

高效液相色谱法检测果冻中的姜黄素类化合物

方恩华^{1,3}, 陈鹭平¹, 吴茗梅^{2*}, 王雪虹², 林蓉³

(1. 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 厦门 361026; 2. 集美大学, 厦门 361021;
3. 厦门市食品行业协会, 厦门 361012)

摘要: **目的** 建立果冻制品中姜黄素类化合物的高效液相色谱测定方法。**方法** 样品用甲醇水混合溶液(7+3, V:V)提取, 经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。色谱柱: Kinetex PFP 五氟苯基柱; 流动相: 0.1%甲酸水和 0.1%甲酸乙腈; 洗脱方式: 等度; 检测器波长 420 nm; 流速为 1 mL/min; 柱温: 室温; 进样量为 4.0 μL ; 采用色谱峰保留时间定性, 外标法峰面积定量。**结果** 标准溶液在 1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, 相关系数 0.999, 平均回收率在 93.0%~103.2%之间, 相对标准偏差 2.73%~4.89%。**结论** 该方法具有样品预处理简单等特点, 实测中发现可吸果冻和凝胶果冻中普遍含有姜黄素成分, 姜黄素类化合物总含量在 1~15 mg/kg 之间。

关键词: 高效液相色谱法; 果冻; 姜黄素类化合物

Determination of curcuminoids in jelly by high performance liquid chromatography

FANG En-Hua^{1,3}, CHEN Lu-Ping¹, WU Ming-Mei^{2*}, WANG Xue-Hong², LING Rong³

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Center, Xiamen 361026, China; 2. Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. Xiamen Food Industry Association, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT: Objective A sensitive and efficient method based on high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for simultaneous identification and quantification of curcuminoids in jelly. **Method** Jelly samples were diluted and extracted by methanol: water (7:3). Using Kinetex PFP (five fluorinated phenyl) column, with a 0.1% formic acid water solution and 0.1% formic acid acetonitrile solution as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and detection wavelength was 420 nm under room temperature with 4.0 μL injection volume. **Results** The recoveries of curcuminoids were in range of 93.0%~103.2%, the relative standard deviation was 2.73%~4.89%. It showed a good linearity in 1.0~100.0 $\mu\text{g/mL}$ with the correlation coefficients (r^2) of 0.999. **Conclusion** Curcuminoids were detected in gel jelly and straw jelly, and the level of curcuminoids was between 1~15 mg/kg.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; jelly; curcuminoids

1 引言

经典意义上的果冻是用富含果胶的天然水果汁

制成, 不具有流动性, 移动时有颤动感, 刀切后断面夹角可以维持^[1], 呈晶莹透明并有水果清新香味的半固体凝胶。根据英文“Jelly”发音而亦称“啫喱”, 商品

基金项目: 出入境检验检疫行业标准制(修)订计划(2014B085)

Fund: Supported by Entry-exit Inspection and Quarantine Occupation Standard (2014B085)

*通讯作者: 吴茗梅, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 1037919935@qq.com

*Corresponding author: WU Ming-Mei, Jimei University, Xiamen 361021, China. E-mail: 1037919935@qq.com

化的果冻制品是由卡拉胶等植物多糖添加果汁、果肉制成^[2]。GB 19883 根据组织形态将果冻分为能够保持原有形态的凝胶果冻和半流体的可吸果冻, 根据原料含量以 15% 为界, 又分为果味、果汁和果肉类^[3]。由于加入各种香精、色素, 酸味剂、甜味剂可能对消费者健康有害^[4], 追求保健功效已经成为果冻产品发展的新潮流, 添加微量元素和增加功能性食品原料成为两个主要的方向^[5]。

姜黄素是一种天然黄色素, 着色力强, 广泛用于糕点、饮料等快消食品^[6], 姜黄素还具有抗氧化、抗肿瘤、抑制肥胖和延缓衰老等多种生物活性^[7], 因而出现在生姜^[8]、姜汁^[9]、姜枣汁^[10]等保健型果冻的配料表中。GB 2760-2014 规定果冻产品可以按生产需要适量使用姜黄, 而姜黄素的最大使用量限制在 0.01 g/kg^[11]。标准中的姜黄所指是植物根茎, 姜黄素(curcumin)是从姜黄中提取得到的黄色结晶, 其中含有姜黄素(Curcumin, Cur I)、脱甲氧基姜黄素(Demethoxycurcumin, Cur II)、双脱甲氧基姜黄素(Bidemethoxycurcumin, Cur III)3 种化合物^[12], 统称姜黄素、姜黄色素或姜黄素类化合物。

文献报道姜黄素测定方法主要有液相色谱法^[13], 液质联用法^[14], 从对姜黄素化学组成的认识上看, 有些研究者认为姜黄素仅指 Cur I。本文的主张是: 作为食品添加剂的姜黄或姜黄素本身就是 3 种化合物的混合物, 严谨的做法还是应该将 3 种姜黄素作为一个整体进行研究分析, 为此本文采用高效液相色谱法对不同口味和品牌果冻中姜黄素的含量进行测定比较。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

供试果冻类样品 15 种, 采购自厦门市海沧区的各大超市, 涉及品牌有喜之郎、徐福记、蜡笔小新等。

甲醇(色谱纯); 姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素标准物质(上海安谱实验科技股份有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 超纯水。称取姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素标准品若干, 精确到 0.0001 g, 在容量瓶中用甲醇定容, 使各自的浓度达到 200 $\mu\text{g/mL}$ 。此为标准母液, 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 6 个月有效。

2.2 仪器设备

配有 DAD 检测器的 LC1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); IKA T18 Basic 均质器(广州艾卡仪器设备有限公司); TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2.3 样品处理

准确称取 2.50 g 样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 溶剂甲醇水(7+3, V:V), 在均质器中均质提取混匀后, 再将样品以 4000 r/min 的转速离心 3 min, 用 1 mL 针筒取上清液过 0.45 μm 亲水聚四氟乙烯(PTFE)针式滤膜, 若是无法过膜, 则需要将上清液再次进行高速离心, 取上清液过滤膜到进样小瓶中, 进样分析。

2.4 液相色谱条件

色谱柱: Kinetex PFP 五氟苯基柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液(999 mL 超纯水加 1 mL 甲酸)B 为 0.1% 甲酸乙腈(999 mL 乙腈加 1 mL 甲酸); 洗脱: 等度洗脱; 检测器波长: 420 nm, 参比波长 360 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 4.0 μL 。

姜黄素标准母液(200 $\mu\text{g/mL}$)用甲醇-水(V:V=1:1)稀释成浓度为 1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液系列。在上述色谱条件下进样分析, 以峰面积为纵坐标, 对应浓度为横坐标, 绘制标准曲线。同时测定样品提取液, 根据标准曲线计算测试液中姜黄素的含量($\mu\text{g/mL}$), 据此推算样品中 3 种姜黄素的各自含量及总姜黄素含量(mg/kg)。

3 结果与讨论

3.1 线性方程、相关系数

取 2.4 中姜黄素混合标准溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 以姜黄素浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得到双脱甲氧基姜黄素、脱甲氧基姜黄素、姜黄素的回归方程见表 1, 在 1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数均大于 0.999。

图 1 为 1 $\mu\text{g/mL}$ 姜黄素混合标准溶液色谱图, 出峰顺序依次为: Cur III, Cur II, Cur I, 结合考虑前处理中样品稀释 10 倍因素, 方法的定量限为 10 mg/kg。

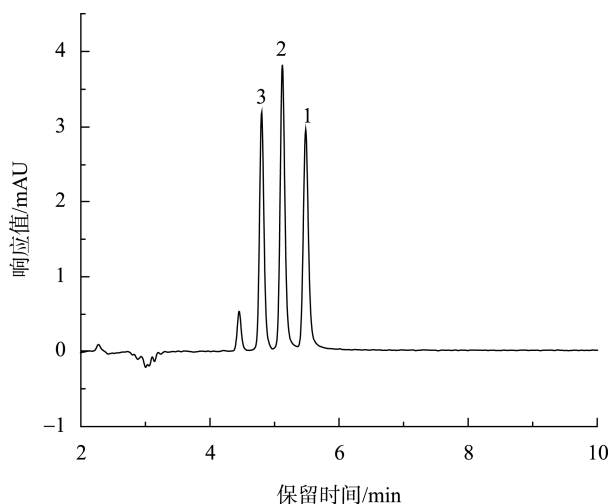


图 1 姜黄素标准品色谱图(1 μg/mL)

Fig. 1 Chromatogram of curcumins standard (1 μg/mL)
1. 姜黄素(Cur I); 2. 脱甲氧基姜黄素(Cur II); 3. 双脱甲氧基姜黄素(Cur III)
1. Curcumin (Cur I); 2. Demethoxycurcumin (Cur II);
3. Bidemethoxycurcumin (Cur III)

3.2 加标回收率和精密度

取果冻阴性样品 2.50 g, 分别添加姜黄素标准母

液(200 μg/mL)0.050、0.100、0.250 mL, 使果冻样品中的浓度水平分别为 10、20、50 mg/kg, 每种浓度做三个平行样。

如表 2 所示, 三种姜黄素在 10.0、20.0、50.0 mg/kg 三个浓度水平下, 各自的平均回收率在 93.0%~103.2% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.73%~4.89%。由此可见, 方法具有良好的准确性和精密度。

3.3 实际样品的测定

市售果冻根据组织形态分为两类, 即凝胶果冻和可吸果冻。实际样品检测中发现可吸果冻(图 2)中的姜黄素总含量一般都要高于凝胶果冻(图 2)。

如图 3~图 5 所示为两种果冻 14 个样品中 CurIII、CurII、CurI 的含量从低到高对比图。

根据检测结果汇总分析, 可吸果冻中 CurIII、CurII、CurI 的含量范围分别为 1.43~6.02 mg/kg、0.54~4.51 mg/kg、1.2~4.03 mg/kg, 凝胶果冻中 CurIII、CurII、CurI 的含量范围分别为 0~1.68 mg/kg、0~0.73 mg/kg、0~2.11 mg/kg。可以看出在姜黄素的总体含量上, 可吸果冻高于凝胶果冻。

表 1 线性范围、检出限
Table 1 The results of linear range and detection limit

化合物	线性范围 (μg/mL)	线性方程	r^2	检测限(μg/mL)
CurIII	1~100	$Y=34.688X-16.063$	0.9992	1
CurII	1~100	$Y=32.845X-17.308$	0.9991	1
CurI	1~100	$Y=28.871X-17.314$	0.9993	1

表 2 加标回收率及其相对标准偏差(n=3)
Table 2 Recoveries and relative standard deviation of samples (n=3)

化合物	加标样加标浓度 (mg/kg)	加标样测试液理论浓度 (μg/mL)	测试液平均实测值 (μg/mL)	平均回收率 (%)	相对标准偏差(n=3) (%)
CurIII	10.0	1.00	0.97	97.0	4.22
	20.0	2.00	1.88	94.0	3.91
	50.0	5.00	4.91	98.2	4.96
CurII	10.0	1.00	0.98	98.0	2.73
	20.0	2.00	1.86	93.0	3.36
	50.0	5.00	5.06	101.2	4.89
CurI	10.0	1.00	0.93	93.0	4.75
	20.0	2.00	1.94	97.0	3.99
	50.0	5.00	5.16	103.2	4.36

4 结 论

本文建立了高效液相色谱法检测果冻中姜黄素含量的分析方法, 试验结果表明该方法准确、简便、快速, 且回收率较高, 精密度好。在实际果冻样品的检测中发现, 虽然在产品配料表中没有明确标注, 但是在可吸果冻和凝胶果冻中普遍检测出姜黄素成分, 含量范围在 1~15 mg/kg 之间。如以总姜黄素含量计, 可吸果冻类比凝胶果冻类含量普遍偏高。

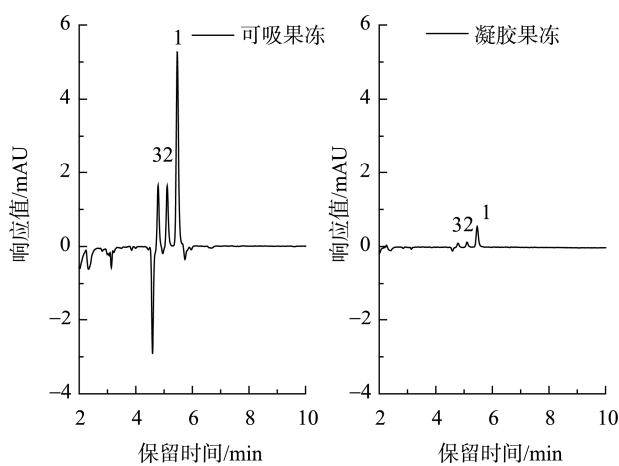


图 2 可吸果冻与凝胶果冻色谱图对比

Fig. 2 Comparison of chromatogram of straw jelly and gel jelly

1. 姜黄素(Cur I), 2. 脱甲氧基姜黄素(Cur II), 3. 双脱甲氧基姜黄素(Cur III)

1. Curcumin (Cur I); 2. Demethoxycurcumin (Cur II);
3. Bidemethoxycurcumin (Cur III)

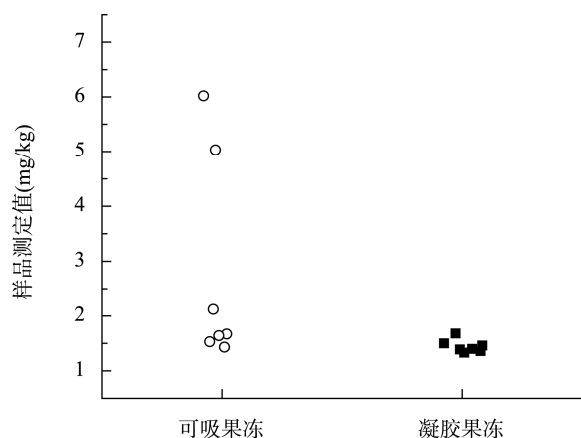


图 3 两种果冻样品中 CurIII 的测定值域

Fig. 3 CurIII content range of 2 type jelly (mg/kg)

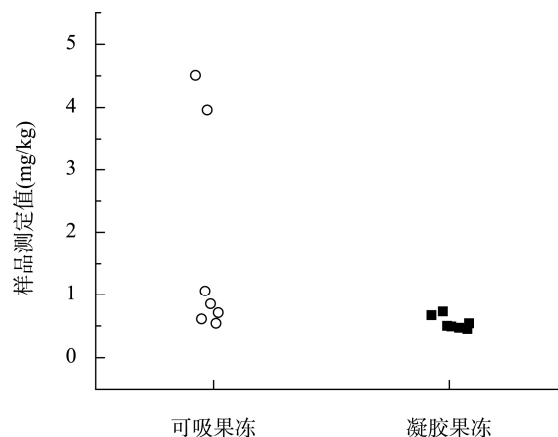


图 4 两种果冻样品中 CurII 的测定值域

Fig. 4 CurII content range of 2 type jelly (mg/kg)

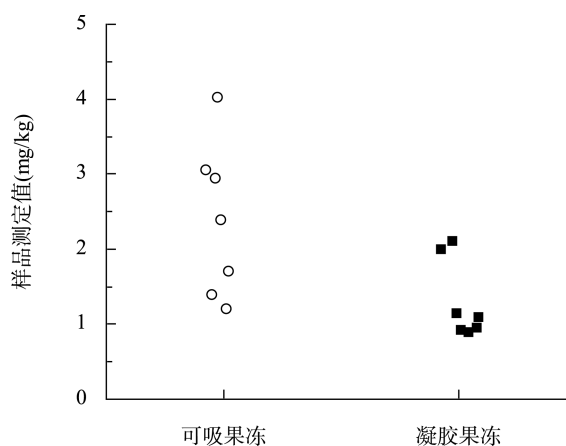


图 5 两种果冻样品中 CurI 的测定值域

Fig. 5 CurI content range of 2 type jelly (mg/kg)

参考文献

- [1] Wikipedia. Jelly[EB/OL]. (20 November 2015) https://en.wikipedia.org/wiki/Fruit_preserves#Jelly.
- [2] 薛仕妹. 果冻营养揭秘[J]. 江苏食品与发酵, 2003, (03): 24.
Xue SM. Secret jelly nutrition [J]. Jiangsu Food Ferment, 2003, (03): 24.
- [3] GB 19883-2005, 果冻 [S]
GB 19883-2005, Jelly [S]
- [4] 郭少惠, 许圆. 新型马蹄果冻(马蹄糕)的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, (02): 67-71.
Guo SH, Xu Y. The new horseshoe jelly (chestnut cake) research [J]. J Food saf qual, 2011, (02): 67-71.
- [5] 王琦. 果冻产品发展趋势及相关技术问题的初探[J]. 食品工

- 业科技, 2001, (04): 77-78.
- Wang Q. Preliminary jelly product development trends and related technical problems [J]. Food Sci Technol, 2001, (04): 77-78.
- [6] 刘树兴, 胡小军. 姜黄色素的研究进展[J]. 陕西科技大学学报, 2003, (04).
- Liu SX, Hu XJ. Research curcumin [J]. Shaanxi Univ Sci Technol, 2003, (04).
- [7] 袁鹏, 陈莹, 肖发, 等. 姜黄素的生物活性及在食品中的应用[J]. 食品工业科技, 2012, (14): 371-375.
- Yuan P, Chen Y, Xiao F, *et al.* Biological activity of curcumin and its application in food [J]. Food Ind, 2012, (14): 371-375.
- [8] 彭知云, 黄伟, 关郁芳, 等. 生姜保健果冻的研制[J]. 食品与发酵科技, 2009, (04): 74-76.
- Peng ZY, Huang W, Guan YF, *et al.* Development of ginger jelly health [J]. Food Ferment Technol, 2009, (04): 74-76.
- [9] 冯颖, 王建国. 姜汁果冻的研制[J]. 食品科技, 2005, (04): 49-50.
- Feng Y, Wang JG. Development of ginger jelly [J]. Food Sci Technol, 2005, (04): 49-50.
- [10] 张燕红, 王娜, 范会平, 等. 姜枣保健果冻微波工艺研究[J]. 河南农业大学学报, 2012, (04): 427-433.
- Zhang YH, Wang N, Fan HP, *et al.* Health research ginger jelly jujube microwave technology [J]. Henan Agric Univ, 2012, (04): 427-433.
- [11] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]
- GB 2760-2014 National food safety standards of food additives using a standard [S]
- [12] 秦晓燕, 龚菊梅, 陈卫东. 总姜黄素 3 种单体高纯度同时分离方法[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(1): 73-77.
- Qin XY, Gong JM, Chen WD. Total curcumin three kinds of monomers simultaneously high purity separation [J]. Anhui Univ Chin Med, 2012, 31 (1): 73-77.
- [13] 施冰. 高效液相色谱法测定食品中的姜黄素[J]. 福建分析测试, 2008, 17(3): 28-30.
- Shi B. Determination of curcumin in food [J]. Fujian Anal Test, 2008, 17 (3): 28-30.
- [14] 韩超, 朱振瓯, 刘滨, 等. 微波辅助萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定温郁金中 3 个姜黄素类化合物[J]. 药物分析杂志, 2013, (02): 185-188.
- Han C, Zhu ZO, Liu B, *et al.* Microwave assisted extraction - high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry temperature turmeric in three curcuminoids [J]. J Pharm Anal, 2013, (02): 185-188.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



方恩华, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: fangeh@xmciq.gov.cn



吴茗梅, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 1037919935@qq.com