

食品中蘆薈素及蘆薈大黃素檢驗方法評估

沈盈如* 古瓊寧 吳白玟 廖家鼎 高雅敏 陳惠芳

衛生福利部食品藥物管理署

(接受刊載日期：中華民國一〇五年八月十五日)

蘆薈具芳香特性、苦味及藥理活性，廣泛作為食品、飲料、膳食補充品及製藥等成分，有研究顯示未經脫色處理之蘆薈全葉萃取物會引起大鼠大腸癌和造成大鼠大腸、小腸、胃及淋巴結等增生之風險，基於安全考量，含蘆薈產品需進行適當品質控管。目前國內外對於相關產品訂定之規範或建議主要針對蘆薈素(Aloin)含量，考量蘆薈大黃素(Aloe Emodin)為其代謝物之一，故本研究選取Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin等3化合物作為目標分析物，檢體方面選用「膠囊粉劑」、「優格」及「飲料」等3種常見型態作為評估基質，並同時進行液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器(liquid chromatography-photodiode array detector, LC-PDA)及液相層析串聯質譜儀(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)等2種儀器分析，目的為建立簡便、適用範圍廣及能符合規範之檢驗方法供不同需求選擇使用。結果顯示，固態可檢測範圍介於0.1-1,000 µg/g(LC-PDA: 10-1,000 µg/g; LC-MS/MS: 0.1-10 µg/g)；半固態及液態可檢測範圍則介於0.01-10 µg/g(LC-PDA: 0.2-10 µg/g; LC-MS/MS: 0.01-2 µg/g)；整體來說，回收率介於61-121%、變異係數皆<16%，試驗結果理想。本研究建立之檢驗方法可同步進行Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin等3品項分析，適用不同類型食品，並可因應需求選擇使用LC-PDA或LC-MS/MS進行分析。

關鍵字：蘆薈素，蘆薈大黃素，LC-PDA，LC-MS/MS，蘆薈產品。

Evaluation of the Analysis Method of Aloin and Aloe Emodin in Food

Ying-Ru Shen*, Ai-Ning Ku, Pai-Wen Wu, Chia-Ding Liao, Ya-Min Kao and Hwei-Fang Cheng
Food and Drug Administration, Ministry of Health and Welfare

(Accepted for publication: August 15, 2016)

Aloe is widely used composition to manufacture food, beverages, dietary supplements or pharmaceuticals because of its aromatic properties, bitter taste, and pharmacological activities. Some studies showed that nondecolorized whole aloe leaf extract caused cancers of the large intestine in rats and also caused the risk of hyperplasia of the large intestine, small intestine, stomach, and lymph nodes in rats. For the safety reason that aloe commercial products should be control its quality. Concentration of Aloin is as the requirement of specification or recommendations for products of aloe in both domestically and abroad so far. Consider Aloe Emodin is metabolism of Aloin, so Aloin A, Aloin B and Aloe Emodin were selected in this study. In order to develop a method which can meet simple, widely use, and the requirement of specifications, the study was developed to determine the 3 compounds in 3 common products (capsule powder, yoghurt and beverage) with liquid chromatography-photodiode array detector (LC-PDA) or liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for options. The linear range of solid sample was from 0.1-1,000 µg/g (LC-PDA: 10-1,000 µg/g; LC-MS/MS: 0.1-10 µg/g) while semisolid sample and liquid sample were from 0.01-10 µg/g (LC-PDA: 0.2-10 µg/g; LC-MS/MS: 0.01-2 µg/g). For overall results, this study had satisfied recovery (61-121%) and well repeatability (< 16%). The developed method has been applied multiple 3 compounds and suitable for various products with LC-PDA or LC-MS/MS for options.

Key words: Aloin, Aloe Emodin, LC-PDA, LC-MS/MS, Products of aloe.

前 言

蘆薈(aloe)屬(genus)為百合科(Liliaceae family)，含超過400種(species)類別，是原

生於非洲之多年生多肉植物，現已廣泛分布在熱帶及亞熱帶地區⁽¹⁾。此植物可儲存大量的水分於膠體中，水含量約99.0-99.5%間，剩餘1.0-0.5%之固形物則含有維生素、礦物質、醇

* Corresponding author. E-mail: yingrushen@fda.gov.tw

素、醣類、酚類化合物和有機酸等超過 75 個潛在的活性成分⁽²⁾。以蘆薈葉子結構來看，外圍為含葉綠素的厚角質層；中心膠體含大型薄壁細胞，內部則包含蘆薈凝膠(gel)；木質部、韌皮部和週環管(pericyclic tubules)等運輸系統位於葉子內緣及膠體間之區域，週環管可輸送蘆薈乳膠(latex)，蘆薈乳膠含有酚醛(phenolic)、糖苷鍵結蒽醌(anthraquinone C-glycosides)、蒽酮(anthrones)及游離蒽醌(free anthraquinones)等主要成分⁽²⁾。Hydroxyanthrone衍生物或anthraquinones會造成腹瀉，該成分主要位於蘆薈乳膠中，乳膠層中 Aloin 佔 15~40%，Aloin 含 Aloin A (barbaloin) 及 Aloin B (isobarbaloin) 2 鏡像異構物，屬於 anthraquinone C-glycosides⁽³⁾。蘆薈凝膠中亦存在 Aloin，但含量上相對少了許多，依不同品種及採收季節其範圍約 10~90 $\mu\text{g/g}$ 間，夏天採收之蘆薈，其凝膠中 Aloin 含量顯著高於冬天採收的量⁽⁴⁾。Aloin 攝入後，經腸道細菌水解成具活性代謝物 aloe-emodin-9-anthrone，其會刺激腸道而產生腹瀉反應，

亦會進一步氧化為 Aloe Emodin 及 rhein⁽²⁾。蘆薈產品經適當加工處理(去除外皮或添加活性碳)可大幅減少蘆薈素含量，舉例來說，蘆薈全葉提取物經脫色處理，可由原來黃綠色液體變為無色，但同時碳的吸附會降低流變(rheological)特性及減少 19~23% 多醣含量，造成某些物化特性改變⁽²⁾。

目前有關蘆薈產品蒽醌化合物含量之規範，主要以 Aloin 含量訂定之。在臺灣需遵循之相關規範包含「蘆薈供作食品原料之使用規定」、「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」及「使用原料『蘆薈』之有容器或包裝食品應標示警語」等規定^(5~7)；國際間如歐盟於 88/388/EEC 訂有 Aloin 作為香料成分(flavourings)之各類食品最大限量(maximum limits)⁽⁸⁾；另國際蘆薈科學協會(International Aloe Science Council, IASC)亦對蘆薈產品中 Aloin 含量提出建議⁽⁹⁾，相關資訊彙整於表一。

Aloin A 及 Aloin B 為鏡像異構物，兩者物化特性相近，與 Aloe Emodin 相比，Aloin 極性較

表一 有關蘆薈產品中蘆薈素含量規範/建議之相關資訊

Table 1. Informations of regulation or recommendation of Aloin in products

國家/組織 (Reference)	名稱	規範/建議
	蘆薈供作食品原料之使用規定	確實「完全去皮」後始得供作食品及加工使用之原料，無產品類型及攝食量之限制。 產品販售時應加標「孕婦忌食」字樣之警語；如檢具經公信機構檢驗不含「蘆薈素(Aloin)」之分析證明者，始得免標「孕婦忌食」警語。 純化之「蘆薈素」未准許添加於食品中。 蘆薈原料或其萃取物之蘆薈素含量如高於 0.3% (3,000 ppm)，應依「非傳統性食品原料申請作業指引」，提出資料進行安全評估。
臺灣(5~7)	食品添加物使用範圍及限量暨規格標準	蘆薈素作為香料 飲料：0.1 mg/kg 使用原料「蘆薈」需確實經完全去皮後始得加工使用。 添加「蘆薈」之產品，每日最高攝食量以蘆薈素(Aloin)計不得超過 10 毫克。
	使用原料『蘆薈』之有容器或包裝食品應標示警語(105年7月1日實施)	使用原料「蘆薈」之有容器或包裝食品應以中文顯著標示「不建議經期、懷孕或哺乳期婦女、12 歲以下孩童、腸胃不適、腹痛患者及腎病患者食用」字樣之警語；若檢具產品經具公信機構檢驗所含「蘆薈素」含量低於 0.1 mg/kg 之分析證明者，則始得免標前述之警語。
歐盟(8)	88/388/EEC	蘆薈素作為香料 食品：0.1 mg/kg 飲料：0.1 mg/kg 酒精飲料：50 mg/kg
國際蘆薈科學協會(9)	—	含蘆薈之口服產品，蘆薈素 < 10 mg/kg



高。Wang等人⁽¹⁰⁾建議以50%甲醇水溶液(*v/v*)及二甲基亞礦(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶劑分別配製Aloin A及Aloe Emodin標準品原液(stock solution)；產品萃取方面，大多文獻以去離子水搭配甲醇或乙腈有機溶劑進行萃取，本研究選擇4篇較具代表性的檢驗方法彙整於表二^(3,10-12)；普遍使用的分析儀器為LC-UV/PDA，近年來由於儀器發展，亦有人以LC-MS/MS進行分析；目標分析物穩定度方面，則有文獻針對Aloin進行評估^(13,14)，大致來說，Aloin於鹼性、高溫及甲醇溶劑中較不穩定。

蘆薈所含成分因具有理化及藥理活性，廣泛被製作成各式食品，而有研究顯示蘆薈全葉萃取物會引起大鼠大腸癌和造成大鼠大腸、小腸、胃及淋巴結等增生之風險⁽²⁾，目前國內外對於含蘆薈產品中Aloin訂有規範(表一)，故含蘆薈產品需進行適當品質控管。本研究以膠乳層中含量較高的Aloin(含Aloin A及Aloin B)及與代謝相關的Aloe Emodin等3化合物作為目標分析物，選用「膠囊粉劑」、「優格」及「飲料」等3種不同型態產品作為評估基質，並同時探討LC-PDA及LC-MS/MS等2種不同類型儀器，期能建立簡便、適用範圍廣及能符合規範之檢驗方法供不同需求選擇使用。

材料與方法

一、試驗樣品

選擇常見飲品「紅葡萄蘋果汁」、「原味優格」及自行配製膠囊錠狀食品常見賦形劑「粉末基質」(每100 g粉末基質含玉米澱粉24 g、乳糖24 g、結晶纖維素24 g、澱粉24 g、硬脂酸鎂2 g及二氧化矽2 g)分別代表「液體」、「半固體」及「固體」基質，並作為檢驗方法建立及測試所需之空白檢體；「紅葡萄蘋果汁」及「原味優格」儲放於4°C，「粉末基質」則儲放於室溫備用。

二、試驗藥品

1. Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin對照用標準品

Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin等3品項標準品皆購自ChromaDex[®]公司(Irvine, CA, USA)，純度分別92.3%、89.1%及87.6%。

2. 試藥溶劑

乙腈(acetonitrile, MeCN)及甲醇(methanol, MeOH)採用液相層析級(HPLC

grade)；醋酸(acetic acid)採用分析級；二甲基亞礦(dimethyl sulfoxide, DMSO)、玉米澱粉、乳糖、結晶纖維素、澱粉、硬脂酸鎂及二氧化矽均採用試藥級。

三、試驗方法

1. 標準溶液之配製

取Aloin A及Aloin B對照用標準品各約5 mg，精確稱定，分別以甲醇：去離子水(1:1, *v/v*)溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-20°C避光貯存；取Aloe Emodin對照用標準品約5 mg，精確稱定，以DMSO溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於-20°C避光貯存。臨用時，取適量各標準原液混合，以乙腈：去離子水(4:6, *v/v*)溶液稀釋至10 µg/mL，供作標準溶液(Aloin易降解，試驗前須確認標準原液之Aloin含量)。

2. 檢液之調製

將檢體均勻混合後，膠囊錠狀食品取約0.1/0.5 g(取樣量可視目標分析物濃度適度調整)、液體/半固體類取約5 g，分別精確稱定至15 mL及50 mL聚丙烯(Polypropylene, PP)離心管，加入乙腈：去離子水(4:6, *v/v*)溶液5 mL，旋渦混合1分鐘，超音波振盪10分鐘，再旋渦混合1分鐘，以4,500 × g離心10分鐘，取上清液，經0.2 µm聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)濾膜過濾，作為檢液原液，以LC-PDA分析；取檢液原液500 µL，加入乙腈：去離子水(4:6, *v/v*)溶液使體積為1,000 µL，混合均勻，供作檢液，以LC-MS/MS分析。

四、儀器分析條件

1. LC-PDA

Dionex Ultimate 3000高效液相層析儀，搭配Ultimate 3000 RS光二極體陣列檢出器及Chromelone Version 6.80數據分析軟體之電腦系統，台灣賽默飛世爾科技股份有限公司(Taipei, Taiwan)。

光二極體陣列檢出器：Aloin定量波長357 nm；Aloe Emodin定量波長257 nm。

層析管：Phenomenex Kinetex C18, 2.6 µm，內徑4.6 mm × 10 cm。

層析管溫度：40°C。

樣品盤溫度：10°C。

注入量：10 µL。



移動相溶液A：取醋酸1 mL，加去離子水使成1,000 mL，供作移動相溶液A。

移動相溶液B：取醋酸1 mL，加甲醇使成1,000 mL，供作移動相溶液B。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0 → 6	55 → 55	45 → 45
6 → 7	55 → 0	45 → 100
7 → 9	0 → 0	100 → 100
9 → 10	0 → 55	100 → 45
10 → 15	55 → 55	45 → 45

移動相流速：1.0 mL/min。

2. LC-MS/MS

Acquity I Class超高效液相層析儀 (ultra performance LC, UPLC)，搭配Xevo® TQ-S micro質譜儀及Target Lynx Version 4.1數據分析軟體之電腦系統，美商沃特斯(Waters)國際股份有限公司台灣分公司(Taipei, Taiwan)。

層析管：Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 μm ，內徑2.1 mm × 10 cm。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析。

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 0.4	70 → 70	30 → 30
0.4 → 5.0	70 → 15	30 → 85
5.0 → 6.0	15 → 15	80 → 85
6.0 → 7.0	15 → 0	85 → 100
7.0 → 8.0	0 → 0	100 → 100
8.0 → 9.0	0 → 70	100 → 30
9.0 → 15.0	70 → 70	30 → 30

移動相流速：0.3 mL/min。

樣品盤溫度：10 °C。

注入量：5 μL 。

毛細管電壓(Capillary voltage)：電灑離子化負離子(ESI-)採用1.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150 °C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：450 °C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow)：30 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow)：900 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量(collision

energy)如下表：

分析物	離子對		碰撞能量(eV)
	前驅離子(m/z)>	產物離子(m/z)	
Aloin A	417 > 297*	31	22
	417 > 268	31	33
Aloin B	417 > 297*	31	22
	417 > 268	31	33
Aloe Emodin	269 > 240*	47	43
	269 > 211		

*定量離子對

五、基質效應(matrix effect)評估

1. 製備基質匹配檢量線(matrix-matched calibration curve)

取不同基質之空白檢液原液，分別量取500 μL ，分別加入1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準溶液3-300 μL ，再加入乙腈：去離子水(4 : 6, v/v)溶液使體積為1,000 μL ，混合均勻，製作成0.003-0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之基質匹配檢量線(使用加權線性回歸1/x進行校正，以提高低濃度數值之準確性)(EU DG SANCO)⁽¹⁶⁾。

2. 製備溶劑標準曲線(calibration curve in solvent)

取適量標準溶液，以乙腈：去離子水(4 : 6, v/v)溶液稀釋至0.003-0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，製作溶劑標準曲線(使用加權線性回歸1/x進行校正，以提高低濃度數值之準確性)。

3. 計算方式：

定量離子波峰面積與對應之濃度製成之基質匹配檢量線($y = \alpha x + n_1$)及溶劑標準曲線($y = \beta x + n_2$)，依下列計算式求得Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin於不同基質下的基質效應：

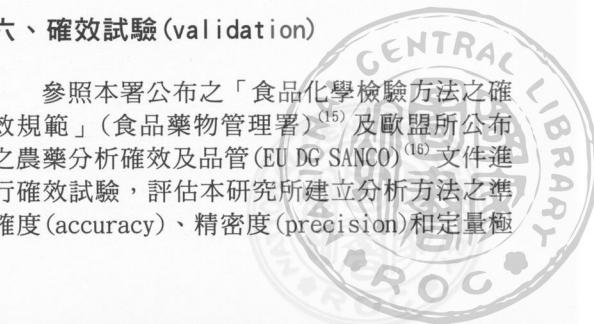
$$\text{基質效應}(\%) = \left(\frac{\alpha}{\beta} - 1 \right) \times 100$$

α ：基質匹配檢量線之斜率

β ：溶劑標準曲線之斜率

六、確效試驗(validation)

參照本署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範」(食品藥物管理署)⁽¹⁵⁾及歐盟所公布之農藥分析確效及品管(EU DG SANCO)⁽¹⁶⁾文件進行確效試驗，評估本研究所建立分析方法之準確度(accuracy)、精密度(precision)和定量極



限(limit of quantification, LOQ)。

結果與討論

一、目標分析品項之選擇

根據美國國家毒理學計畫報告⁽²⁾及相關文獻資料⁽³⁾顯示，蘆薈全葉萃取物會造成急性和慢性不良反應；對應國內外有關蘆薈之相關規範(表一)，發現目前主要針對蘆薈產品蒽醌化合物之Aloin含量有所規範。Aloin含有Aloin A及Aloin B等2項鏡像同分異構物，另考量Aloin於甲醇中不穩定，會逐漸轉成Aloe Emodin⁽¹³⁾或經氧化作用成為Aloe Emodin⁽¹⁰⁾，故本研究選擇Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin作為目標分析物。

二、儀器條件參數之設定及LOQ評估依據

儀器條件參數之設定部分，分別配製 Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin等3品項單一標準品溶液，參考相關文獻資料^(3,10-12)進行儀器條件參數設定，LC-PDA以單一標準品進行全波長掃描，選定Aloin A及Aloin B的定量波長為357 nm，Aloe Emodin的定量波長則為257 nm；LC-MS/MS則主要參考文獻資料⁽¹⁰⁾，以單一標準品進行最適條件測試，設定之參數資料列於材料與方法之「儀器分析條件」。在層析使用之移動相方面，參考文獻資料^(3,10)結果，分別比較含0.1%及0.5%醋酸之移動相層析之LC-MS/MS測試結果(結果未呈現)。發現3品項目標分析物於前述2種移動相所得層析圖感度及分離度皆良好，無明顯差異，本研究選擇0.1%醋酸作為移動相溶液。

定量極限(limit of quantification, LOQ)評估，分別參考文獻資料中蘆薈相關產品Aloin及Aloe Emodin含量檢測結果^(3,10)及國內外相關規範(表一)。由文獻檢測結果發現，不同類型之產品，Aloin之含量介於未檢出~160,000 µg/g，而Aloe Emodin則介於未檢出~453 µg/g之間。由上述可知，檢測濃度範圍差距極大，因需標示警語之Aloin含量界限為0.1 µg/g，故其LOQ至少需≤ 0.1 µg/g。

三、測試樣品之選擇

市面上常見之含蘆薈產品型態有液體(含蘆薈之飲品)、半固體(含蘆薈之果凍或優格)

及膳食補充品(含蘆薈萃取物之膠囊錠狀產品)。因Aloin及Aloe Emodin為天然存在於蘆薈植物之成分，其空白基質難以取得，故以人工設計類似基質作為測試樣品。本研究經評估選擇常見的果汁飲品「紅葡萄蘋果汁」、「原味優格」及自行配製膠囊錠狀食品常見賦形劑「粉末基質」，分別代表「液體」、「半固體」及「固體」空白測試檢體。

四、試驗流程設定

比較表二彙整之4篇方法試驗流程，考量簡便、時效及現階段儀器進步等因素，以Wang等人⁽¹⁰⁾試驗流程為主要架構進行測試。在萃取溶劑部分，除CNS 15502「飲料中蘆薈素含量檢驗法」⁽¹¹⁾使用疏水性有機溶劑乙酸乙酯萃取外，其他3篇皆以親水性有機溶劑(乙腈或甲醇)水溶液作為萃取溶液。以化學結構式來看，Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin等3品項皆帶有多個-OH基團(圖一)，屬親水性化合物，可以推測以疏水性有機溶劑進行萃取效果會較差，進一步解釋CNS的試驗流程須進行多次反覆萃取之原因。為選取合適之萃取溶液，本研究以自行配製之賦形劑「粉末基質」為測試樣品，分別進行4種萃取溶液(乙酸乙酯、55%甲醇水溶液、0.1%醋酸甲醇溶液及40%乙腈水溶液)於5 µg/g Aloin A及Aloin B添加含量之回收測試(n = 3)，試驗結果整理於表三。由表三可發現，乙酸乙酯之萃取效果不佳，與上述推論相符；而萃取溶液以適當混合水及有機溶劑萃取效果較佳；比較甲醇水溶液及乙腈水溶液之回收率結果，發現兩者差異不大，且皆能符合本署「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽¹⁵⁾，因甲醇對於脂肪溶解性較佳，為減少干擾物質，故選擇以40%乙腈水溶液作為萃取溶液。綜合上述，確定本研究之試驗流程。

五、確效試驗

1. 基質效應評估結果

評估及計算方式詳見材料與方法之「基質效應(matrix effect)評估」，結果整理於圖二，正值表示促進(enhancement)效應，負值則為抑制(suppression)效應；數值大小顯示促進或抑制程度。圖二為3種不同基質(粉末、果汁及優格)中Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin分別於2種不同線性範圍(0.003–0.075 µg/mL及0.05–0.3 µg/mL)所呈現之基質

表二 Aloin 及 Aloe Emodin 檢驗方法資訊

Table 2. Informations of method collection for Aloin and Aloe Emodin

Items \ References ^(*)	CNS 15502 ⁽¹¹⁾	Ann. Rept. NLFD 9:209-216, 1991 ⁽¹²⁾	J. AOAC Int. 97: 1323-1328, 2014 ⁽³⁾	Anal. Methods 4: 3612-3619, 2012 ⁽¹⁰⁾
Matrix	Beverage (alcohol)	Beverage	Liquid (juice) and powder (capsule)	Liquid, soft gel, capsule and tab
Target	Aloin	Aloin	Aloin A and Aloin B	Aloin A and Aloe Emodin
Extraction solvent (ES)	Ethyl acetate	Adsorbex RP-18 (SPE) with MeOH: dH ₂ O = 55:45 (v/v)	Liquid (juice): 0.1% acetic acid in MeOH powder (capsule): 1. 0.1% acetic acid in water; 2. 0.1% acetic acid in MeOH	MeCN: dH ₂ O = 40 : 60 (v/v)
Sample preparation	25 g sample → [30 mL ES → centrifugation → supernatant] × 2 → evaporation → MeOH → filtration → LC-UV (293 nm)	10 mL sample → adsorbex RP-18 (SPE) → ES (elute) → filtration → LC-UV (295 nm)	Liquid (juice): → dilute 1 : 1 (v/v) with ES → centrifugation → filtration (supernatant) → LC-PDA/UV (357 nm) Powder (capsule): → 0.1 g sample → 1 mL ES1 for > 50 µg/mL → 1 mL ES2 → centrifugation → filtration (supernatant) → LC-PDA/UV (357 nm)	Soft gel, capsule and tab: → 10-20 mg sample → 10 mL ES → sonication → centrifugation → filtration (supernatant) → LC-MS/MS Liquid: → 2 mL sample → 8 mL ES → sonication → centrifugation → filtration (supernatant) → LC-MS/MS
Mobile phase	A: 0.1% phosphoric acid sol. B: MeCN	MeOH : dH ₂ O = 55 : 45 (v/v) Isogradient	A: 0.1% acetic acid in water B: 0.1% acetic acid in MeCN	A: 0.5% acetic acid in water B: 0.5% acetic acid in MeOH
LOD/LOQ	LOD: 0.03 ppm	LOD: 0.04 ppm	LOQ: LOD: 0.09 µg/mL (both) LOQ: 0.23 µg/mL (Aloin A) 0.21 µg/mL (Aloin B) Others: 5 µg/g (Aloin A) 1 µg/g (Aloe Emodin)	LOQ: Liquid: 0.025 µg/mL (Aloin A) 0.005 µg/mL (Aloe Emodin) Others: 5 µg/g (Aloin A) 1 µg/g (Aloe Emodin)

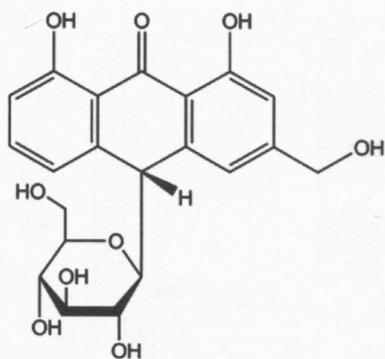
效應。由結果發現，Aloin A、Aloin B 及 Aloe Emodin 於粉末基質及果汁之基質效應不明顯，均小於 ±15%；優格所呈現基質效應則較明顯，大於 15%（介於 -12~25%），故建議優格基質採基質匹配檢量線進行定量。為增加試驗之可信度及準確性，於質譜分析部分，本研究測試之基質皆採基質匹配檢量線進行定量。

2. 添加回收及 LOQ 結果

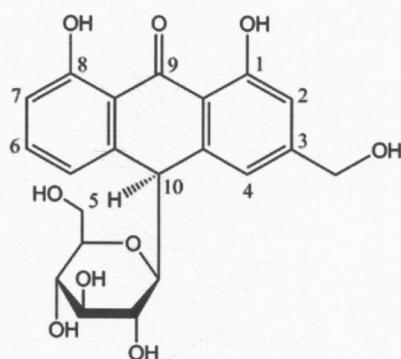
(a) LC-PDA

首先進行標準曲線線性範圍測試，經評估發現，Aloin A、Aloin B 及 Aloe Emodin 濃度於 0.1~20 µg/mL 間可達良好線性。考量膠囊食品加工之濃縮效應及國內外針對含蘆薈產品所訂定之規範（表一），設計 2 種不同之線性範圍分別搭配粉末基質（0.1~20 µg/mL）及果汁和優格基質（0.1~10 µg/mL）。粉末基質分別製作含 10 及 600 µg/g 之 3 品項化合物檢體，而果汁和優格基質則分別製作含 0.2 及 5 µg/g 之 3 品項化合物檢體，皆進行 5 重複試驗，利用所得結果評估本

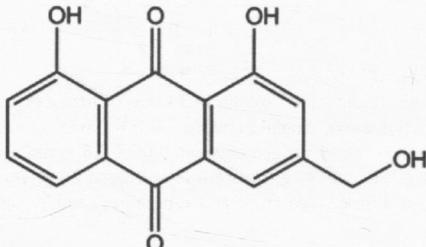
Aloin A



Aloin B



Aloe Emodin



圖一 Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin之結構
Fig. 1. Structures of Aloin A, Aloin B and Aloe Emodin.

表三 4種不同萃取溶液於含Aloin粉末基質^{*}之萃取效果(n = 3)Table 3. Extraction efficiency for Aloin A and Aloin B spiked into powder matrix^{*} at 5 µg/g using 4 kinds of extraction solvents (n=3)

Extraction solvent	Spiked level (µg/g)	Aloin B		Aloin A	
		Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)
Ethyl acetate		34.73	7.69	32.51	19.64
MeOH: dH ₂ O = 55 : 45 (v/v)	5	84.48	4.27	80.84	5.96
0.1% acetic acid in MeOH		70.10	2.46	61.04	10.41
MeCN: dH ₂ O = 40 : 60 (v/v)		96.69	5.59	96.79	7.02

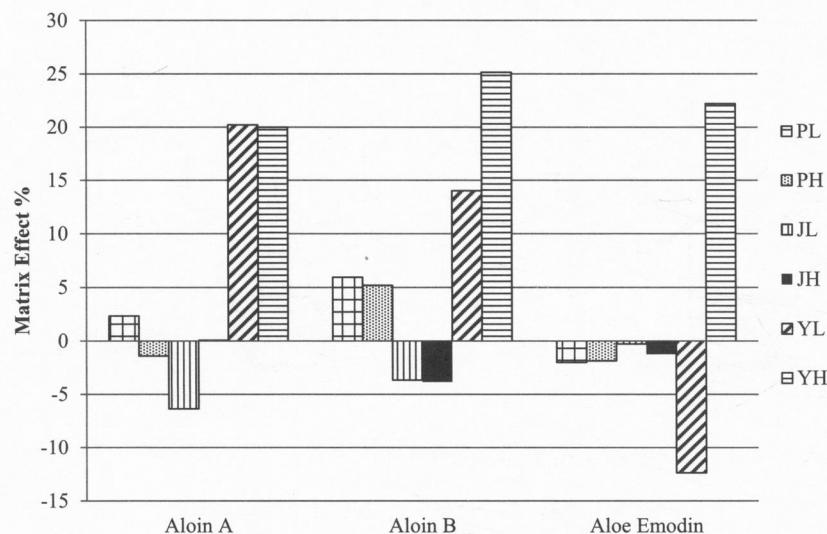
*The powder matrix containing corn starch 24 g, lactose 24 g, crystalline cellulose 24 g, starch 24 g, magnesium stearate 2 g and silicon dioxide 2 g per 100 g.

研究開發流程之準確度、精密度及LOQ，試驗結果整理於表四。除優格基質在0.2 µg/g Aloe Emodin添加濃度之平均回收率(121.44%)略高於「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽¹⁵⁾之建議範圍(70–120%)，其餘皆能符合規範要求，本研究認為Aloe Emodin略高之回收率為可接受，故其仍為適用分析濃度範圍。綜合來說，以LC-PDA進行分析，粉末基質及果汁和優格基質適用之分析範圍分別介於10–1,000 µg/g及0.2–10

µg/g；LOQ則分別為10 µg/g及0.2 µg/g，如檢體含量超出線性範圍，可彈性調整取樣量及萃取溶液體積並搭配品保確認試驗準確性。

(b) LC-MS/MS

由於本研究LC-PDA於「粉末基質」及「果汁和優格基質」之LOQ分別為10 µg/g及0.2 µg/g，仍高於部分國內外規範Aloin所設定之0.1 µg/g，故另外搭配液相層析串聯



圖二 Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin於3種基質之基質效應

Fig. 2. Matrix effects for Aloin A, Aloin B and Aloe Emodin in 3 kinds of matrices.

1. L indicates the lower calibration curve ranged between 0.003 ~ 0.075 $\mu\text{g/mL}$.2. H indicates the higher calibration curve ranged between 0.05 ~ 0.3 $\mu\text{g/mL}$.

3. P: powder (corn starch 24 g, lactose 24 g, crystalline cellulose 24 g, starch 24 g, magnesium stearate 2 g and silicon dioxide 2 g per 100 g), J: juice (red grape and apple juice) and Y: yogurt.

表四 以LC-PDA分析3目標物於3種基質之添加回收結果($n = 5$)Table 4. Recovery results for Aloin A, Aloin B and Aloe Emodin spiked into a powder matrix, juice matrix and yogurt by LC-PDA ($n = 5$)

Matrix	Spiked level $\mu\text{g/g}$	Aloin A		Aloin B		Aloe Emodin	
		Avg. R%	CV%	Avg. R%	CV%	Avg. R%	CV%
Powder ^a	10.0*	95.70	15.07	103.21	12.67	114.88	3.35
	600.0	89.64	2.16	91.04	2.75	100.06	1.63
Juice ^b	0.2*	95.82	9.14	97.57	9.78	95.81	1.82
	5.0	91.11	9.19	91.56	9.19	91.39	9.03
Yogurt	0.2*	91.92	6.18	93.32	6.63	121.44 ^c	8.82
	5.0	79.73	10.88	80.75	10.76	99.57	10.13

1. ^aThe powder matrix containing corn starch 24 g, lactose 24 g, crystalline cellulose 24 g, starch 24 g, magnesium stearate 2 g and silicon dioxide 2 g per 100 g.2. ^bRed grape and apple juice.3. ^cindicates R % of each compound does not meet the criterion of method validation⁽¹⁵⁾.

4. * indicates LOQ in each matrix.

質譜分析，藉助其靈敏的鑑別性及感度分析較低之濃度範圍。基質匹配檢量線線性範圍測試結果顯示，Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin於0.002–0.5 $\mu\text{g/mL}$ 間可達良好線性。考量膠囊食品加工之濃縮效應及國內外針對含蘆薈產品所訂定之規範(表一)，粉末基質分別製作含0.1及10 $\mu\text{g/g}$ 之3品項化合物檢體，而果汁和優格基質則分別製作含0.01及0.4 $\mu\text{g/g}$ 之3品項化合

物檢體，皆進行5重複試驗，利用所得結果評估本研究開發流程之準確度、精密度及LOQ，試驗結果整理於表五。表五中除優格基質在0.4 $\mu\text{g/g}$ Aloe Emodin添加濃度之平均回收率(64.60%)略低於「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽¹⁵⁾建議範圍(70–120%)，其餘皆能符合規範要求，而本研究認為Aloe Emodin略低之回收率尚可接受，故其仍為適用分析濃度範圍。綜

表五 以LC-MS/MS分析3目標物於3種基質之添加回收結果(n=5)

Table 5. Recovery results for Aloin A, Aloin B and Aloe Emodin spiked into a powder matrix, juice matrix and yogurt by LC-MS/MS (n=5)

Matrix	Spiked level μg/g	Aloin A		Aloin B		Aloe Emodin	
		Avg. R%	CV%	Avg. R%	CV%	Avg. R%	CV%
Powder ^a	0.10*	100.80	1.77	99.20	1.10	93.60	1.79
	10.00	101.57	3.00	97.98	0.44	97.38	0.58
Juice ^b	0.01*	95.20	3.52	85.60	4.18	97.60	4.67
	0.40	104.46	1.49	101.66	0.74	106.10	0.84
Yogurt	0.01*	95.60	2.73	94.80	1.16	61.20	5.47
	0.40	101.68	2.41	98.94	1.46	64.60 ^c	1.56

1. ^aThe powder matrix containing corn starch 24 g, lactose 24 g, crystalline cellulose 24 g, starch 24 g, magnesium stearate 2 g and silicon dioxide 2 g per 100 g.

2. ^bRed grape and apple juice.

3. ^cindicates R % of each compound does not meet the criterion of method validation⁽¹⁵⁾.

4. * indicates LOQ in each matrix.

合來說，以LC-MS/MS進行分析，「粉末基質」及「果汁和優格基質」適用之分析範圍分別介於0.1-10 μg/g及0.01-2 μg/g；LOQ則分別為0.1 μg/g及0.01 μg/g，如檢體含量超出線性範圍，可彈性調整取樣量及萃取溶液體積並搭配品保確認試驗準確性。

本研究所得之LC-PDA及LC-MS/MS結果，可分別運用於不同需求之檢驗。舉例來說，如含蘆薈產品Aloin含量低，想進一步確認是否可達免標警語之標準(Aloin含量小於0.1 mg/kg)符合我國規範⁽⁷⁾，則可以LC-MS/MS分析；如是確認蘆薈原料是否符合使用規定(Aloin含量0.3%為進行安全評估之界線值)⁽⁵⁾，則使用LC-PDA即可滿足需求。質譜儀所需的保養維護及相關花費相較一般LC，的確高出許多，故本研究同時進行LC-PDA及LC-MS/MS之試驗評估，提供實驗室進行檢驗時能有更多選擇。

結論

本研究所建立之「食品中蘆薈素及蘆薈大黃素檢驗方法」可同步進行Aloin A、Aloin B及Aloe Emodin等3品項分析，適用不同類型(固體、半固體或液體)食品，並可因應需求選擇使用LC-PDA或LC-MS/MS進行分析。雖然目前國內外對於含蘆薈產品所訂定之規範或建議主要針對蘆薈成分中的Aloin含量(表一)，但考量Aloin emodin含量仍可作為相關研究參考，故進行方法建立時亦納入此品項。

參考文獻

- K Patel and D. K. Patel: Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of Aloin: a concise report. *J. Acute Disease*, **2**(4): 262-269 (2013).
- National Institutes of Health: Toxicology and carcinogenesis studies of a nondecolorized whole leaf extract of Aloe Barbadensis Miller (Aloe vera) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). NTP TR 577, U.S. (2013).
- P. N. Brown, R. Yu, C. H. Kuan, J. Finley and E. M. Mudge: Determination of Aloin A and Aloin B in Aloe vera raw materials and finished products by high-performance liquid chromatography: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.*, **97**(5): 1323-1328 (2014).
- P. J. Zapata, D. Navarro, F. Guillén, S. Castillo, D. Martínez-Romero, D. Valero and M. Serrano: Characterisation of gels from different Aloe spp. as antifungal treatment: potential crops for industrial applications. *Ind. Crops Prod.*, **42**: 223-230 (2013).
- 衛生福利部食品藥物管理署：食藥署重申蘆薈供作食品原料之使用規定。<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?id=13518&chk=a76dbe41-005a-4529-b374-8f1783be1aa8¶m=pn#.VnUNTXh97IU> (發布日期：2015.05.15)。
- 衛生福利部食品藥物管理署：食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。<https://consumer.fda.gov.tw/Law/FoodAdditivesList.aspx?nodeID=521> (發布日期：2013.11.25)。
- 衛生福利部食品藥物管理署：預告訂定「使用原料『蘆薈』之有容器或包裝食品應標示警語」草案。<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?id=19307&chk=dc0731f7-fe9c-414a-8ed0-60117ee6a228¶m=pn&cid=3&cchk=46552e96-810a-42c3-83e1-bd5e42344633&key1=%E8%98%86%E8%96%88#.VnUPsXh97IU> (發布日期：2015.12.03)。
- The European Economic Community (EEC) Council: on the approximation of the laws of the Member States

- relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav09_en.pdf (88/388/EEC) (released 1991.02.07).
- (9) International Aloe Science Council (IASC): IASC Aloe vera FAQ. <http://www.iasc.org/faq.html> (2013).
- (10) P. G. Wang, W. Zhou, W. G. Wamer, A. J. Krynnitsky and J. I. Rader: Simultaneous determination of Aloin A and Aloe Emodin in products containing Aloe vera by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*, 4: 3612-3619 (2012).
- (11) 經濟部標準檢驗局：飲料中蘆薈素含量檢驗法。中華民國國家標準100年11月15日 CNS 15502 N6398。臺北，臺灣(2011)。
- (12) 吳白玟，張碧秋，周薰修：飲料中蘆薈素檢驗方法之探討。藥物食品檢驗局調查研究年報，9: 209-216 (1991)。
- (13) W.-J. Ding, X.-F. Wu, J.-S. Zhong and J.-Z. Wan: Effects of temperature, pH and light on the stability of Aloin A and characterisation of its major degradation products. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 49: 1773-1779 (2014).
- (14) X. L. Chang, C. Wang, Y. Feng and Z. Liu: Effects of heat treatments on the stabilities of polysaccharides substances and barbAloin in gel juice from Aloe vera Miller. *J. Food Eng.*, 75: 245-251 (2006).
- (15) 行政院衛生署食品藥物管理署：食品化學檢驗方法之確效規範。<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115> (發布日期：2012.10.15)。
- (16) European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013, EU (2013).
- (17) 行政院衛生署食品藥物管理署：食品中蘆薈素之檢驗方法。<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=1574> (TFDAA0037.00) (發布日期：2015.09.11)。

