

膠囊錠狀食品及茶包中sennosides檢驗方法之探討

黃詩珊 廖振翔 黃彥鈞 林雅姿 蔡佳芬 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本研究建立以高效液相層析法搭配光二極體陣列檢測器(HPLC/PDA)，分析含番瀉葉之膠囊錠狀食品及茶包食品中sennosides含量之方法。膠囊錠狀食品與茶包檢體分別經70%甲醇溶液及去離子水萃取過濾後，採用C18層析管柱，以乙腈及0.085%磷酸溶液為移動相溶液進行梯度沖提，利用高效液相層析儀於波長270 nm進行分析。sennoside A(濃度0.16-81.7 μg/mL)及sennoside B(濃度0.16-83.45 μg/mL)標準曲線之線性關係良好，其判定係數(r^2)均於0.999以上。同日內與異日間試驗之相對標準偏差(RSD)分別為0.07-2.52%及0.10-1.30%。添加回收試驗結果：sennoside A回收率為107-108%，sennoside B回收率為99-104%，其相對標準偏差(RSD)分別小於2.30及2.38%。錠劑及茶包之偵測極限分別為0.53及0.27 μg/mL，而定量極限分別為1.77及0.80 μg/mL。應用本方法進行市售來源及組成均不同之17件檢體中sennosides含量分析，僅1件檢體之層析圖譜仍見些微干擾，針對該檢體進行個別調整後，亦可成功分離之，其餘檢體之層析圖譜均無干擾之情形，本方法將公開供各界進行sennosides檢測之參考。

關鍵詞：sennoside A、sennoside B、膠囊錠狀食品、茶包、高效液相層析

前言

番瀉葉(Senna Leaf)為豆科Leguminosae植物狹葉番瀉*Cassia angustifolia* Vahl或尖葉番瀉*Cassia acutifolia* Delile之乾燥小葉。其一般性狀為披針形或狹披針形之葉，全緣，葉端急尖，葉基不對稱，具短柄。葉脈隆起，一次支脈沿著葉緣至葉尖，與直上支脈連結，顏色為淺灰黃色-淺灰黃綠色，並於葉下表面有稀疏之毛茸，味微苦⁽¹⁾。本品含有sennoside A, B, C, D及1,8-dihydroxyanthraquinone衍生物，如rhein、chrysophanol、aloe-emodin及其配糖體等成分，其中以sennoside A及sennoside B為主⁽²⁾。番瀉葉的主要功能為：瀉熱行滯，通便，利水。用於熱結積滯，便秘腹痛，水腫脹滿

⁽³⁾。近年來，由於國人飲食及生活型態日漸西化，加上多數人並未養成良好的生活習慣，極易造成肥胖，致使不少宣稱減肥、纖體、窈窕等產品陸續上市。而觀察其產品屬性及標示，其中不乏標示含番瀉葉成分者，前行政院衛生署於88年7月28日衛署藥字第88037570號函知直轄市及縣市衛生局，且於91年3月11日衛署藥字第0910020787號函特再公告周知，如標示番瀉葉、莢果或昔者，則依標示之含量、用法、用量判定，每日使用劑量以番瀉葉昔計為12毫克以上者，以藥品管理，每日使用劑量未達12毫克，則不以藥品管理⁽⁴⁾。為準確測定市售食品中番瀉葉昔之含量，本研究利用高效液相層析法搭配光二極體陣列檢測器(HPLC/PDA)建立檢驗方法，並以市售含有番瀉葉成

分之膠囊錠狀食品及茶包進行適用性之評估，未來可供作各項檢驗之依據，以維護民眾食用相關食品之安全與健康。

材料與方法

一、材料及試藥、試劑

本報告之檢體係來自檢、警、調、直轄市及縣市衛生局送驗之含番瀉葉成分之膠囊(5件)、錠狀(9件)及茶包(3件)食品共17件。Sennoside A (98.87%)及sennoside B (98.59%)對照用標準品為衛生福利部食品藥物管理署供應。甲醇、乙腈及磷酸(85%)均使用試藥特級或特級品，購自德國Merck公司。

二、儀器設備

高效液相層析儀(e2695 separations Module, Waters Co., Milford, MA, USA)。純水製造機(Milli-Q SP Advantage A10 System, Millipore Ltd., Bedford, MA, USA)。超音波振盪器(Elma D-78224, Germany)。

三、方法

(一)標準原液之配製

取sennoside A及sennoside B約1.6 g，精確稱定，分別置於20 mL容量瓶中，加入70%甲醇溶液溶解並定容之，供作標準原液。

(二)0.085%磷酸溶液之配製

取磷酸1 mL置於1000 mL定容瓶中，以去離子水定容，均勻混合後以濾膜過濾。

(三)檢液之調製

1. 膠囊錠狀食品：將膠囊內容物或錠狀食品研磨混合均勻後，取約1 g，精確稱定，加入70%甲醇溶液20 mL，以超音波振盪萃取30分鐘後，以濾紙過濾，收集濾液，殘渣再以70%甲醇溶液重複萃取1次，合併濾液，以70%甲醇溶液定容至50 mL，供作檢液。

2. 茶包：依檢體外盒標示之沖泡方法沖

泡，取出茶包，茶湯待冷卻後定容，供作檢液。若檢體外盒未標示食用法，則以95°C熱開水450 mL浸泡5分鐘後，取出茶包，茶湯待冷卻後定容至500 mL，供作檢液。

(四)高效液相層析條件

層析管柱為GL Sciences Inertsil® ODS-2 (4.6 × 250 mm, 5 μm)；移動相為(A)乙腈，(B)0.085%磷酸溶液進行梯度沖提(如表一)；移動相流速0.9 mL/min；管柱溫度30°C；檢測波長270 nm；注射體積20 μL。

表一、梯度分析條件

時間(min)	A(%)	B(%)
0	15	85
20	15	85
40	20	80
60	25	75
62	100	0
67	100	0
69	15	85
75	15	85

(五)標準曲線製作

精確量取sennoside A及sennoside B標準原液各5 mL，分別以70%甲醇溶液定容至10 mL，再依序進行系列稀釋至sennoside A濃度分別為81.70、40.85、20.43、10.21、5.11、2.55、1.28、0.64、0.32及0.16 μg/mL及sennoside B濃度分別為83.45、41.73、20.86、10.43、5.22、2.61、1.30、0.65、0.33及0.16 μg/mL，注入高效液相層析儀中進行檢測。

(六)同日內及異日間試驗

自檢體中選擇茶包及錠劑檢體各1件，分別依照檢液調製方法配製3組不同濃度之檢液，於同1日及不同的3日以HPLC各分析3次，並將所得之數據計算相對標準偏差(RSD)。

(七)添加回收試驗

取已知含有sennoside A及sennoside B成分之樣品1 g，依照上述檢液調製方法處理，作為添加回收試驗之基質溶液。另取前述基質溶液5 mL置於10 mL容量瓶中，分別加入不同濃度之sennosides標準溶液，並以70%甲醇溶液定容至10 mL，使檢液中標準品添加濃度分別為sennoside A：8.17、16.34及24.51 $\mu\text{g/mL}$ 及sennoside B：8.35、16.69及25.04 $\mu\text{g/mL}$ 。將各濃度之溶液分別注入HPLC分析之，重複3次，並計算所得數據之相對標準偏差(RSD)。

(八)偵測極限及定量極限

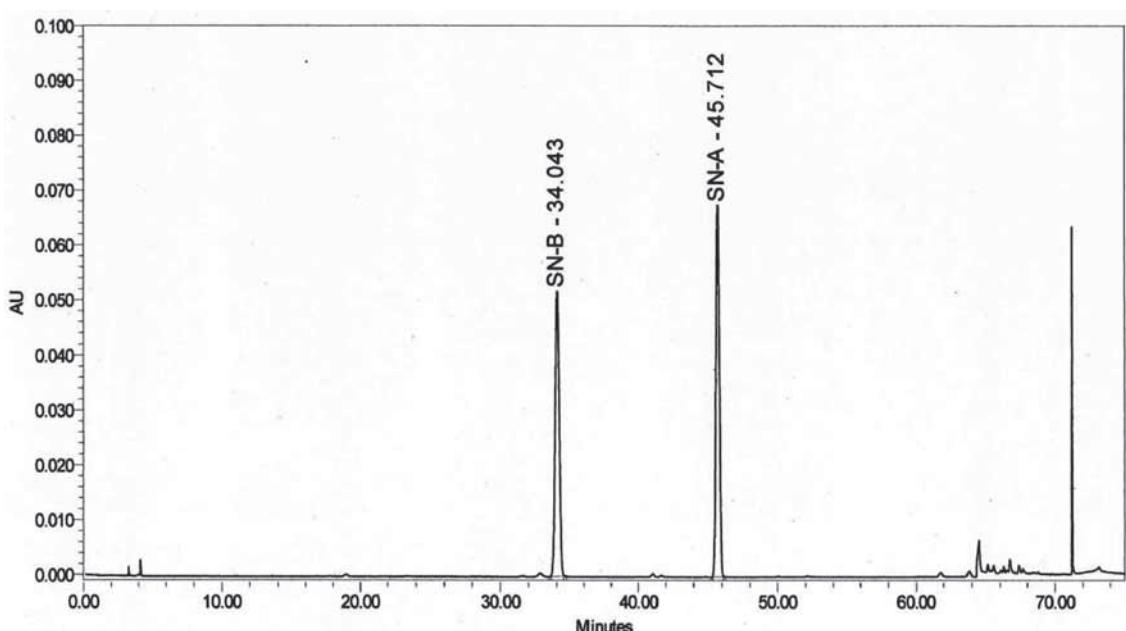
精確稱取均質後之空白錠狀檢體及不含番瀉葉成分之茶包，分別加入標準溶液，依檢液調製方法製備檢液，就所得之波峰訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，波峰高度為雜訊高度3倍之濃度作為本方法之偵測極限(limit of detection, LOD)，並以波峰高度為雜訊高度10倍之濃度作為本方法之定量極限(limit of quantification, LOQ)。

結果與討論

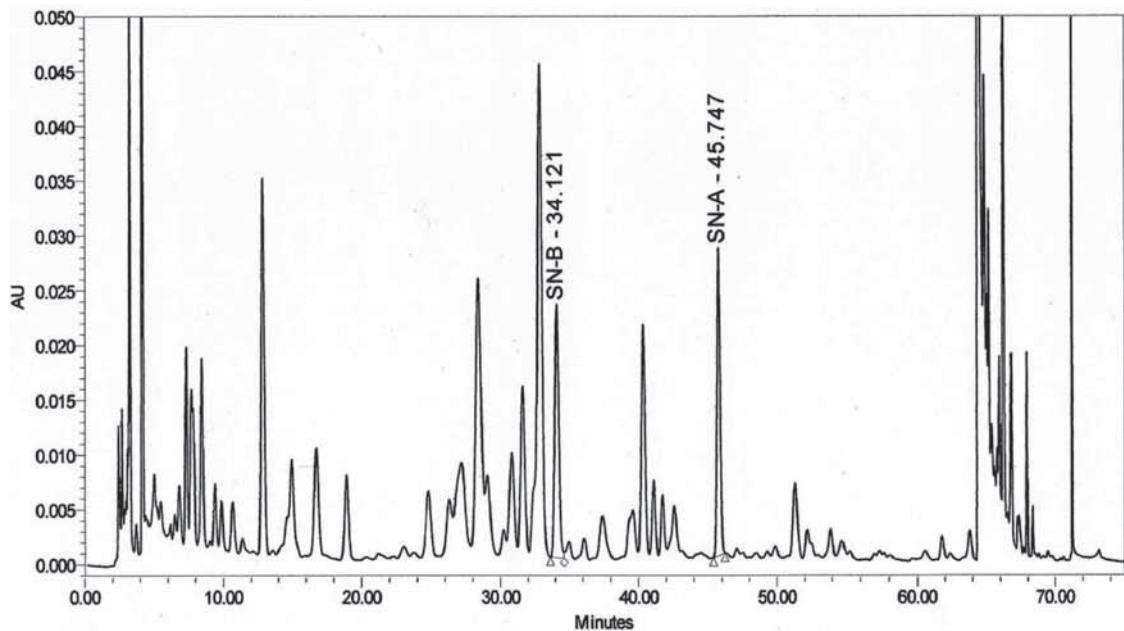
一、高效液相層析條件之選擇

本研究之檢體係由檢、警、調、直轄市及縣市衛生局抽查送驗，每件檢體之組成均不相同，且成分極為複雜，尤以茶包更勝，導致sennosides成分分析之困難度大增。本實驗以乙腈與0.085%磷酸溶液為移動相，嘗試多種不同比例之移動相層析條件，並以Inertsil® ODS-2及Inertsil® ODS-SP等不同種類之層析管柱，進行17種含有番瀉葉成分食品之測試。結果顯示，使用Inertsil® ODS-2搭配表一之梯度沖提條件時，sennoside A及sennoside B均具有較佳分離效果，在17件檢體中，僅有1件檢體無法成功與雜訊分離，針對該檢體進行個別調整後，亦可成功分離之，故以此為最適層析條件。sennoside A與sennoside B之滯留時間分別為45.7及34.0分鐘，整個分析過程需時75分鐘，其層析圖譜如圖一及圖二。

二、標準曲線之測定



圖一、sennoside A與sennoside B標準溶液之HPLC圖譜



圖二、錠狀食品(檢體編號12)中sennosides之HPLC圖譜

表二、茶包檢體中sennosides同日內與異日間試驗結果

Marker substance	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intraday Mean \pm SD (RSD,%) ^a	Interday Mean \pm SD (RSD,%) ^a
Sennoside A	1.5	1.46 \pm 0.02 (1.58)	1.46 \pm 0.01 (0.53)
	3.0	2.80 \pm 0.01 (0.37)	2.79 \pm 0.01 (0.21)
	6.0	6.28 \pm 0.00 (0.07)	6.32 \pm 0.05 (0.75)
Sennoside B	1.2	1.11 \pm 0.01 (0.88)	1.11 \pm 0.01 (0.61)
	2.4	2.23 \pm 0.02 (0.76)	2.23 \pm 0.01 (0.50)
	4.8	4.69 \pm 0.02 (0.46)	4.66 \pm 0.02 (0.47)

a. n=3

Sennoside A在濃度0.16-81.7 $\mu\text{g/mL}$ 之標準曲線迴歸方程式為 $Y = 10558X - 1733.4$ ，判定係數(r^2)為0.9995；sennoside B在濃度0.16-83.45 $\mu\text{g/mL}$ 之標準曲線迴歸方程式為 $Y = 11900X - 2111.1$ ， r^2 為0.9999，顯示濃度與波峰面積比值間有良好之線性關係。

三、同日內及異日間試驗

添加3種不同濃度標準品之茶包及錠狀檢體溶液，分別於同1日內及不同的3日連續分析3次。茶包檢體sennosides之分析結果如

表二所示，sennoside A同日內之相對標準偏差介於0.07-1.58%，異日間介於0.21-0.75%；sennoside B同日內之相對標準偏差介於0.46-0.88%，異日間介於0.47-0.61%。錠狀檢體sennosides之分析結果如表三，sennoside A同日內之相對標準偏差介於0.12-0.42%，異日間介於0.22-2.52%；sennoside B同日內之相對標準偏差介於0.20-0.35%，異日間介於0.10-1.30%，顯示本方法具有良好的再現性與精密度。

表三、錠劑檢體sennosides同日內與異日間試驗結果

Marker substance	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intraday Mean \pm SD (RSD,%) ^a	Interday Mean \pm SD (RSD,%) ^a
Sennoside A	18.0	18.34 \pm 0.08 (0.42)	18.42 \pm 0.10 (0.55)
	36.0	36.81 \pm 0.04 (0.12)	36.77 \pm 0.08 (0.22)
	72.0	73.66 \pm 0.15 (0.21)	75.81 \pm 1.91 (2.52)
Sennoside B	15.0	15.70 \pm 0.05 (0.30)	15.70 \pm 0.02 (0.10)
	30.0	30.89 \pm 0.11 (0.35)	30.75 \pm 0.13 (0.41)
	60.0	63.21 \pm 0.13 (0.20)	64.10 \pm 0.83 (1.30)

a. n=3

表四、Sennoside A與sennoside B添加回收試驗結果

Marker substance	Spiked Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery ^a (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
Sennoside A	8.17	107.8	8.81 \pm 0.20	2.30
	16.34	107.2	17.52 \pm 0.24	1.37
	24.51	108.5	26.59 \pm 0.05	0.18
Sennoside B	8.35	104.8	8.75 \pm 0.15	1.75
	16.69	99.9	16.67 \pm 0.40	2.38
	25.04	101.4	25.38 \pm 0.10	0.36

a. n=3

四、添加回收試驗

於實驗中所萃取之基質溶液中添加3種不同濃度之sennoside A與sennoside B標準品，結果如表四，sennoside A回收率為107.2-108.5%，sennoside B為99.9-104.8%，相對標準偏差(RSD)：sennoside A介於0.18-2.30%，sennoside B介於0.36-2.38%，符合食藥署建議之食品化學檢驗方法之確效規範⁽⁵⁾，顯示此分析方法之準確性高。

五、偵測極限及定量極限之評估

Sennoside A與sennoside B之偵測極限在錠劑及茶包檢液中略有不同，於錠劑檢液中sennoside A與sennoside B之偵測極限均為0.53 $\mu\text{g/mL}$ ，定量極限均為1.77 $\mu\text{g/mL}$ ；於茶包檢液中sennoside A與sennoside B之偵測極限均為0.27 $\mu\text{g/mL}$ ，定量極限為0.80 $\mu\text{g/mL}$ ，顯示錠

劑檢體基質對於sennoside A與sennoside B分析有較大的干擾。

結 論

本研究建立以HPLC/PDA分析膠囊錠狀食品及茶包中sennosides含量之檢驗方法，此方法之前處理流程，操作簡便、省時，其回收率、重複性及靈敏度皆相當良好，以此方法應用於17件檢體之分析，僅1件檢體之層析圖譜仍見些微干擾，需個案調整層析條件，其餘檢體均無干擾情形，故本方法可供作sennosides產品檢驗之參考。

參考文獻

1. 行政院衛生署臺灣中藥典編修小組。2013。台灣中藥典。第二版。第239頁。行政院衛生署中醫藥委員會，台北。
2. Lin, Y. T., Huang, C. Y. and Wen, K. C. 1998.

- Determination of sennosides A and B in diet tea by HPLC. J. Food Drug Anal. 6(1): 433-438.
3. 國家藥典委員會。2010。中華人民共和國藥典。第327頁。中國醫藥科技出版社，北京。
 4. 行政院衛生署。1999。有關番瀉葉茶包之管理，茲重新規定。88.07.28衛署藥字第88037570號公告。
 5. 行政院衛生署食品藥物管理局。2012。食品化學檢驗方法之確效規範。[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/SiteListGet-File.ashx?mid=133&id=10975&chk=7e48207e-eba9-416a-b71b-347b6c12308b>]。

Determination of Sennosides in Teabags and Foods in Capsule or Tablet form by HPLC/PDA

SHIH-SHAN HUANG, CHEN-HSIANG LAIO, YEN-CHUN HUANG,
YA-TZE LIN, CHIA-FEN TSAI AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

A method for the analysis of sennosides in teabags and foods in capsule or tablet form by high performance liquid chromatography/photodiode array detector (HPLC/PDA) was developed. Methanol (70%) and hot water (95°C) was applied for the extraction of sennosides from foods and teabags, respectively. The extracts were analyzed by HPLC/PDA system consisted of C18 reverse column and gradient mobile phase of acetonitrile and 0.085% H₃PO₄. The detection wavelength was 270 nm. The method demonstrated good linearities of sennoside A (range: 0.16-81.7 µg/mL) and sennoside B (range: 0.16-83.45 µg/mL) with regression coefficients (r^2) all above 0.999. The recovery studies were conducted by spiking sennosides into sample extract at the concentration of 8.17-25.04 µg/mL. For sennoside A, the average recoveries, relative standard deviations (RSDs) of intraday and interday recovery studies, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) were 107-108%, 0.07-2.52%, 0.53 µg/mL, and 1.77 µg/mL respectively. For sennoside B, the average recoveries, RSDs of intraday and interday recovery studies, LOD, and LOQ were 99-104%, 0.10-1.30%, 0.27 µg/mL, and 0.8 µg/mL respectively. The method selectivity was tested in 17 commercial products. The results showed only 1 sample revealed a chromatographic interference which was further improved after manual adjustment. This report will provide as reference to administrative authorities and public.

Key words: sennoside A, sennoside B, food with capsule and tablet forms, teabag, high performance liquid chromatography