“相似相溶”的原理, 兼顾萃取对象材料的性质, 选择最佳有机溶媒, 在适当的物理条件下, 将萃取对象材料中的类胡萝卜素组分最大量地转移到萃取溶媒中, 并使之处于可供作进一步色谱和光谱分析的物理状态。

1.1 样品采集与贮存

在很多情况下, 首先应当考虑的是采集样品的代表性问题。必须严格按照随机取样的原则进行样品的采集。如果材料在收集后不能马上萃取, 必须马上选择合适的贮存方式, 而不要将材料萃取后再贮存。常用的贮藏方式为深冻。短期贮存的冻结温度最好在 -20°C 以下。长期贮存则最好在 -70°C 下。

1.2 材料破碎

天然类胡萝卜素是存在于生物组织细胞中的。如不把细胞破碎, 是不可能将其中的类胡萝卜素有效地萃取出

来的。因此, “材料的破碎”, 准确地讲是指细胞的破碎, 破碎的程度应达到“亚细胞级”。

从机械过程来讲, 破碎的方式一般有“剪切”和“研磨”两种。在实践中, 需根据样品的类型、形状、大小、坚固程度和稳定性选择剪切

或研磨。机械剪切的设备有组织捣碎机, 家用的果汁机和豆浆机亦可。研磨的工具具有研钵和组织匀浆器等。两种方法均可能会在样品中引入空气, 导致样品中的类胡萝卜素加速降解。机械研磨还可能使样品的温度升高, 也会导致样品中的类胡萝卜素加速降解。总之, 萃取温度不应该超过周围环境温度, 因此可以将搅拌机的容器放在冰域中来达到维持所需要的温度条件。

1.2.1 植物组织

克级以上的材料可在 4 倍左右的萃取溶媒中剪切。对更少量的样品, 在研钵中加萃取溶媒进行研磨。在研钵中加等量的酸洗过的沙有助于材料的破碎。这一过程实际上是集破碎和萃取于一体。向植物材料中加入 MgCO_3 粉或饱和的 Na_2CO_3 液可以中和从细胞中释放出来的有机酸的影响。对于含水量少于 13% 的植物材料, 萃取溶媒的量可减少。

1.2.2 动物组织

其萃取方式与植物材料相似。但是, 研磨比剪切更有效。对于少量样品, 除了研钵以外, 最有效的设备是套管结构的“匀浆器”。对非常硬的材料, 可能需要用机械 (如: 咖啡磨) 将样品磨成粉。

1.2.3 油悬浮物和油树脂

功能性食品和膳食补充剂中类胡萝卜素功效成分最基本的剂型是油悬浮物和油树脂。“油悬浮物”是人工合成或天然的类胡萝卜素微结晶在食用植物油中悬浮形成的悬浮体系。在天然类胡萝卜素的制备过程中, 类胡萝卜素组分从自然资源中萃取后需蒸发除去其中的溶剂, 萃取物在脱去溶剂后形成的残留被称“油树脂”。油树脂中除含有被萃取的类胡萝卜素组分外, 还含有其它脂溶性组分, 如: 甘油三酯、甾醇和蜡。通常, 油树脂的黏性更强。番茄萃取物油树脂中番茄红素的含量一般为 6%, 但其粘性比 20% 含量的油悬浮物要大。万寿菊花萃取物油树脂中的叶黄素含量为 10%~25%。叶黄素含量为 10% 的万寿菊花萃取物油树脂在室温、常压下已经基本失去了流动性, 而 20%~25% 的油树脂在室温、常压下已经是固体了。这两类样品的制备较为简单, 先用少量的试剂将其溶解, 再用相同或不同的试剂定容。

1.2.4 微胶囊包埋粉

类胡萝卜素的水质胶乳化物可以被喷雾干燥,制成微胶囊包埋粉剂,用来制成各种功能性食品和膳食补充剂。微胶囊包埋粉由类胡萝卜素构成的芯材和适当的壁材组成。这种粉剂可以承受住高压,适合制造片剂,亦可作硬胶囊产品。在对这类样品进行萃取之前,必须对它们进行破碎处理,以破坏它们的包埋壁材和乳化颗粒结构。最常用的方法是先将其溶于蒸馏水中,超声波处理,使壁材和微乳结构打开,随后(或同时)加入有机溶媒进行萃取,收集并浓缩有机相用于分析。

1.3 萃取

类胡萝卜素的萃取一般与材料的破碎同步进行,方法包括研磨和剪切。应注意的事项包括:

1.3.1 第一萃取溶媒的选择

在全部制备工作应使用分析纯甚至色谱纯和光谱纯的试剂作溶剂。溶剂应当贮存在暗色的玻璃瓶中,不能使用塑料容器、吸管或塞子。塑料材料(如:聚乙烯)有可能进入溶剂中,在检测时形成干扰。由于类胡萝卜素类化合物在大多数有机试剂中均具有良好的饱和溶解度,可供作萃取溶媒的有机试剂很多,如:正己烷、甲苯、氯仿、乙醚、二氯甲烷、四氢呋喃、丙酮、乙酸乙酯、石油醚、乙醇、甲醇及其它们的混合物。在选择萃取溶媒时,需考虑的原则和事项包括:

(1) 根据有机化合物“相似相溶”的规律,含氧的类胡萝卜素在极性强的有机溶剂中饱和溶解度高,不含氧类胡萝卜素在非极性的有机试剂中饱和溶解度高。在萃取工作中,必须要求“完全萃取”。这样,分析与检测的结果才能最大限度地反映样品中类胡萝卜素组成的真实状况。如果被萃取的样品既含有极性强的类胡萝卜素,也含有极性弱的类胡萝卜素,就必须使用极性的有机试剂萃取。这样,才能将样品中的各种类胡萝卜素萃取出来。因此,当对样品的类胡萝卜素组成不了解时,一般采用极性较强的溶剂(如:丙酮)做第一萃取溶媒。

(2) 对于含水多的新鲜生物材料,第一萃取试剂可以使用与水以任意比例互溶的有机溶剂,来帮助类胡萝卜素从细胞中释放以及阻止乳化体系的形成,如:丙酮、四氢呋喃等。但是在使用

四氢呋喃时,建议加入 0.1% (W/V) 的抗氧化剂(如 BHT) 来阻止可导致类胡萝卜素降解的过氧化物形成。新鲜的生物组织通常可在丙酮中通过机械匀浆而直接萃取。对于干燥的材料,可直接使用不溶于水的提取试剂(如石油醚等)作第一萃取溶媒。当要检测干制或者灌装水果和蔬菜,比如杏干,桃子,甘薯和柑橘类水果时,提取之前将样品浸泡于水中数小时将有利于提取过程的进行,同时也可以促进提取的效率。这一过程除掉了糖类和其他的水溶性物质,因此也降低了形成乳化体系的风险。

(3) 因为很难除去其中痕量的 HCl,最好避免使用氯仿,使用二氯甲烷。

(4) 苯是优秀的类胡萝卜素溶剂,由于它的毒性,如果有可能,应该避免使用。通常可用甲苯代替。

(5) 尽量避使用正己烷,它的蒸气具有神经毒性。

1.3.2 萃取溶媒的收集

在使用组织捣碎机时,萃取溶媒可通过减压过滤与残渣分离。第一次使用的滤纸可与残渣一起进行第二次萃取,以回收其吸附的色素,减少损失。在使用研钵和组织匀浆器时,每次研磨后,将样品体系静置 2~3min,使残渣尽量沉降,随后用滴管小心取出上清液。

1.3.3 反复萃取

应持续向残渣中加入新的溶剂进行破碎和萃取,直至残渣和滤液均无色,或者用极性更强的溶剂萃取时不再有色素释出。一般来说,六次萃取可获得满意的萃取率。

1.3.4 防止乳化

一些情况下,用有机试剂均质食品材料会导致乳化液的产生,而阻塞或放慢真空过滤。通过硅藻土或者砂藻土来过滤萃取液可以克服这个问题。或者也可以在均质之前将硅藻土放入样品和有机溶剂的混合物中。

1.3.5 溶媒脱水

当样品含有大量的水时,先用丙酮或甲醇萃取几乎不能萃取出类胡萝卜素,但会有效地脱水。在随后的萃取中,应不断取出原有的溶媒,加入新的溶媒,使溶媒中水分的含量逐步下降,类胡萝卜素则可高效地进入萃取溶媒。

1.3.6 第二萃取溶媒的使用

对高含水量样品使用的水溶性第一萃取溶媒(如:丙酮或甲醇)的萃取物含有大量的水,这在随后的类胡萝卜素纯化步骤之前必须除去。少量($\leq 1\sim 2\text{mL}$)的低含水量样品,能通过吹氮气的方式直接蒸发。对大量的高含水量样品,需用第二溶媒富集。其原理是将萃取液中的类胡萝卜素通过液-液萃取的方法转移至乙醚、叔丁基甲醚(TBME)、正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯或正己烷-二氯甲烷(3:1, V/V)的混合物等不溶于水的有机相中。在这一操作中,可同时加与乙醚或己烷等体积的水或5%(W/V)的氯化钠水溶液到体系中,使体系形成界面分明的上相和下相。由于氯化物溶剂中可能存在HCL,所以,当有机相是二氯甲烷时,还要加入大约0.1%(V/V)的某种胺类物质(如:三乙胺)来中和仍然存在于萃取液中的少量有机酸。用富集相反复萃取水溶相,直至萃取完全。这个过程可以在分液漏斗中完成。

1.3.7 浓缩

收集、合并富集相,反复用水洗几次以除掉所有残留的水溶性有机试剂。如果富集相的体积庞大,可以在旋转蒸发器上蒸发、浓缩。为了定量分析,必须在浓缩的最后阶段除掉体系中作为共沸物的残留水。通过在体系中加入少量的乙醇可以达到这个目的。如果富集相体积有限,可经过无水 Na_2SO_4 或 MgSO_4 干燥。经过干燥的萃取物再被溶解到一个合适的体积。在大多数情况下,提取物应该进行离心或者通过滤膜($0.45\mu\text{m}$)过滤,以除去细小的颗粒,以便于HPLC分析的进样。

1.3.8 纯化

从样品中获得溶媒萃取物中存在着可溶于溶媒的所有组分,例如:脂肪、叶绿素和类胡萝卜素。食品中的类胡萝卜素在碱性条件下一般是稳定的,故皂化(碱水解)反应可被用来除去萃取物中的脂肪和叶绿素。对于大多数的水果和蔬菜来说,可以采用温和条件来进行皂化。其过程为:在惰性气体(如氮气或者氩气)存在的环境下,用氢氧化钾或者氢氧化钠(5~10%W/V)的乙醇或者甲醇溶液对萃取物进行处理。当类胡萝卜素在酒精中的溶解度比较差时,可以添加碱性

稳定剂并共溶的溶剂,如:二氯甲烷,四氢呋喃,乙醚或者叔丁基甲醚。但是丙酮或者乙酸乙酯不可。通常情况下,皂化反应在室温下几个小时就可以完成。然而对于包含有高浓度的脂肪和甾醇的高脂食品来说,可以在较高温度下。有些类胡萝卜素(如虾青素)对碱很敏感。可使用酶进行水解,如:脂肪酶或胆固醇酯酶。

皂化反应还可水解类胡萝卜素醇酯,产生相对应的胡萝卜素醇。一般的类胡萝卜素分析都是要对类胡萝卜素酯进行皂化,以精简HPLC的分析过程。但是,萃取物也可以不被皂化而直接进行HPLC分析,以检测萃取物中类胡萝卜素单酰甘油酯和二酰甘油酯。万寿菊花瓣正己烷萃取物的皂化过程为一典型的例子^[1]。

1.3.9 样品液的配制

样品溶剂必须与流动相匹配,否则可能导致HPLC结果的假象。如样品溶剂中类胡萝卜素组分的溶解度比流动相的高,当类胡萝卜素组分被注射到流动相(如:二氯甲烷,氯仿,苯,甲苯或四氢呋喃)中时,可能会产生沉淀,或者可能保留在样品溶剂中,随着流动相通过柱子,导致双重甚至多重峰的出现。例如,如果使用的流动相为:乙腈-甲醇-二氯甲烷(55:25:20),全反式- β -胡萝卜素一般可形成一个单峰。但是,如果用二氯甲烷做为样品溶剂,色谱图上会出现两个峰。二者都是全反式- β -胡萝卜素。解决问题的方法是用流动相做样品溶剂。配制好的样品液需经过 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤或10000转/分的离心方可进样。

1.3.10 注意事项

(1) 快速—为使在样品制备过程中类胡萝卜素的破坏减至最小,所有的操作应该尽可能地快速。

(2) 除氧—应尽量避免含有类胡萝卜素的样品提取液暴露在空气中。使用惰性气体作为保护剂非常有效。推荐使用氮气(>99.9%纯度)或氩气。另外,通过抽真空以降低环境中的氧气分压也很有效。在旋转蒸发器上蒸发完溶液之后,应使用惰性气体而不是空气导入瓶中来释放真空。

(3) 温度控制—高温可能会促使类胡萝卜素分子发生不需要的变化,特别是E/Z异构化。因

此, 类胡萝卜素的操作和处理应该在尽可能低的温度下进行。一般的萃取可在室温下进行。应当优先使用低沸点的溶剂, 这样, 在除去溶剂时可以避免高温。大体积的溶液一般可在不超过 40℃ 的水浴中用旋转蒸发器来减压浓缩。当萃取液在旋转蒸发器上蒸发完全后, 应立即从水浴中取出蒸发瓶, 以避免对产物的过度加热而导致的化合物降解。小体积 (< 5mL) 的溶液可直接用温和的氮气或氩气流吹拂来浓缩或蒸发。晶体或浓缩物在氮或氩气中密封于安培瓶中, 然后避光贮存于 - 20℃。

(4) 避光 — 所有操作应在散射的自然光或柔和的人工光下进行, 必须避免直射的紫外线和阳光。

(5) 避免酸 — 除非有特殊需要, 类胡萝卜素与酸的接触应严格地避免。

2 HPLC 分离条件的建立

类胡萝卜素的 HPLC 分析始于 20 世纪 70 年代早期。目前, 已有许多成功的应用实例。在实践中, 如果需要建立针对某个样品的 HPLC 分离条件时, 可先进行相关文献的查阅。这个选择可能有点使人有点无所适从。如果请二十位类胡萝卜素分析人员推荐一种 HPLC 分离条件, 可能会得到二十种不同的答案。因此, 对 HPLC 原理和目标组分色谱行为的充分理解就显得尤为重要, 以便选择一种合适的分离条件, 达到具体的目的。一套优秀的 HPLC 分离条件应该可以从其结果中得到最大限度的信息量。

2.1 类胡萝卜素的 HPLC 色谱行为特征

类胡萝卜素是线性分子, 其长的共轭多烯结构形成了严格的全反式异构体。这一分子结构与 HPLC 固定相的相互作用对其色谱行为具有很重要的影响。这一结构还赋予了类胡萝卜素分子在可见光区 (400~550nm) 的吸收光的特性。当使用 PDA 检测器时, 不仅每一种组分在最大吸收波长下的色谱行为可以被监测, 而且其电子吸收光谱图也可以在线收取。在使用固定波长检测器时, 对于某一个化合物来说, 应该在其最大吸收波长下监测其吸光值。对于未知的类胡萝卜素组分, 通常会选择 450nm 左右的波长。当其吸光系

数已知时, 就可以根据其峰面积对化合物进行定量分析。

类胡萝卜素的极性基团类型、数量和位置是影响其色谱行为的主要因素。末端基团环化与否、主链的不饱和程度和双键的位置、顺反异构化等其次。

2.2 固定相选择

用于类胡萝卜素分离的固定相应选择对类胡萝卜素有最好的亲和力, 以产生足够的保留时间和更高的分离效果。非极性的类胡萝卜素在反相固定相上拥有更好的亲和力。绝大多数反相高压液相色谱在应用中使用 C₁₈ 或者 C₃₀ 反相柱和一种相对极性较大的流动相。极性类胡萝卜素在正相固定相上的分离是可行的。经常使用的正相固定相为氧化铝和硅胶, 配以相对较弱极性的流动相。键合腈基柱分离叶黄素混合物特别有效。

2.2.1 正相固定相

2.2.1.1 氧化硅 在类胡萝卜素的正相 HPLC 分离中, 最常用的固定相是硅胶。流动相通常极性更强, 如叔丁基甲醚 (TBME)、丙酮、异丙醇或甲醇。化合物的极性是影响类胡萝卜素和固定相颗粒表面的硅烷醇基团之间相互作用的主要因素。洗脱规律包括: (1) 极性弱的组分 — 极性强的组分; (2) 双环化合物 — 单环化合物 — 非环化合物; (3) 双键少的化合物 — 双键多的化合物; (4) 一羟基化合物 — 二羟基化合物 — 三羟基化合物; (5) 母体 — 环氧化合物; (6) 酮基类胡萝卜素 — 羟基类胡萝卜素, 硅胶柱的磷酸酸化可改善酮基类胡萝卜素的色谱行为。总之, 硅胶柱适于极性化合物的分离。

2.2.1.2 腈基柱 正相键合腈基柱对含氧类胡萝卜素非常有效, 常用的流动相主要由正己烷和二氯甲烷组成, 还包含少量的甲醇和有机胺。有效的分离实例包括: (1) 叶黄素和玉米黄素; (2) 叶黄素、3' - 环氧叶黄素及其顺式异构体; (3) 叶黄素及其 5, 6 - 和 5, 8 - 环氧衍生物。

2.2.2 反相固定相

2.2.2.1 C₁₈ 固定相 C₁₈ 是最常使用的分离类胡萝卜素的固定相。这种固定相对全部极性范围内的类胡萝卜素都能起到分离作用。在 C₁₈ 固定相上, 类胡萝卜素的分离受到很多因素的影响, 包括:

(1) 颗粒的大小、形状和孔径。当固定相为 5μ 或 3μ 直径的均匀球型颗粒时, 可以得到很好的和可重复的分离度。固定相颗粒的孔径大小对分离度有很重要的影响。若要达到最佳分离, 长度大约为 35 埃的类胡萝卜素分子必须能完全穿入到孔中, 并和 C_{18} 烷基链发生吸附。该烷基链的长度大概为类胡萝卜素分子的一半。如果填料的孔径过小, 类胡萝卜素分子可能只会纵向地插入到孔径中, 与烷基链的吸附有限。

(2) 固定相颗粒表面的被覆盖程度, 即: 载碳量。增大载碳量可增加类胡萝卜素分子的保留时间和分离度。

(3) 端基封尾是在固定相颗粒表面对键合了 C_{18} 链后仍然裸露的硅醇基团的甲基化。端基封尾使固定相对类胡萝卜素分子的极性相互作用减到了最小程度, 并且提高了柱的重复性。但是无端基封尾的硅醇基团有利于胡萝卜素醇的分离。

(4) C_{18} 固定相的基质可以是硅胶, 也可是聚合物。后者拥有较大的孔径和较低的载碳量, 在分离几何异构体时较好。

随同为 C_{18} 固定相, 不同品牌和型号柱子的上述参数可能很不同。因此, 柱子的品牌和型号的选择对一个分离方法类说是一个决定性的影响因素。对一个分离方法, 应当使用相同品牌和型号的柱子, 否则结果可能是不一致的。

用于 C_{18} 固定相的流动相总体上看虽然变化很大, 但有矩可循:

(1) 主要溶剂: 最常使用的为乙腈或者甲醇。乙腈是最常使用的主要溶剂。在硅胶柱上, 其显示了对叶黄素较好的选择性。

(2) 优化剂: 一些极性更弱的溶剂。最常使用的有: 二氯甲烷, 四氢呋喃, 叔丁基醚, 乙酸乙酯和丙酮。

(3) 少量的水: 它可是流动相的极性显著增强, 有利于极性类胡萝卜素的分离。

(4) 助剂: 通过在乙腈中添加三乙胺缓冲液可以改进柱的回收率。甲醇也可得到高的回收率。

C_{18} 固定相分离的机理可以总结如下^[21]:

(1) C_{18} 固定相对类胡萝卜素的分离是基于化合物在固定相的疏水 C_{18} 链上和极性流动相中的分配比例。在分离极性类胡萝卜素时, 化合物会

高效地进入极性流动相。在分离低极性的类胡萝卜素时, 化合物会很好地与非极性的固定相结合。化合物的洗脱按极性依次减少的顺序进行, 与正相固定相上的顺序相反。但例外是有的: 在正相和绝大部分的反相系统中, 叶黄素的洗脱顺序总是在玉米黄质之前。

(2) C_{18} 固定相与类胡萝卜素醇酯的酰基之间的相互作用十分强烈。因此, 类胡萝卜素醇单酯和二酯的保留时间与不含氧类胡萝卜素接近, 甚至更长一些。

(3) 食物中 (尤其在柑橘类中) 阿朴类胡萝卜素的存在是非常普遍的。它们在 C_{18} 上的分离主要受分子的链长和极性基团的数量和性质影响。在 C_{18} 固定相上, 链长是主要影响因素。短链化合物比长链类似物要先洗脱出来。阿朴类胡萝卜素的保留时间通常比拥有相同极性基团的 C_{40} 类胡萝卜素要短。所以, 它们很可能被误以为是拥有更多极性基团的组分。

2.2.2.2 C_{30} 固定相 十年前, C_{30} 固定相被引入到类胡萝卜素 HPLC 分离中^[3,4]。其键合烷烃链的长度为 30 个碳, 基质为多聚物。其选择性和分辨率均较高。目标组分的分子形状是决定其选择性一个主要因素。所以, 其对几何异构体的分离非常好。高水平的分离效果使 C_{30} 柱成为对类胡萝卜素进行 HPLC-MS 分析时的最佳选择。其缺点是分析时间延长。典型的时间为 60~100 分钟, 与 C_{18} 柱的 10~25 分钟形成鲜明的对比。

若想使化合物在 C_{30} 柱和 C_{18} 柱上的洗脱顺序有关系是不太可能的。洗脱顺序在两种系统中会发生剧烈变化。第一个例子为: 在 C_{18} 柱上, 非环的番茄红素通常会比环状的 β -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的保留时间要短。但在 C_{30} 的柱上, 其洗脱时间要长。第二个例子为: 单羟基的 β -隐黄质在 C_{18} 柱上的保留时间在双羟基的玉米黄素和 β -胡萝卜素之间。而在 C_{30} 柱上, 它甚至在 β -胡萝卜素之后才被洗脱出来。因此, 使用 C_{30} 固定相时, 必须进行独立的组分鉴定, 不能根据组分在 C_{18} 柱上的色谱行为来进行理论上的推断。

2.3 温度

由于其线型和刚性结构, 类胡萝卜素分子对 HPLC 条件的改变比其它化合物要敏感的多。这

些分子结构上的特点强烈地影响了类胡萝卜素分子进入固定相颗粒孔隙和与烷基链进行相互作用的能力。在大多数类胡萝卜素 HPLC 分离过程中,环境温度比较重要。尤其是在反相系统中^[5],烷基链在低温下具有更大的刚性,温度可以强烈地影响固定相与不同形状分子的相互作用。此外,温度控制对保持 HPLC 结果的重复性很重要。当周围温度在很大的范围内变化时,温度变化会导致类胡萝卜素组分的保留时间发生剧烈的变化。还应注意:流动相中易挥发性组分易丢失,组分的保留时间也因此会改变。因此,对于常规的定量分析来说,应优先选择恒定梯度洗脱。

2.4 参比样品混合物

一根柱子的质量应该常常被测试。推荐的测试样品有两个:

(1) 类胡萝卜素: α -胡萝卜素、 β -类胡萝卜素、番茄红素、8'-阿扑- β -胡萝卜素-8'-

醇和角黄素参比样品混合物。这组混合物涵盖了主要的分子极性范围。

(2) 当没有参比样品时,可用包含 β -胡萝卜素、叶黄素、紫黄质、新黄质、叶绿素 a 和 b 及其相对应的脱镁叶绿素的新鲜植物叶片的丙酮萃取物。

3 分离实例

3.1 不含氧类胡萝卜素

绝大多数的 C_{18} 柱可以对不含氧类胡萝卜素的混合物有分离作用。影响分离的因素包括:

(i) 目标化合物的末端基团是否为环状。在 C_{18} 柱上,洗脱顺序通常为:非环-单环-双环。例如,番茄红素- γ -胡萝卜素- β -胡萝卜素(参阅图 1)^[6,7]。

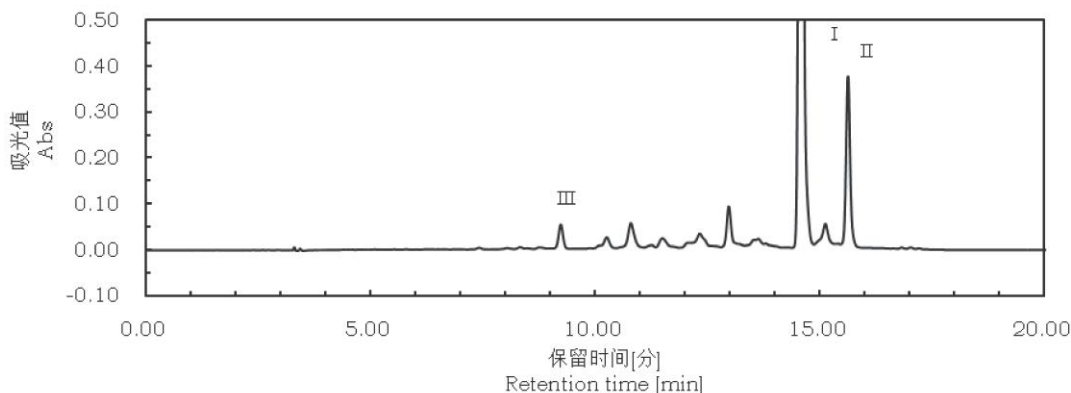


图 1 番茄果实萃取物的 C_{18} - HPLC 色谱图。

色谱条件: 色谱柱: DiamonsilTM (5 μ , 4.6mmx25cm); 流动相 A: 乙腈-水 (9:1, V/V); 流动相 B: 乙酸乙酯; 线性梯度洗脱: B 在 15 分钟内由 0% 增加至 100%; 流速: 1.0 毫升/分; 检测波长: 475nm; 波长收集范围: 260nm - 700nm; 进样量: 20 微升。组分鉴定: I = 番茄红素; II = β -胡萝卜素; III = 叶黄素。

(ii) 双键在环状末端基团上的位置。对于环状末端基团来说, β 环对 C_{18} 固定相比 ϵ 环具有更强的吸附力,故洗脱顺序为: ϵ , ϵ -胡萝卜素- β , ϵ -胡萝卜素- β , ϵ -胡萝卜素- β , β -胡萝卜素。

(iii) 双键的数量。例如,生物合成过程中去饱和系列产物的洗脱顺序为:番茄红素-链孢红素- ζ -胡萝卜素-六氢番茄红素-八氢番茄红素。

3.2 叶黄素

在反相固定相和正相固定相上,叶黄素都可以得到良好的分离。反相系统不仅可以对叶黄素和玉米黄素有良好的分离度,包括环氧玉米黄素、叶黄素 5, 6-环氧化合物、紫黄质和新黄质在内的多种含氧类胡萝卜素也有较好的分离度。这些化合物及相关胡萝卜素在正相柱上也有很好的分离度。对于正相和绝大多数反相系统叶黄素的洗脱顺序永远在玉米黄质之前(参阅图 2)^[8,9]。

3.3 几何异构体

类胡萝卜素立体异构体的首次分离是在 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 柱上实现的^[10]。最近,反相 C_{30} 柱在分离胡萝卜素的顺反异构体上已经被证明是十分理想的^[11,12]。UV/VIS 光谱给出了化合物可能的鉴定,但准确的分子特征描述需要核磁共振分析。这项工作非常困难,几乎没有关于一种类胡萝卜素的所有几何异构体已经全部被分离并经过核磁共振分析充分描述了其特征的报道。目前在市场上已经可以购买到一些类胡萝卜素顺式异构体的参比样品。

3.3.1 不含氧类胡萝卜素

β -胡萝卜素的几何异构体最早的分离是在 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 柱子上实现的。后来,主要顺式异构体的分离可以通过无末端封尾的 C_{18} (如 Zorbax 和 ODS-2) - HPLC 来实现,柱温应在 30°C , 25 分钟的运行时间内可以获得 13-顺式、全反式、9-顺式、13-顺式和 15-顺式异构体。

最近的一项研究描述了番茄红素十五种几何异构体在一个正相硅胶柱上的分离,并且全部经过了核磁共振鉴定^[13],而六种未被鉴定的组分可以在一个反相柱上被分离^[14]。最具挑战性的是番茄红素全反式与 5-顺式异构体的分离可以在 C_{30} 柱上实现 (参阅图 3)。

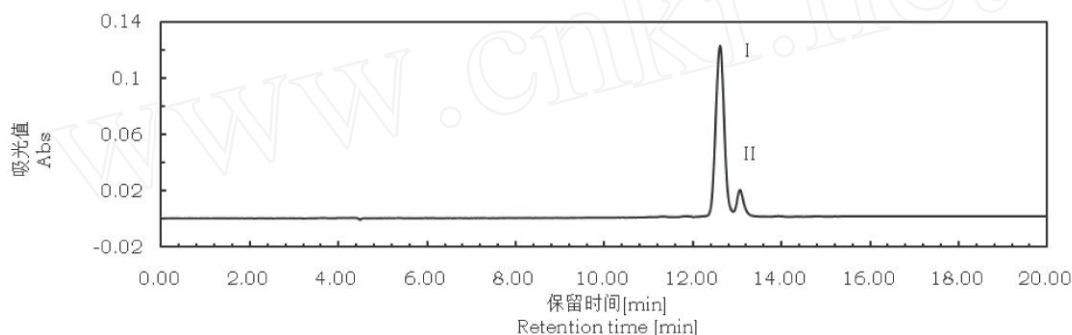


图 2 万寿菊花萃取物皂化物的 C_{30} - HPLC 色谱图。

色谱条件: 色谱柱: YMC Carotenoid S-5 (5μ , $4.6 \times 250\text{mm}$); 流动相 A: 乙腈 - 甲醇 (3 :1, V/V); 流动相 B: MTBE。线性梯度洗脱为 B 在 20 分钟内由 0 增加至 55% (V/V), 流速: 1.0 毫升/分; 检测波长: 450nm; PDA 光谱收集范围 260~600nm; 进样量: 20 微升。组分鉴定: I = 全反式叶黄素; II = 全反式玉米黄素。

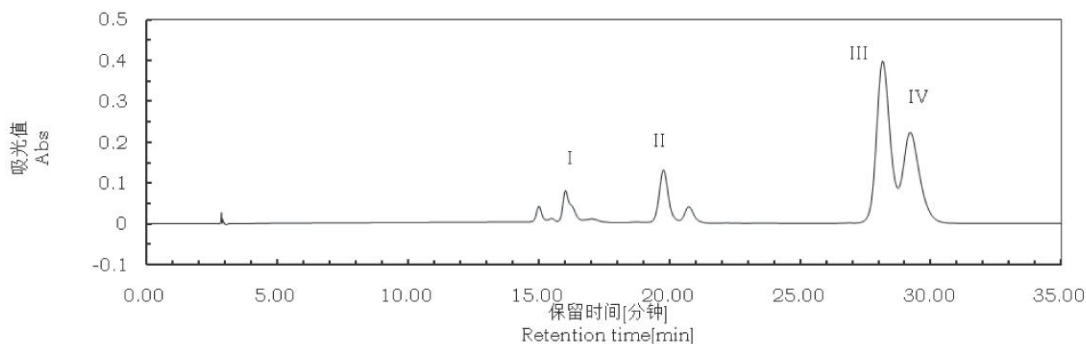


图 3 番茄红素碘诱导物的 C_{30} - HPLC 色谱图。

色谱条件: 色谱柱: YMC Carotenoid S-5 (5μ , $4.6 \times 250\text{mm}$); 流动相 A: 乙腈 - 甲醇 (3 :1, V/V); 流动相 B: MTBE; 流动相 A 与 B 中分别加入 0.05% (V/V) 三乙胺; 线性梯度洗脱: B 在 8min 内由 0 增加至 55% (V/V); 8 - 35min 内 B 维持 55%; 流速: 1.0 毫升/分; 检测波长: 475nm; PDA 光谱收集范围 260~700nm; 进样量: 20 微升。组分鉴定: I = 13-顺式番茄红素; II = 9-顺式番茄红素; III = 全反式番茄红素; IV = 5-顺式番茄红素。

3.3.2 含氧类胡萝卜素

首先,叶黄素和玉米黄素的分离是已持续了

很久的例子。目前,在 C_{30} 柱子上可以得到解决。玉米黄素主要几何异构体的洗脱顺序和相对

应的胡萝卜素是一样的,即全反式—9顺式—13顺式—15顺式。由于分子的不对称性,叶黄素可能存在的顺式异构体数目更大,如:9顺式、13顺式、9'顺式、13'顺式等。它们在C30株上的洗脱顺序已有报道(参阅图4)。

3.4 酰基酯

在水果和花食品中,叶黄素以拥有长链脂肪酸的酯形式大量出现。常见脂肪酸是C₁₂和C₁₈的饱和或不饱和的脂肪酸。对于一个类胡萝卜素分子来说,两个酯化了的酸可能是相同的也可能是不同的,这就增加了分子类型的数量。如果该类胡萝卜素的两个末端基团不同,这种情况就更有可能出现。对于绝大多数的常规分析来说,应该皂化萃取物以水解酯类,随后分析游离的类胡萝卜

素。

绝大多数已公布的方法都是使用C₁₈柱来分离酯。洗脱的规律有:

(i) 极性较大的类胡萝卜素酯类首先被洗脱出来。紫黄质酯类(含有两个额外环氧化物基团)会先于叶黄素酯类和玉米黄素酯类被洗出来。

(ii) 脂肪酸链短的酯先出来,长的后出来。例如,在分离婴儿食品中的南瓜成分中的类胡萝卜素时,当脂肪酸链的碳原子数每增加4h,在HPLC上的保留时间也会增加约4min(参阅图5)^[15]。

(iii) 脂肪酸链上的不饱和现象通常会减少保留时间。

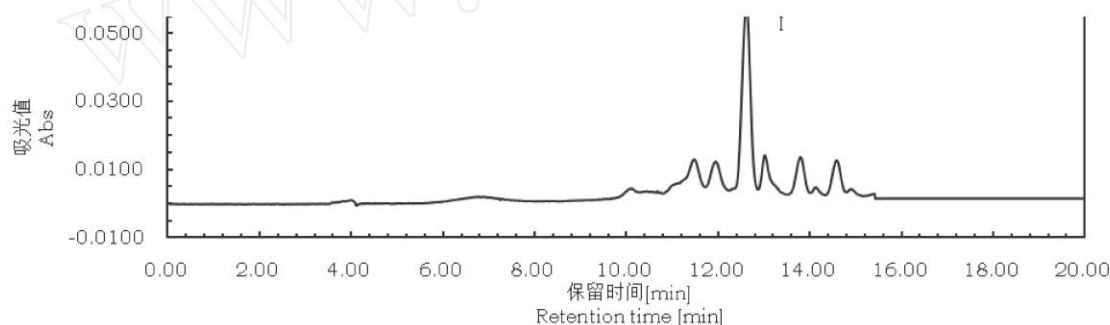


图4 万寿菊萃取物皂化物碘诱导物的C₃₀-HPLC色谱图。

色谱条件:色谱柱: YMC Carotenoid S-5 (5 μ , 4.6 $\times$ 250mm); 流动相 A: 乙腈-甲醇 (3:1, V/V); 流动相 B: MTBE。线性梯度洗脱为 B 在 20 分钟内由 0 增加至 55% (V/V), 流速: 1.0 毫升/分; 检测波长: 450nm; PDA 光谱收集范围 260~600nm; 进样量: 20 微升。组分鉴定: I = 全反式叶黄素。

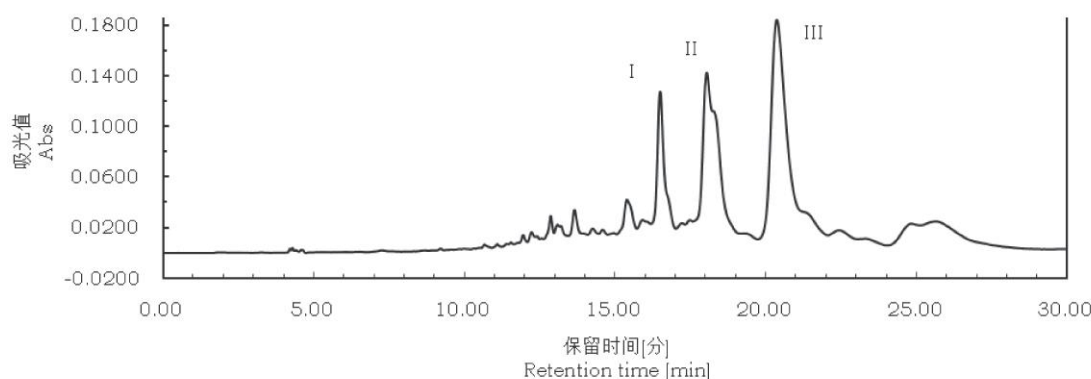


图5 万寿菊萃取物的C₃₀-HPLC色谱图。

HPLC条件:色谱柱: YMC Carotenoid S-5 (5 μ , 4.6 $\times$ 250mm); 流动相 A: 乙腈-甲醇 (3:1, V/V); 流动相 B: MTBE。线性梯度洗脱为 B 在 10 分钟内由 0 增加至 60% (V/V), 10-30 分钟内 B 维持 60%; 流速: 1.0 毫升/分; 检测波长: 450nm; PDA 光谱收集范围 260~600nm; 进样量: 20 微升。组分鉴定: 组分 I、II、III 均为叶黄素酯。

3.5 光学异构体

许多天然类胡萝卜素都包含至少一个手性中心。两种方法可以用来分离一类胡萝卜素的映异构体混合物：(1) 在手性异构体分离柱上分离；(2) 在普通 HPLC 柱上得到映异构体混合物后，与手性试剂相互作用，分离出异构体。

4 结构描述

4.1 “基本鉴定标准”

对类胡萝卜素进行定性鉴定是一个归纳推理过程。证据越多，结论越可信。类胡萝卜素的定性鉴定的“基本标准”包括：(1) 在相同溶剂中，UV/VIS 吸收光谱的 $\lambda_{\max}$ 和精细结构（在 300~700nm 范围内）必须与参比样品一致；(2) 在 HPLC 上，被鉴定组分与参比样品的保留时间一致；(3) 质谱（如：EI）分析，确定分子离子峰相对质量。这些均可在 HPLC - PDA - MS 上完成。NMR 质子谱的数据也是必要的。

4.2 立体化学描述

类胡萝卜素分子几何异构化的现象是很普遍的。所有类胡萝卜素分子异构体在溶液中均有可能经历可逆的几何异构化。因此，几何异构鉴定在类胡萝卜素的定性鉴定中具有特殊的意义。

4.3 完整的结构描述

完整的类胡萝卜素分子结构描述包括：分子的元素组成（分子式）、相对分子量、分子结构、手性特征、E/Z 构型等。

5 定量分析

在电子吸收光谱（UV - VIS）区，类胡萝卜素分子的共轭多烯链使其具有很强的光吸收，并具有独特的吸收光谱特征。类胡萝卜素分子在最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 处的吸光值与其在溶液中的浓度关系符合 Lambert - Beer 定律。可据此进行定量测定。

5.1 外标法

5.1.1 原理

如果有参比样品，在相同条件下制作参比样品的质量浓度 - 吸光值回归曲线，在 UV - VIS 上，测定样品的吸光值，从回归曲线计算出样品溶液的浓度。在安装了 UV - VIS 检测器的 HPLC 上，先将样品中的类胡萝卜素在色谱柱上分离，

再用 UV - VIS 检测器测定各类胡萝卜素组分在色谱图上的峰面积。如果有参比样品，在相同条件下制作参比样品的质量浓度 - 峰面积回归曲线，根据该组分的峰面积，从曲线上计算萃取物中该类胡萝卜素的含量。

5.1.2 外标使用注意事项

5.1.2.1 高纯度试剂 市场上只有 6~8 种高纯度类胡萝卜素的全反式异构体产品可直接用于分析，纯度在 90% (W/W) 以上。包装规格一般为：1~5mg (晶体) / 安培管。这类样品可以直接被用来作为分析工作中的参比样品。用这些样品配制的储备液（浓度 $\geq 40\mu\text{g/mL}$ ）不能长时间储存。在避光和室温条件下，要求在 24h 内使用；在充保护气（如：氩气）、-20℃ 条件下，要求在 72h 内使用；在充保护气、-70℃ 条件下，要求在一周内使用。

5.1.2.2 标示浓度的商品 已标示了类胡萝卜素含量的食品和饲料级添加剂产品也可做为参比样品，其类胡萝卜素含量一般在 3%~10% (W/W)。使用前须测定其类胡萝卜素的即时含量。方法是：使用 0.00001g 级的天平，精确称量一定量的样品，配制成溶液，定容。以产品的类胡萝卜素标示含量计算，溶液的浓度应控制在 $2\mu\text{g/mL}$ 左右。在该类胡萝卜素的 $\lambda_{\max}$ 处测定其吸光值。按公式 (2) 计算该溶液中的类胡萝卜素实际含量，再换算成样品中类胡萝卜素的实际含量。平行测定 3 次，取平均值为结果。

5.1.2.3 自制参比样品 有条件的实验室可以从天然资源中制备一些类胡萝卜素提取物，经过纯化后，做为参比样品使用。使用前须测定类胡萝卜素含量。测定方法同上。

5.1.2.4 储备液 参比样品储备液的存放时间超过上述期限时，再次使用之前须按上述方法测定类胡萝卜素含量。

5.2 内标法

对于准确的定量分析来说，使用内标是可靠的选择。

5.2.1 内标物特点

- (i) 不能在原始样品中存在；
- (ii) 在选定的分离条件下能与目标组分分离；
- (iii) 保留时间与目标组分接近；

(iv) 在流动相中的溶解度和色谱响应与目标组分相似, 吸收系数已知。

(v) 检测波长应该和目标化合物一致。

(vi) 与目标组分的稳定性相似;

(vii) 不能与目标组分、固定相、流动相发生反应;

(viii) 高纯度。

5.2.2 内标物举例

(i) 在 RP - HPLC 中, 8'-阿朴 - β - 胡萝卜素 - 8'-al 是首选。例如, 在柑橘中类胡萝卜素的定量分析中^[16];

(ii) 对于叶黄素的分析可用 8'-阿朴 - β - 胡萝卜素 - 8'-羟基:

(iii) (2R, 2R) - 2, 2'-二甲基 - β - 胡萝卜素已经被作为一种内标物成功地运用于人体血清中 β - 胡萝卜素的定量测定中。

(iv) 胡萝卜素醇的内标物

未皂化的水果提取物通常包含一系列的叶黄素酯, 它们在 RP - HPLC 上的保留时间非常接近。类胡萝卜素的二酰基酯是适合的内标物。首先, 角黄素的降解来制得异玉米黄素^[17]。随后, 可制备拥有不同碳链长度脂肪酸的异玉米黄素酯。二壬酸盐 (二酯) 对于存在于南瓜中的天然类胡萝卜素酯 (主要组分为叶黄素二元酸酯) 的分析来说是适合的。

5.2.3 内标物的使用

首先, 需要制作内标标准曲线, 方法为: 配制类胡萝卜素内标物和参比样品的储备液。用其配制不同浓度系列的工作液。在不同浓度的类胡萝卜素参比样品工作液中添加一已知浓度的内标物, 测定每个工作液中参比样品和内标物的峰面积。回归参比样品峰面积与内标物峰面积比值和参比样品浓度与内标浓度比值的线性关系, 节距为 0, 并以参比样品浓度与内标浓度比值为横坐标做图。在对食品样品进行萃取之前, 将与标准曲线样品中同样含量的内标物添加其中, 对萃取物进行 HPLC 分离, 测量目标组分和内标物的峰面积, 计算二者的比值, 从标准曲线上计算目标化合物的含量。作为样品制备过程的一个结果, 目标类胡萝卜素组分的任何损失都伴随有内标物的等量损失。为了得到可靠的数据, 必须仔细地监测萃取之后内标物的回收率和色谱的重现性。

5.3 吸光系数计算法

如果没有参比样品, 测定样品溶液的吸光值后, 根据样品中类胡萝卜素组分的吸光系数, 按照 Beer - Lambert 定律计算其浓度, 样品液体积 y (毫升) 中类胡萝卜素的量 x (克) 为:

$$x = Ay/A_{1cm}^{1\%} 100 \quad (1)$$

在 UV - VIS 上, 吸光系数 $A_{1cm}^{1\%}$ 的定义为: 在 1 厘米光程的比色杯中 1% (W/V) 浓度溶质的理论吸收值。多数类胡萝卜素在 λ_{max} 处的 $A_{1cm}^{1\%}$ 值通常在 2500 左右。当样品中类胡萝卜素组成不清楚时, $A_{1cm}^{1\%}$ 可使用平均值 2500。摩尔吸收系数 ϵ 的定义为: 是在 1 厘米光程的比色杯中 1 摩尔/升浓度溶液的理论吸收值。二者的关系为:

$$\epsilon = (A_{1cm}^{1\%} \times \text{分子量}) / 10 \quad (2)$$

类胡萝卜素溶液的摩尔浓度可根据下式计算:

$$[M] = A / \epsilon \quad (3)$$

在 HPLC - UV/VIS 上, 根据已公布的每种类胡萝卜素 $A_{1cm}^{1\%}$ 或 ϵ 值, 按公式 (1) 计算萃取物中类胡萝卜素组分的含量。式中的 A 应换为峰面积, 并根据不同 HPLC 设备输出的色谱图单位修正分母中的常数。

光源的发射能量变化在这种检测方法中会引起误差。

6 食物中类胡萝卜素的 HPLC 分析

6.1 绿叶蔬菜和水果

所有绿色植物组织的细胞的叶绿体内包含有同样的主要色素: 叶绿素 a 和 b 、 β - 胡萝卜素、叶黄素、紫黄质和新黄质。它们在光合作用中都起到了重要作用。少量的 α - 胡萝卜素, 玉米黄素, 环氧玉米黄素, 叶黄素环氧化物和 β - 隐黄质也可能被检测到。各色素的比例受到遗传和生长条件的影响而变化。通常, RP - HPLC 对它们有良好的分离。对提取物皂化物的分离可以使对其中的类胡萝卜素组分的分析变得简单 (参阅图 6)。

叶黄素、玉米黄素和它们的几何异构体在 C_{30} - HPLC 上有清晰的分离, 但在 C_{18} - HPLC 上做不到。因此, 在大多数情况下, 食物组成文献中仅仅能列出“叶黄素 + 玉米黄素”组分的数

据。由于在人血清和视网膜中发现了高浓度的玉米黄素，所以其在食物中的存在不应被忽视。在今后的分析工作中，应当特别重视二者的分离和检测。

6.2 黄 - 橙 - 红色水果和蔬菜

黄 - 橙 - 红色水果中类胡萝卜素的组分是十分多样化的。同样的颜色可以由不同的类胡萝卜素来产生。最典型的例子为番茄（番茄红素）和红辣椒（辣椒红素）。常见的黄 - 橙色食品还有：杏，哈密瓜，胡萝卜，南瓜和甘薯等^[18]。虽然来

源于这些食物的提取物可较容易地在 RP - HPLC 上用梯度洗脱分离，但当样品中仅含胡萝卜素时，使用恒定梯度 HPLC 条件洗脱可能更有效。在胡萝卜和甘薯样品的分析中，样品中仅含有阿 α - 和 β - 胡萝卜素，它们就可以在恒定梯度洗脱程序中被快速高效地洗脱出来。各种红色水果，比如番茄、粉色葡萄柚和西瓜均是非环类胡萝卜素（包括：番茄红素、 ζ - 胡萝卜素，六氢番茄红素和八氢番茄红素）的主要日常饮食来源，其健康功能应予重视。

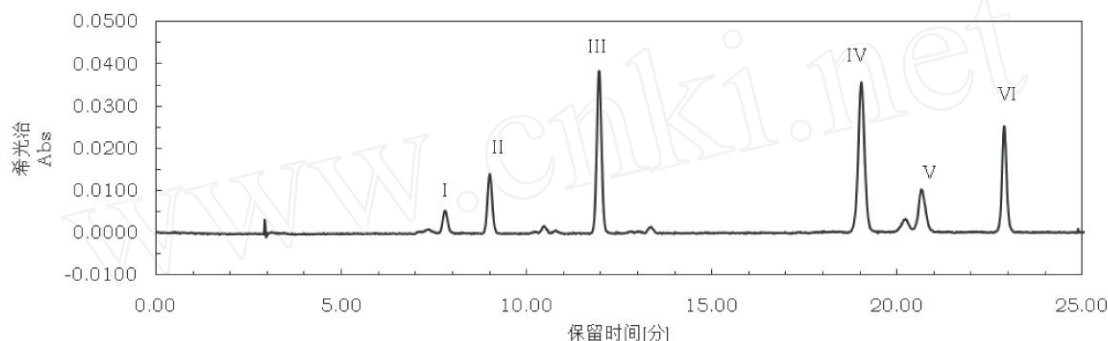


图 6 菠菜叶片萃取物的 C_{18} - HPLC 色谱图。

色谱条件：色谱柱：DiamondsilTM (5 μ , 4.6mmx25cm)；流动相 A：乙腈 - 水 (9 :1, V/V)；流动相 B：乙酸乙酯；线性梯度洗脱：B 在 15min 内由 0% 增加至 100%；流速：1.0mL/分；检测波长：475nm；波长收集范围：260nm ~700nm；进样量：20 μ L。组分鉴定：I =新黄质；II =紫黄质；III =叶黄素；IV =叶绿素 b；V =叶绿素 a；VI = β -胡萝卜素。

6.3 以胡萝卜素醇和醇酯为主的水果和蔬菜

目前，已发现的含有胡萝卜素醇酯基酯的食物有南瓜，主要类胡萝卜素在 C_{18} 柱上的洗脱顺序为：胡萝卜素醇— α - 和 β - 胡萝卜素—单酯—双酯。从南瓜中已分离的天然叶黄素单豆蔻酸盐和单棕榈酸酯的大量 NMR 数据来看，叶黄素单酰基酯的酰基位点在 β 而不是 ϵ 末端基团上^[19]。在 C_{18} - HPLC 上，类胡萝卜素酰基酯可以得到良好的分离。在进行样品中类胡萝卜素的定量分析时，可将提取物皂化，再检测其中的单体含量。

7 结论

在分析食物中类胡萝卜素的组成方面，HPLC 提供了一个很有效的方法^[20]。PDA 可以在选定的波长范围内与色谱过程同步对组分检测。这意味着可在 HPLC 上提供每种色谱组分的在线的电子吸收光谱图作为结构鉴定的第一参考信

息。HPLC - MS 和 HPLC - NMR 在结构鉴定上具有重要的前景。

参考文献：

- [1] 惠伯棣，唐粉芳，裴凌鹏，廖萍泰，李京. 万寿菊干花中叶黄素的实验室制备 [J]. 食品科学，2006，(6).
- [2] 惠伯棣，欧阳清波，曾悦. 植物食品中类胡萝卜素的高压液相色谱检测 [J]. 中国食品添加剂，2002，(5).
- [3] 惠伯棣，张西，文镜. 反相 C_{30} 柱在 HPLC 分析类胡萝卜素中的应用 [J]. 食品科学，2005，(1).
- [4] C Emenhiser, N Simunovic, L C Sander and S J. Schwartz Separation of geometrical carotenoids isomers in biological extracts using a polymeric C_{30} column in reversed - phase liquid chromatography J. Agric Food Chem., 44, 3887 (1996).
- [5] L C Sander and S A Wise Subambient Temperature Modification of Selectivity in Reversed - Phase Liquid Chromatography Anal Chem., 61, 1749 (1989).
- [6] 刘沐霖，惠伯棣，庞克诺. 番茄及其制品中番茄红素含量的 C_{18} - HPLC - PDA 定量分析 [J]. 食品科学，2007，(7).

(下转第 241 页)

国产果胶酶的酶活性是今后研究领域的重要方向。在此基础上进行果胶酶分离纯化、酶学性质研究和果胶酶的分子生物学水平研究对于更好、更合理地利用果胶酶、拓展果胶酶的应用范围和提高理论研究水平等具有重大的意义。

参考文献:

- [1] 朱宏莉, 郭爱莲, 宋纪蓉, 等. 氦-氖激光诱变细菌细胞及原生质体选育果胶酶高产菌株 [J]. 光子学报, 2005, 34 (11): 1693 - 1696.
- [2] 张智维, 杨辉, 陈合. He - Ne激光诱变选育果胶酶高产菌株 [J]. 食品工业科技, 2006, 27 (10): 156 - 157.
- [3] 杨建霞, 王百姓, 王军军, 等. 黑曲霉果胶酶高活性菌株的诱变选育及对苹果汁澄清的研究 [J]. 陇东学院学报 (自然科学版), 2006, 16 (2): 47 - 49.
- [4] 杜国军, 刘晓兰, 郑喜群. 产果胶酶黑曲霉的筛选及诱变育种 [J]. 农业与技术, 2008, 28 (1): 68 - 70.
- [5] 陈坚, 堵国成, 董云舟, 等. 一种碱性果胶酶高产菌及其筛选方法和用该菌株发酵法生产碱性果胶酶: 中国, 03131952 1 [P]. 2004 - 03 - 10.
- [6] 张保国, 白志辉, 李祖明, 等. 吉氏芽孢杆菌 S - 2 菌株固态发酵制备碱性果胶酶 [J]. 食品科技, 2004 (12): 8 - 11.
- [7] 李祖明, 李鸿玉, 白志辉. 高产碱性果胶酶吉氏芽孢杆菌的诱变育种与固态培养条件优化 [J]. 食品科技, 2008 (9): 5 - 9.
- [8] 马建华, 那安, 崔福绵. 黑曲霉果胶酶液体发酵及酶作用条件 [J]. 微生物学通报, 1985 (2): 62 - 64.
- [9] 张洪勋, 齐鸿雁. 固态发酵果渣、菜渣制备果胶酶: 中国, 00107955. 7 [P]. 2000 - 11 - 01.
- [10] 张洪勋, 白志辉, 顾红燕, 等. 利用废渣和废水固态发酵生产果胶酶: 中国, 02129637. 5 [P]. 2003 - 02 - 26.
- [11] 卫春会, 杨辉. 黑曲霉液态发酵生产果胶酶的工艺条件初探 [J]. 中国酿造, 2005, 4 (4): 25 - 27.
- [12] 汤鸣强. 黑曲霉产果胶酶的分离纯化和酶学特性研究 [D]. 福建师范大学生物工程学院, 2004.
- [13] 周建琴. 黑曲霉果胶酶产生条件的初步研究 [J]. 现代食品科技, 2006, 22 (1): 91 - 94.
- [14] 田林茂, 张红燕, 刘成, 等. 黑曲霉 HG - 1 发酵苹果渣生产果胶酶的工艺优化及部分酶学性质 [J]. 生物技术, 2008, 18 (2): 74 - 77.
- [15] 尤华, 陆兆新, 冯红霞. 曲霉液体发酵产原果胶酶的条件优化研究 [J]. 微生物学通报, 2003, 30 (1): 26 - 30.
- [16] 钟卫鸿, 岑沛霖, 陈瑶, 等. 聚氨酯泡沫固定化黑曲霉 P - 6021 可同时产果胶酶和澄清果汁 [J]. 菌物系统, 2001, 20 (2): 503 - 507.
- [17] 王瑞芳, 陈姗姗, 仇农学. S - 8 大孔吸附树脂固定果胶酶条件的优化研究 [J]. 中国食品添加剂, 2006 (4): 67 - 70.
- [18] 陈姗姗, 仇农学. 阴离子交换树脂固定化果胶酶研究 [J]. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 2008, 36 (2): 102 - 105.
- [19] 高振红. 磁性壳聚糖复合微球固定化果胶酶及反应动力学研究 [D]. 陕西. 杨凌: 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 2007.
- [20] 林建城, 朱丽华, 苏渊红. 壳聚糖固定化果胶酶在枇杷果汁澄清中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34 (7): 164 - 167.
- [7] 李京, 惠伯棣, 裴凌鹏. 番茄果实成熟过程中类胡萝卜素含量的变化 [J]. 中国食品学报, 2006, (2).
- [8] 张艳, 惠伯棣, 裴凌鹏, 李京, 张凌霄, 胡雅馨. 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, (11).
- [9] 惠伯棣, 李京, 裴凌鹏. 应用 C30 - HPLC - PDA 分离与鉴定食品中全反式叶黄素和玉米黄素 [J]. 食品科学, 2006, (9).
- [10] K Tsukida, K Saiki, T Takii and Y Koyama. Separation and determination of cis/trans - β - carotenes by high - performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 245, 359 (1982).
- [11] 惠伯棣, 李京, 裴凌鹏. 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, (7).
- [12] 李京, 惠伯棣. 番茄红素在体内代谢中的几何异构体组成变化 [J]. 食品科学, 2008, (9).
- [13] U Hengartner, K Bernhard, K Meyer, G Englert and E Glinz. Synthesis, Isolation, and NMR - Spectroscopic Characterization of Fourteen (Z) - Isomers of Lycopene and of Some Acetylenic Didehydro - and Tetrahydrolycopenes. Helv. Chim. Acta, 75, 1848 (1992).
- [14] F W Quackenbush. Reverse phase HPLC separation of cis - and trans - carotenoids and its application to β - carotenes in food materials. J. Liquid Chromatogr., 10, 643 (1987).
- [15] F Khachik and G R Beecher. Separation of carotenol fatty acid esters by high - performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 449, 119 (1988).
- [16] G Noga and F Lenz. Separation of citrus carotenoids by reversed - phase high - performance liquid chromatography. Chromatographia, 17, 139 (1983).
- [17] F J Petrcek and L Zechmeister. Reaction of β - Carotene with N - Bromosuccinimide: The Formation and Conversions of Some Polyene Ketones. J. Am. Chem. Soc., 78, 1427 (1956).
- [18] F Khachik, G R Beecher, and W R Lusby. Separation, identification, and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe, and pink grapefruit by liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., 37, 1465 (1989).
- [19] F Khachik, G R Beecher and W R Lusby. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography 2. Isolation and characterization of carotenoids and related esters. J. Agric. Food Chem., 36, 938 (1988).
- [20] 惠伯棣, 刘沐霖, 庞克诺, 胡雅馨, 张艳, 李京. 食品中类胡萝卜素几何异构体组成的 C30 - HPLC 检测 [J]. 中国食品添加剂, 2007, (2).

(上接第 267 页)