

高速逆流色谱分离制备胡椒中的胡椒碱

钱登勇¹, 李博¹, 蒋志国², 应晓国¹, 杜琪珍^{1,*}

(1. 浙江工商大学食品与生物工程研究所, 浙江 杭州 310035; 2. 海南大学食品学院, 海南 海口 570228)

摘要: 采用高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)法从胡椒中分离制备胡椒碱。HSCCC的溶剂系统条件为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1, V/V)。从5g粗提取物中可一次分离得到纯度为98.72%的胡椒碱单体1.58g, 分离得到的胡椒碱结构经电喷雾质谱以及核磁共振氢谱(¹H NMR)和碳谱(¹³C NMR)进行鉴定。该法制备量大、分离效率高, 对胡椒碱在食品医药领域的应用具有重要意义。

关键词: 高速逆流色谱; 胡椒碱; 胡椒

Separation of Piperine from Pepper by High-Speed Countercurrent Chromatography

QIAN Deng-yong¹, LI Bo¹, JIANG Zhi-guo², YING Xiao-guo¹, DU Qi-zhen^{1,*}

(1. Institute of Food and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China ;

2. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract : Piperine was separated from crude ethanolic pepper extract by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) with a solvent system composed of n-hexane-acetic ether-methanol-water (1:1:1:1, V/V). The method allowed the separation of 1.58 g of individual piperine with a purity of 98.72% from 5 g of crude ethanolic pepper extract. The separated piperine was structurally identified by ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. The method is of high sample loading capacity, high separation efficiency, and great importance for piperine applications in the food and medical fields.

Key words : high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) ; piperine ; pepper

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0274-03

高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)技术是一种无固体载体的连续液-液分配色谱技术, 其固定相通过重力场和离心力场作用被保留在分离柱内^[1-2], 可避免固体载体与样品发生化学反应而变性及不可逆吸附, 样品回收率高, 可从粗制样品中规模制备高纯度单体化合物, 现已广泛用于生化工程、医药、天然产物、食品等领域^[3-4]。在分离天然产物方面具有一般色谱技术所无法比拟的优势^[5]。

胡椒有“香料之王”的美称, 是世界上古老而著名的香料作物, 广泛用作厨房烹饪调味料。此外, 在食品加工上, 胡椒可用作防腐剂来延长食品的保存期; 在医学上, 胡椒可以作为驱风剂与退热剂用来治疗消化不良与普通感冒并有微弱的抗疟作用^[6]。胡椒碱(piperine)化学名为(*E,E*)-1-[5-(1,3-苯并二氧戊环-5-基)-1-

氧代-2,4-戊二烯基]-哌啶(图1), 是胡椒的主要活性成分之一, 属于桂皮酰胺类生物碱^[7-8], 具多种药理学活性^[9-10], 对人体内一些药物代谢的酶类有抑制作用, 可以提高药物的生物利用率^[11-13], 具有抗惊厥作用, 对电休克、戊四唑、印防己毒素、土的宁、筒箭毒碱和谷氨酸钠引起的大鼠和小鼠惊厥均有不同程度缓解作用, 此外还有镇静作用和加强其他中枢神经系统制药的中枢抑制作用, 以及杀虫、利胆、升压、抗氧化^[14-15]等作用。

近些年对胡椒碱的生物活性和药理作用研究非常活跃^[16-17], 但是目前胡椒碱的分离纯化方法主要是采用制备液相色谱法。该法操作成本高、制备量有限, 建立相关的高效分离纯化方法至关重要。本实验运用HSCCC技术对胡椒提取物中的胡椒碱进行分离纯化, 能够一次

收稿日期: 2011-01-04

基金项目: 浙江省自然科学基金杰出青年人才项目(R507719)

作者简介: 钱登勇(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物提取与分离。E-mail: qiandengyong05@163.com

* 通信作者: 杜琪珍(1964—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为天然产物化学与食品质量安全。

E-mail: qizhendu@163.com

性分离得到大量高纯度的单体, 对其在医药食品领域的研究具有重要意义。

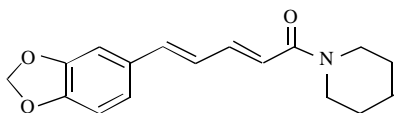


图1 胡椒碱的化学结构式
Fig.1 Chemical structure of piperine

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

胡椒(杭州本地市场购买); 20cm × 20cm Silica gel 60 F254 薄层层析色谱板 德国 Merck 公司。

正己烷、甲醇、乙酸乙酯、氯仿、乙醇 华东医药股份有限公司; 甲醇(HPLC 纯); 纯净水 杭州娃哈哈集团有限公司; 其余所用试剂均为分析纯。

HSCCC-D1200制备型高速逆流色谱仪 浙江工商大学逆流色谱研究室; K-1800 恒流泵 德国 Knauer 公司; B-684 自动收集器、R-215 旋转蒸发仪 瑞士 Büchi 公司; AY-120 电子天平、LC-20A 高效液相色谱仪 日本 Shimadzu 公司; Bruker Avance 500 II 核磁共振波谱仪 德国 Karlsruhe 公司; LCQFleet 电喷雾质谱 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理

称取胡椒 6kg 烘干粉碎, 以 1:10(g/mL) 的比例用 95% 乙醇 55 渗漉提取 3 次, 合并提取液并减压浓缩至基本无乙醇, 以适量水溶解后用氯仿萃取 3 次, 减压浓缩萃取液, 得到氯仿相 94 g。

1.2.2 HSCCC 分离

1.2.2.1 溶剂系统选择

挑取少量氯仿相样品溶解于不同溶剂系统中, 剧烈振荡后静置分层, 用毛细管取近似等量的上下两相溶液进行薄层色谱分析。通过上下相中浓度的差异观察各个组分的分配系数的差异, 从而选择合适的溶剂系统。然后通过小型逆流色谱仪分离试验选定溶剂系统。优化的溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1, V/V)。上相为固定相, 下相为流动相。

1.2.2.2 HSCCC 操作步骤

首先将选好的溶剂系统按比例配制于分液漏斗中, 将其充分混合后, 静置分层。取上相作为固定相, 下相作为流动相, 超声脱气后备用, 准确称取 5g 氯仿相样品, 用上、下相各 50 mL 溶解, 超声脱气后备用。然后将固定相注满制备型高速逆流色谱仪的螺旋管后开

启直流电机, 转速调至 700r/min, 并以 4mL/min 的流速从首端泵入流动相, 在色谱柱尾端用量筒收集流出的固定相; 待色谱柱尾端不再有固定相流出时, 表明系统已动态平衡, 根据流出的固定相体积, 计算在此条件下的固定相保留率, 然后进样 100mL, 出口端用自动收集器收集, 通过 TLC 检测。TLC 展开剂: 乙酸乙酯-正己烷(3:2, V/V), 显色剂: 体积分数 10% 的浓硫酸-乙醇溶液。

1.2.3 纯度检测

采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测分离后的样品纯度。色谱条件: 色谱柱为 YMC-Pack ODS-AQ(150mm × 4.6mm, 3 μm); 检测波长为 280nm; 进样量: 10 μL; 流动相为甲醇-水(70:30, V/V); 流速: 0.25mL/min; 柱温: 25 °。

1.2.4 电喷雾质谱分析

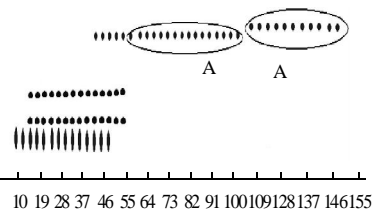
取少量化合物溶解在色谱纯甲醇中进行质谱分析。离子源: 电喷雾电离(electron spray ionization, ESI); 干燥气: 氮气; 干燥气流速: 5.0L/min; 干燥气温度: 270 °; 喷雾压力: 5.0psi。

1.2.5 核磁共振鉴定单体结构

样品以氘代氯仿溶解, 以 TMS 溶剂峰为内标, ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 的工作频率分别为 500MHz 和 125MHz。

2 结果与分析

2.1 胡椒碱的 HSCCC 分离



展开剂为乙酸乙酯-正己烷(3:2, V/V); 显色剂为 10% 浓硫酸-乙醇溶液。15mL/管。

图2 HSCCC 分离氯仿相的薄层色谱图

Fig.2 Thin layer chromatogram of chloroform phase resulting from HSCCC separation

图2是5g胡椒粗提物氯仿相经1200mL分离柱高速逆流色谱仪分离、薄层色谱检测获得的分离图谱。10~57管检出多个斑点, 58~144管(组分A)检出一个斑点。合并58~144管, 浓缩干燥后得样品A为1.58g。

2.2 高效液相色谱检测

高速逆流色谱分离得到的化合物A用HPLC分析检测其纯度, 结果显示纯度为98.72%(图3)。

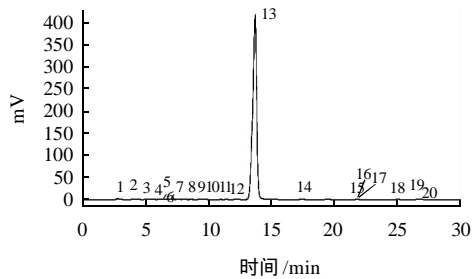


图3 化合物A的高效液相色谱分析图谱
Fig.3 HPLC chromatogram of compound A

2.3 胡椒碱结构解析

采用EMI-MS、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 技术鉴定化合物A的结构。EMI-MS 图谱显示, 信号峰(m/z)为308.22[M+Na] $^+$ 、593.08[2M+Na] $^+$ 、286.27[M+H] $^+$ 和571.03[2M+H] $^+$, 提示其相对分子质量为285。其 ^1H NMR谱和 ^{13}C NMR谱数据如表1所示, 对照文献[12-13], 鉴定该化合物为胡椒碱。

表1 化合物A的 ^1H NMR和 ^{13}C NMR数据
Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR data of compound A

^{13}C (CDCl ₃)		^1H (CDCl ₃)	
所在位置	化学位移	所在位置	化学位移
C-1	165.4	—	—
C-2	119.97	H-2	6.41(1H, d, J = 14.8Hz)
C-3	142.45	H-3	7.39(1H, dd, J = 10.4, 14.8Hz)
C-4	125.28	H-4	6.73(1H, dd, J = 9.7, 14.3Hz)
C-5	138.18	H-5	6.75(1H, d, J = 15.6Hz)
C-1'	130.9	—	—
C-2'	108	H-2'	6.95(1H, d, J = 1.7Hz)
C-3'	148.13	—	—
C-4'	148.07	—	—
C-5'	105	H-5'	6.85(1H, d, J = 8.0Hz)
C-6	122.44	H-6'	6.87(1H, dd, J = 1.6, 8.0Hz)
C-7'	101.24	H(-O-CH ₂ -O-)	5.94(2H, s, -O-CH ₂ -O-)
C-2''	43.19	H-2''	3.50(2H, m)
C-3''	25.58	H-3''、H-5''	1.56(4H, m)
C-4''	24.58	H-4''	1.64(2H, m)
C-5''	26.68	—	—
C-6''	46.84	H-6''	3.61(2H, m)

注: “-”表示在此处没有氢原子和化学位移。

3 结论

本研究采用高速逆流色谱方法, 一次性从胡椒中制备出高纯度(98.72%)的胡椒碱, 该方法制备量大、分离效率高、节约成本, 有望发展为工业级规模的胡椒碱

制备技术, 为功能食品或医药产品开发提供必需的样品。

参考文献:

- [1] ITO Y. Counter current chromatography[M]. New York: Marcel Dekker, 1988: 79.
- [2] ITO Y, BOWMAN R L. Preparative countercurrent chromatography with a slowly rotating helical tube[J]. Journal of Chromatography A, 1977, 136(2): 189-198.
- [3] 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.
- [4] DU Qizhen, JERZ G, WAIBEL R, et al. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1008(2): 173-180.
- [5] 夏明, 杜琪珍. 高速逆流色谱提取分离红曲色素的研究[J]. 广州食品工业科技, 2002, 18(4): 5-6.
- [6] 刘红, 赵建平, 谭乐和. 胡椒碱的研究进展[J]. 中国调味品, 2008(10): 33-36.
- [7] RIBEIRO T S, FREIRE-DE-LIMA L, FREIRE-DE-LIMA M E. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2004, 14(13): 3555-3558.
- [8] SIDDIQUI B S, BEGUM S, GULZAR T, et al. An amide from fruits of *Piper nigrum*[J]. Phytochemistry, 1997, 45(8): 1617-1619.
- [9] REEN R K, WIEBEL F J, SINGH J. Piperine inhibits aflatoxin B₁-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1997, 58(3): 165-173.
- [10] BAJAD S, SINGLA A K, BEDI K L. Liquid chromatographic method for determination of piperine in rat plasma: application to pharmacokinetics [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 776(2): 245-249.
- [11] DOGRA R K S, KHANNA S, SHANKER R. Immunotoxicological effects of piperine in mice[J]. Toxicology, 2004, 196(3): 229-236.
- [12] CORREA E A, HÖGESTÄTT E D, STERNER O, et al. *In vitro* TRPV1 activity of piperine derived amides[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2010, 18(9): 3299-3306.
- [13] ZHANG Hailong, MATSUDA H, NAKAMURA S, et al. Effects of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2008, 18(11): 3272-3277.
- [14] SELVENDIRAN K, SINGH J P V, SAKTHISEKARAN D. *In vivo* effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice[J]. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 2006, 19(2): 107-111.
- [15] BAJAD S, COUMAR M, KHAJURIA R, et al. Characterization of a new rat urinary metabolite of piperine by LC/NMR/MS studies[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003, 19(5): 413-421.
- [16] CAPASSO R, IZZO A A, BORRELLI F, et al. Effect of piperine, the active ingredient of black pepper, on intestinal secretion in mice[J]. Life Sciences, 2002, 71(19): 2311-2317.
- [17] WATTANATHORN J, CHONPATHOMPIKUNLERT P, MUCHIMAPURA S. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(9): 3106-3110.