

高速逆流色谱法分离纯化辣椒碱研究

朱妞¹, 訾荣禄²

(1. 咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712081; 2. 陕西科技大学 生命科学与工程学院, 西安 710021)

摘要:通过对3种不同溶剂体系的研究,选择正丁醇-乙酸-水(4:1:5)体系作为HSCCC法分离纯化辣椒碱的溶剂体系;此方法可以将粗提物中的辣椒碱和红色素得到很好的分离,出峰时间在40~70 min的收集物即为辣椒碱;用HSCCC纯化处理后的辣椒碱收集物经HPLC法测定,纯度为90.3%。

关键词: HSCCC; 辣椒碱; 分离; 纯化

中图分类号: TS202.3 文献标识码: B 文章编号: 1000-9973(2012)01-0077-03

Study on separation and purification of capsaicin with HSCCC

ZHU Niu¹, ZI Rong-lu²

(1. Xianyang Vocational Technical College, Xianyang 712081, China; 2. Life Science and Engineering Department, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: In this paper, we tried to purify capsaicin with HSCCC. The results showed that n-butyl alcohol : acetic acid : H₂O (4 : 1 : 5) was the best solvent system to separate capsaicin. After purification with HSCCC, we could get 90.3 % purified capsaicin determined by HPLC.

Key words: HSCCC; capsaicin; separation; purification

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属茄科本草植物,其果实可食用,根茎可入药。近年来随着研究的深入,辣椒的研究已经不限于传统的食用和药用上。辣椒含有辣椒红色素和辣椒碱,辣椒红色素色泽鲜艳且无毒,是食品添加剂红色素的优良原料^[1]。辣椒碱更是近年来的研究热点,药用价值极高,而且在军事、生化农药等领域也有很大的应用,相关的研究国内外报道已有很多^[2,3]。辣椒碱具有镇痛、消炎、促进食欲、改善消化、抗菌杀虫及对神经递质的选择性等药理作用^[4-6],但是辣椒碱粗提物中有一些酚类物质能够拮抗辣椒碱对神经肽的作用,故辣椒碱粗品在临床上不能诱导神经肽活性,反而加剧疼痛和炎症^[7],因此辣椒碱必须提纯才有应用价值。因此,为了拓宽辣椒碱的应用范围,提高其经济效益和价值,有必要对辣椒碱粗提物进行进

一步分离、纯化,从而得到高纯度的辣椒碱。

高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography,简称HSCCC)是20世纪80年代发展起来的一种液液分配色谱技术,与其它色谱技术不同的是它不需任何固态载体(如柱填料、吸附剂、亲和剂、板床和筛膜等),因而避免了分离样品与固态载体表面因发生化学反应而造成的失活、变性、污染及不可逆吸附等不良情况。此外,它还具有高效、快速、进样量大、回收率高等优点,所以特别适合于天然产物的分离与纯化。经过近30年的发展,随着其理论和技术的日益发展和完善,HSCCC正越来越广泛的应用于生化、生物工程、医药、天然药物化学、有机合成、环境分析、食品、地质和材料等领域,尤其在天然产物分离纯化与制备领域显示了其它色谱技术无可比拟的优势^[8-10]。

收稿日期:2011-07-04

基金项目:咸阳职业技术学院科学研究基金资助项目(2009KYA07)

作者简介:朱妞(1983-),女,湖南邵阳人,硕士,研究方向:食品保藏与加工。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

辣椒碱粗提物浸膏,实验室自制;正丁醇,分析纯,天津化学试剂厂;乙酸,氯仿,分析纯,西安化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

TBE-300型高速逆流色谱仪 上海同田生化技术有限公司生产(包括S-1007单缸柱塞泵和8823B紫外检测器,聚四氟乙烯柱,柱内径1.6 mm,螺旋管总体积300 mL,转速0~1000 r/min);N2000色谱工作站 浙江大学智达信息工程有限公司研制开发;溶剂体系选择软件 清华大学研制;DDB-300多通道蠕动泵 浙江象山定山仪器厂;PHS-3C型精密pH计 上海雷磁仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 分配系数的测定方法^[1]

溶剂系统的选择是同时选择色谱分离过程的两相,是对样品成功分离的关键所在,而样品中各组分的分配系数决定着这种溶剂系统是否合适,因此分配系数的测定是选择溶剂系统的重要环节。目前,分配系数的测定多采用薄层色谱法、毛细管电泳法、HPLC法、生物活性分配比率法及分析型HSCCC法。被分离物质的分配系数(K)范围在0.5~2之间时可以达到比较好的分离效果。按上述方法得到溶有样品的溶剂体系,取上、下两相,进行高效液相色谱(HPLC)或薄层色谱(TLC)分析,得到一对色谱图,计算对应峰之间的高度和面积之比,则可算出每一成分的K值。

本试验选择浓度测定法测定K值,计算公式见(1)。

$$K = \frac{C_u}{C_L} \quad (1)$$

式中: C_u 为上相中溶质浓度, C_L 为下相中溶质浓度。

1.3.2 HSCCC的分离操作

将选好的溶剂体系按照比例配好,超声波脱气1~3 h,然后用塑料薄膜将容器封好,放置一夜,使体系中的气体排尽。取粗提物浸膏0.5 g,用固定相和流动相各5 mL将粗提物溶解,过滤作为样液备用。

分离前,先高流速泵入固定相,待固定相充满整个管路后,停泵,启动工作鼓,把转速调至900 r/min,然后以2.0 mL/min的速度泵入流动相,同时用量筒接

收流出的固定相,当出口端开始流出流动相,并在量筒中不断透过固定相液层达到筒底部时,读取量筒中排出的固定相的体积,按公式(2)计算固定相保留率。此时,停泵,通过六通进样阀进样,进样量为8 mL,然后继续以2.0 mL/min的速度泵入流动相。此时启动色谱工作站记录图谱,紫外检测器检测波长280 nm。

$$\text{保留率}(\%) = \frac{\text{螺旋管总体积} - \text{排出的固体相体积}}{\text{螺旋管总体积}} \times 100\% \quad (2)$$

注:本试验色谱仪的螺旋管总体积为300 mL。

2 结果与分析讨论

2.1 溶剂体系的选择

2.1.1 氯仿:甲醇:水体系

对于未知组成的样品,一般根据经验来选择溶剂体系。通常先选用氯仿:甲醇:水为2:2:1溶剂体系先进行尝试。它的平衡时间短,两相体积比大致相等。在这个体系中,氯仿、水分成两相,甲醇在上、下相均有分布,甲醇在其中起到调节两相极性的作用。甲醇量的增加,一方面增加氯仿的极性,另一方面减少水的极性。

试验发现,上相主要成分为辣椒碱,而色素主要分布在下相。通过计算K值远远小于0.5,所以该体系比例不适合。另外,又对氯仿:甲醇:水为4:3:2和氯仿:甲醇:水为7:13:8这两个经典体系进行了尝试,结果辣椒碱还是很不均匀的分配在上相,即水相。从试验可以看出,辣椒碱极性相对较大,该体系不适合辣椒碱的纯化。因此,本试验尝试用强极性溶剂体系。

2.1.2 氯仿水体系中调节pH值

氯仿水体系中调节pH值以增大极性,典型的溶剂体系如氯仿:甲醇:0.3 mol/L或0.2 mol/L盐酸的水溶液(4:1.5:2),试验发现,上相主要成分为辣椒碱,而色素主要分布在下相。通过计算K值远远小于0.5,所以该体系不适合。

2.1.3 正丁醇和水体系

强极性溶剂体系的基本两相由正丁醇和水组成,可根据需要在上下相中加入甲醇、乙醇、醋酸乙酯等来调节溶剂系统的极性。参考相关文献资料,本试验首先尝试选用经典体系正丁醇:乙酸:水(4:1:5),试验发现:该溶剂体系平衡时间短,两相体积比大致相等。通过计算K=0.504,符合溶剂体系选择的分配系数(0.5~2)的范

围。所以本试验初步选定正丁醇和水体系作为提纯辣椒碱的溶剂体系。在改变各组分的比例的基础上,观察分层以及比例分配,并按公式(1)计算K值,以求能得到最佳的分离溶剂体系比例,试验结果见表1。

表1 正丁醇-乙酸-水体系不同比例下分离效果
Table 1 Separation effects of alcohol : acetic acid : H₂O solvent system with different ratio

体系比例	C _u (mg/L)	C _L (mg/L)	K
4 : 1 : 5	10.358	20.532	0.504
4 : 2 : 5	11.356	22.180	0.512
4 : 2 : 4	12.15	21.86	0.556
3 : 1 : 4	12.035	34.058	0.35
4 : 3 : 5	14.116	22.266	0.634
3 : 3 : 5	16.659	26.89	0.620

试验发现,减少水的比例和加大乙酸的比例,都可以使分配系数变大。但是随着乙酸加入比例的增大,溶剂体系上下层分层很慢,且由于正丁醇和水混合存在一定的乳化特性,中间还很容易生成一条乳白色的带。虽然K值相对较大,但是由于乳化以及分层缓慢等原因,也会影响辣椒碱的分离纯化效果。综合考虑,本试验选择经典溶剂体系:正丁醇:乙酸:水(4:1:5)进行辣椒碱的分离,该比例下上下相分布基本为1:1,可以减少溶剂的浪费,从而降低成本。

2.2 高速逆流色谱分离结果及分析

对辣椒碱粗提物的分离纯化结果见分离色谱图1。

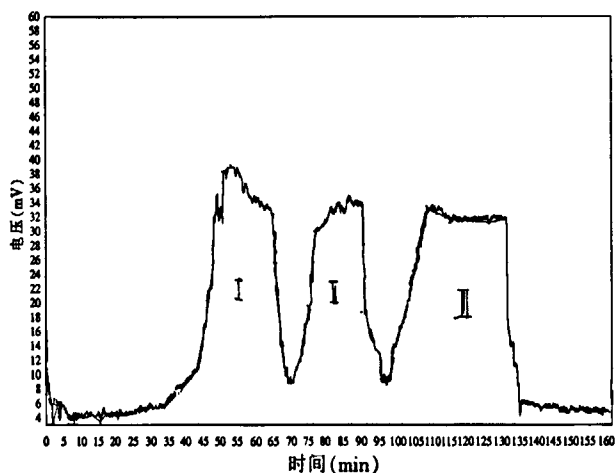


图1 辣椒碱的HSCCC分离色谱图

Fig. 1 Chromatogram map of capsaicin by HSCCC

在溶剂体系正丁醇:乙酸:水(4:1:5)下,辣椒碱粗提物中的辣椒碱和其它物质能够很好的实现分离。峰I收集物为无色,出峰时间在40~70 min之

间,经定性检测为辣椒碱组分。其余两个峰的收集物检测无辣椒碱,具体物质有待进一步确定。将组分I挥干有机溶剂后,用高效液相色谱法进行定量测定,计算出辣椒碱纯度为90.3%。

3 小结


选用正丁醇:乙酸:水(4:1:5)为HSCCC法分离纯化辣椒碱的最佳溶剂体系。

该法可以将粗提物中的辣椒碱和红色素得到很好的分离,出峰时间在40~70 min的收集物即为辣椒碱。经HSCCC纯化处理后的辣椒碱收集物经HPLC法测定,纯度为90.3%。

本方法结合HSCCC来分离纯化辣椒碱具有创新性,目前鲜见报道,分离效果良好,但是该方法处理的量小,对工业化应用有一定的限制,需要进一步改进。

参考文献:

- [1]卢胜. 苏浓. 辣椒纵横谈[J]. 现代农业, 2004(1):12-14.
- [2]王东, 丁雪艳. 值得开发的辣椒碱[J]. 化工中间体, 2004, 1(2):12-14.
- [3]邱建生, 张彦雄. 中国辣椒深加工产业的现状及发展趋势[J]. 中国食品添加剂, 1999(3):39-48.
- [4]Ochoar Alejo N, Gomez-Peralla J E. Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus and fruits of Chilli pepper[J]. J. Plant Physiol, 1993:141-152.
- [5]杨丹. 辣椒碱膜剂镇痛作用的研究[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(12):1739-1740.
- [6]刘可春. 辣椒碱的抑菌效果研究[J]. 山东科学, 2007, 20(2):38-40.
- [7]林绮雯. 辣椒碱的药理与临床研究概况[J]. 广东药学, 2000, 10(5):5-8.
- [8]Oka Hisao, Ito Yoichiro. Separation of lac dye components using high-speed countercurrent chromatography [J]. Countercurrent Chromatography, 2000(4):24-29.
- [9]袁黎明, 傅若农, 张天佑. 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(1):60-65.
- [10]Zhengrong Kong, Kenneth L Rinehart, Richard M. Milberg, et al. Application of high-speed countercurrent chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (HSCCC/ESI-MS) in natural products chemistry [J]. J. Liq. Chrom. & Rel. Techol., 1998, 21 (1 & 2): 65-82.
- [11]戴德舜, 王义明, 罗国安. 高速逆流色谱研究进展[J]. 分析化学, 2001, 29(5):586-591.

作者: 朱妞, 訾荣禄, ZHU Niu, ZI Rong-lu
作者单位: 朱妞, ZHU Niu(咸阳职业技术学院, 陕西咸阳, 712081), 訾荣禄, ZI Rong-lu(陕西科技大学生命科学与工程学院, 西安, 710021)
刊名: 中国调味品 
英文刊名: China Condiment
年, 卷(期): 2012, 37(1)

参考文献(11条)

1. 卢胜;苏浓 辣椒纵横谈 2004(01)
2. 王东;丁雪艳 值得开发的辣椒碱 2004(02)
3. 邱建生;张彦雄 中国辣椒深加工产业的现状及发展趋势 1999(03)
4. Ochoar Alejo N;Gomez-Peralla J E Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus and fruits of Chilli pepper 1993
5. 杨丹 辣椒碱膜剂镇痛作用的研究[期刊论文]-现代医药卫生 2007(12)
6. 刘可春 辣椒碱的抑菌效果研究[期刊论文]-山东科学 2007(02)
7. 林绮雯 辣椒碱的药理与临床研究概况 2000(05)
8. Oka Hisao;Ito Yoichiro Separation of lac dye components using high-speed countercurrent chromatography 2000(04)
9. 袁黎明;傅若农;张天佑 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用[期刊论文]-药物分析杂志 1998(01)
10. Zhengrong Kong;Kenneth L Rinehart;Richard M. Milberg Application of high-speed countercurrent chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (HSCCC/ESIMS) in natural products chemistry 1998(1 - 2)
11. 戴德舜;王义明;罗国安 高速逆流色谱研究进展[期刊论文]-分析化学 2001(05)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgtwp201201023.aspx