

不同产地玛咖中酰胺含量分析

朱颖秋¹, 邓小宽¹, 沈洋², 陈尚猛², 林俊杰¹, 高平^{1*}

¹四川大学生命学院药用天然产物实验室, 成都 610064; ²极咖生物科技有限公司, 成都 610000

摘要: 建立玛咖酰胺测定方法, 测定不同产地玛咖切片中玛咖酰胺含量。采用 HPLC 法, 色谱条件为 Sepax Sapphire C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~15 min, 90%~95% A; 15~50 min, 95% A。检测波长 208 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃。酰胺 1、酰胺 2、酰胺 3 分别在 0.88~132 μg/mL、0.85~128 μg/mL、0.96~144 μg/mL 线性关系良好。酰胺 1、酰胺 2 平均回收率分别为 99.21% (RSD = 1.64%)、98.59% (RSD = 1.75%)。不同产地玛咖中玛咖酰胺含量差别较大, 建立可靠、准确、重复性好的检测方法, 有利于评价不同产地玛咖的质量。

关键词: 玛咖; 不同产地; 玛咖酰胺; HPLC

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

Determination of Macamides in *Lepidium meyenii* from Different Regions

ZHU Ying-qiu¹, DENG Xiao-kuan¹, SHEN Yang², CHEN Shang-meng², LIN Jun-jie¹, GAO Ping^{1*}

¹Natural Products Lab, Key Laboratory for Bio-resource and Eco-environment Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; ²Jika Biological Science and Technology Co Ltd, Chengdu 610000, China

Abstract: The objective of this study was to establish a method for analyzing the contents of macamides in *Lepidium meyenii* by HPLC. The chromatographic conditions were as follows: A Sepax Sapphire C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase consisting of acetonitrile (A) and 0.05% phosphoric acid (B), from 90% to 95% (A) in 15 min and maintained at 95% (A) in 15-50 min; detection wavelength was 208 nm; flow rate: 1.0 mL/min; column oven temperature was 30 ℃. The linear ranges of macamide 1, macamide 2 and macamide 3 were 0.88-132 μg/mL, 0.85-128 μg/mL and 0.96-144 μg/mL, respectively. The average recoveries of macamide 1 and macamide 2 were 99.21% (RSD = 1.64%) and 98.59% (RSD = 1.75%), respectively. The results showed that there were great differences in the contents of macamides in *L. meyenii* from different regions. The developed HPLC method was reliable, accurate and reproducible for the quality evaluation of Maca from different origins.

Key words: *Lepidium meyenii*; different regions; macamides; HPLC

玛咖(*Lepidium meyenii*)是十字花科独行菜属植物玛咖的块根,原产秘鲁高海拔地区,我国云南、新疆等高山地区现已有引种^[1]。玛咖中含有蛋白质、氨基酸、糖类、维生素、矿物质等多种营养成分^[2];同时,玛咖还含有玛咖烯、玛咖酰胺、芥子油苷及其异硫氰酸苄酯、甾醇、儿茶酚等次生代谢产物^[2,3]。玛咖作为南美特有的传统药食两用植物,已成为紧俏的国际医药保健品原料。

玛咖具有很高的营养价值,具有增强精力,抗疲劳,提高性欲及生育能力的作用^[4]。最近的研究还表明玛咖具有防止前列腺增生的作用^[5]。有研究推测显示,玛咖中特有的玛咖烯和玛咖酰胺可能引

起性功能改善^[6]及具有抗疲劳的作用^[4]。

玛咖酰胺作为玛咖中的特有的与重要的功效成分,也就自然成为玛咖标准化研究的热点目标成分。本研究利用高效液相色谱,建立玛咖酰胺测定方法并测定多地玛咖中的玛咖酰胺,以玛咖酰胺为指标成分,综合评估不同产地玛咖质量,为玛咖生产产品的标准化控制提供实验依据。目前相关研究内容未见报道。

1 仪器与材料

1.1 仪器

创新通恒 LC3000 型高效液相色谱仪(UV3000 紫外检测器, P3000 高压输液泵); BS124S 电子天平(北京赛多利斯); KH5200E 型超声波清洗器, 超声频率为 40 KHz, 超声功率 200 w(昆山禾创)。

1.2 材料

酰胺 1、酰胺 2、酰胺 3 均为四川大学大生命学院药用天然产物实验室自制对照品(质量分数大于 98%)。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。不同产地的玛咖切片均由极咖生物科技有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

C_{18} 色谱柱(Sepax Sapphire, 250 mm × 4.6 mm, 5

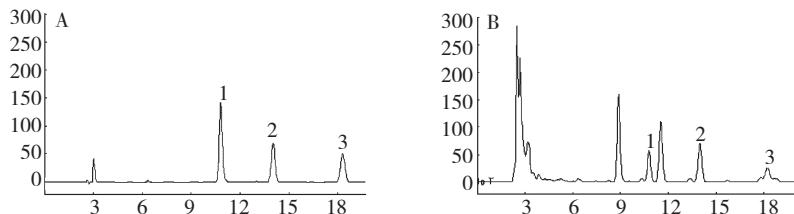


图 1 对照品(A)与供试液(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the reference substances (A) and sample (B)

注:1:酰胺 1;2:酰胺 2;3:酰胺 3

Note:1:macamide 1;2:macamide 2;3:macamide 3

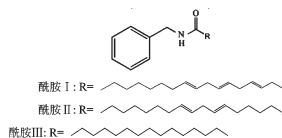


图 2 酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III 结构式^[1]

Fig. 2 Chemical structures of macamide I, macamide II and macamide III^[1]

2.2 对照品溶液制备

取酰胺 1、酰胺 2、酰胺 3 对照品适量,精密称定,于 10 mL 容量瓶中加甲醇稀释至刻度线,制得对照品溶液。取对照品溶液 1 mL,酰胺 1 稀释为 0.88、6.6、13.2、26.4、66、132 $\mu\text{g}/\text{mL}$;取对照品溶液 1 mL,酰胺 2 稀释为 0.85、6.4、12.8、25.6、64、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$;取对照品溶液 1 mL,酰胺 3 稀释为 0.96、7.2、14.4、28.8、72、144 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 供试品溶液的制备

取玛咖干燥切片粉末 1 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇 10 mL,称定质量,超声提取 45 min,放置室温,再称定质量,用无水乙醇补足减少的质量,摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。提取物方法同上。

2.4 线性关系考察

取各浓度对照品溶液,分别进样 10 μL ,按上文

μm);流动相:乙腈(A) ~ 0.05% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱:0 ~ 15 min,90% ~ 95% A;15 ~ 50 min,95% A。检测波长 208 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。理论塔板数不低于 5000。供试品中酰胺 1、酰胺 2 各相邻色谱峰的分度度符合要求,峰形对称。但是酰胺 3 色谱峰不能符合分离度要求,所以样品不进行其含量计算。对照品及供试品色谱图见图 1。酰胺 1、酰胺 2、酰胺 3 结构式见图 2。

色谱条件测定。结果显示,酰胺 1 在 0.88 ~ 132 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 间与峰面积具有良好线性关系,回归方程为 $Y = 30599X + 9075.5$ ($r = 0.9999, n = 6$)。酰胺 2 在 0.85 ~ 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 间与峰面积具有良好线性关系,回归方程为 $Y = 17996X + 261.37$ ($r = 1.0000, n = 6$)。酰胺 3 在 0.96 ~ 144 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 间与峰面积具有良好线性关系,回归方程为 $Y = 14365X - 1432.8$ ($r = 1.0000, n = 6$)。

2.5 精密度实验^[7]

取酰胺 1、酰胺 2、酰胺 3 混合对照品溶液,重复进样 6 次。结果峰面积的 RSD 分别为 0.55%、1.51%、1.25%。

2.6 稳定性实验

取供试液溶液分别在 0、4、8、12、24 h 进样,进样量分别为 10 μL ,结果酰胺 1、酰胺 2 RSD 分别为 1.02%、1.74%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性实验^[8]

精密称取 6 份质量均为 1 g 玛咖粉末,按供试液方法制备,各吸取 10 μL 进样。结果显示,酰胺 1、酰胺 2 的 RSD 分别为 1.59%、1.75%,表明样品重复性良好。

2.8 加样回收率实验^[9]

精密称取已知含量样品(M1)1 g,加入适量酰胺 1、酰胺 2 混合对照品溶液(酰胺 1 26.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

酰胺 2 25.6 $\mu\text{g/mL}$) 10 mL, 按供试品溶液制备方法处理后, 各吸取 10 μL 进样, 测定含量。结果, 酰胺

1、酰胺 2 的平均回收率分别为 99.21%、98.59%, RSD 分别为 1.64%、1.75%。结果见表 1。

表 1 回收率实验

Table 1 Results of recovery tests ($n=6$)

样品质量 Sample amount (g)	酰胺 1 含量 Original amount of macamide 1 ($\mu\text{g/mL}$)	酰胺 1 加入量 Added amount of macamide 1 ($\mu\text{g/mL}$)	酰胺 1 测得量 Detected amount of macamide 1 ($\mu\text{g/mL}$)	酰胺 2 含量 Original amount of macamide 2 ($\mu\text{g/mL}$)	酰胺 2 加入量 Added amount of macamide 2 ($\mu\text{g/mL}$)	酰胺 2 测得量 Detected amount of macamide 2 ($\mu\text{g/mL}$)
1.0112	25.03	26.40	51.49	64.01	25.60	89.17
1.0069	24.75	26.40	50.49	63.27	25.60	88.39
1.0103	24.83	26.40	51.12	63.49	25.60	88.59
1.0092	24.90	26.40	50.67	63.42	25.60	88.27
1.0120	24.87	26.40	50.80	63.59	25.60	88.68
1.0087	24.79	26.40	51.67	63.39	25.60	89.50

2.9 样品含量测定

精密称取不同产地玛咖根粉末 1 g (每个产地 3 份, 提取物同样), 按供试品溶液制备方法处理后,

精密吸取 10 μL 进样测定, 外标法计算酰胺 1、酰胺 2 含量, 结果见表 2。

表 2 不同产地玛咖中玛咖酰胺测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination results of macamides in Maca from different regions ($n=3$)

编号 No.	产地 Regions	酰胺 1 含量 Contents of macamide 1 (%)	酰胺 2 含量 Contents of macamide 2 (%)
M1	丽江 Lijiang	0.0246	0.0628
M2	香格里拉 Shangri-la	0.0108	0.0292
M3	会泽 Huize	0.0112	0.0242
M4	攀枝花 Panzihua	0.0289	0.0550

3 讨论

用不同比例乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸溶液、乙腈-0.2% 冰醋酸、甲醇-0.05% 磷酸溶液为流动相, 进行等度或梯度洗脱。发现在各个条件下, 供试液中酰胺 1、酰胺 2 在酸溶液梯度条件下能达到较好分离效果, 而供试液中酰胺 3 色谱峰都不能符合分离度要求, 所以供试品暂不进行其含量计算, 待后续研究。

玛咖原产地是秘鲁海拔 3500 m 以上的安第斯山区, 其环境特点为缺氧、少肥、昼夜温差大等^[2]。国内多地区有引种, 在云南、新疆、吉林、四川都有种植。由于种植地的温度、光照、降雨、土壤等因子的影响, 玛咖次生代谢产物如特有的玛咖酰胺含量有较大差异。前述研究结果显示, 不同产地玛咖中玛咖酰胺含量有较大差别, 以酰胺 1、酰胺 2 含量来看, 丽江产玛咖、攀枝花格萨拉种植玛咖的含量较

高; 并发现经精制的攀枝花格萨拉玛咖提取物指纹图谱与基地药材基本一致, 酰胺含量更得到了约 2~3 倍提高, 为深度利用提取物开发新产品奠定了基础。

攀枝花格萨拉未种植过玛咖, 此次极咖公司在格萨拉首次种植的玛咖其重要成分玛咖酰胺含量与丽江产玛咖相当, 充分显示此地种植的成功。但值得注意的是, 在相关成分测试分析中发现, 同一产地不同后期加工方法同样会导致酰胺成分出现明显差异, 如整果与切片加工炮制。所以, 玛咖生产企业质量控制指标的建立与检测方法尤为重要。研究认为玛咖酰胺可作为玛咖质量标准控制的重要指标。

本文以两种玛咖酰胺为指标成分, 建立 HPLC 方法同时检测多地产玛咖及提取物的酰胺含量, 可为企业玛咖生产产品的标准化控制提供实验依据。目前本研究课题组已完成了玛咖酰胺类化合物分离鉴定、样品累积, 制备了玛咖酰胺类工作对照品, 在

国内该工作标准品的制备方面处于领先水平。

参考文献

- 1 Gao DF(高大方),Zhang ZS(张泽生). Functional constituents identification in Maca, a novel food, by UPLC-MS/MS. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学),2013,41:830-832.
- 2 Jin WW(金文闻). Study on the functional factors of *Lepidium meyenii*, a plant with medicine and food characteristics. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology (华中科技大学),PhD. 2006.
- 3 Fernando EC, Alfredo G, Jose CM, *et al.* Macamides from wild 'Maca', *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae). *Phytochem Lett*,2014(8):145-148.
- 4 Liu YJ(刘跃金),Wang YN(王钰楠),Feng HY(冯鸿雁),*et al.* Anti-fatigue effects of N-benzyl hexadecanamide and maca extract in mice. *Chin J Public Health* (中国公共卫生),2014,8:1-2.
- 5 Noratto G, Condezo-Hoyos L, Gasco M, *et al.* *Lepidium meyenii* (maca) consumption prevent benign prostatic hyperplasia. *FASEB J*,2013,27:861.
- 6 Zhang BL, He K, Kim CH, *et al.* Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*,2000,55:598-602.
- 7 Kong WD(孔卫东),Zhang LX(张立新). Determination of ferulic acid in Chanfuxin granules by HPLC. *Chin Pharm* (中国药业),2013,22(16):47-48.
- 8 Li CT(李才堂),Wen P(文萍),Guo QL(郭琦丽),*et al.* HPLC determination of verbascoside in *Callicarpa nudiflora*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志),2012,18:84-86.
- 9 Pan XM(潘雪梅),Wei H(韦辉),Liu Y(刘毅),*et al.* Study on quality of *Salvia miltiorrhiza* from different habitats. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2004,26:134-136.
- 10 Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*,1999,26:1231-1237.
- 11 Lee YL, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chemistry*,2008,106:1128-1137.
- 12 Yu YY(余燕影),Zhang LH(章丽华),Cao SW(曹树稳). Investigation on free radical scavenging activity of flavonoid extracts from *Milletta nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z. Wei. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2007,19:741-744.
- 13 Wang BC, He R, Li ZM. The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry. *Food Technol Biotechnol*,2010,48:42.
- 14 Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*,2005,53:4290-4302.

(上接第 1911 页)