

高效液相色谱法测定减肥类保健食品中番泻苷 A、 番泻苷 B 的含量

刘春霖, 刁飞燕, 谢强胜, 董 蓬, 李启艳*

(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘 要: 目的 建立一种用于测定减肥类保健食品中番泻苷 A、番泻苷 B 的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测方法。**方法** 采用 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C, 二极管阵列检测器进行检测, 检测波长为 254 nm。**结果** 番泻苷 A、番泻苷 B 分别在 2.050~20.50 μg/mL($r=0.9999$)、1.803~18.03 μg/mL($r=0.9993$) 范围内呈良好线性关系, 定量限分别为 30、27 μg/kg; 平均回收率分别为 96.8%、95.1%, 相对标准偏差分别为 1.3%、2.3%。**结论** 该方法简单、可行, 结果准确、可靠, 适用于减肥类保健食品中番泻苷 A、番泻苷 B 含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 减肥类保健食品; 番泻苷 A; 番泻苷 B

Determination of sennoside A and sennoside B in slimming health foods by high performance liquid chromatography

LIU Chun-Lin, DIAO Fei-Yan, XIE Qiang-Sheng, DONG Peng, LI Qi-Yan*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of sennoside A and sennoside B in slimming health foods by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were separated on a ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 40 °C. The samples were detected with diode array detector, and the detection wavelength was 254 nm. **Results** Sennoside A and sennoside B had good linear relationships in the ranges of 2.050~20.50 μg/mL ($r=0.9999$) and 1.803~18.03 μg/mL ($r=0.9993$), respectively. The limits of quantification (LOQ) were 30 μg/kg and 27 μg/kg. The average recoveries were 96.8% and 95.1%, and the relative standard deviations (RSDs) were 1.3% and 2.3%. **Conclusion** The method is simple, specific and accurate, which is suitable for determination of sennoside A and sennoside B in slimming health foods.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; slimming health foods; sennoside A; sennoside B

*通讯作者: 李启艳, 副主任药师, 研究方向为保健食品质量控制。E-mail: 15253118118@163.com

*Corresponding author: LI Qi-Yan, Associate Chief Pharmacist, Shandong Institute for Food and Drug Control, No. 2749, the New Lok Street, High-tech District, Jinan 250101, China. E-mail: 15253118118@163.com

1 引言

番泻叶为豆科植物狭叶番泻(*Cassia angustifolia* Vahl)或尖叶番泻(*Cassia acutifolia* Delile)的干燥小叶,具有泻热行滞、通便利水等药理作用^[1],番泻叶是最早用作泻药和减肥药的植物之一^[2],主要含有蒽醌类和黄酮类成分^[3],而番泻苷A和番泻苷B等蒽醌类成分是其药理作用的主要活性成分^[4,5]。番泻叶近年来用于减肥类保健食品,具有抗菌^[6,7]、排毒养颜、减肥^[8]等功效。但番泻叶药性较为猛烈,应严格控制使用人群及用量;而且长期服用添加番泻叶的减肥类保健食品,会使肠壁神经感受细胞的应激性降低,可能会导致顽固性便秘等问题。

目前国内尚无保健食品中番泻苷A、番泻苷B的检测标准。参考相关研究发现,番泻苷A、番泻苷B的测定方法主要包括薄层扫描法^[9]、高效毛细管电泳法^[10]、紫外分光光度法^[11]、高效液相色谱法^[12-15]等。薄层扫描法只能定性鉴别,无法准确定量。由于保健食品基质复杂,如采用紫外分光光度法检验,因杂质干扰,可能使测定结果偏高^[8]。因此本研究采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对样品进行测定,经验证,该方法简便、准确,可用于减肥类保健食品中番泻苷A、番泻苷B的测定。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

茶剂14批,胶囊剂9批,片剂1片,饮品1批,购于药店及超市。

乙腈(色谱纯,德国Merker公司);磷酸(优级纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);乙醇(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);碳酸氢钠(优级纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);超纯水(美国Millipore公司);番泻苷A(98.2%,批号:A3440010,上海安谱实验科技股份有限公司);番泻苷B(98.0%,批号:V4590010,上海安谱实验科技股份有限公司)。

2.2 仪器与设备

Mettler Toledo MS 电子天平(美国梅特勒-托利多公司);Waters e2695 高效液相色谱仪(配Waters 2998 二极管阵列检测器,美国Waters公司);KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BPZ-6063 真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%磷酸水溶液(A),乙腈(B);梯度洗脱程序:

0~5 min, 90%A; 5~13 min, 90%A~87%A; 13~26 min, 87%A~83%A; 26~32 min, 83%A~78%A; 32~32.1 min, 78%A~90%A; 32.1~35 min, 90%A。流速:1.0 mL/min;柱温:40℃;检测波长:254 nm;检测器:二极管阵列检测器;进样量:10 μL。

2.3.2 溶液的配制

(1) 标准溶液的制备

精确称取番泻苷A、番泻苷B标准物质适量,减压干燥12 h,分别置棕色量瓶中,加0.1%碳酸氢钠溶液制成每1 mL含番泻苷A、番泻苷B各0.1 mg的标准储备液。分别准确吸取不同体积的番泻苷A、番泻苷B标准储备液,用0.1%碳酸氢钠溶液将其稀释成浓度分别为2、4、10、16、20 μg/mL的混合标准工作液。

(2) 样品溶液的制备

精密称取混合均匀的样品0.2 g(若为片剂或茶剂,需粉碎后混匀;若为硬胶囊,需取出20粒以上内容物研细混匀;若为软胶囊,需挤出20粒以上内容物混匀;若为口服液,混匀称取),置50 mL具塞容量瓶中,加入0.1%碳酸氢钠溶液40 mL,超声处理1 h(40℃),放冷,用0.1%碳酸氢钠溶液定容至刻度,摇匀,3500 r/min离心5 min,取上清液过0.45 μm滤膜,滤液供HPLC分析。

3 结果与分析

3.1 波长的选择

对番泻苷A、番泻苷B标准溶液在190~400 nm紫外波长范围内进行扫描,结果显示,番泻苷A、番泻苷B在202 nm处有最大吸收波长,结果如图1所示。实验比较了202、254、265 nm 3处波长的样品测定结果,202、265 nm波长处的样品溶液色谱杂质峰较多,影响目标化合物的测定结果,故选择254 nm作为检测波长。

3.2 流动相条件的优化

实验比较了乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1 mol/L 醋酸钠溶液4种流动相的分离效果。结果显示,样品溶液中番泻苷A、番泻苷B在乙腈-0.1%磷酸水溶液条件下,通过梯度洗脱程序能达到较好的分离效果,故确定乙腈-0.1%磷酸水溶液为本研究的流动相条件。

3.3 样品前处理条件的优化

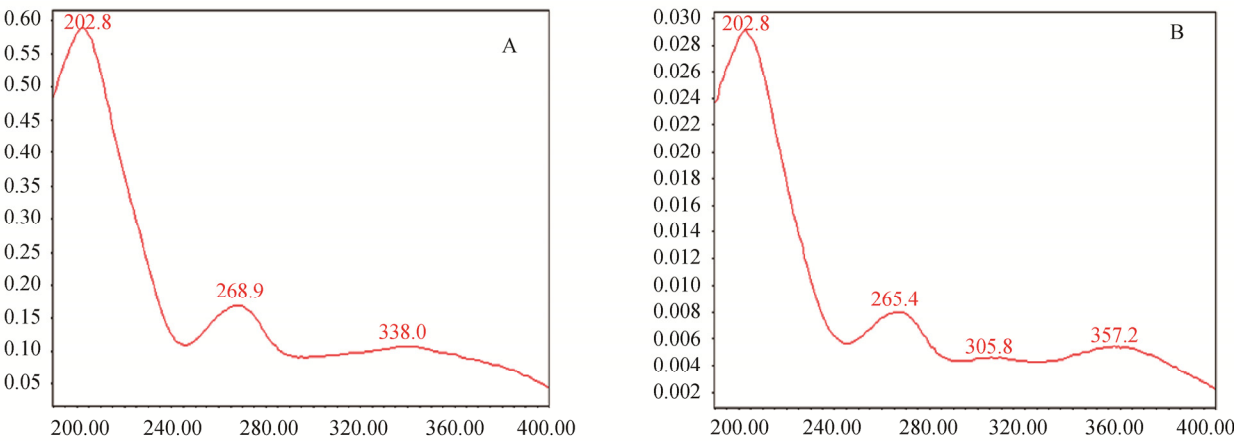
综合考虑番泻苷A、番泻苷B理化性质,实验比较了超声、浸提、水浴回流3种方法对番泻苷A、番泻苷B提取效果的影响。结果显示,在超声条件下,适当提高温度有助于番泻苷A、番泻苷B的溶出,但过高的温度会加快番泻苷A、番泻苷B的降解;超过80℃的浸提温度,番泻苷A、番泻苷B的含量逐渐下降;100℃水浴回流1 h,番泻苷A降解30%,番泻苷B降解40%。40~60℃条件下,番泻苷A、番泻苷B的含量无明显变化。实验最终确定40℃

超声处理 60 min 为样品前处理条件。

3.4 标准品与样品溶液图谱

分别精密吸取 2.3.2 项下的标准品溶液、样品溶液各

10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果如图 2、图 3 所示, 样品溶液与标准品溶液具有相同保留时间的色谱峰, 样品溶液色谱峰具有较好的分离度, 满足实验分析要求。



注: A: 番泻苷 A; B: 番泻苷 B。
图 1 番泻苷 A、番泻苷 B 光谱扫描图
Fig. 1 The UV spectra of sennoside A and sennoside B

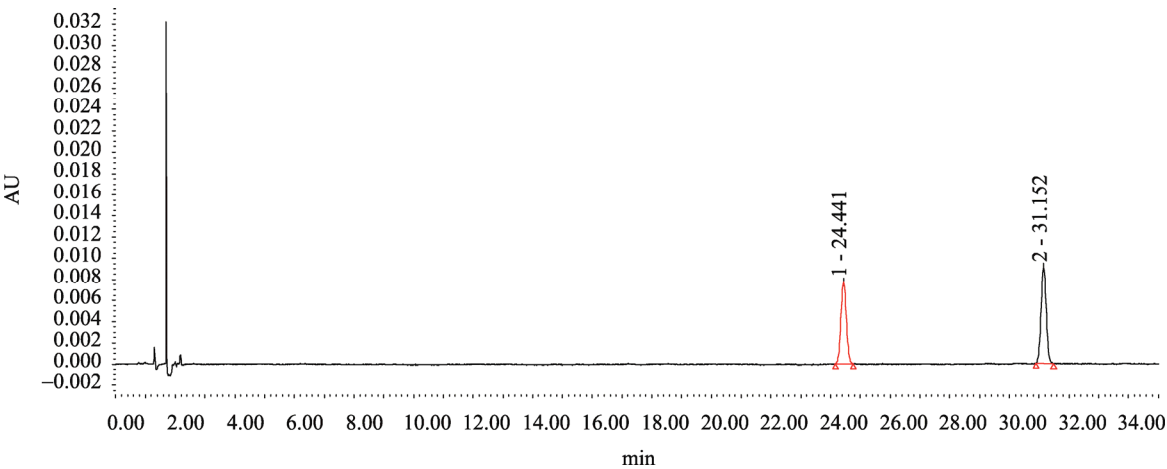


图 2 标准溶液色谱图(1: 番泻苷 B, 2: 番泻苷 A)
Fig. 2 Chromatogram of standard sample (1: sennoside B, 2: sennoside A)

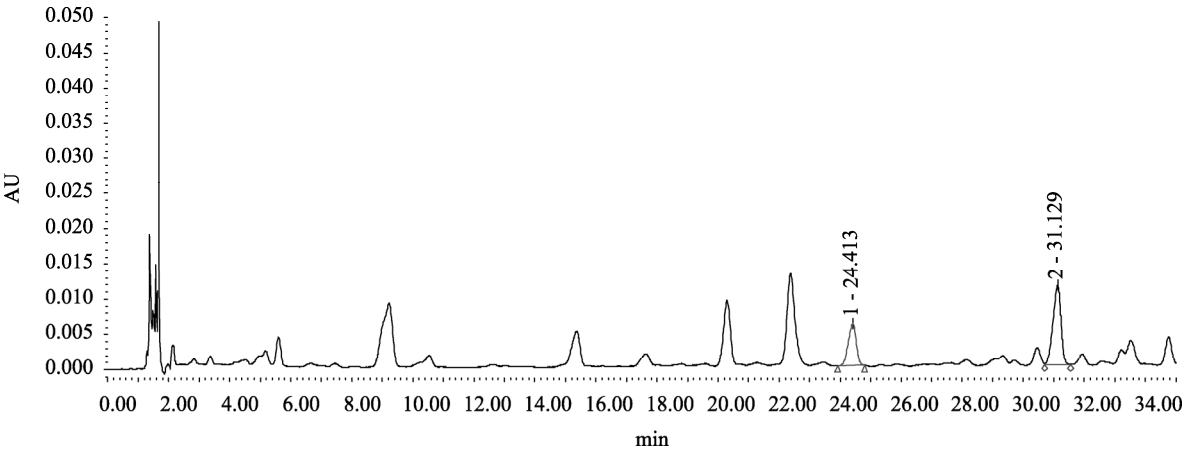


图 3 样品(茶叶)色谱图(1 番泻苷 B, 2 番泻苷 A)
Fig. 3 Chromatogram of tea sample (1: sennoside B, 2: sennoside A)

3.5 标准曲线与定量限

分别取 2.3.2 项下混合标准工作液, 按 2.3.1 项下的色谱条件进行测定, 各组分以浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程: 番泻苷 A: $Y=1.14\times10^4X-5.36\times10^3$, $r=0.9999$, 线性范围: 2.050~20.50 $\mu\text{g/mL}$; 番泻苷 B: $Y=1.12\times10^4X-2.89\times10^3$, $r=0.9993$, 线性范围: 1.803~18.03 $\mu\text{g/mL}$ 。分别将番泻苷 A、番泻苷 B 标准储备液稀释至一定浓度, 以仪器的 10 倍信噪比确定定量限, 番泻苷 A 定量限为 30 $\mu\text{g/kg}$ 、番泻苷 B 定量限为 27 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.6 仪器精密度实验

取番泻苷 A 浓度为 20.50 $\mu\text{g/mL}$ 、番泻苷 B 浓度为 18.03 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液 10 μL , 连续进样 6 次, 按上述色谱条件进行测定, 计算相对标准偏差(RSD, %)。结果显示, 番泻苷 A、番泻苷 B 峰面积的 RSD 值分别为

0.92%、0.047%, 表明仪器精密度良好。

3.7 稳定性实验

取同一份样品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样一次, 样品溶液中番泻苷 A、番泻苷 B 峰面积的 RSD 值分别为 1.8%、0.042%, 符合相关实验要求, 表明溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

3.8 方法精密度和回收率实验

取 2.3.2(2)项下制备的阳性样品, 进行低、中、高 3 组加标回收率实验, 每组平行称取 3 份, 分别定量加入标准物质, 按上述色谱条件进行测定, 结果见表 1。

3.9 样品的测定

取 25 批样品(茶剂 14 批, 胶囊剂 9 批, 片剂 1 片, 饮品 1 批), 按 2.3.2(2)项下方法对样品进行提取测定, 结果见表 2。

表 1 番泻苷 A、番泻苷 B 的回收率和相对标准偏差($n=3$)
Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of sennoside A and sennoside B ($n=3$)

组分	本底值(μg)	加入量(μg)	测得值(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
番泻苷 A	215.2	30.75	243.6	92.36	96.8	1.3
	212.8	30.75	241.9	94.63		
	215.3	30.75	243.6	92.03		
	213.3	61.50	277.5	104.4		
	213.2	61.50	276.0	102.1		
	217.2	61.50	279.7	101.6		
	216.8	102.5	314.7	95.51		
	217.4	102.5	314.6	94.83		
	220.1	102.5	316.1	93.66		
	133.1	54.10	190.9	106.8		
番泻苷 B	131.6	54.10	186.8	102.0	95.1	2.3
	133.2	54.10	191.2	107.2		
	131.9	90.16	212.2	89.06		
	131.9	90.16	215.0	92.17		
	134.4	90.16	215.3	89.73		
	134.1	135.2	254.9	89.35		
	134.4	135.2	252.9	87.65		
	136.1	135.2	260.5	92.01		

表 2 样品测定结果($n=3$)
Table 2 Determination results of samples ($n=3$)

样品序号	番泻苷 A (mg/g)	番泻苷 B (mg/g)
1	3.32	4.53
2	3.05	3.56
3	2.79	4.12
4	2.95	4.28
5	ND	ND
6	3.21	4.37
7	1.32	1.54
8	2.48	2.33
9	ND	ND
10	0.162	0.170
11	1.69	2.02
12	2.82	3.67
13	2.78	3.53
14	2.18	2.03
15	ND	ND
16	ND	ND
17	ND	ND
18	ND	ND
19	ND	ND
20	ND	ND
21	ND	ND
22	ND	ND
23	ND	ND
24	ND	ND
25	ND	ND

注: ND 表示未检出, 样品 1~14 为茶剂, 15~23 为胶囊剂, 24 为片剂, 25 为饮品。

由表 2 可知, 12 批样品检出番泻苷 A、番泻苷 B, 检出样品中番泻苷 A 含量范围为 0.162~3.32 mg/g, 番泻苷 B 含量范围为 0.170~4.53 mg/g, 其中 5 批样品处方原料未含有上述成分, 疑似违规添加了含有番泻苷 A、番泻苷 B 成分的中药。胶囊剂、片剂、饮品等样品均未检出番泻苷 A、番泻苷 B。

4 结 论

本研究建立了高效液相色谱法测定减肥类保健食品中番泻苷 A、番泻苷 B 的含量。在所测样品中, 胶囊剂、

片剂、饮品均未检出番泻苷 A、番泻苷 B, 而茶剂样品中检出违规添加样品 5 批, 结果表明, 茶剂违规添加具有泻下作用成分的中药材问题比较突出。含有番泻苷 A、番泻苷 B 这 2 种成分的中药材为刺激性泻药, 药性较为猛烈, 服用人群和服用量均需严格控制, 过量服用会对胃肠系统产生毒副作用, 但目前现行国家标准中没有相应的检验方法对其进行测定, 存在监管盲区, 故急需建立相应的补充检验方法, 解决现行标准的不足。本研究为建立相关标准提供了技术依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Pharmacopoeia commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (edition 2015, volume 1) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.

[2] 段文娟, 吴秋霞, 李月, 等. 高速逆流色谱分离纯化番泻叶中的苷类化合物[J]. 山东科学, 2017, 30(1): 15-19.
Duan WJ, Wu QX, Li Y, *et al.* Separation and purification of glycosidic compounds from folium sennae by high-speed counter-current chromatography [J]. Shandong Sci, 2017, 30(1): 15-19.

[3] 杨建平, 刘晓燕, 曾正. 番泻叶的临床药理作用以及化学成分的研究进展[J]. 药物与人, 2014, 27(3): 22-24.
Yang JP, Liu XY, Zeng Z. Senna's clinical research progress of pharmacological action and chemical composition [J]. Med People, 2014, 27(3): 22-24.

[4] 张苗, 顾燕. HPLC 法在测定番泻总苷胶囊中番泻苷 A B 含量中的应用[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(21): 3235-3237.
Zhang M, Gu Y. Application of HPLC method for determination of sennoside A and B contents in senna total glycosides capsules [J]. J Mod Med Health, 2015, 31(21): 3235-3237.

[5] 黄娟, 张靖, 徐文, 等. 番泻叶提取液中番泻苷 A、番泻苷 B 的稳定性考察[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(10): 794-797.
Huang J, Zhang J, Xu W, *et al.* Study on stabilities of sennoside A and sennoside B in the extract of sennae folium [J]. Chin Hosp Pharm J, 2014, 34(10): 794-797.

[6] Kamaraj C, Rahuman AA, Siva C, *et al.* Evaluation of antibacterial activity of selected medicinal plant extracts from south India against human pathogens [J]. Asian Pac J Trop Dis, 2012, 2: 296-301.

[7] Sharma R A, Bhardwaj R, Sharma P, *et al.* Antimicrobial activity of sennosides from Cassia pumila Lamk [J]. J Med Plants Res, 2012, 6(19): 3591-3595.

[8] 肖晶, 方从容, 杨杰, 等. HPLC 法同时测定保健食品中番泻苷 A 和番泻苷 B 的含量[J]. 卫生研究, 2011, 40(3): 355-357.
Xiao J, Fang CR, Yang J, *et al.* Determination of sennoside A and sennoside B simultaneously in health food by HPLC [J]. J Hyg Res, 2011, 40(3): 355-357.

[9] 胡太德, 陈绍成. 通便灵胶囊质量标准的研究[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1159-1161.
Hu TD, Cheng SC. Quality standard for tongbianling capsule [J]. Chin Tradit Pat Med, 2008, 30(8): 1159-1161.

- [10] 石上梅, 张庆生, 王宝琴. 高效毛细管电泳法测定番泻叶中番泻苷 A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(1): 24–26.
Shi SM, Zhang QS, Wang BQ. Determination of sennoside A in senna leaf by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2002, 22(1): 24–26.
- [11] 杨素玲, 杜文孝, 刘新华, 等. 紫外分光光度法测定通便灵胶囊番泻苷 B 的含量[J]. 现代中医药, 2004, (1):65–66.
Yang SL, Du WX, Liu XH, *et al.* Determination of sennoside B in tongbianling capsule by ultraviolet spectrophotometric method [J]. Mod Tradit Chin Med, 2004, (1):65–66.
- [12] 邬秋萍, 王祝举, 唐力英, 等. HPLC 测定番泻叶中 5 种主要化学成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 363–365.
Wu QP, Wang ZJ, Tang LY, *et al.* Determination of five primary chemical constituents in cassia angustifolia by HPLC [J]. Chin J Chin Mater Med, 2008, 33(4): 363–365.
- [13] 何伟, 张现涛, 严军, 等. HPLC 测定番泻总苷提取物中番泻苷 A、番泻苷 B 的含量[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1182–1184.
He W, Zhang XT, Yan J, *et al.* Determination of sennoside A and sennoside B in the extract of senna total glycosides by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2008, 30(8): 1182–1184.
- [14] 金施施, 牛换云, 丁辉, 等. 正交实验法优化番泻叶的提取工艺[J]. 天津中医药大学学报, 2016, 35(2): 122–125.
Jin SS, Niu HY, Ding H, *et al.* The orthogonal experiment method to

optimize the extraction process of senna [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2016, 35(2): 122–125.

- [15] 于波涛, 宋宗辉, 范开华, 等. 番泻苷 A 与 B 的稳定性研究[J]. 华西药

学杂志, 2015,30(4): 471–473.
Yu BT, Song ZH, Fan KH, *et al.* Study on the stability of sennoside A and B [J]. West Chin J Pharm Sci, 2015, 30(4): 471–473.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘春霖, 主管药师, 主要研究方向为保健食品检测。

E-mail: chunlin0320@126.com



李启艳, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品质量控制。

E-mail: 15253118118@163.com