

邵金良, 樊建麟, 杨东顺, 等. HPLC-PAD 同时测定玛咖中 8 种酰胺类化合物含量[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 229-233.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.036

HPLC-PAD 同时测定玛咖中 8 种酰胺类化合物含量

邵金良, 樊建麟, 杨东顺, 刘兴勇, 杜丽娟, 王丽, 刘宏程
(云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 云南 昆明 650223)

摘要: 为了建立同时测定玛咖中亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺和十八烷酰胺含量的 HPLC-PAD 方法, 样品用正己烷超声波辅助提取, 采用 Waters Symmetry Shield 色谱柱(C_{18} , 5 μm , 4.6 mm \times 250.0 mm), 以乙腈-水溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 200 nm, 外标法定量。结果显示, 8 种酰胺类化合物在 0.05~10.00 mg/L 具有良好的线性, 相关系数 ≥ 0.999 , 检出限为 0.08~0.22 mg/kg, 定量限为 0.26~0.76 mg/kg。20 mg/kg、50 mg/kg 和 100 mg/kg 添加水平的加标样回收率为 77.0%~117.0%, 相对标准偏差为 1.58%~5.12%。表明该方法操作简单, 重复性和稳定性好, 适合玛咖中 8 种酰胺类化合物同时检测和定量分析。

关键词: HPLC-PAD; 玛咖; 酰胺类化合物

中图分类号: S637.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)01-0229-05

Simultaneous determination of eight macamides in *Lepidium meyenii* Walp. by HPLC-PAD

SHAO Jin-liang, FAN Jian-lin, YANG Dong-shun, LIU Xing-yong, DU Li-juan, WANG Li, LIU Hong-cheng
(*Institute of Quality Standards&Testing Technique, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China*)

Abstract: To establish a HPLC-PAD method to determine eight macamide components, N-benzyl-(9Z, 12Z, 15Z)-octadecadienamide, N-benzyl-(9Z, 12Z, 15Z)-octadecatrienamide, N-benzyl-(9Z, 12Z)-octadecadienamide, N-benzyl-(9Z, 12Z)-octadecadienamide, N-(3-methoxybenzyl)-hexadecanamide, N-(3-methoxybenzyl)-benzyloctadecanamide, N-benzyl-(9Z)-octadecanamide, and N-benzyloctadecanamide in *Lepidium meyenii* Walp, the sample was extracted by hexane with ultrasound assistance. The chromatographic separation was performed on Waters Symmetry Shield column(C_{18} , 5 μm , 4.6 mm \times 250.0 mm) by using water solution-acetonitrile as the mobile phase. The photodiode array detector (PAD) wavelength was set at 200 nm. The calibration curve was liner in the range of 0.05–10.0 mg/L with the correlation coefficients more than 0.999. The limit of detection was from 0.08 to 0.22 mg/kg and the limit of quantification was from 0.26 to 0.76

mg/kg for eight macamide components. The spiked recoveries of 20 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg ranged from 77.0% to 117.0%, with the relative standard deviations (RSDs) being 1.58%–5.12%. The method showed good repeatability, accuracy and stability, and could be applied in the accurate quantification of eight macamide components in *Lepidium meyenii* Walp.

Key words: high performance liquid chromatography-photo diode array (HPLC-PAD); *Lepidium meyenii* Walp.; macamide component

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 云南省科技惠民专项(农业)重点项目(2014RA054); 云南省科技创新平台建设计划(公共科技服务)项目(2014DA001); 国家自然科学基金地区科学基金项目(31560453)

作者简介: 邵金良(1979-), 男, 云南陆良人, 硕士, 副研究员, 主要从事农产品质量安全检测与品质评价等研究。(Tel) 0871-65163090; (E-mail) shaojinliang@126.com

通讯作者: 刘宏程, (E-mail) liuorg@163.com

玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp., Maca), 又名秘鲁参, 是十字花科独行菜属一年生或两年生草本植物, 其营养主要储藏于萝卜样块根^[1], 原产于秘鲁中部基宁) 及帕斯科附近海拔 4 000 m 以上的安第斯大林山区, 是一种非常独特的高原农作物^[2]。大量研究结果表明, 玛咖具有抗疲劳、改善性功能、抗氧化、减少前列腺增生、缓解更年期综合症、抑制癌细胞、增加骨密度等多种功效, 因此受到越来越广泛的关注^[3]。玛咖块根中含有丰富的营养物质, 如维生素 C、蛋白质、氨基酸、碳水化合物和微量元素, 还含有多种次生代谢物质: 玛咖烯、生物碱(包括玛咖酰胺)、芥子油苷及其水解衍生物、甾醇、多酚类及其他成分, 玛咖的生理活性与其化学组成有着密切的关系, 其中蛋白质和生物碱被认为是玛咖的主要功效成分^[4-6]。生物碱是一类含氮的且具有碱性的天然产物, 广泛分布于植物中, 具有镇痛、降压、消炎、抗菌、抗癌等多种生物活性, 是中草药中的重要有效成分之一^[7]。其中生物碱类物质玛咖酰胺仅在玛咖中被发现, 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^[8]。因此研究玛咖中酰胺类化合物含量的测定方法, 对玛咖及玛咖制品质量控制具有非常重要的意义。目前, 虽有文献报道, 可采用 HPLC-UV-MS/MS 法测定玛咖中玛咖酰胺含量^[9-10], 但此法检测仪器价格昂贵, 不利于普通实验室开展, 且分析检测的玛咖酰胺数量和种类较少等。本试验采用 HPLC-PAD 同时测定玛咖中亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺、十八烷酰胺的含量, 为玛咖的全面质量控制提供一种快速简便的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Waterse2695-2998 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司产品)、Empower 3 色谱数据工作站(美国 Waters 公司产品)、Laborata 4000-efficient 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司产品)、JJ200 电子分析天平(江苏省常熟市双杰测试仪器厂产品)、KQ500-E 型超声清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司产品)、TGL-10B 型低速大容量离心机(上海安亭科学

仪器厂产品)。

1.2 药品与试剂

亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺、十八烷酰胺均由云南省丽江质检院提供(经 HPLC 峰面积归一化法测定, 纯度质量分数大于 99.5%); 乙腈, HPLC 级(德国 Merck 公司产品); Millipore-Q 超纯水; 正己烷(上海国药集团化学试剂有限公司产品)分析纯。

玛咖收集于云南丽江、会泽、昭通等产地, 经云南省农业科学院高山经济植物研究所杨正松副研究员鉴定为十字花科独行菜属玛咖。粉碎后过 50 目筛, 备用。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制 分别准确称取亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺、十八烷酰胺的对照样品 5.00 mg、5.00 mg、5.00 mg、2.00 mg、2.00 mg、2.00 mg、2.00 mg、2.00 mg, 用乙腈溶解并定容至 10 ml 容量瓶中, 摇匀, 得到单一对照品溶液, 然后分别量取上述对照品溶液 1 ml 于 10 ml 容量瓶中并用乙腈定容, 得到亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺、十八烷酰胺浓度分别为 50.0 mg/L、50.0 mg/L、50.0 mg/L、20.0 mg/L、20.0 mg/L、20.0 mg/L、20.0 mg/L、20.0 mg/L 混合对照品溶液, 4 °C 储存, 备用。

1.3.2 样品前处理 称取 0.50 g 玛咖粉(精确至 0.01g)于 100 ml 具塞三角烧瓶中, 加入 20 ml 正己烷, 置于超声清洗机中 300 W, 35 °C, 超声 20 min; 静置 2 min 后吸取上清液, 残渣再同样条件重复提取 1 次, 合并两次提取液, 5 000 r/min 离心 5 min, 将上清液浓缩至接近干燥, 乙腈溶解并定容至 5 ml, 过 0.22 μm 滤膜备用。

1.3.3 色谱条件 Waters Symmetry Shield™ 色谱柱(C₁₈, 5 μm, 4.6 mm×250.0 mm), 流动相水(A)-乙腈(B)。线性梯度洗脱程序为: 0~9.5 min, 10% 水; 9.5~13.5 min, 10%~13% 水; 14.5.0~30.0 min, 13%~13% 水; 30~35 min, 13%~10% 水。柱温 35.0 °C, 流速 1.00 ml/min, PDA 2998 检测器波长 200 nm, 进样量 20.0 μl。

1.3.4 添加回收试验 称取 0.50 g 玛咖粉(精确至 0.01g)9 份,每份样品重复三次,添加 20 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 的混合标准溶液,混匀后静置 1 h。按照方法 1.3.2 中提取方法和方法 1.3.3 的色谱条件测定,考察方法的准确度和精密度。

2 结果

2.1 提取方法

比较超声波提取法、索氏提取法、震荡提取法和浸提法 4 种提取方法对玛咖酰胺提取率的影响,结果显示:昭通产玛咖样品中 8 种酰胺类化合物的提取率由大到小为超声提取法(708.6 mg/kg) > 索氏提取法(685.3 mg/kg) > 震荡提取法(635.1 mg/kg) > 浸提法(585.2 mg/kg),超声提取具有步骤简单,提取效率高,节约时间等优点,最终确定超声波提取法作为样品提取方法。

2.2 提取溶剂

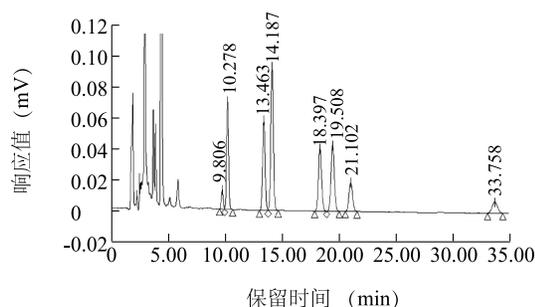
考察正己烷、石油醚、异丙醇和无水乙醇作为提取溶剂,对比提取效果。结果显示:昭通产玛咖样品中 8 种酰胺类化合物的提取率由大到小为正己烷(712.5 mg/kg) > 石油醚(699.4 mg/kg) > 异丙醇(680.2 mg/kg) > 无水乙醇(655.7 mg/kg),正己烷和石油醚对酰胺类化合物的提取率相当,但正己烷毒性分级属于低毒,石油醚属于中毒,从安全性考虑,首选正己烷作为提取溶剂。

2.3 色谱图

亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺、十八烷酰胺的标准溶液色谱图见图 1,空白样品及样品加标样色谱图见图 2,从图 1 和图 2 可以看出,8 种玛咖酰胺的色谱峰能很好地分离,且标准组分出峰处无明显干扰杂峰,说明本方法的色谱条件选择合适。

2.4 线性范围、检出限和定量限

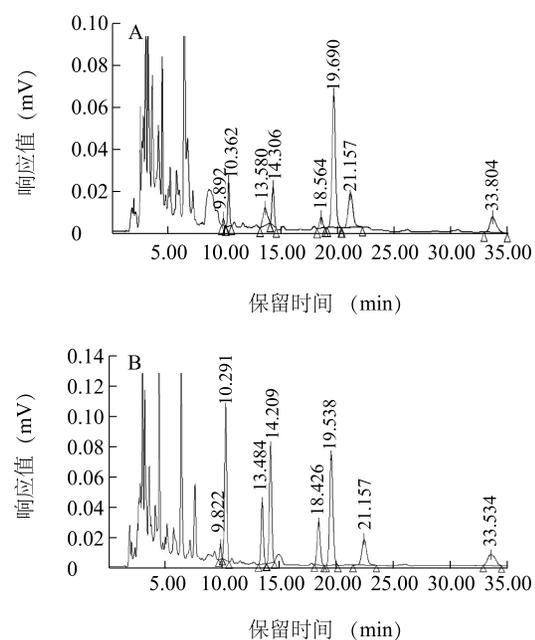
用流动相配制亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺和十八烷酰胺质量浓度均为 0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L、5.00 mg/L 和 10.00 mg/L 的混合标准溶液。在优化后的测定条件下进行测定,分别以峰目标化合物的峰面积(Y)和目标化合物的质量浓度(x)做工作曲线。结果(表 1)显示,8 种酰胺类化合物在 0.05~10.00



9.806 min: 亚麻酰胺; 10.278 min: 亚油酰胺; 13.463 min: 十六烷酰胺; 14.187 min: 甲氧亚麻酰胺; 18.397 min: 甲氧亚油酰胺; 19.508 min: 甲氧十六烷酰胺; 21.102 min: 油酰胺; 33.758 min: 十八烷酰胺。

图 1 玛咖酰胺对照样品 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed standard sample of *Lepidium meyenii* Walp.



A: 玛咖样品; B: 玛咖样品加标。9.822 min: 亚麻酰胺; 10.291 min: 亚油酰胺; 13.484 min: 十六烷酰胺; 14.209 min: 甲氧亚麻酰胺; 18.426 min: 甲氧亚油酰胺; 19.538 min: 甲氧十六烷酰胺; 21.157 min: 油酰胺; 33.534 min: 十八烷酰胺。

图 2 玛咖样品和加标提取液的 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatograms of sample and spiked sample of *Lepidium meyenii* Walp.

mg/L 范围内具有良好的线性,相关系数 ≥ 0.999 ,检出限为 0.08~0.22 mg/kg,定量限为 0.26~0.76 mg/kg,满足测定要求。

表1 8种玛咖酰胺的线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 1 Linear range, calibration curve, correlation coefficient, limit of detection and quantification of eight macamides

分析物	线性方程	线性范围 (mg/L)	相关系数	检出限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)	相对标准偏差 (%)
亚麻酰胺	$Y=264.97x-645.38$	0.05~10.00	0.999 8	0.22	0.76	1.37
亚油酰胺	$Y=2\ 468.1x-3\ 743.80$	0.05~10.00	0.999 7	0.08	0.26	1.29
十六烷酰胺	$Y=1\ 319.1x-2\ 487.40$	0.05~10.00	0.999 5	0.12	0.35	1.54
甲氧亚麻酰胺	$Y=9\ 676.5x-3\ 231.40$	0.05~10.00	0.999 8	0.09	0.28	1.77
甲氧亚油酰胺	$Y=2\ 938.4x-2\ 114.60$	0.05~10.00	0.999 4	0.14	0.39	1.53
甲氧十六烷酰胺	$Y=7\ 556.5x-4\ 745.60$	0.05~10.00	0.999 6	0.10	0.28	1.51
油酰胺	$Y=3\ 057.3x-4\ 318.50$	0.05~10.00	0.999 2	0.18	0.46	1.91
十八烷酰胺	$Y=2\ 322.7x-3\ 775.40$	0.05~10.00	0.999 3	0.21	0.61	1.75

2.5 回收率与精密度

在取已知含量的玛咖粉末(产地:云南会泽)进行低、中、高3种不同质量分数(20 mg/kg、50 mg/kg和100 mg/kg)的8种玛咖酰胺类化合物的加标样回收试验,每个添加水平做5组平行试验。结果(表2)显示,8种玛咖酰胺类化合物的回收率为77.0%~117.0%,相对标准偏差为1.58%~5.12%。

2.6 样品测定

对收集的10份玛咖粉末样品,分别测定其亚麻酰胺、亚油酰胺、十六烷酰胺、甲氧亚麻酰胺、甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺、油酰胺和十八烷酰胺等8种玛咖酰胺含量,结果(表3)显示,云南不同产地的玛咖样品均含有8种玛咖酰胺,丽江玛咖样品中8种玛咖酰胺含量为5.20~727.20 mg/kg,含量最高的为亚油酰胺,含量最低的为油酰胺;昭通玛咖样品中8种玛咖酰胺含量为4.76~271.30 mg/kg,含量最高的为亚油酰胺,含量最低的为甲氧亚油酰胺;会泽玛咖样品中8种玛咖酰胺含量为2.74~217.99 mg/kg,含量最高的为亚油酰胺,含量最低的为油酰胺。云南不同产地玛咖中玛咖酰胺总含量平均值差异较大,含量由高到低依次为丽江玛咖>昭通玛咖>会泽玛咖。

3 讨论

与传统的样品前处理方法索氏提取、震荡提取、浸提等方法相比,超声波提取法具有步骤简单、提取效率高、节约时间等优点。异丙醇和无水乙醇对玛咖酰胺类化合物的提取率较正己烷和石油醚低,正己烷和石油醚对玛咖酰胺类化合物的提取率相当,

表2 方法的回收率和精密度(n=3)

Table 2 Recovery and precision of the method (n=3)

分析物	添加浓度 (mg/kg)	测得量 (mg/kg)	回收率 (%)	相对标准 偏差 (%)
亚麻酰胺	20	15.4	77.0	1.58
	50	40.6	81.2	2.52
	100	92.5	92.5	1.68
亚油酰胺	20	16.8	84.0	2.35
	50	48.1	96.1	2.68
	100	98.4	98.4	1.52
十六烷酰胺	20	18.9	94.5	3.56
	50	46.8	93.6	1.89
	100	108.9	108.9	3.45
甲氧亚麻酰胺	20	22.0	110.0	2.65
	50	51.9	103.9	2.68
	100	90.2	90.2	4.84
甲氧亚油酰胺	20	23.4	117.0	4.33
	50	51.1	102.3	3.15
	100	86.3	86.3	3.68
甲氧十六烷酰胺	20	22.4	112.0	5.12
	50	53.7	107.4	2.68
	100	106.4	106.4	2.45
油酰胺	20	17.8	89.0	4.38
	50	47.5	94.9	4.25
	100	95.3	95.3	3.66
十八烷酰胺	20	16.9	84.5	5.63
	50	46.0	92.0	4.84
	100	111.5	111.5	4.24

表 3 玛咖样品中 8 种玛咖酰胺含量

Table 3 The contents of eight macamides in *Lepidium meyenii* Walp. samples

产地	亚麻酰胺 (mg/kg)	亚油酰胺 (mg/kg)	十六烷酰胺 (mg/kg)	甲氧亚麻酰胺 (mg/kg)	甲氧亚油酰胺 (mg/kg)	甲氧十六烷酰胺 (mg/kg)	油酰胺 (mg/kg)	十八烷酰胺 (mg/kg)	总量 (mg/kg)
丽江	372.96	727.20	107.17	267.51	11.43	267.28	15.70	56.96	1 826.2
昭通	113.12	210.75	37.65	76.26	5.24	67.64	8.45	15.62	534.7
会泽	115.50	99.14	29.60	33.85	2.84	24.50	18.28	5.92	329.6
丽江	202.49	497.87	55.04	158.53	6.16	165.79	8.74	27.60	1 122.2
昭通	169.42	271.30	52.83	97.68	6.83	81.18	11.75	19.35	710.3
会泽	96.74	141.26	30.43	46.90	4.79	40.72	8.26	11.19	380.3
丽江	188.13	302.06	51.38	96.53	6.93	112.25	5.20	19.52	782.0
昭通	111.18	220.62	38.21	75.45	4.76	55.67	8.93	12.81	527.6
会泽	98.71	180.91	26.11	54.09	3.16	28.75	15.75	7.29	414.8
会泽	94.75	217.99	26.43	66.05	4.70	90.01	2.74	14.86	517.5

正己烷毒性分级属于低毒,石油醚属于中毒,从安全性考虑,正己烷比石油醚相对安全。

本研究采用乙腈和水作为色谱分析的流动相,等度洗脱很难将甲氧亚油酰胺、甲氧十六烷酰胺和油酰胺 3 种酰胺类化合物同时分离,而采用梯度洗脱方式可以较好地解决这一问题,8 种酰胺类化合物的分离效果较好,如果色谱峰的峰形较差,可以往水相中添加 0.1% 的甲酸改善峰形。

本研究测定了云南 3 个产地的 10 个玛咖样品中 8 种玛咖酰胺类化合物含量,从测定结果来看,玛咖酰胺类化合物总量丽江>昭通>会泽,3 个产地的玛咖酰胺类化合物总量差异明显,可能跟玛咖的适宜产地和生长海拔有关;8 种玛咖酰胺类化合物中亚油酰胺的含量最高,亚麻酰胺的含量次之,含量最少的是甲氧亚油酰胺。

参考文献:

[1] 郝利民,张建春,鲁吉珂,等.云南种植玛咖中多糖提取工艺的

优化研究[J].食品工业科技,2013,34(3):262-264,268.

[2] 孙晓东,杜萍,单云,等.丽江玛卡片和秘鲁玛卡片营养成分对比分析和评价[J].食品科学,2011,32(19):214-216.

[3] 甘瑾,冯颖,张弘,等.三种色型玛咖芥子油苷组分及含量分析[J].中国农业科学,2012,45(7):1365-1371.

[4] 徐涓,张弘,孙彦琳,等.鲜玛咖块根中芥子油苷提取工艺研究[J].中国食品学报,2013,13(6):62-68.

[5] 甘瑾,冯颖,何钊,等.云南栽培 3 种颜色玛咖中总生物碱含量分析[J].食品科学,2010,31(24):415-419.

[6] 张维,张铁,王伟伟,等.云南种植玛咖不同部分化学成分和抗氧化活性分析[J].天然产物研究与开发,2014(26):813-818,823.

[7] 柏云娇,于森,赵思,等.生物碱的药理作用及机制研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2013,29(1):8-11.

[8] 朱颖秋,邓小宽,沈洋,等.不同产地玛咖中酰胺含量分析[J].天然产物研究与开发,2014,26(12):1982-1985.

[9] 朱财延,李炳辉,罗成,等.高效液相色谱-质谱法分析植物玛咖中的玛咖烯和玛咖酰胺[J].分析仪器,2014(5):44-49.

[10] MEGAN M, MCCOLLOM J R, VILLINSKI K L, et al. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS[J].Phytochem Anal,2005,16:463-469.

(责任编辑:袁伟)