

对保健食品中芦荟苷测定标准的改进建议

朱晓玲*, 刘杰, 张莉, 严恒, 余婷婷, 蒋丽萍, 李玲
(湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430070)

摘要: **目的** 探讨我国保健食品中芦荟苷测定方法标准中可能存在的问题并提出相关建议。**方法** 采用保健食品检验与评价技术规范(2003年版)中测定芦荟苷的方法对大量市售的以芦荟苷为主要功效成分的保健食品样品进行检测分析, 通过实践对所遇到的问题进行分析总结。**结果** 芦荟苷是两个非对映异构体芦荟苷A和芦荟苷B的混合物, 采用标准方法所测的保健食品中的芦荟苷含量可能仅为芦荟苷A的含量, 而并不是芦荟苷的总含量。**结论** 建议对保健食品中芦荟苷的测定方法进行进一步深入研究, 以逐步完善国家标准。

关键词: 保健食品; 芦荟苷; 标准; 改进建议

Improvement suggestion for analytical standards of aloin in health care food

ZHU Xiao-Ling*, LIU Jie, ZHANG Li, YAN Heng, YU Ting-Ting, JIANG Li-Ping, LI Ling

(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Objective To explore the existing problem of analytical standards for aloin in health care food and to improve the measures in China. **Methods** Aloin in health care food was determined according to Technical Standards for Testing and Assessment of Health Food (The 2003 edition), and the problems encountered through the experiment were analyzed and summarized. **Results** Aloin was a mixture of two non-enantiomer aloin A and aloin B. The standard method in health care food just measured the content of aloin A, but not the total aloin content. **Conclusion** It is necessary to further the study of determination method of aloin in health care food, in order to lay the foundation for further improvement of the standard in China.

KEY WORDS: health food; aloin; standard; suggestions

1 引言

芦荟是百合科多年生肉质草本植物^[1]。近年来, 芦荟在医药、保健食品、化妆品等领域的应用十分广泛。芦荟的主要成分为蒽醌类化合物, 芦荟苷是芦荟中最主要的蒽醌类成分, 具有增强免疫、抗肿瘤、致泻通便、抗菌、抗胃损伤及保肝、保护皮肤等功能^[2]。随着芦荟的应用越来越广泛, 对保健食品中的主要有效成分芦荟苷的测定也极为重要^[3], 芦荟苷的存在

与否是芦荟产品中是否真正添加了芦荟的重要衡量指标, 因此, 有必要对保健食品中的芦荟苷含量进行准确测定。

关于芦荟产品中芦荟苷的测定方法较多, 文献报道的有比色法^[4]、紫外分光光度法^[5]、荧光法^[6]、TLC法^[7,8]、极谱法^[9]、高效液相色谱法^[10-15]、毛细管电泳法^[16,17]、液相色谱-串联质谱法^[18,19]等, 其中高效液相色谱法是芦荟苷测定的最常见方法。目前, 国内机构对保健食品中的芦荟苷含量采用保健食品检

*通讯作者: 朱晓玲, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测与色谱分析。E-mail: chuandian1987@aliyun.com

*Corresponding author: ZHU Xiao-Ling, Masters, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430070, China. E-mail: chuandian1987@aliyun.com

验与评价技术规范(2003 年版)^[20]中规定的方法, 本文采用此法对市售的以芦荟苷为功能成分的保健食品进行检测, 就实际检测过程中所遇到的问题对标准提出相应的改进建议。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

U3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司, 配二极管阵列检测器); Xevo TQ-S 三重四级杆高效液相色谱-串联质谱联用仪(美国 Waters 公司); 超声波清洗器(深圳现代有限公司); 高速冷冻离心机(美国 Bechman 公司); 超纯水器(英国威立雅水处理技术有限公司); 万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 0.22 μm 有机相滤膜(德国 MEMBRANA 公司)。

芦荟苷标准物质(纯度 97.00%, 阿拉丁公司); 甲醇(色谱纯, 美国默克公司); 其他试剂为分析纯, 保健食品样品为市售。

2.2 色谱条件

HPLC 条件: 色谱柱为 C_{18} 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相为 55%甲醇+45%水; 流速为 0.7 mL/min; 进样量 10 μL ; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; DAD 扫描波长范围为 200~600 nm, 紫外检测波长为 293 nm。

质谱条件: 离子源为 ESI 源, 负离子模式扫描, 采用子离子扫描和选择离子对扫描两种方式进行监测, MRM 扫描检测定量离子对为 417.09 > 297.03, 定性离子对为 417.09 > 268.22, 417.09 > 251.06。

2.3 标准溶液的配制

芦荟苷标准储备液(2.00 mg/mL): 准确称取芦荟苷标准品 0.0200 g, 加甲醇-水(55:45, v:v)溶解并移入 10 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 配成质量浓度为 2.00 mg/mL 的芦荟苷标准储备液, 冷冻避光保存。再将芦荟苷标准储备液逐级稀释成 2.0、4.0、10、20、40、100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液, 供液相测定时使用, 临用时配制。液质测定时需将标准溶液进一步稀释至适当浓度后使用, 以免污染仪器。

2.4 样品处理

按照保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)中规定的保健食品中芦荟苷的测定方法进行样品处理。

对于固体样品, 将固体试样粉碎成粉末状, 混匀。准确称取粉碎处理后的试样 1.00 g 于 50 mL 容量瓶中, 加检测用流动相 30 mL 溶解, 超声提取 5 min, 加流动相定容至 50 mL, 摇匀, 离心沉淀, 上清液经滤膜过滤, 滤液供 HPLC 分析。

对于液体试样, 如芦荟汁饮料, 直接经滤膜过滤, 供 HPLC 分析。

2.5 结果计算

$$X = \frac{A_1 \times C}{A_2 \times m}$$

式中: X ——试样中芦荟苷含量, mg/g (mg/mL);

A_1 ——试样中芦荟苷的峰面积;

C ——标准溶液的质量浓度, mg/mL;

A_2 ——标准溶液中芦荟苷的峰面积;

V ——试样定容体积, mL;

m ——试样的质量, g (mL)。

3 结果与分析

3.1 定性分析

分别将经处理后的样品溶液与所配制的标准工作溶液注入液相色谱仪, 根据保留时间初步定性, 并采用二极管阵列检测器的全波长扫描功能对比供试液与标准液的紫外光谱图以进一步定性, 图 1 为标准品和样品的色谱图和相应的紫外光谱图。通过对比, 可发现样品中保留时间为 5.4 min 的色谱峰即为芦荟苷目标峰。

通过对市售的 6 个保健食品样品检测, 发现在 6 个样品的色谱图中, 除了保留时间为 5.4 min 的目标峰外, 均在 4.9 min 处有一峰的浓度与芦荟苷相近, 且与芦荟苷的紫外光谱图也一致, 疑为芦荟苷的同分异构体。李婷等^[21]指出芦荟苷存在芦荟苷 A 和芦荟苷 B 两种同分异构体, 两者的主要区别在于葡萄糖基团在蒽酮基的位置不同。芦荟苷 A 分子具有反式结构, 芦荟苷 B 分子具有顺式结构, 两者的结构式见图 2。因此, 为了进一步明确样品色谱图中保留时间为 4.9 min 的峰情况, 本文采用 LC-MS/MS 对样品进行了进一步分析, 芦荟苷为极性化合物, 其分子量为 418.39, 在 ESI^+ 和 ESI^- 两种模式下, 芦荟苷分子离子峰信号均较强, 因此可以分别采用 ESI^+ 和 ESI^- 两种模式对样品中所含的化合物进行进一步定性确认。本文主要以 ESI-扫描模式为例进行定性分析说明。

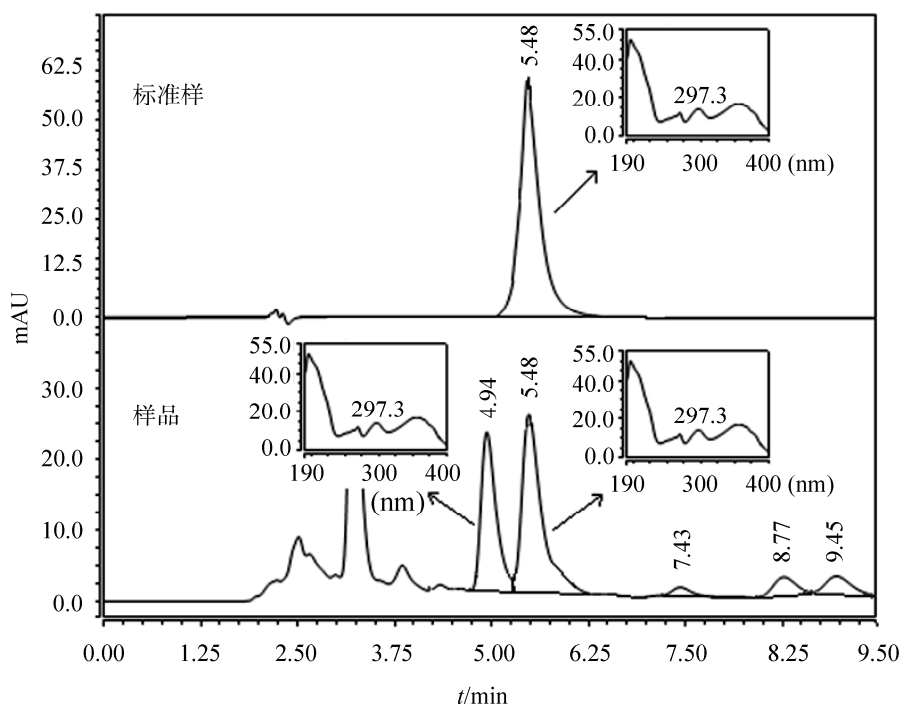


图 1 标准溶液和样品溶液的液相色谱图和相应的紫外光谱图

Fig. 1 Liquid chromatogram and UV spectrum of the standard solution and sample solution

采用芦荟苷标准溶液进行质谱仪器的条件优化, 在 ESI-模式下进行一级全扫描时, 芦荟苷分子失去一个质子形成 m/z 为 417 的负离子峰, 然后对分子离子峰进行二级质谱分析, 采用仪器自带的优化软件对质谱参数进行自动优化, 使特征碎片离子对信号强度的响应值达到最佳, 最终得到 MRM 扫描检测的定量离子对为 417.09 > 297.03, 定性离子对为 417.09 > 268.22, 417.09 > 251.06。采用此三对离子对对标准溶液和样品溶液进行测定, 得到色谱图见图 3。从图 3 中可以看出, 在进行 MRM 选择离子对监测时, 样品溶液中也出现了两个色谱峰, 且分子离子和碎片离子均与芦荟苷标准溶液相同, 一般三重四级杆质谱对化合物进行分析, 主要采用离子碎片和离子丰度比进行物质定性, 通过计算, 样品溶液色谱峰与芦荟苷标准溶液色谱峰各离子丰度比均为 87:8:5, 因此可初步确定样品中的两色谱峰为芦荟苷的同分异构体。为了进一步确认推断, 开启仪器的 PICS 功能进行子离子确证扫描, 即在对样品进行 MRM 扫描的同时对化合物进行增强子离子全扫描, 得到样液中两个色谱峰的子离子全扫描碎片质谱图见图 4。通过图 4 可以看出当碰撞能量设置为 12 时, 样液中的两种化合物均仅出现 296.9 的碎片离子, 当加大碰撞能量

至 20 时, 样液中两化合物碎片离子增多, 且基本吻合, 可基本确证为芦荟苷的同分异构体芦荟苷 A 和芦荟苷 B。陈欣霞等^[22]在测定芦荟样品中的蒽醌类成分时也分别检出了芦荟苷 A 和芦荟苷 B。表明芦荟苷是两个非对映异构体芦荟苷 A 和芦荟苷 B 的混合物, 但采用标准方法所测的保健食品中的芦荟苷含量仅为芦荟苷 A 的含量, 而并不是芦荟苷的总含量。

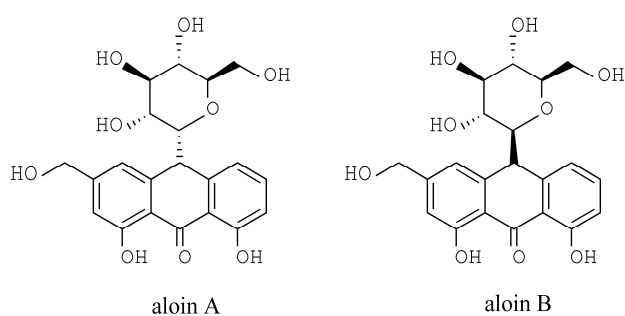


图 2 芦荟甙 A 和 B 的化学结构式

Fig. 2 Chemical formula of aloin A and B

3.2 稳定性研究

由于芦荟苷不稳定, 易受外界因素的影响发生结构变化^[23], 因此标准溶液的保存以及样品处理后的测定实效性直接影响到测定结果的准确性。李凌军

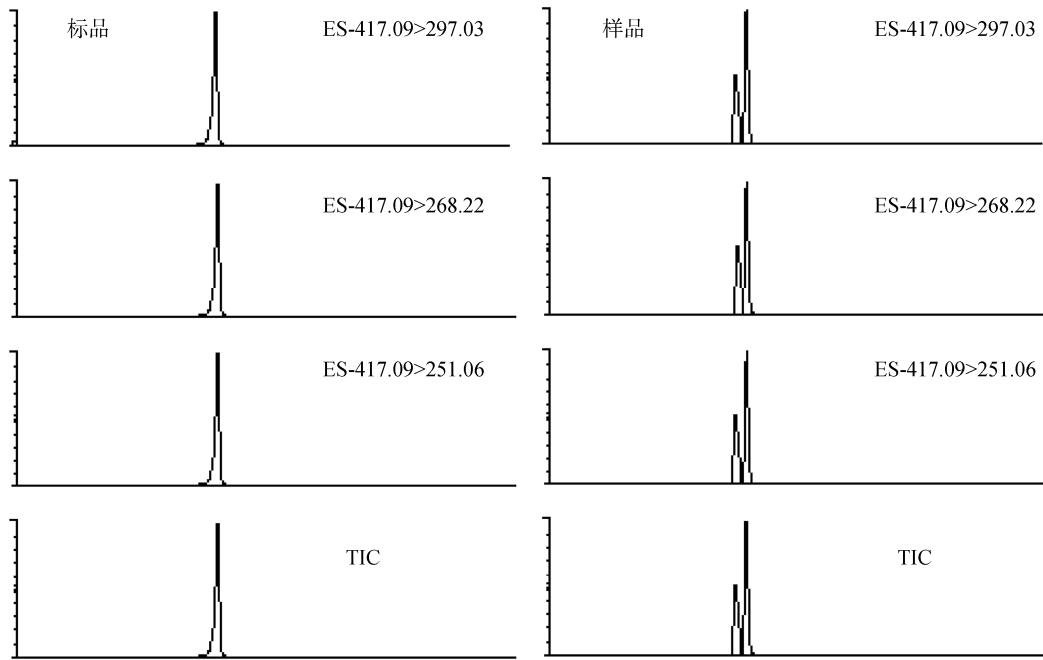


图 3 标准溶液和样品溶液 MRM 监测色谱图

Fig. 3 MRM monitoring chromatogram of standard solution and sample solution

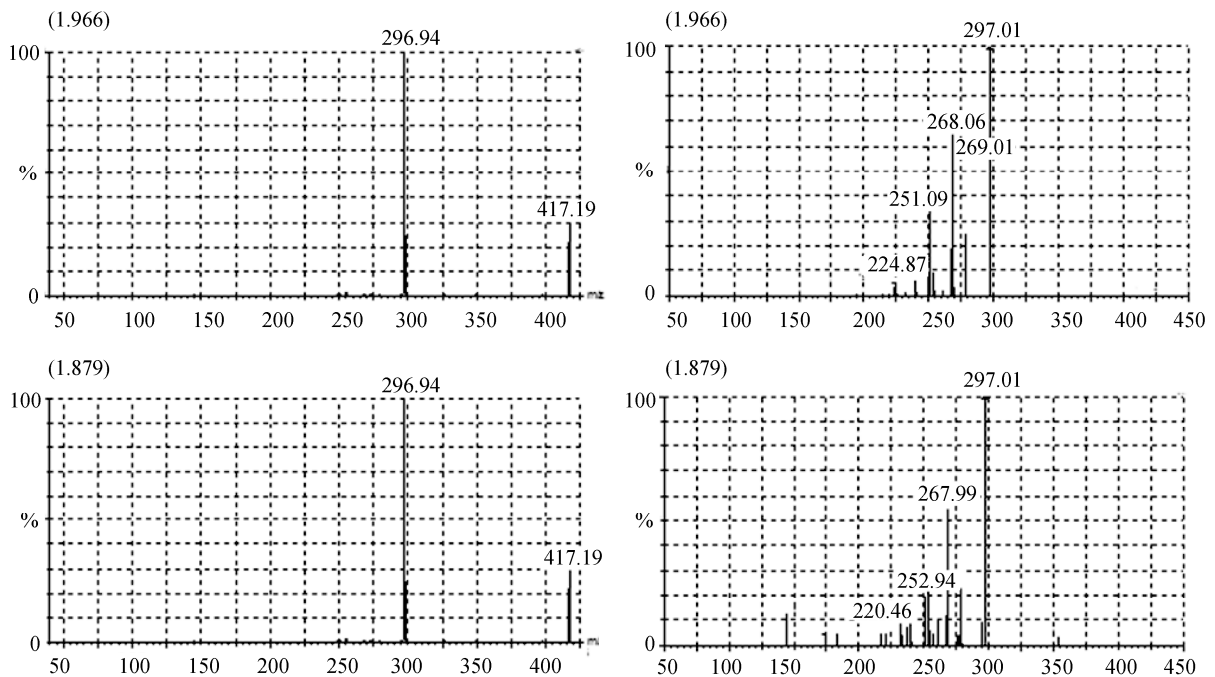


图 4 子离子扫描碎片质谱图

Fig. 4 Ion fragment spectrum of daughter ion scan

等^[24]指出芦荟苷对热、光均不稳定, 高温时含量会迅速降低, 4 °C避光 10 d 内含量基本稳定, 在碱性溶液中极不稳定, 易氧化为芦荟大黄素等多种物质。本实

验将标准工作溶液在室温下放置, 5 d 内间断进样以观察色谱峰的变化情况, 结果发现放置一天后芦荟苷标准溶液色谱峰即开始变形。因此, 在实验过程中,

固体标准品应尽量注意避光保存, 液体标准储备液应冷冻避光保存, 标准工作溶液应现用现配。

4 对标准的改进建议

4.1 建议增加标准溶液的储存说明和样品及时测定的备注说明

在保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)中对芦荟苷测定时, 没有对标准溶液的储存环境进行说明, 也没有对样品的测定实效性进行备注, 由于芦荟苷不稳定, 若测定不及时或标准溶液已变质, 则直接影响结果的准确与否, 因此, 建议在整个实验过程中, 固体标准品应避光保存, 液体标准储备液应冷冻避光保存, 标准工作溶液应现用现配, 样品处理后应及时测定。

4.2 建议对芦荟苷测定时分别测定芦荟苷 A 和芦荟苷 B 的含量

芦荟苷是两个非对映异构体芦荟苷 A 和芦荟苷 B 的混合物, 张美玲^[25]在文献中指出芦荟苷同分异构体 A 具有较高的实用价值, 但具体的潜在毒性研究较少。但在保健食品中, 芦荟苷 A 和 B 的比例随使用的提取方法不同而有所差异, 由于各生产厂家所采用的提取方法、条件不一, 要将芦荟苷异构体分离纯化具有一定的难度, 需要更高的成本, 因此, 目前芦荟制品中的芦荟苷多以混合物的形式存在。因此, 在对芦荟制品中芦荟苷的含量进行测定时, 可以考虑单独测定芦荟苷 A 和芦荟苷 B 的含量, 以保证产品的有效性与安全性。

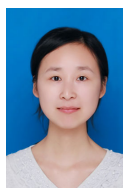
参考文献

- [1] 李启虔, 李军生, 阎柳娟, 等. 芦荟保健食品的潜在安全隐患分析[J]. 中医杂志, 2010, 51(1): 260-262.
Li QQ, Li JS, Yan LJ, *et al.* Potential security risk analysis of aloe health food[J]. *J Tradit Chin Med*, 2010, 51(1): 260-262.
- [2] 卢朝国, 王红专, 李燕红, 等. 高效液相色谱法同时测定芦荟中芦荟苷和芦荟大黄素的含量[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(3): 584-586.
Lu CG, Wang HZ, Li YH, *et al.* Simultaneous determination of Aloin and Aloe emodin in Aloe by HPLC[J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2008, 43(3): 584-586.
- [3] 赵霞, 郭舒岗. 高效液相色谱法评定保健食品中芦荟苷含量的不确定度[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(4): 455-456.
Zhao X, Guo SG. Uncertain assessment of the HPLC method determine aloin in healthy food[J]. *Chin Remed Clin*, 2012, 12(4): 455-456.
- [4] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 2000 年版第一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
State Pharmacopoeia Commission. First of the 2000 edition of People's Republic of China Pharmacopoeia [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [5] 李光文, 陈伟, 黄丽英, 等. 多波长直线回归法同时测定芦荟苷和芦荟大黄素的含量[J]. 光谱实验室, 2005, 22(5): 1021-1024.
Li GW, Chen W, Huang LY, *et al.* Determination of the Aloin and Aloe-Emodin by Multi-Wavelength Linear Regression Method[J]. *Chin J Spectrosc Lab*, 2005, 22(5): 1021-1024.
- [6] 黄丽英, 赖丽, 陈伟, 等. 荧光法测定芦荟康胶囊中芦荟大黄素和芦荟苷[J]. 福建医科大学学报, 2006, 40(2): 182-184.
Huang LY, Lai L, Chen W, *et al.* The Fluorimetric Determination of Aloe-emodin and Aloin in Aloe Capsules[J]. *J Fujian Med Univ*, 2006, 40(2): 182-184.
- [7] 李多伟, 李稳宏, 王锋, 等. 薄层扫描法测定芦荟中芦荟甙含量的方法研究[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 102-104.
Li DW, Li WH, Wang F, *et al.* Determination of aloin in aloe by TLC method[J]. *Food Sci*, 2002, 23(5): 102-104.
- [8] Silvia AC, Gianluca B, Massimo BA. Selective determination of aloin in different matrices by HPTLC densitometry in fluorescence mode[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(2): 422-425.
- [9] 熊晓燕, 向仕学, 刘一. 单扫描极谱法测定保健食品中芦荟甙[J]. 预防医学情报杂志, 2006, 22(3): 367-368.
Xiong XY, Xiang SX, Liu Y. Determination of aloin in health food by single sweep polarography[J]. *J Prev Med Inf*, 2006, 22(3): 367-368.
- [10] 方子季, 许自明, 徐霞. 反相高效液相色谱法测定芦荟中芦荟苷及芦荟大黄素[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(9): 541-544.
Fang ZJ, Xu ZM, Xu X. Determination of Aloin and Aloe-emodin in Aloe by HPLC[J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2002, 22(9): 541-544.
- [11] 马晶军, 方正, 吴秋华, 等. HPLC 法测定芦荟体内芦荟苷、芦荟大黄素含量的研究[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(2): 57-60.
Ma JJ, Fang Z, Wu QH, *et al.* On determination of Aloin and Aloe-emodin in Aloe barbadensis mill by HPLC[J]. *J Agric Univ Hebei*, 2005, 28(2): 57-60.
- [12] 方翠芬, 陈碧莲. RP-HPLC 法测定复方芦荟片中芦荟苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(6): 305-306.
Fang CF, Chen BL. Determination of Aloin in Compound Aloe piece By RP-HPLC[J]. *J Northwest Pharm*, 2007, 22(6):

- 305-306.
- [13] 龙洲雄, 万春花, 胡海山, 等. 反相液相色谱法测定芦荟制品中芦荟苷的含量[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 349-351.
Long ZX, Wan CH, Hu HS, *et al.* Determination of Aloin in Aloe Products by RP-HPLC[J]. Food Sci, 2005, 26(8): 349-351.
- [14] Yang SP, Tian JM, Sun DX, *et al.* Determination of aloin content in Aloe with HPLC and analysis of Aloe chromatogram.[J]. J Med Plant, 2012, 3: 75-77, 80
- [15] Kaliyaperumal L, Thiyagarajan D, Kannaiyan P. Quantitative Detection of Aloin and Related Compounds Present in Herbal Products and Aloe vera Plant Extract Using HPLC Method[J]. American J Anal Chem, 2013, 10(4): 382-388.
- [16] 黄宝美, 姚程炜, 边清泉, 等. 高效毛细管电泳法测定芦荟中芦荟苷的含量[J]. 应用化学, 2009, 26(3): 302-305.
Huang BM, Yao CW, Bian QQ, *et al.* Determination of Barbalion in Aloe by Capillary Electrophoresis Coupled with Amperometric Detection[J]. Chin J Appl Chem, 2009, 26(3): 302-305.
- [17] 吴小芳, 刘丹, 钟佳胜, 等. 高效毛细管电泳法分析库拉索芦荟中的多种成分[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 331-335.
Wu XF, Liu D, Zhong JS, *et al.* Multicomponent Analysis of Aloe Barbadensis Mill by High-performance Capillary Electrophoresis[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm, 2012, 23(3): 331-335.
- [18] 周瑜, 廖帼英, 杨欣卉, 等. 液相色谱-串联质谱法检测纺织品中芦荟成分[J]. 产业用纺织品, 2013, 275 (8): 45-48.
Zhou Y, Liao GY, Yang XH, *et al.* LC-MS/MS determination of aloe constituents in textiles[J]. Ind Textile, 2013, 275 (8): 45-48.
- [19] Wang PG, Zhou WL, Wamer WG, *et al.* Simultaneous determination of aloin A and aloe emodin in products containing Aloe vera by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Anal Methods, 2012, 4: 3612-3619.
- [20] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[M]. 2003.
People's Republic of China Ministry of Health. Technical Standards for Testing and Assessment of Health Food (The 2003 edition) [M]. 2003.
- [21] 李婷, 钟英, 王芝, 等. 芦荟苷 A、B 以及异芦荟苷 D 的同时分离纯化[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23: 878-881.
Li T, Zhong Y, Wang Z, *et al.* Isolation and Purification Simultaneous of Aloins A and B and Isoaloesresin D[J]. Nat Prod Res Dev, 2011, 23: 878-881.
- [22] 陈欣霞, 张宇航, 林颖, 等. HPLC-DAD 和 LC-M S/MS 法对各种芦荟样品中蒽醌类成分的分析研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 817-821.
Cheng XX, Zhang YH, Lin Y, *et al.* Analysis of Anthraquinones in Different Samples of Aloe with HPLC-DAD and LC-M S/MS [J]. Nat Prod Res Dev, 2009, 21: 817-821.
- [23] Wen JD, Wu XF, Zhong JS, *et al.* Effects of temperature, pH and light on the stability of aloin A and characterisation of its major degradation products[J]. Int J Food Sci Technol, 2014, 49(7): 1773-1779.
- [24] 李凌军, 孙敬昌, 李运伦, 等. 用正交设计优选清热降压胶囊提取工艺条件[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(6): 552-554.
Li LJ, Sun JC, Li YL, *et al.* Extraction conditions with heat buck Capsule by Orthogonal Design[J]. J Shandong Univ TCM, 2011, 35(6): 552-554.
- [25] 张美玲. 芦荟中芦荟甙的提取、分离、纯化及其在化妆品中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
Zhang ML. Extraction, separation, purification and its application in cosmetics of Aloe glycosides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



朱晓玲, 硕士, 主要研究方向为食品质量安全检测与色谱分析。
E-mail: chuandian1987@aliyun.com