

# 高效液相色谱法检测食品中姜黄素类化合物

张盼盼<sup>1</sup>, 钱疆<sup>2</sup>, 杨方<sup>2\*</sup>, 程权<sup>3</sup>, 陈健<sup>2</sup>, 张玉燕<sup>2</sup>

(1. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350108; 2. 福建出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 福建福州 350001; 3. 福州大学化学系, 食品安全分析与检测教育部重点实验室, 福建省食品安全分析与检测重点实验室, 福建 福州 350108)

**摘要:** 建立了食品中姜黄素类化合物的液相色谱分析方法。采用甲醇提取试样中姜黄素及其同系物去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素, 以 YMC<sup>TM</sup> Carotenoid 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离, 甲醇水溶液(A) - 甲基叔丁基醚(B)梯度洗脱。对所分析化合物的稳定性、前处理条件及色谱条件进行考察。3种分析物在 0.5 ~ 100 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.997 7 ~ 0.999 8。在 10 ~ 100 mg/kg 加标浓度范围内, 平均回收率为 72.2% ~ 102%, 相对标准偏差为 3.4% ~ 13.8%。对姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素的检出限分别为 6、5、5 mg/kg。方法稳定、可靠, 已应用于实际样品的检测。

**关键词:** 姜黄素类化合物; 高效液相色谱; 分析

中图分类号: O657.72; TQ457.25 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 4957(2013)09 - 1127 - 04

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2013.09.018

## Determination of Curcuminoids in Food by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Pan-pan<sup>1</sup>, QIAN Jiang<sup>2</sup>, YANG Fang<sup>2\*</sup>, CHENG Quan<sup>3</sup>, CHEN Jian<sup>2</sup>, ZHANG Yu-yan<sup>2</sup>

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350108, China; 2. Inspection and Quarantine Center of Fujian Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China; 3. Fujian Provincial Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food Safety, MOE Key Laboratory of Analysis and Detection for Food Safety, Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** An effective high-performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the determination of three curcuminoids, e. g. curcumin (Cur I), demethoxycurcumin (Cur II) and bisdemethoxycurcumin (Cur III), in food. The analytes were extracted from homogenised samples using methanol, and separated on a YMC<sup>TM</sup> Carotenoid column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by using methanol - water (A) and methyl tertiary butyl ether (B) as mobile phase. The influences of experimental conditions were investigated. Under the optimal conditions, the calibration curves were linear in the range of 0.5 - 100 μg/mL, with correlation coefficients of 0.997 7 - 0.999 8. The average recoveries at spiked concentration range of 10 - 100 mg/kg ranged from 72.2% to 102% with relative standard deviations of 3.4% - 13.8%. The limits of detection (LOD) of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were 6, 5 mg/kg and 5 mg/kg, respectively. This method is suitable for the determination of curcuminoids in food.

**Key words:** curcuminoids; high-performance liquid chromatography (HPLC); determination

天然食品着色剂姜黄素(Curcuminoids)是从姜黄属植物姜黄、郁金、莪术等块茎中提取的一种酚类色素, 主要包括姜黄素(Curcumin, 约占70%)、去甲氧基姜黄素(Demethoxycurcumin, 约占10%~20%)和双去甲氧基姜黄素(Bisdemethoxycurcumin, 约占10%)3种同系物(见图1)<sup>[1]</sup>。我国食品添加剂使用卫生标准 GB 2760 规定姜黄素可作为食用色素用于糕点、饮料、糖果、冷冻饮品等食品中, 同时对其使用量进行了规定。姜黄素也是欧盟批准使用的食品添加剂, 广泛用于如芥末及腌制食品中。大量研究表明, 姜黄素具有调节血脂、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化及防止衰老等多方面药理作用<sup>[2-5]</sup>, 符合当前人们对天然健康饮食的要求, 受到越来越多的青睐。但一小部分不法商人为牟取利益, 谎称

收稿日期: 2013-04-08; 修回日期: 2013-05-08

基金项目: 十二五国家科技支撑计划产学研项目(2011BAK10B04); 食品安全国家标准制修订项目(spaq-2012-67); 福建省科技厅重点项目(2010Y0001)

\*通讯作者: 杨方, 博士, 主任技师, 研究方向: 食品安全分析, Tel: 0591-87065506, E-mail: yfjciq@gmail.com

食品中添加了天然色素或营养强化剂进行虚假宣传,因此需要有适宜的检测方法加以识别。

已有不少文献对姜黄素类化合物的分析方法进行报道,包括早期的分光光度法<sup>[6]</sup>和薄层色谱法<sup>[7-8]</sup>以及近年来的近红外光谱法<sup>[9]</sup>、毛细管电泳法<sup>[10]</sup>、流动注射法<sup>[11]</sup>和液相色谱-质谱法<sup>[12-13]</sup>等,其中液相色谱法在姜黄素类化合物的检测中发挥了重要作用<sup>[14-15]</sup>,也是报道最多的方法。但这些方法大多针对姜黄属植物进行研究<sup>[16-17]</sup>,对于作为食品添加剂使用的姜黄素类化合物的检测研究报道较少,部分文献报道仅针对姜黄素 1 种化合物<sup>[18]</sup>。由于作为天然食品着色剂使用的姜黄素是混合物,因此,有必要对姜黄素的主要成分进行分析。本文采用高效液相色谱法建立了食品中姜黄素类化合物的检测方法,优化了前处理及色谱条件,并进行方法学验证,用于实际样品检测,结果满意。方法能很好地满足各类食品中姜黄素类化合物的检测需求。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(美国沃特世有限公司)。

姜黄素(CAS 458-37-7)、去甲氧基姜黄素(CAS 24939-17-1)和双去甲氧基姜黄素(CAS 24939-16-0)对照品(纯度为 98%,上海 Pureone BioTech 公司)使用时以甲醇溶解,配制成适宜浓度的标准溶液。甲醇、乙腈、甲基叔丁基醚(色谱纯,德国 Merck 公司);其余试剂均为分析纯,购自上海试一化学试剂有限公司;实验用水为超纯水。试验材料咖喱粉、汤料、调味料、薯片、饼干等均购自当地市场。

### 1.2 样品前处理

称取约 2 g 匀样于 50 mL 离心管中,以 3 × 30 mL 甲醇涡旋振荡 2 min 后超声提取 10 min, 4 500 r/min 离心 2 min,取上清液,于 40 °C 减压浓缩至溶液体积少于 5 mL,以甲醇定容至 25 mL,过 0.45 μm 有机滤膜,待测。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: YMC™ Carotenoid 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温 35 °C;流速 1.0 mL/min;进样量 20 μL;检测波长为 430 nm;流动相 A 为甲醇-水(85:15),流动相 B 为甲基叔丁基醚,梯度洗脱,0~10 min: 100% A; 10~11 min: 100%~10% A; 11~20 min: 10% A; 20~21 min: 10%~100% A。

## 2 结果与讨论

### 2.1 姜黄素类化合物的稳定性

取目标化合物浓度均为 200 μg/mL 的混合标准溶液 3 份,分别置于户外、室内及暗处,于 0、2、4、8 h 后测定,以 3 种化合物峰面积之和为纵坐标、放置时间为横坐标作图。结果显示,光照可致姜黄素类化合物降解,这与文献报道一致<sup>[19]</sup>。但在室内光照及暗处,姜黄素类化合物可稳定存在,因此,实验选择在室内进行。另外,本文对姜黄素类化合物在样品处理过程中的稳定性也进行了探讨,取以甲醇为溶剂的目标化合物浓度为 200 μg/mL 的混合标准溶液,按“1.2”进行实验操作,实验结果表明姜黄素类化合物未发生变化。

### 2.2 提取溶剂的选择

姜黄素类化合物是由 2 个邻甲基化的酚以及 1 个 β-二酮组成,属于多酚类,不溶于水和乙醚,溶

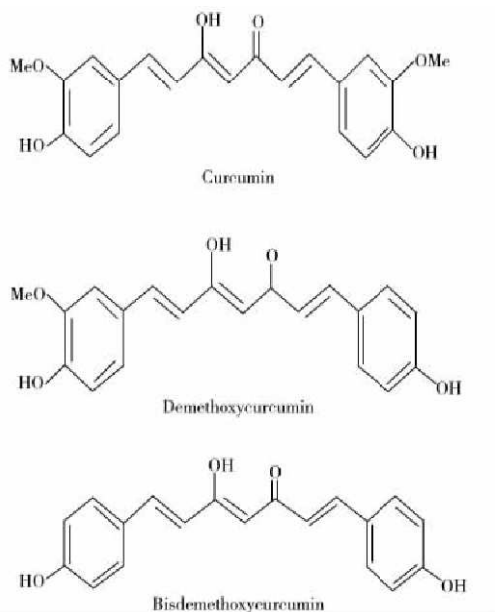


图 1 姜黄素类化合物的分子结构式  
Fig. 1 Molecule structures of curcuminoids

于乙醇、丙酮、冰醋酸和丙二醇等。本文进行了提取溶剂的选择实验。以标识含有姜黄素添加成份的咖喱粉为基体, 比较了乙酸、甲醇、乙腈、丙酮、三氯甲烷、异丙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、二氯甲烷和正丁醇等常见溶剂对姜黄素类化合物的提取效果, 结果见图2。由图可见, 乙酸和甲醇对3种化合物的提取效果较好。在此基础上, 本文同时试验了5% 乙酸甲醇的提取效果, 并与甲醇的提取效果进行比较, 结果无明显差别。为方便后续浓缩, 本文选择甲醇作为最佳提取溶剂。

本文还比较了超声提取、涡旋振荡和高速均质3种常见提取方式, 并对提取时间进行了考察, 最终确定以甲醇超声提取10 min后, 再以甲醇涡旋振荡重复提取2次的操作方式。

### 2.3 色谱条件的优化

在已报道的HPLC测定姜黄素类化合物中, 大多采用C<sub>18</sub>柱在较复杂的流动相体系与洗脱梯度下进行分离<sup>[20-21]</sup>。C<sub>30</sub>柱的出现为包括姜黄素类化合物在内的胡萝卜素类化合物的分离提供了新的选择。本文采用的YMC<sup>TM</sup> Carotenoid色谱柱为硅胶基质上键合了C<sub>30</sub>烷基的反相液相色谱柱, 烷基链较长, 疏水性强, 使被分离组分与固定相的相互作用增强, 有较好的分离效果。在参考文献的基础上<sup>[22-24]</sup>, 本文比较了几种流动相和洗脱条件, 其中包括甲醇-乙腈-二氯甲烷-水、甲醇-甲基叔丁基醚-水、乙腈-磷酸水溶液和甲醇-甲基叔丁基醚-1 mmol/L 乙酸铵溶液, 结果表明, 甲醇-甲基叔丁基醚-水流动体系可有效分离3种化合物, 获得较理想的峰形与灵敏度。本文最终选择流动相为甲醇-水(85:15)(A)及甲基叔丁基醚(B)进行梯度洗脱。

实验还考察了柱温对分离的影响, 结果表明, 适当提高柱温可使保留时间缩短, 在不影响分离度的前提下, 最终选择柱温为35℃。

在上述优化条件下, 3种姜黄素类化合物有较好的分离。图3为3种姜黄素类化合物标准品与实际样品(咖喱粉)的色谱图, 从图中可见, 本文所建立的色谱条件在实际检测中应用效果良好, 样品基体干扰可以忽略。

### 2.4 线性关系、检出限及回收率

在优化实验条件下, 测定不同浓度姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素的色谱信号, 并以峰面积( $y$ )对标准溶液的质量浓度( $x$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )作图。结果显示, 在0.5~100  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围内, 3种化合物呈良好的线性关系, 线性方程分别为 $y = 1.43 \times 10^5 x - 4.46 \times 10^4$ ,  $y = 1.47 \times 10^5 x - 6.99 \times 10^4$ ,  $y = 1.59 \times 10^5 x - 1.33 \times 10^5$ , 相关系数分别为0.9977、0.9998和0.9997。以3倍信噪比测得姜黄素、去甲氧基姜黄素及双去甲氧基姜黄素的检出限分别为6、5、5 mg/kg。

分别以未添加姜黄素类化合物的薯片、鸡精和饼干等阴性样品作为基质, 进行10、20、100 mg/kg 3个浓度水平的加标回收实验, 每种样品基体、每个加标水平重复测定6次, 回收率与相对标准偏差见表1。由表1可见, 对于所添加的3个浓度水平, 3种化合物的回收率为72.2%~102%, 相对标准偏差均小于15%, 结果令人满意。

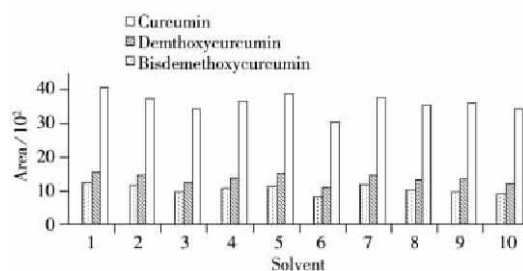


图2 不同提取溶剂的提取效率比较

Fig. 2 Extraction capability of different extract solvents for curcuminoids

1. acetic acid, 2. methanol, 3. acetonitrile, 4. acetone,
5. chloroform, 6. isopropanol, 7. ethyl acetate,
8. tetrahydrofuran, 9. dichloromethane, 10. butanol

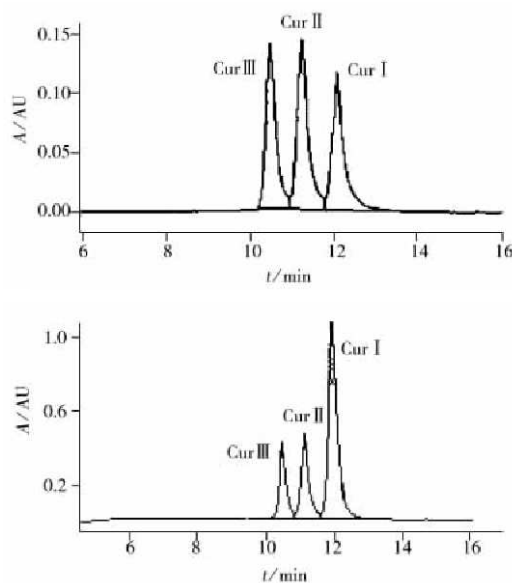


图3 姜黄素类化合物标准品(A)及咖喱粉(B)的色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of curcuminoids (A) and curry powder (B)

- Cur I: curcumin, Cur II: demethoxycurcumin,  
Cur III: bisdemethoxycurcumin

表 1 3 种姜黄素类化合物的平均回收率与相对标准偏差( $n=6$ )Table 1 Average recoveries and the relative standard deviations (RSDs) of three curcuminoids ( $n=6$ )

Sample	Spiked $w/$ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Recovery $R/\%$			RSD $s_r/\%$		
		Cur I	Cur II	Cur III	Cur I	Cur II	Cur III
Potato chips (薯片)	10,20,100	99.7,97.5,92.1	94,93.5,98.5	102,99.5,102	6.4,9.6,4.1	8.6,6.4,3.9	10.9,3.9,9.2
Chicken essence (鸡精)	10,20,100	77.3,80.5,82.2	76.6,76.5,76.2	72.2,87.0,79.8	3.6,3.4,10.8	8.2,3.7,4.7	8.6,6.8,9.7
Biscuit(饼干)	10,20,100	101,94.5,93.3	93.5,93.3,94.2	97.2,95.5,97.4	8.1,12.7,7.7	5.4,7.3,13.1	11.7,13.8,7.4

## 2.5 实际样品的检测

将该方法应用于食品中姜黄素类化合物的检测。表 2 为购自福州市市场的标识含有姜黄素类化合物的双枪牌咖喱粉、味好美咖喱粉、浓汤宝、家乐汤料的检测结果。结果显示,4 种样品均检出姜黄素及其同系物。

表 2 市售食品中姜黄素类化合物的检测结果

Table 2 Analysis results of curcuminoids in food obtained from local market

 $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$ 

Sample	Cur I	Cur II	Cur III
Waugh's curry powder(双枪牌咖喱粉)	813.4 ± 21.2	281.6 ± 14.3	203.5 ± 16.9
McCormick curry powder(味好美咖喱粉)	668.3 ± 23.3	239.1 ± 15.5	175.7 ± 21.3
Treasure soup(浓汤宝)	23.2 ± 1.8	10.9 ± 1.1	10.1 ± 0.8
Knorr soup(家乐汤料)	21.3 ± 1.6	<5	<5

## 参考文献:

- [1] Revathy S, Elumalai S, Benny M, Antony B. *J. Exp. Sci.*, **2011**, 2(7): 21-25.
- [2] Li M, Zhang Z, Hill D L, Wang H, Zhang R. *Cancer Res.*, **2007**, 67(5): 1988-1996.
- [3] Bharti A C, Donato N, Singh S, Aggarwal B B. *Blood*, **2003**, 101: 1053-1062.
- [4] Singh R K, Yadav D, Bhargava A, Balzarini J, Clercq E D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45: 1078-1086.
- [5] Sandur S K, Pandey M K, Sung B, Ahn K S, Murakami A, Sethi G, Limtrakul P, Badmaev V, Aggarwal B B. *Carcinogenesis*, **2007**, 28: 1765-1773.
- [6] A. S. T. Association, Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association, **1985**, Englewood Cliffs, NJ.
- [7] Pathania V, Gupta A P, Singh B. *J. Liq. Chromatogr. Related. Technol.*, **2006**, 29(6): 877-887.
- [8] Paramasivam M, Poi R, Banerjee H, Bandyopadhyay A. *Food Chem.*, **2009**, 113: 640-644.
- [9] Tanaka K, Kuba Y, Sasaki T, Hiwatashi F. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56: 8787-8792.
- [10] Yuan K, Weng Q, Zhang H, Xiong J, Xu G. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, 38(1): 133-138.
- [11] Thongchai W, Liawruangrath B, Liawruangrath S. *Food Chem.*, **2009**, 112: 494-499.
- [12] Li W, Xiao H B, Wang L X, Liang X M. *Chin. J. Chromatogr.* (李伟, 肖红斌, 王龙星, 梁鑫淼. 色谱), **2009**, 27(3): 264-269.
- [13] Saradhi U V R V, Ling Y, Wang J, Chiu M, Schwartz E B, Fuchs J R, Chan K K, Liu Z. *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878: 3045-3051.
- [14] Jadhav B K, Mahadik K R, Paradkar A R. *Chromatographia*, **2007**, 65(7/8): 483-488.
- [15] Han Y R, Zhu J J, Wang Y R, Wang X S, Liao Y H. *Biomed. Chromatogr.*, **2011**, 25(10): 1144-1149.
- [16] Wang Y, Hu W Y, Wang M Z. *Acta Pharm. Sin.* (王琰, 胡文言, 王慕邹. 药学报), **1999**, 34(6): 467-470.
- [17] Jin C, Kong W, Luo Y, Wang J, Wang H, Li Q. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 53: 43-49.
- [18] Xia C. *Chem. Anal. Meterage*(夏春. 化学分析计量), **2011**, 20(1): 54-55.
- [19] Wang X M, Chen L H, Shi W T. *J. Anhui Univ. : Nat. Ed.* (王雪梅, 陈利华, 施文婷. 安徽大学学报: 自然科学版), **2012**, 36(3): 73-78.
- [20] Yang C H, Xiang Z M, Yao Y D, Jin B, Liu H C. *J. Instrum. Anal.* (杨承鸿, 向智敏, 姚煜东, 金波, 刘汉槎. 分析测试学报), **2005**, 24(2): 86-88.
- [21] Li R, Xiang C, Ye M, Li H F, Zhang X, Guo D A. *Food Chem.*, **2011**, 126: 1890-1895.
- [22] Kao T H, Loh C H, Inbaraj B S, Chen B H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 66: 144-153.
- [23] Taylor K L, Brackenridge A E, Vivier M A, Oberholster A. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1121(1): 83-91.
- [24] Gleize B, Steib M, Andre M, Reboul E. *Food Chem.*, **2012**, 134(4): 2560-2564.