

高效液相色谱法测定芦荟甙的4个标准方法比较

陈星蓉*, 汪玉玲, 李桑, 刘小玉, 黄迪麟, 陆婷婷

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: **目的** 比较4个标准方法中高效液相色谱法测定芦荟及其制品中芦荟甙含量的优劣。**方法** 分别采用4个标准的前处理方法处理芦荟及其制品, 并对样品做低、中、高3个浓度水平的加标实验, 采用4个色谱方法测定芦荟甙的含量。通过计算相对标准偏差和回收率等方面来评价4个方法的优劣。**结果** 芦荟甙的出峰时间为8.807 min。线性方程为 $Y=13700X+16000$, 相关系数 r 为0.9994。4种方法的相对标准偏差为0.21%、0.37%、0.35%和0.18%, 加标回收率为97.3%、98.3%、98.8%和98.5%。**结论** 4个方法的测定结果均满足对芦荟及其制品测定芦荟甙前处理要求, 其中QB/T 2489-2007《食品原料用芦荟制品》的前处理步骤最方便快捷, 使用的有机试剂量最少, 回收率最高。适用于芦荟及其制品中芦荟甙含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 芦荟甙; 鲜芦荟; 芦荟软胶囊; 芦荟干粉; 前处理方法

Comparison of 4 standard methods for determination of aloin by high performance liquid chromatography

CHEN Xing-Rong*, WANG Yu-Ling, LI Sang, LIU Xiao-Yu, HUANG Di-Lin, LU Ting-Ting

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To compare the advantages and disadvantages of four standard methods for the determination of aloin in aloe and its products by high performance liquid chromatography. **Methods** Four standard pretreatment methods were used to treat aloe and its products respectively, and standard addition experiments of low, medium and high concentrations were carried out on samples to determine the content of aloin. The relative standard deviation and recovery rate were calculated to evaluate the advantages and disadvantages of the four methods. **Results** The peak time of aloin was 8.807 min. The linear equation was $Y=13700X+16000$, and the correlation coefficient r was 0.9994. The relative standard deviations of the four methods were 0.21%, 0.37%, 0.35% and 0.18%, and the recoveries were 97.3%, 98.3%, 98.8% and 98.5%. **Conclusion** The determination results of the four methods all meet the pretreatment requirements for the determination of aloin in aloe and its products. Among them, QB/T 2489-2007 *Aloe products for food raw materials* has the most convenient and fast pretreatment steps, uses the least amount of organic test and has the highest recovery rate. It is suitable for the quantitative detection of aloin in aloe and its products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; aloin; aloe; aloe soft capsule; aloe powder; pretreatment method

*通讯作者: 陈星蓉, 助理工程师, 主要研究方法为食品理化检验与食品安全。E-mail: 395685470@qq.com

*Corresponding author: CHEN Xing-Rong, Assistant Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: 395685470@qq.com

1 引言

芦荟属多年生百合科多肉草本植物, 可药食两用。其主要有效成份是以芦荟甙为主的多羟基蒽醌类衍生物, 芦荟甙(aloin, $C_{21}H_{22}O_9$)也被称为芦荟素或芦荟酵素, 具有良好的抗菌^[1]、抗氧化、促进排便、调节肿瘤细胞凋亡、保护皮肤等作用^[2], 还具有增强免疫力、预防心律不齐和动脉硬化等心脑血管疾病的功效^[3-5], 因此芦荟及其提取物常被用于作为保健食品原料。芦荟甙纯品为淡黄色粉末, 易溶于甲醇, 乙醇等有机溶剂, 在水中溶解性较小^[6]。芦荟的成分十分复杂, 主要有有机活性成分为蒽醌类衍生物, 芦荟甙是主要成分^[7,8]。芦荟现广泛应用于药品、保健品及化妆品中。但由于芦荟来源广泛, 其有效成份芦荟甙的含量存在较大差别, 且芦荟甙是一种强致泻物质, 若食品级芦荟制品中芦荟甙的含量过高则对人体健康不利, 因此芦荟甙的含量是评价食品芦荟制品质量的重要指标之一。

国内外测定芦荟甙的方法多为薄层色谱法^[9,10]、分光光度法^[11]等。但这些方法的灵敏度不够高, 而且测得的是总蒽醌含量。此外, 芦荟甙的测定经常受其水解产物芦荟大黄素的干扰, 使得不同方法测定结果之间存在着很大的差异。为了扩大芦荟的资源开发应用, 促进芦荟产业发展, 本文研究了 4 个标准: (SN/T 4136-2015《出口芦荟干粉中芦荟甙含量的测定 高效液相色谱法》^[12]、NY/T 1693-2009《芦荟及制品中芦荟甙的测定 高效液相色谱法》^[13]、QB/T 2489-2007《食品原料用芦荟制品》^[14]和《保健食品功效成分检测方法》)中芦荟甙的高效液相色谱测定法^[15]对鲜芦荟、芦荟软胶囊和芦荟干粉这 3 种类型样品的前处理, 采用高效液相色谱法对芦荟及其制品中的芦荟甙进行测试分析, 旨在为建立更加科学、简便、快速、准确的芦荟甙定量的检测方法提供依据。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

甲醇(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 乙酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 芦荟甙标准品(纯度 $\geq 98\%$, 美国 Stanford Analysis Chemicals 公司); 实验所用水均为超纯水。

鲜芦荟、芦荟软胶囊、芦荟干粉均为市售商品。

2.2 仪器与设备

Waters E2695 高效液相色谱仪(配 Waters 2998 型紫外检测器, 美国 Waters 公司); MS105DU 万分之一天平、PL602E 电子天平(瑞士梅特勒公司); KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Thermo Stratos 冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司); Milli-Q Reference 超纯水仪(美国密理博公司); 0.45 μm 针孔滤膜(德国波尔公司)。

2.3 溶液制备

芦荟甙准储备液: 称取芦荟甙标准品 0.02 g(精确到 0.0001 g)至 10 mL 于容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至, 浓度为 2000 mg/L。于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存一周。芦荟甙标准溶液: 芦荟甙储备液各取 12.5、100、400、600 和 1000 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用水定容。标准系列工作液浓度为 2.5、20、80、120、200 mg/L。1%乙酸溶液: 取 1 mL 乙酸于 100 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度。

2.4 4 个方法的色谱条件和前处理条件

色谱柱: C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 进样量: 10 μL ; 柱温: $40\text{ }^\circ\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长 359 nm。

用 4 个标准的前处理方法分别处理鲜芦荟、芦荟软胶囊和芦荟干粉, 对测得的芦荟甙的含量进行分析和对比。鲜芦荟称 5.0000 g 定容到 50 mL, 共稀释 10 倍; 芦荟软胶囊称 1.0000 g 定容到 50 mL, 再取 2 mL 样液定容到 10 mL, 共稀释 250 倍; 芦荟干粉称 0.5000 g 定容到 50 mL, 再取 0.5 mL 样液定容到 10 mL 共稀释 2000。

方法(a)SN/T 4136-2015《出口芦荟干粉中芦荟甙含量的测定 高效液相色谱法》: 流动相: 甲醇:水=55:45(V/V)。准确称取适量样品于 50 mL 容量瓶中, 加入 30 mL 甲醇, 混匀。冰水浴超声提取 5 min, 以水定容至刻度。转入 50 mL 离心管, 在 4000 r/min 下离心 5 min, 上清液经微孔过滤后供高效液相色谱仪测定。

方法(b)NY/T 1693-2009《芦荟及制品中芦荟甙的测定 高效液相色谱法》, 流动相: 甲醇:1%乙酸水=50:50(V/V)。准确称取适量样品于 50 mL 容量瓶中, 加入 25 mL 甲醇, 混匀。超声提取 30 min, 用 1%冰醋酸水溶液定容至刻度。转入 50 mL 离心管, 在 4000 r/min 下离心 5 min 后, 上清液经微孔过滤后供高效液相色谱仪测定。

方法(c)QB/T 2489-2007《食品原料用芦荟制品》: 流动相: 甲醇:1%乙酸水=60:40(V/V)。准确称取适量样品于 50 mL 容量瓶中, 加入 15 mL 甲醇, 混匀。超声波提取 30 min, 用水定容至刻度, 静置沉淀, 上清液经微孔过滤后供高效液相色谱仪测定。

方法(d)《保健食品功效成分检测方法》中芦荟甙的高效液相色谱测定法: 流动相: 甲醇:水=55:45(V/V)。准确称取适量样品于 50 mL 容量瓶中, 加入 30 mL 流动相, 混匀。超声波提取 5 min, 用流动相定容, 转入 50 mL 离心管。在 4000 r/min 下离心 5 min 后, 上清液经过微孔过滤后供高效液相色谱仪测定。

3 结果与分析

3.1 线性关系与检出限

在 2.4 方法(c)给定色谱条件下测定芦荟甙标准工作曲

线,用保留时间定性。以峰面积 Y 为纵坐标,相应的浓度 $X(\text{mg/L})$ 为横坐标,进行线性回归定量,线性方程为 $Y=13700X+16000$ 。标准工作曲线相关系数 r 为 0.9994,在 2.5 ~ 200 mg/L 范围内呈良好线性关系。

根据检出限定义为响应信号为噪音的 3 倍(S/N)时所需的样品量。定量限定义为响应信号为噪音的 10 倍(S/N)时所需的样品量。根据 2.4 方法(c)的色谱条件,测得本方法检出限为 1.3 mg/kg,定量限为 4.3 mg/kg。

3.2 重现性实验

按 2.4 的色谱条件和前处理条件,制备 3 种样品,重复 6 次,精密吸取 10 μL 待测试样溶液,测定芦荟甙的含量,计算 RSD(%),结果见表 1。

结果表明 4 种前处理方法测得芦荟甙 RSD 均在 0.5% 以下,分别为(a)0.21%、(b)0.37%、(c)0.35%和(d)0.18%,说明这 4 种前处理方法重现性良好。

方法(a)测得的芦荟软胶囊含量最高,方法(b)测得的

芦荟干粉含量最高,方法(d)测得的鲜芦荟含量最高,方法(c)测得的 3 种样品的含量居中。

通过 t -检验方法对测得芦荟甙的含量进行数据分析,对于鲜芦荟 4 个方法存在显著性差异($P < 0.05$);对于芦荟软胶囊和芦荟干粉,方法(a)、(b)、(c)和(d)之间存在显著性差异($P < 0.05$),而方法(c)和(d)之间不存在显著性差异($P > 0.05$)。

3.3 加标实验

对样品中芦荟甙的含量进行加标,由于芦荟软胶囊和芦荟干中的芦荟甙含量过高,所以在二次稀释的过程中加标,鲜芦荟则在称样后直接进行加标。依次准确加入一定量的标准溶液,在 2.4 给定条件下处理和测定芦荟甙的含量。计算芦荟甙的回收率,结果详见表 2~5。结果表明 4 个方法的评价回收率均在 90%~110%之间,分别为(a)97.3%、(b)98.3%、(c)98.8%和(d)98.5%,加标结果均为满意,其中方法(c)加标回收率最高。

表 1 重现性实验结果

Table 1 Results of reproducibility experiment for the method

前处理方法	样品	平均值/(mg/kg)	RSD/(%)($n=6$)	平均 RSD/%
(a)	鲜芦荟	148.19	0.47	0.21
	芦荟软胶囊	31843	0.12	
	芦荟干粉	121517	0.05	
(b)	鲜芦荟	178.16	0.41	0.37
	芦荟软胶囊	23175	0.27	
	芦荟干粉	129473	0.43	
(c)	鲜芦荟	156.28	0.46	0.35
	芦荟软胶囊	28445	0.09	
	芦荟干粉	124192	0.49	
(d)	鲜芦荟	188.59	0.26	0.18
	芦荟软胶囊	25323	0.05	
	芦荟干粉	127175	0.23	

表 2 (a)SN/T 4136-2015 加标回收实验($n=4$)

Table 2 Results of recovery for the method of (a)SN/T 4136-2015 ($n=4$)

样品类型	加标水平/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	加标回收率/%	平均回收率/%
鲜芦荟	0	149.63	-	97.3
	180	315.22	93.1	
	360	494.52	96.4	
	450	647.71	92.6	
芦荟软胶囊	0	30140	-	97.3
	15000	45070	99.5	
	30000	59689	98.1	
	45000	75366	100.5	
芦荟干粉	0	110638	-	97.3
	100000	208072	97.4	
	120000	228860	98.5	
	140000	250413	99.8	

表 3 (b)NY/T 1693-2009 加标回收实验(n=4)

Table 3 Results of recovery for the method of (b)NY/T 1693-2009(n=4)

样品类型	加标水平/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	加标回收率/%	平均回收率/%
鲜芦荟	0	178.18	-	98.3
	180	356.84	99.3	
	360	529.88	97.7	
	450	711.18	98.8	
芦荟软胶囊	0	24116	-	
	15000	39119	100.0	
	30000	53444	95.9	
	45000	69022	99.8	
芦荟干粉	0	115195	-	
	100000	212681	97.4	
	120000	230771	96.3	
	140000	253961	99.1	

表 4 (c)QB/T 2489-2007 加标回收实验(n=4)

Table 4 Results of recovery for the method of (c)QB/T 2489-2007 (n=4)

样品类型	加标水平/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	加标回收率/%	平均回收率/%
鲜芦荟	0	155.96	-	98.8
	180	337.14	100.7	
	360	517.37	100.4	
	450	685.31	98.0	
芦荟软胶囊	0	29290	-	
	15000	44260	99.8	
	30000	59451	101.3	
	45000	74064	99.5	
芦荟干粉	0	113601	-	
	100000	212681	97.5	
	120000	229307	96.4	
	140000	247431	95.6	

表 5 (d)保健食品中芦荟甙的测定加标回收实验(n=4)

Table 5 Results of recovery for the method of determination of (d)aloin in health food (n=4)

样品类型	加标水平/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	加标回收率/%	平均回收率/%
鲜芦荟	0	189.22	-	98.5
	180	369.44	100.1	
	360	538.97	97.2	
	450	716.11	97.6	
芦荟软胶囊	0	25512	-	
	15000	40211	98.0	
	30000	54694	96.7	
	45000	69707	98.2	
芦荟干粉	0	102047	-	
	100000	203477	101.4	
	120000	218239	96.8	
	140000	242624	100.4	

3.4 精密度

比较 4 种色谱条件所得到的标准品和样品的色谱图, 方法(c)所得的色谱图峰型对称, 无拖尾现象, 理论塔板数高, 出峰时间适中为 8.807 min, 出峰效果最理想, 如图 1 所示。

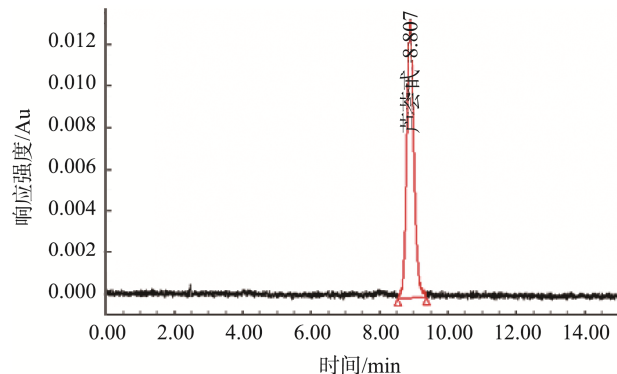


图 1 标准溶液的色谱图

Fig.1 Chromatogram of standard solution

按 2.3 制成芦荟甙标准溶液, 准确吸取 10 μL , 在 2.4 方法(c)的色谱条件下连续进样 6 次, 测定芦荟甙的峰面积和保留时间, 计算相对标准偏差, 结果见表 6。结果表明芦荟甙的峰面积 RSD 为 0.08%, 保留时间 RSD 为 0.10%, 说

明仪器精密度良好。

4 结论与讨论

从前处理条件看: (a)方法甲醇的使用量最大为 30 mL, 且前处理过程中需要冰水浴, 操作相对繁琐, 不够高效和环保。(b)方法甲醇的使用量较少为 25 mL, 适用于以上 3 种基质的测定。(c)方法使用的甲醇量最少为 15 mL, 仅需用水进行定容, 适用于以上 3 种基质的样品, 是 4 个方法中最为简单高效和环保的一个。(d)方法在处理芦荟干粉这类样品时出现液体浑浊的现象, 难以过滤, 不适用此类样品。

从色谱条件看: 从表 2~5 中可知, 4 种方法的平均加标回收率为(a)97.3%、(b)98.3%、(c)98.8%和(d)98.5%, 结果均为满意。方法(c)的样品加标回收率最高。方法(c)的色谱条件所得的 3 种样品的色谱图峰型对称, 无拖尾现象, 理论塔板数高, 整体效果最佳。

综上所述, 4 种方法均满足芦荟及其制品中芦荟甙的测定, 其中(c)方法 QB/T 2489-2007 最优, 此方法前处理简单效率高, 用到的有机试剂少, 低成本, 环保; 6 次样品重复测定样品含量 RSD 为 0.35%, 重复性良好; 加标回收率在 4 种前处理中最高, 达 98.8%, 加标回收率高; 方法(c)色谱条件下得到的样品色谱图整体效果最好, 适用于多种样品基质中芦荟甙的测定。

表 6 芦荟甙峰面积和保留时间重现性结果($n=6$)
Table 6 Repeatability of aloin area and retention time ($n=6$)

组分名称	峰面积测定值	RSD/%	保留时间测定值/min	RSD/%
芦荟甙	567706, 567628, 568458, 567909, 567737, 567091。	0.08	8.912, 8.912, 8.916, 8.921, 8.914, 8.906。	0.1

参考文献

- [1] 白乐, 弓太生, 穆学慧. 芦荟苷对足部主要致病菌抑菌活性的研究[J]. 中外鞋业, 2017, (8): 27-30.
Bai L, Gong TS, Mu XH. Study on antimicrobial activity of aloin against main pathogens of foot [J]. Shoes, 2017, (8): 27-30.
- [2] Yasemin Y, Mustafa G, Burak K, *et al.* Effects of aloe vera on spinal cord ischemia-reperfusion injury of rats [J]. J Invest Surg, 2016, 29(6): 389-398.
- [3] Cao Z, Tian Y, Hao J, *et al.* Barbaloin inhibits ven- tricular arrhythmias in rabbits by modulating voltagegated ion channels [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 39(3): 357-370.
- [4] Esmat AY, Said MM, Khalil SA. Aloin: A natural antitumor anthraquinone glycoside with iron chelating and non-atherogenic activities [J]. Pharm Biol, 2015, 53(1): 138-146.
- [5] 蔡健. 芦荟的功能成分与保健功效[J]. 食品与药品, 2006, (8): 27-30.
Cai J. Function components and health function of aloe [J]. Food Drug, 2006, (8): 27-30.
- [6] 付银龙, 钱和. 芦荟甙的提取与检测[J]. 江苏食品与发酵, 2002, (2): 24-27.
Fu YL, Qian H. Extraction and detection of aloin [J]. Jiangsu Food Ferment, 2002, (2): 24-27.
- [7] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 1996.
The Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1996.
- [8] 焦玉英, 华伟. 芦荟的功能[J]. 食品研究与开发, 1997, 18(4): 35-37.
Jiao YY, Hua W. Functions of aloe [J]. Food Res Dev, 1997, 18(4): 35-37
- [9] 石炳娟, 陈波. 薄层扫描测定复方芦荟胶囊中芦荟甙的含量[J]. 潍坊医学院学报, 2003, 25(6): 474.
Shi BJ, Chen B. Determination of aloin in compound aloe capsule by TLC scanning [J]. J Weifang Med Coll, 2003, 25(6): 474.
- [10] 李多利, 李稳宏, 王峰, 等. 薄层扫描测定复方芦荟中芦荟甙含量的方法研究[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 102-104.
Li DL, Li WH, Wang F, *et al.* Study on determination of aloin in

compound aloe by TLC scanning [J]. Food Sci, 2002, 23(5): 102-104.

[11] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995.
The Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1995.

[12] SN/T 4136-2015 出口芦荟干粉中芦荟甙含量的测定 高效液相色谱法 [S].
SN/T 4136-2015 Determination of aloin in aloe powder for export-High performance liquid chromatography [S].

[13] NY/T 1693-2009 芦荟及制品中芦荟甙的测定 高效液相色谱法[S].
NY/T 1693-2009 Determination of barbaloin in aloe and its products-High performance liquid chromatography[S].

[14] QB/T 2489-2007 食品原料用芦荟制品[S].

QB/T 2489-2007 Aloe products for food raw material [S].

[15] 保健食品功效成检测方法. 保健食品中芦荟甙的测定[S].
Health food efficacy test method. Determination of aloin in health food [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



陈星蓉, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检验与食品安全。
E-mail: 395685470@qq.com



“农副产品加工与检测分析”专题征稿函

农副产品是由农业生产所带来的副产品, 包括农、林、牧、副、渔五业产品, 分为粮食、经济作物、禽畜产品、干鲜果、干鲜菜及调味品、土副产品、水产品等若干类。我国农副产物资源丰富, 每年农产品的加工利用产生种类众多的食品和相关制品, 但同时也产生大量副产物, 致使资源得不到充分利用以及造成环境污染。为提高农副产物资源的综合利用水平, 实现农产品加工的全利用和零排放, 同时使农副产物增值, 实现农产品加工的可持续发展。

本刊特别策划了“农副产品加工与检测分析”专题, 主要围绕**果蔬加工与综合利用、禽肉制品加工与综合利用、农产品营养与健康功能、食品生物发酵技术、农产品贮藏保鲜技术、水产品加工与综合利用、粮油作物加工与综合利用**等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可, 本专题计划在 2020 年 12 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编**国家食品安全风险评估中心吴永宁**研究员特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 **2020 年 10 月 15 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“**专题: 农副产品加工与检测分析**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注**农副产品加工与检测分析**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部