

无溶剂微波预处理-NaOH 溶液搅拌法提取干红辣椒中的辣椒素

吴丽威 孙颖 孙秀敏 王丽英 姜春竹 宋大千*

(吉林大学化学学院, 长春 130012)

摘 要 将无溶剂微波预处理与 NaOH 搅拌提取相结合提取辣椒素类物质(Capsaicinoids)。在干辣椒样品中加入微波吸收介质羰基铁粉(CIP)对干辣椒样品进行微波预处理。根据辣椒素与 NaOH 之间可发生特异性反应,利用 NaOH 溶液从辣椒中提取两种主要的辣椒素类化合物——辣椒素(Capsaicin ,C)和二氢辣椒素(Dihydrocapsaicin ,DHC)。实验表明,本方法提取时间短(10 min) ,提取率高,并可有效避免有机溶剂对实验室的污染。

关键词 微波预处理法; 氢氧化钠; 辣椒素; 羰基铁粉

1 引 言

辣椒素类物质是辣椒果实中辣味的主要成分。因其具有独特的辛香味和生物活性,除了被广泛用作食品添加剂外,还具有诸多药理作用。辣椒素和二氢辣椒素是两种主要的辣椒素类化合物,约占辣椒素总量的 90%^[1]。

近年来,发展了很多提取辣椒素的新方法,如超临界二氧化碳萃取法^[2]、纤维素酶预处理结合乙醇回流法^[3]、微波萃取法^[4]等。微波作为一种高效、环保的能源已被广泛应用于提取天然植物和中草药的有效成分^[5-8]。多数报道采用有机溶剂对目标物质进行提取^[9,10],而采用无机溶剂从天然植物中提取有效成分的报道却很少。

本研究以 NaOH 提取辣椒中的辣椒素。在干辣椒样品中加入微波吸收介质羰基铁粉(CIP)^[11],对样品进行微波预处理以破坏其细胞壁;再加入 NaOH 溶液,使其渗透到细胞中与目标物质充分接触,以利于最大限度地溶出有效成分,从而提取辣椒素和二氢辣椒素,并与其它提取方法进行了比较。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); NN-MX25WF 型微波炉(上海松下微波炉有限公司); KQ 2200E 型超声波清洁器(100 W 2450 MHz , 昆山市超声仪器有限公司); SZCL 型智能双控磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂)。

辣椒素和二氢辣椒素标准品(中国药品生物制品检定所); NaOH ,HCl(分析纯,北京化工厂); 甲醇(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司); 羰基铁粉(含铁量 97.8% ,平均粒度 4.30 μm ,吉林吉恩镍业股份有限公司); 超纯水。市售干红辣椒(产地长春,去籽后 60 °C 干燥 24 h ,粉碎 60 目(0.24 mm 粒径) 备用)。

2.2 实验方法

2.2.1 微波预处理(CIP)-NaOH 搅拌提取法 分别称取 0.5 g 辣椒粉末和 0.5 g 羰基铁粉于 100 mL 烧杯中,混匀后在 440 W 的微波功率下加热 80 s。取出烧杯,向其中加入 20 mL 5% (m/m) NaOH 溶液,搅拌 10 min ,过滤,用 HCl 将滤液调至 pH 6.0。以超纯水定容至 50 mL。取 0.6 mL 样品溶液,与 2.4 mL 甲醇混匀,过 0.45 μm 滤膜后进行 HPLC 测定。

2.2.2 超声波辅助提取 称 0.5 g 辣椒粉末于 100 mL 烧杯中,加 20 mL 甲醇,超声提取 10 min。过滤并用甲醇定容至 50 mL ,过 0.45 μm 滤膜后进行 HPLC 测定。

2.2.3 微波预处理(H_2O)- NaOH 搅拌提取法 称 0.5 g 辣椒粉末于 100 mL 烧杯中,加 0.25 mL 超纯水,将样品完全浸湿后放入微波炉中,以下步骤与 2.2.1 节相同。

2.2.4 微波预处理(CIP)-甲醇搅拌提取法 微波预处理过程同 2.2.1 节。预处理结束后,取出烧杯,加入 20 mL 甲醇,搅拌 10 min,过滤并用甲醇定容至 50 mL。样品过 0.45 μm 滤膜后测定。

2.3 色谱条件

Eclipse XDB- C_{18} 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , Agilent 公司),柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 甲醇-水(80:20, V/V) 流速: 0.8 mL/min; 紫外检测器波长: 280 nm; 进样量: 20 μL 。

3 结果与讨论

3.1 微波预处理(CIP)- NaOH 搅拌提取法提取条件优化

3.1.1 微波预处理功率 考察了微波功率对提取率的影响。从图 1A 可见,微波功率偏低时,由于样品体系温度不高,样品的细胞壁破坏不够完全,导致提取率低;当微波功率高于 440 W 后,提取率出现下降趋势,这可能是因为辣椒素类化合物在高温下发生分解所致^[12]。因此,本研究微波预处理的功率选择 440 W。

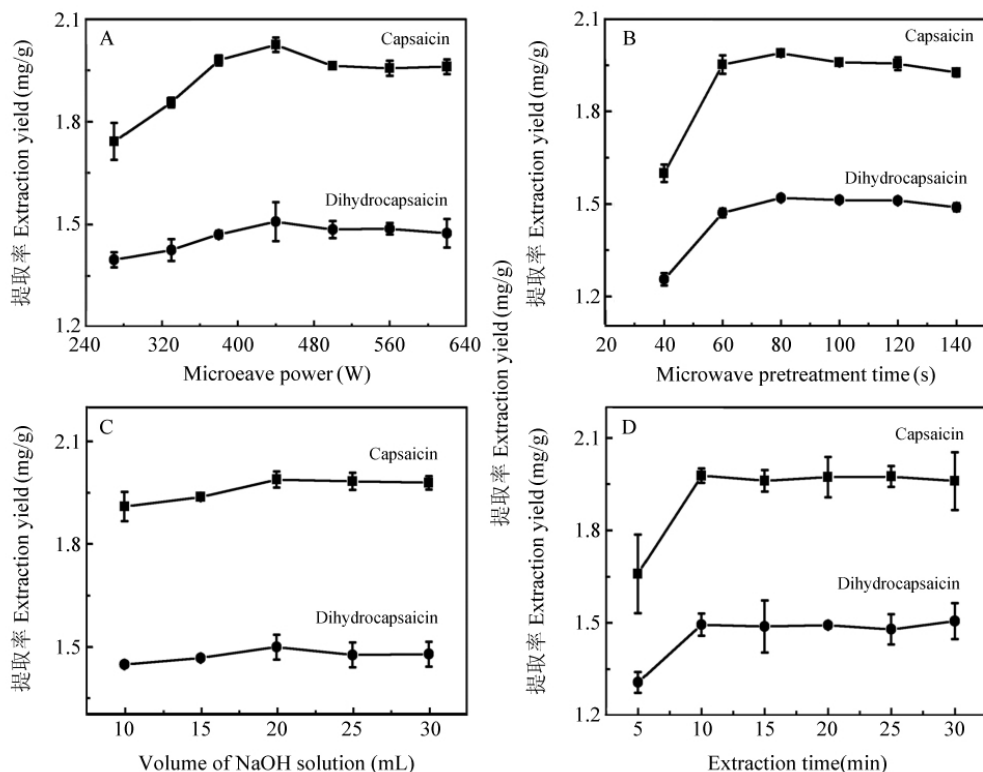


图 1 微波功率(A)、微波预处理时间(B)、 NaOH 溶液体积(C)及提取时间(D)对提取率的影响

Fig.1 Effect of microwave power (A), microwave pretreatment time (B), volume of NaOH solution (C) and extraction time (D) on extraction yield

3.1.2 微波预处理时间 在相同微波功率条件下,考察了不同预处理时间对提取率的影响,结果如图 1B 所示。当预处理 80 s 时,提取率最高,之后提取率逐渐降低。这是由于在固定微波功率的情况下,样品体系的温度随着微波预处理时间的增加而升高,从而有利于样品细胞壁的破裂,提高提取率。但如果样品体系升温过高,辣椒素类化合物在高温下容易发生分解而降低提取率^[12]。因此最佳预处理时间选择 80 s。

3.1.3 CIP 与样品的质量比对提取产率的影响 考察了 CIP 与样品的质量比为 3:1, 2:1, 1:1 和 1:2 时的提取效果。实验表明,质量比大于 1:1 时,出现样品烧灼现象;而 CIP 较少时,提取体系升温速度慢,耗时较长。因此,实验选取 CIP 与样品的质量比 1:1 为最终物料比。

3.1.4 NaOH 溶液用量的选择 本实验根据辣椒素分子中含有酚羟基,呈弱酸性,可与强碱发生反应的原理,选用 NaOH 溶液作为提取剂,经搅拌提取后过滤,再以 HCl 调节样品溶液的 pH 值,使辣椒素释放出来^[13]。考察了 NaOH 溶液用量对提取率的影响(图 1C)。结果表明 20 mL 5% (m/m) NaOH 溶液已足够将样品中的目标物质提取完全。因此,本实验提取溶液选择 20 mL 5% (m/m) NaOH。

3.1.5 搅拌提取时间的选择 考察了搅拌时间对提取率的影响(图 1D)。实验表明:搅拌时间在 0 ~ 10 min 时,随着时间的延长,提取率升高;搅拌时间在 10 ~ 30 min 时,提取率无明显变化。这说明搅拌 10 min 就可将辣椒素类化合物提取完全。本实验搅拌时间选择 10 min。

3.1.6 样品溶液 pH 值的选择 由于实验利用 NaOH 溶液与辣椒素的特异性反应将被测物提取出来,因此为了使被测物能够完全释放出来,需要用 HCl 将样品溶液调至 pH < 7.0。另外考虑到所使用的色谱柱的最佳 pH 值范围(3.0 ~ 9.0),实验分别考察了样品溶液在 pH 3.0 ~ 7.0 时被测物的释放情况。实验表明,在 pH 3.0 ~ 7.0 范围内,pH 值对提取率基本无影响。即在此范围内,被测物可完全被释放。为了减少 HCl 用量,并且获得最大提取率,实验最佳 pH 值选择 6.0。

3.2 样品的测定

辣椒样品在最佳实验条件下,按 2.2.1 节处理后进行 HPLC 检测的色谱图如图 2 所示,辣椒素和二氢辣椒素得到了较好的分离。

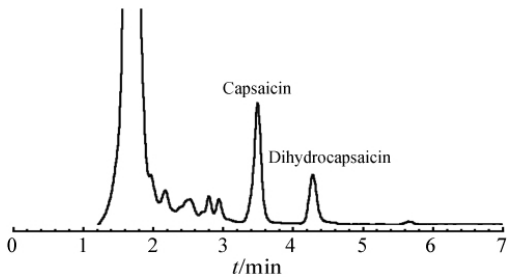


图 2 辣椒提取物的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of extract obtained from hot peppers

3.3 不同提取方法所得辣椒素类化合物的比较分析

通过 HPLC 分析,将微波预处理 (CIP) -NaOH 搅拌提取法分别与其它 4 种方法进行比较分析(表 1)。结果表明,微波预处理 (CIP) -NaOH 溶液搅拌提取法对辣椒素和二氢辣椒素的提取效果最佳。

表 1 不同方法提取结果的比较
Table 1 Comparison of different extraction methods

提取方法 Method	辣椒素 Capsaicin		二氢辣椒素 Dihydrocapsaicin	
	提取率 Extraction yield (%)	RSD (%, n = 5)	提取率 Extraction yield (%)	RSD (%, n = 5)
微波预处理 (CIP) -NaOH 溶液搅拌提取 Microwave pretreatment (CIP) -stir extraction using NaOH	0.19	2.1	0.14	3.0
超声波辅助提取 Ultrasound assisted extraction	0.17	2.6	0.10	3.8
微波预处理 (H ₂ O) -NaOH 溶液搅拌提取 Microwave pretreatment (H ₂ O) -stir extraction using NaOH	0.16	10.7	0.14	1.9
微波预处理 (CIP) -甲醇搅拌提取 Microwave pretreatment (CIP) -stir extraction using methanol	0.19	0.8	0.11	2.6

3.4 标准曲线的绘制

分别称取 2.5 mg 辣椒素和二氢辣椒素的标准品,用甲醇定容至 25 mL,配制成 100 mg/L 的辣椒素和二氢辣椒素的标准储备液。将储备液稀释成 4, 8, 15, 25, 50 和 100 mg/L 的系列标准溶液,按 2.3 节的色谱条件进样,用信号峰面积 (Y) 和标准溶液的浓度 (X) 进行线性回归。辣椒素和二氢辣椒素在 4 ~ 100 mg/L 范围内呈良好的线性关系,回归方程分别为 $Y = 17.27X - 20.08$ ($R = 0.9993$), $Y = 15.45X - 25.12$ ($R = 0.9990$),检出限 (LOD) 分别为 0.24 和 0.27 mg/L。

3.5 微波预处理 (CIP) -NaOH 溶液搅拌提取法的精密度和加标回收率的测定

分别称取 5 份 0.5 g 干辣椒样品,在最优实验条件下进行实验,以辣椒素和二氢辣椒素提取率的变化考察了本实验方法的重现性。实验表明,辣椒素和二氢辣椒素的提取率的相对标准偏差分别为 2.1% 和 3.0% (n = 5),本方法具有较好的重现性。

选取 3 种辣椒样品进行微波预处理 (CIP) -NaOH 溶液搅拌法的加标回收实验。称取 0.5 g 样品,分别加入适量辣椒素和二氢辣椒素标准品,在最优实验条件下处理并检测,所得加标回收率结果见表 2。

实验证明,采用微波预处理(CIP) – NaOH 溶液搅拌提取法对辣椒样品进行处理所得辣椒素的提取率高于其它提取方法。该方法具有良好的重现性和回收率,并且操作简便快捷、准确度高、分析时间较短。由于使用无机溶剂作为提取剂,可有效避免有机溶剂对环境的污染和对人体的伤害,同时也降低了实验成本。

表 2 加标回收率测定结果
Table 2 Recovery of capsaicinoids determined by standard addition method

化合物 Compound	原含量 Original (mg/g)	添加量 Added (mg/g)	检测量 Found (mg/g)	回收率 Recovery (%)	RSD (% , n = 3)
辣椒素 Capsaicin	1.50	0.75	2.05	73.3	0.3
	1.54	0.75	2.17	84.0	2.9
	1.98	0.75	2.56	77.4	3.6
二氢辣椒素 Dihydrocapsaicin	1.21	0.75	1.86	86.7	0.5
	1.32	0.75	1.91	78.7	10.4
	1.49	0.75	2.09	80.2	6.1

References

1 Barbero G F , Liazid A , Palma M , Barroso C G. *Talanta* ,**2008** ,75(5) : 1332 ~ 1337

2 WANG Cong(王 聪) , WANG Jian-Chao(王建超) , YANG Guo-Ping(杨国平) , XIAO Huai(肖 怀) . *Medical Recapitulate*(医学综述) ,**2009** ,15(20) : 3166 ~ 3168

3 DONG Xin-Rong(董新荣) , LIU Zhong-Hua(刘仲华) , GUO De-Yin(郭德音) , LI Yu-Hong(李雨虹) , XIE Da-Ping(谢达平) . *Food Science*(食品科学) ,**2007** ,28(3) : 100 ~ 103

4 CHEN Meng(陈 猛) , YUAN Dong-Xing (袁东星) , XU Peng-Xiang(徐鹏翔) . *Food Science*(食品科学) ,**1999** ,20(10) : 25 ~ 27

5 Ganzler K , Szinai I , Salgo A. *J. Chromatogr. A* ,**1990** ,520(1) : 257 ~ 262

6 Young J C. *J. Agric. Food Chem.* ,**1995** ,43(11) : 2904 ~ 2910

7 QU Chen-Ling(渠琛玲) , YU Song-Cheng(玉崧成) , BAI Yu-Ping(白雨萍) , YOU Jing-Yan(游景艳) , ZHANG Han-Qi (张寒琦) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) ,**2009** ,37(5) : 685 ~ 690

8 LIU Zhong-Ying(刘忠英) , YAN Guo-Quan(晏国全) , BU Feng-Quan(卜凤泉) , DING Lan(丁 兰) , ZHANG Han-Qi (张寒琦) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) ,**2005** ,33(4) : 531 ~ 534

9 Williams O J , Raghavan G S V , Orsat V , Dai J M. *J. Food Biochem.* ,**2004** ,28(2) : 113 ~ 122

10 Pan X J , Niu G G , Liu H Z. *J. Chromatogr. A* ,**2001** ,922(1-2) : 371 ~ 375

11 Wang Z M , Wang L , Li T C , Zhou X , Ding L , Yu Y , Yu A M , Zhang H Q. *Anal. Bioanal. Chem.* ,**2006** ,386(6) : 1863 ~ 1868

12 Gerardo F B , Miguel P , Carmelo G B. *Anal. Chim. Acta* ,**2006** ,578(2) : 227 ~ 233

13 Kaga H. *Org. Chem.* ,**1984** ,54(14) : 52 ~ 56

Solvent-free Microwave Pretreatment Coupled with Sodium Hydroxide Aqueous Solution Stir for Extraction of Capsaicinoids from Hot Peppers

WU Li-Wei , SUN Ying , SUN Xiu-Min , WANG Li-Ying , JIANG Chun-Zhu , SONG Da-Qian*
(College of Chemistry , Jilin University , Changchun 130012)

Abstract Solvent-free microwave pretreatment (SFMP) coupled with sodium hydroxide aqueous solution stir extraction was applied to the extraction of capsaicinoids. In the microwave pretreatment , Carbonyl iron powders (CIP) was added into the samples , which was used as microwave absorption medium. Then , based on the reaction with capsaicinoids , NaOH aqueous solution was used to extract the capsaicin and dihydroc-apsaicin. The experimental results demonstrated that the proposed method shortened the extraction time , increased the extraction yield and avoided the pollution of laboratory caused by organic solvent.

Keyword Microwave pretreatment; Sodium hydroxide; Capsaicinoids; Carbonyl iron powder

(Received 4 May 2010; accepted 28 June 2010)