

HPLC 法检测玛咖中芥子油苷成分的研究

张丽梅^{1*}, 赵学志², 李爱民¹, 夏泉¹, 温波¹¹新时代健康产业(集团)有限公司, 北京 100101; ²国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100080

摘要: 建立玛咖中芥子油苷成分的高效液相检测方法。采用 80% 甲醇溶液萃取、过 DEAE-Sephadex A-25 交换柱及硫酸酯酶酶解处理获得玛咖中芥子油苷样品, 以苜蓿芥子油苷为外标对照品, C₁₈ 色谱柱, 流动相 A 为 0.05% 四甲基氯化铵水溶液, 流动相 B 为 0.05% 四甲基氯化铵、20% 乙腈的水溶液, 梯度洗脱, 检测波长 229 nm, 对玛咖芥子油苷含量进行检测。结果表明, 玛咖芥子油苷的标准曲线在 0.0179 ~ 0.2684 mg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系 ($R^2 = 0.9999$), 精密度相对标准偏差为 0.052%, 不同浓度加标回收率为 89.2% ~ 93.0%, 最低检测线可达到 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实验证实: 该方法简单、稳定、灵敏度高, 可作为玛咖芥子油苷的常规检测方法。

关键词: 玛咖, 芥子油苷, 高效液相色谱

中图分类号: Q946.83

文献标识码: A

Research on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Glucosinolates in *Lepidium meyenii* (MACA)

ZHANG Li-mei^{1*}, ZHAO Xue-zhi², LI Ai-min¹, XIA Quan¹, WEN Bo¹¹New Era Health Industrial Group Co. LTD., Beijing 100101, China;²National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100080, China

Abstract: This study aimed to establish one simple and fast analytical method for detecting glucosinolate in Maca by high performance liquid chromatography (HPLC). Maca powder was extracted with 80% methanol, then the extractions were absorbed onto a column packed with DEAE-Sephadex A-25, followed by enzymatic hydrolysis with sulfatase, after this step we obtained the sample to be tested. The chromatographic method was carried out on a C₁₈ column using the 0.05% Tetra-methylammonium chloride aqueous solution as the mobile phase A and 0.05% Tetra-methylammonium chloride aqueous solution (containing 20% acetonitrile, V/V) as B, Benzyl glucosinolate as standard reference material. The flow rate was 1 mL/min on the gradient elution. The monitoring wavelength was at 229 nm. Results showed that linear ranges of glucosinolate was between 0.0179-0.2684 mg/mL ($R^2 = 0.9999$). The RSD of precision was 0.052%. The sample recovery rate in different concentrations was 89.2% -93.0%. The detection limit can reach 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. This method is reliable and could be used as a quality control method for glucosinolates.

Key words: maca; glucosinolates; HPLC

玛咖 (Maca), 植物学名为 *Lepidium meyenii* Walp, 为十字花科 (Cruciferae) 独行菜属 (*Lepidium apetalum*) 一年生或两年生草本植物。玛咖原产于海拔 3500 ~ 4500 m 的南美安第斯山区, 现主要分布于秘鲁中部的 Puno 生态区、Junin 湖泊周围和秘鲁东南部城市 Puno。玛咖地下根茎为主要药用部位, 主要用于减少前列腺增生^[1-3]、提高男女生育力^[4-7]、抑制疲劳增强精力^[8-13]、缓解压力和更年期症状^[14]等, 也有研究报道具有增加骨密度和防治癌

症的作用^[15,16]。玛咖营养丰富, 富含蛋白质、氨基酸、矿物元素、维生素、生物碱、芥子油苷、甾醇类及脂肪酸等多种营养成分^[17,18]。其中芥子油苷被认为是影响玛咖的风味和药用价值的主要功能物质, 是玛咖中具有提高性功能作用的成分。芥子油苷, 又称硫代葡萄糖苷 (glucosinolate), 是一类主要分布于十字花科的含氮、含硫的植物次生代谢产物。其侧链 (R) 在芥子酶或肠道细菌酶的作用下, 会产生水解产物氰类、硫氰酸酚及异硫氰酸脂, 被认为是玛咖的有效成分, 能作为睾丸酮增强剂, 并能改善学习记忆和男性的性能力, 其抗癌活性亦早已引起生物、

医学等领域研究者的重视^[19,20]。关于玛咖中芥子油苷的检测, 还未有明确稳定的检测标准, 目前主要采用类似物质丙烯基芥子油苷为对照品进行检测, 同时应用质谱技术进行物质鉴定, 费时费力^[21]。本研究采用玛咖中的主要芥子油苷成分—苜基芥子油苷(含量 75% 以上)^[22]为标准对照品, 应用 HPLC 技术, 建立玛咖芥子油苷的简便、稳定的外标检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

苜基芥子油苷标准品, 纯度 98.3%, 购于 ChromaDex, USA; 硫酸酯酶 H1 型: sigma 公司; 甲醇、醋酸钠、乙腈、四甲基氯化铵皆为分析纯。

赛多利斯天平 0.0001 g; 岛津 LC-20AD 高效液相色谱系统, SPD-20A 紫外检测器; 上海茸研 TG16-W 离心机。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

Waters C₁₈ 柱(3.9 × 150 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.05% 四甲基氯化铵水溶液, B 为 0.05% 四甲基氯化铵、20% 乙腈的水溶液, 梯度洗脱; 检测波长 229 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μL。

1.2.2 样品处理

准确称取玛咖冻干粉 0.2000 g 至 50 mL 离心管中, 加入预热至 84 °C 的体积比 80% 甲醇溶液, 84 °C 恒温提取 30 min, 中间震荡一次, 取出, 0 °C 冷却, 3000 rpm 离心 10 min, 取上清液过 DEAE-Sephadex A-25 凝胶柱, 加入 75 μL 硫酸酯酶(总活性不低于 40 mU), 密封, 室温下静置 16 h 以上以保证酶解完全, 超纯水洗脱柱子并收集洗脱液, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 以色谱专用样品瓶收集, 待测。

1.2.3 线性关系考察

精密称取苜基芥子油苷标准品 67.1 mg, 溶解于 50 mL 水中, 得对照品溶液, 按照 1.2.2 步骤进行处理, 得芥子油苷标准品待测样品。精密吸取待测样品, 以超纯水稀释成浓度系列 0.0179、0.0895、0.1431、0.1789、0.2684 mg/mL, 按照 HPLC 分析条件进行测定, 记录峰面积值, 绘制标准曲线, 并计算相对标准偏差 RSD 值。

1.2.4 精密度试验

精密吸取苜基芥子油苷标准样品 10 μL, 按照 HPLC 分析条件进行测定, 重复进样 6 次, 记录峰面

积值, 并计算相对标准偏差 RSD 值。

1.2.5 稳定性试验

取玛咖冻干粉制备的同一供试品溶液, 按照 0、3、6、9、12、24、48 h 时间点分别进样 10 μL, 记录各时间点所测得的芥子油苷含量, 计算相对标准偏差 RSD 值。

1.2.6 重现性试验

分别精密称取玛咖冻干粉 1.2 g, 共 6 份, 按 1.2.2 步骤制备供试品溶液, 按照 HPLC 分析条件进行测定, 记录峰面积值, 并计算供试品溶液含量和相对标准偏差 RSD 值。

1.2.7 回收率试验

精密称取待测玛咖样品 12 份, 每份 0.2 g, 分成 4 组, 分别加入对照标准品溶液 0、200、400、600 μL (1.342 mg/mL), 每个添加量设置三个平行, 按照 1.2.2 步骤进行处理, 得加标样品。将样品按照 HPLC 分析条件进行测定, 计算所测定样品含量, 并计算回收率及相对标准偏差 RSD 值。

2 结果与分析

2.1 标准曲线线性范围与检测限

以标准对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制苜基芥子油苷标准曲线, 见图 1, 得到苜基芥子油苷标准曲线: $y = 4866383x - 6748.98$, $R^2 = 0.9999$, 表明该方法中, 苜基芥子油苷在 0.0179 ~ 0.2684 mg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系。以标准对照品保留时间处基线噪音 3 倍对应的浓度作为测定方法的检出限(信噪比 $S/N = 3$), 测出苜基芥子油苷的最低检出限为 1 μg/kg。

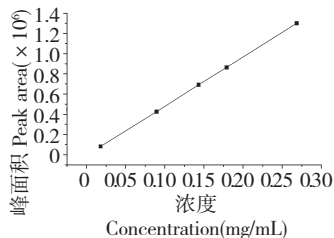


图 1 芥子油苷标准曲线

Fig. 1 Standard curve of benzyl glucosinolate

2.2 检测方法的精密度研究

表 1 中为 6 次重复测定苜基芥子油苷标准对照品的含量数值, 由表中数值可以看出, 6 次测定的相对标准偏差 RSD 为 0.052%, 该方法具有非常好的精密度。

表 1 苜基芥子油苷的精密度结果

Table 1 Result of procession testing for benzyl glucosinolate

编号 Number	称样量 Sample weight (g)	含量 Content (%)	平均值 Average of content (%)	RSD (%)
1	0.2002	1.004		
2	0.2003	1.003		
3	0.2002	1.003	1.004	0.052
4	0.2004	1.004		
5	0.2001	1.003		
6	0.2003	1.004		

2.3 检测方法的稳定性研究

表 2 为不同时间点检测同一样品得到的玛咖芥

表 2 玛咖芥子油苷的稳定性试验结果

Table 2 Result of stability testing for Benzyl glucosinolate

时间 Time(h)	称样量 Sample weight (g)	含量 Content(%)	平均值 Average of content(%)	RSD(%)
0	0.2004	1.054		
3	0.2002	1.054		
6	0.2005	1.052		
9	0.2002	1.052	1.051	0.42
12	0.2005	1.052		
24	0.2004	1.049		
48	0.2001	1.041		

表 4 玛咖芥子油苷回收率结果

Table 4 Result of recovery rate for benzyl glucosinolate

编号 Number	已知量 Known (mg)	加标量 Added (mg)	测得量 Measured (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	1.302	0.268	1.479	93.0		
2	1.302	0.537	1.699	89.2	91.3	3.54
3	1.302	0.835	1.999	91.7		

3 讨论

对玛咖中芥子油苷含量的 HPLC 方法学进行了考察,结果表明,本 HPLC 方法稳定、简便、实用,符合方法学考察的要求,可作为玛咖中芥子油苷含量检测的常规方法。

玛咖中芥子油苷主要包含两种组分,苜基芥子油苷和甲氧基苜基芥子油苷,前期 Piacente^[23]、甘瑾^[17]、艾中^[22]等学者的研究都表明,苜基芥子油苷

子油苷含量值,结果显示芥子油苷含量 RSD 值为 0.42%,说明应用该方法处理的样品溶液在 48 h 稳定性良好。

2.4 检测方法的重现性研究

按 1.2.6 进行方法重现性试验研究,得到表 3 试验结果。从数据上看,6 次玛咖样品的检测得到数据基本一致,RSD 值为 0.046%,符合重现性要求,重现性良好。

表 3 芥子油苷的重现性试验结果

Table 3 Result of repeatability testing for benzyl glucosinolate

编号 Number	称样量 Sample weight (g)	含量 Content(%)	平均值 Average of content(%)	RSD(%)
1	0.2004	1.004		
2	0.2002	1.003		
3	0.2005	1.003	1.054	0.046
4	0.2002	1.004		
5	0.2005	1.003		
6	0.2001	1.004		

2.5 回收率研究

采用加标回收法进行研究。取三个加标浓度,每个浓度设定三个平行,取每个浓度平均值进行回收率计算,得到表 4 数据。通过表中回收率实验结果可以看出,玛咖芥子油苷的回收率为 89.2% ~ 93.0%,符合生物样品回收率认可标准 85% ~ 115% 的要求。

的含量远远大于甲氧基苜基芥子油苷的含量,目前市场上玛咖销售商家基本都以苜基芥子油苷为玛咖唯一功效性标注成分,所以,建立以苜基芥子油苷为标准外标物质的简便快捷的检测方法具有很高的实用性和切实的应用价值。

在此特别感谢国家蔬菜工程技术研究中心营养研究中心何洪巨研究员、宋曙辉副研究员在实验中给予的指导和帮助。

参考文献

- 1 Sandra Yucra, *et al.* Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats. *Fertility and Sterility*, 2008, 89:1461-1467.
- 2 Gasco M, Villegas L, Yucra S, *et al.* Dose-response effect of Red Maca (*Lepidium meyenii*) on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone enanthate. *Phytomedicine*, 2007, 14: 460-464.
- 3 Yu LJ(余龙江), Jin WW(金文闻), Wu YX(吴元喜), *et al.* A survey of botany and pharmacological effects on Maca (*Lepidium meyenii* WALP. , *lepidium peruvianum* chacon.). *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2002, 14(5): 71-74.
- 4 Francisco Chung, *et al.* Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *J Ethnopharm*, 2005, 98:143-147.
- 5 Carla Gonzales, *et al.* Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *J Ethnopharm*, 2006, 103: 448-454.
- 6 Julio Rubio, Marissa I, Manuel Gasco, *et al.* *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate-induced-Damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44: 1114-1122.
- 7 Nie DS(聂东升), Qi F(戚飞), Li S(李颂), *et al.* The study of *lepidium meyenii*(Maca) on sexual function and related health benefits. *Chin J Human Sexuality* (中国性科学), 2013, 22(9): 10-13.
- 8 Mark Stone, Alvin Ibarra, Marc Roller, *et al.* A pilot investigation into the effect of Maca supplementation on physical activity and sexual desire in sportsmen. *J Ethnopharm*, 2009, 126:574-576.
- 9 Yin ZJ(尹子娟), Yang CJ(杨成金), Yin PR(尹品耀), *et al.* 玛咖的营养成分及功效研究进展. *Yunnan Nongye Keji* (云南农业科技), 2012, 5:61-64.
- 10 Fausta Natella, Mariateresa Maldini, Guido Leoni, *et al.* Glucosinolates redox activities; Can they act as antioxidants? *Food Chemistry*, 2014, 149:226-232.
- 11 Kyeong-Jun Lee, *et al.* Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture*, 2005, 244:293-301.
- 12 Sun XD(孙晓东), Tang H(唐辉), Du P(杜萍), *et al.* Nutritional components and antioxidative activity of oligosaccharide in vitro from maca cultivated in Lijiang. *Chin J Spec Lab* (光谱实验室), 2013, 30:2365-2371.
- 13 Li L(李磊), Zhou SS(周昇昇). Nutrition, food security assessment and development prospects of Maca. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2012, 33:376-379.
- 14 Myeong Soo Leea, *et al.* Maca (*Lepidium meyenii*) for treatment of menopausal symptoms: A systematic review. *Maturitas*, 2011, 70:227-233.
- 15 Li ZY, Wang Y, Shen WT, *et al.* Content determination of benzyl glucosinolate and anti-cancer activity of its hydrolysis product in *Carica papaya* L. *Asian Pacific J Trop Med*, 2012, 5:231-233.
- 16 Julio Rubio, Haixia Dang. Aqueous and hydroalcoholic extracts of black Maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45:1882-1890.
- 17 Gan J(甘瑾), Feng Y(冯颖), Zhang H(张弘), *et al.* Analysis on composition and content of glucosinolate in three color types of Maca (*Lepidium meyenii*). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2012, 45:1365-1371.
- 18 Huang Ze-su, Lao Suwan. Inheritance of erucic acid, glucosinolate, and oleic acid contents in rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Northeast Agric Univ* (English Edition), 2012, 19(2):1-8.
- 19 Richard Mithen, Richard Bennett, Julietta Marquez. Glucosinolate biochemical diversity and innovation in the Brassicales. *Hytochemistry*, 2010, 71:2074-2086.
- 20 Rosa Agnetaa, *et al.* Evaluation of root yield traits and glucosinolate concentration of different *Armoracia rusticana* accessions in Basilicata region (southern Italy). *Scientia Horticulturae*, 2014, 170:249-255.
- 21 Irene Dini, Gian Carlo Tenore, Antonio Dini. Glucosinolates from maca (*Lepidium meyenii*). *Biochem Systematics Ecol*, 2002, 30:1087-1090.
- 22 Ai Z(艾中), Cheng AF(程爱芳), Meng JY(孟继勇), *et al.* Analysis of chemical components and content of glucosinolate from domestic Maca. *Food Sci Tech* (食品科技), 2012, 37:182-186.
- 23 Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *J Agric Food Chem*, 2002, 50:5621-5625.