

高效液相色谱法测定高含水量辣椒制品中的辣椒素类物质

王穗萍^{1,2}, 夏延斌¹, 彭进², 熊科¹, 郑瑶瑶¹, 杨峰¹

(1. 湖南农业大学 食品科技学院, 湖南 长沙 410000; 2. 常德市疾病预防控制中心, 湖南 常德 415000)

摘要: 样品以 70%乙醇提取, 采用反相高效液相色谱分离, 色谱条件: 色谱柱 ZORBAX SB C₁₈ 4.6 mm ×250 mm, 5 μm; 流动相为甲醇-水 (体积比 70:30); 流速 0.8 mL/min; UV 230 nm 检测; 进样量 20 μL。以外标峰面积法定量辣椒素 (C)、二氢辣椒素 (DC)、去甲二氢辣椒素 (NDC), 结果以斯氏指数 (SHU) 计。NDC 的色谱行为与 C 极其类似, NDC 采用 C 的标准曲线定量。C 和 DC 的 RSD 分别为 1.0%、1.5% (n=5); 平均回收率分别为 97%、96%。C 和 DC 在 0.001~0.1 g/L 范围内线性良好; 检出限 (LOD) 为 0.1 mg/L, 定量下限 (LOQ) 为 0.5 mg/L。方法满足辣味水平评价要求。

关键词: 高效液相色谱; 高含水量; 辣椒制品; 辣椒素同系物; 辣味水平

中图分类号: O657.72; S641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2007)04-0570-04

Determination of Capsaicinoids in High Water-bearing Pepper Products by High Performance Liquid Chromatography

WANG Sui-ping^{1,2}, XIA Yan-bin¹, PENG Jin², XIONG Ke¹, ZHENG Yao-yao¹, YANG Feng¹

(1. Food Science and Technology College of Hunan Agriculture University, Changsha 410000, China;
2. Changde Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changde 415000, China)

Abstract: A method was developed for the determination of capsaicinoids in highly water-bearing pepper products by high performance liquid chromatography. The sample was extracted with 70% ethanol. The extract was separated on a ZORBAX SB C₁₈ column (250 ×4.6 mm, i. d. 5 μm) at 30 °C, which was then eluted with 70% MeOH aqueous solution at a flow rate of 0.8 mL/min. The UV detection was at 230 nm. With the external standard method, the linear range of the plots of the peak area versus the concentration for capsaicin (C), dihydrocapsaicin (DC) and nordihydrocapsaicin (NDC), respectively were in the range of 0.001 - 0.1 g/L with a correlation coefficient of 0.9998. The determination results were presented in Scoville heat unit. Since the chromatographic behavior of NDC and C were similar, NDC could be determined using the plot of C. The limits of detection and limits of quantification for C and DC were 0.1 mg/L and 0.5 mg/L, respectively. The relative standard deviations for C and DC were 1.0% and 1.5% respectively (n=5) and the average recoveries were 97% and 96% respectively. Based on the developed method, the pungency level for the pepper products could be measured accurately.

Key words: High performance liquid chromatography; High water-bearing; Pepper products; Capsaicinoids; Pungency level

辣椒素类物质是辣椒果实中的辣味成分和生物活性成分, 由 19 种^[1]以上的辣椒素同系物组成, 同系物结构类似, 均是由香草基胺和 C₈~C₁₁支链脂肪酸组成, 具体种类和含量与辣椒品种和成熟度有关, 主要成分按含量高低依次为: 辣椒素 (69%)、二氢辣椒素 (22%)、去甲二氢辣椒素 (7%)、高辣椒素 (1%)、高二氢辣椒素 (1%)。斯氏指数 (scoville heat units, SHU) 是辣椒辣味感官评价指标, 辣椒素 (C)、二氢辣椒素 (DC)、去甲二氢辣椒素 (NDC)、高辣椒素 (HC)、高二氢辣椒素 (HDC) 的 SHU 分别是^[2-3]: 16 100 000、16 100 000、9 300 000、8 600 000、8 600 000。辣椒素和辣椒油树脂作为天然的食品添加剂正得到日益广泛的应用。辣椒素含量是辣椒食品制品十分重要的质量指标, 对该类产品的

收稿日期: 2006-06-12; 修回日期: 2006-09-14

基金项目: 农业部 948 专项经费资助项目 (2003T18)

作者简介: 王穗萍 (1975-), 女, 湖南常德人, 主管技师, 硕士; 夏延斌, 联系人, Tel: 0731-4618085;

E-mail: xy520523@yahoo.com.cn

辣味水平进行评价和实行标准化具有现实意义。

辣椒素类物质的定量分析方法主要有感官分析法^[4]、凯氏定氮法^[5]、比色法^[6-7]、分光光度法^[8]、高效液相色谱法^[3,9-10]、液-质联用^[11-12]、气-质联用^[13]等。感官法受人为因素影响较大。比色法和凯氏定氮法抗干扰能力有待改善,且只能测定辣椒素总同系物含量。辣椒食品制品与辣椒和辣椒油脂相比,在基质的复杂程度、目标物含量水平上对分析方法有着更高的要求。本文旨在建立 HPLC法测定高水分含量辣椒制品中3种主要辣味成分 C、DC、NDC的含量,从而对辣味水平进行准确的评价。

1 实验部分

1.1 仪器与试材

Agilent 1100高效液相色谱配四元泵、紫外检测器;超纯水机,Hi-tech Instruments Co., Ltd; UV-2450岛津紫外分光光度计。

辣椒素(95%,天然提取于辣椒, Sigma公司,美国)2~8℃ 储存;二氢辣椒素(90%, Sigma公司,美国)2~8℃ 储存;甲醇(色谱纯, Tedia公司,美国),其他试剂为分析纯。

坛坛乡精制剁椒、坛坛乡风味辣椒萝卜、坛坛乡脆鲜剁青椒(长沙坛坛香调料食品有限公司)。

1.2 标准溶液配制

精密称取辣椒素和二氢辣椒素标准品 0.050 0 g(折算为纯品),用 HPLC 甲醇溶解准确定容至 50 mL,配制成 1 g/L 的标准储备液。取储备液用 HPLC 甲醇逐渐稀释分别得到质量浓度为 0、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2 g/L 的系列标准溶液。各浓度标准溶液用封口膜密封后置冰箱中冷藏。使用时放置至室温。

1.3 样品制备

准确称取均匀(研磨或组织捣碎机捣碎)样品 10.00 g,用 70% ()乙醇水溶液转移至 100 mL 容量瓶,50℃ 水浴 2 h(期间 0.5 h 振摇 1 次)。取出冷却至室温,用 70% ()乙醇水溶液定容,混匀,过滤,过 0.45 μm 滤膜备用。制备好的样品溶液用封口膜密封后置冰箱中冷藏。使用时放置至室温。乙醇提取浓度的确定:以样品含水量折算后,乙醇浓度为 70% ()。

1.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB C₁₈ 5 μm 4.6 mm ×250 mm;流动相为甲醇-水(体积比 70:30);流速为 0.8 mL/min;UV 检测波长为 230 nm;柱温,30℃;进样量,20 μL。

1.5 HPLC 定量测定

取各浓度标准溶液进 10 μL 以浓度-峰面积绘制标准曲线(或取跟样品浓度相近的标准溶液进行单点校正)。进样品制备液 20 μL,以保留时间定性,峰面积定量。去甲二氢辣椒素与辣椒素共用同一条标准曲线。辣椒素总同系物含量(以 SHU 计)为 $(V/m) \cdot NDC \times 9\,300\,000 + (V/m) \cdot (C + DC) \times 16\,100\,000$, 式中 NDC : 去甲二氢辣椒素质量浓度, g/L; C : 辣椒素质量浓度, g/L; DC : 二氢辣椒素质量浓度, g/L; V : 定容体积, L; m : 取样量, g; 9 300 000, 16 100 000 为 SHU 换算系数。

2 结果与讨论

2.1 流动相的确定及去甲二氢辣椒素色谱峰的确认

改变流动相甲醇与水的比例优化色谱条件。实验表明,流动相为 70% 甲醇时,从 C 的主峰分出一明显达基线分离的小峰(8.030 min),且该峰与 C、DC 的峰面积比为 1:3:6,基本符合辣椒中辣椒素同系物各组分含量的比例。所采用的辣椒素标准品非人工合成,系从辣椒中提取故带有微量去甲二氢辣椒素。C 与 NDC 的结构极其相似,因而有着极其相似的色谱行为,根据两峰相似的光谱和色谱行为及有关文献[13-14]可断定该峰为 NDC。并可以用辣椒素的标准曲线定量去甲二氢辣椒素。甲醇比例超过 75% 无法分出 NDC,70% 时 NDC 与 C 达基线分离,且保留时间较理想,65% 时因洗脱强度弱,见不到 NDC 峰,故确定流动相比比例为 70%。

有关文献[14-15]采用酸改善分离效果,本实验分别考察 1% 乙酸、0.1% 磷酸对分离效果的改善

情况。实验发现采用酸对分离效果改善不明显；同时，酸的加入使色谱柱平衡时间长，洗柱时间延长，故流动相中不需要加入酸。

2.2 检测波长的确定

文献 [13] 一般采用 280 nm 的检测波长，但灵敏度较低。C 和 DC 在 230 nm 和 280 nm 出现两个吸收峰，230 nm 比 280 nm 的吸收值高很多且峰形平缓，230 nm 波长下 C、DC、NDC 的峰高、峰面积显著增加，灵敏度得到很大提高。图 1 为 0.05 g/L 标准溶液色谱图和坛坛乡辣椒酱样品提取液的色谱图。

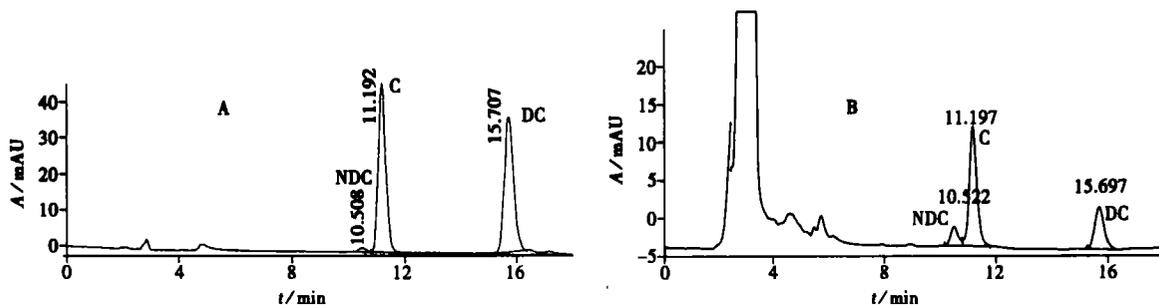


图 1 标准溶液(A)与样品(B)色谱图
Fig. 1 Chromatograms of the standard solution(A) and the sample(B)

2.3 样品提取条件的选择

2.3.1 提取剂的确定 考察了四氢呋喃、甲醇、无水乙醇、石油醚、乙醚、正己烷、乙酸乙酯、丙酮的提取效果。初步分析：四氢呋喃在 20 min 有很强杂峰，在样品连续分析时会带来干扰；乙醚易挥发且提取液未分离出目标峰；乙酸乙酯出峰效果差；乙醇、甲醇提取液峰高、峰面积最好且无明显差异。考虑乙醇无毒性，并在同样的色谱条件下进行试剂空白试验，不存在共色谱现象，确定提取剂为乙醇。

2.3.2 乙醇浓度的确定 考察了乙醇含量为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 时的提取效果，见图 2。乙醇含量在 60%~80% 间提取液稳定，且基本无絮状沉淀产生。70% 乙醇提取液稳定性最好且目标物含量最大。高含量乙醇 (90%~100%) 提取液经低温储存后产生大量色素沉淀。

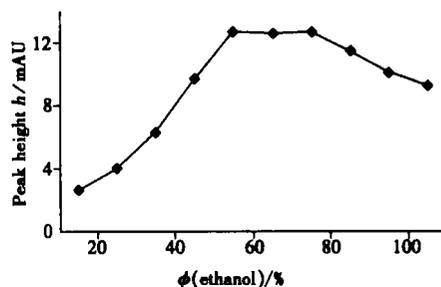


图 2 乙醇含量对提取效果的影响
Fig. 2 Effect of ethanol content on the extraction result

70% 乙醇的良好提取效果可从以下方面解释：制品中的常规成分糖类、蛋白质、盐、色素在 70% 乙醇中溶解度极低，使制备液澄清，无蛋白质、色素、盐及果胶类物质析出。辣椒素类物质的极性与 70% 乙醇极性相似，辣椒素类物质的典型官能团是苯环上有邻位的 $-OH$ 和 $-O-CH_3$ 、支链上有 $-NH-CO-$ ，表明辣椒素类物质有一定极性，易溶解于一定极性的有机溶剂中。

2.3.3 碱性水溶液对辣椒素提取效果的考察 有关文献 [1, 16] 提及辣椒素溶于碱性水溶液，选取 0.05、0.1 mol/L NaOH 水溶液考察提取效果。与样品 (呈酸性) 混匀后 pH 分别为 7.5~8、8.5~9。碱性提取液呈浅黄色，滤液过滤膜困难，可能是水溶性果胶溶出多，提取液目标物出峰不明显。由此可知，碱性水溶液提取不可行，采用有机提取剂更适合。

2.3.4 pH 对辣椒素提取效果的影响 样品的 pH 值在 4~5 间，用 2 mol/L HCl、2 mol/L NaOH 调节 70% 乙醇的 pH 值。试验了 pH 为 2、3、4、5 (对照)、6、7、8、9。以辣椒素峰高评价提取效果，pH 4 处的色谱峰较高，同时 pH 4 左右的提取效果较稳定，食品一般呈酸性，说明测定不需要进行酸碱调节。

2.4 辅料与香辛料的干扰影响考察

辣椒制品中常添加辅料和香辛料制成风味各异的辣椒制品。最常添加的辅料和香辛料有萝卜、豆豉、姜、蒜等。为考察辅料和香辛料对测定的影响，分别取各料适量，按“1.3 样品制备方法处理。结

果表明萝卜、豆豉样品对测定无干扰; 蒜、姜样品分别在辣椒素 (15 min) 和二氢辣椒素 (11 min) 处有共光谱现象, 对测定有干扰。本方法只适用于不含蒜、姜的辣椒制品。对添加各种香辛料 (蒜、姜等) 制品的辣椒素同系物含量测定, 可采用 HPLC-MS/SM 方法对目标物进行定量。

2.5 线性关系与检出限

以 6 个浓度水平绘制标准曲线, 每个浓度水平平行进 3 针, 以峰面积 A 为纵坐标, 质量浓度 (g/L) 为横坐标作校正曲线并进行线性回归。回归方程为 C: $A = 16\ 335 - 3.818(r=0.999\ 8)$; DC: $A = 17\ 761 - 6.236(r=0.999\ 8)$ 。结果表明 C 和 DC 在 0.001 ~ 0.1 g/L 范围内线性良好。以 3 倍信噪比 (S/N) 为检出限 (LOD), 10 倍信噪比为定量下限 (LOQ)。辣椒素、去甲二氢辣椒素、二氢辣椒素的 LOD 为 0.1 mg/L, LOQ 为 0.5 mg/L。

2.6 回收实验

由市场购买甜椒制备空白样, 精密称取 10.00 g 空白样 9 份, 每 3 份为 1 组, 分别加入高、中、低 3 个浓度水平的标准储备液, 按“1.3 样品制备方法进行处理, 分别进样 20 μ L, 由回归方程计算回收率。C、DC 平均回收率分别为 97%、96%, 结果见表 1。

表 1 C 和 DC 回收率实验结果 ($n=3$)
Table 1 Recovery results for capsaicin (C) and dihydrocapsaicin (DC) ($n=3$)

Sample concentration	Added \bar{m}_A /mg		Found \bar{m}_F /mg		Recovery R /%		Average recovery \bar{R} /%		RSD s_r /%	
	C	DC	C	DC	C	DC	C	DC	C	DC
Low	0.5	0.5	0.47	0.46	94	93	97	96	2.13	2.69
Medium	5.0	2.0	4.92	1.95	98	98			0.81	0.51
High	10.0	10.0	9.95	9.93	100	99			0.05	0.36

2.7 精密度与稳定性试验

取 0.05 g/L 标准溶液和制品的样品溶液, 按上述色谱条件, 分别连续进样 5 次, 进行精密度实验, 结果标准溶液和样品溶液的 RSD 分别为 1.0%, 1.5% ($n=5$)。

取新配制的样品制备溶液于 0、2、4、8、12 h 分别测定。辣椒素和二氢辣椒素 RSD 分别为 0.94%、1.08%, 表明供试溶液在 12 h 内稳定。

2.8 样品含量测定

取供试样品 3 批 (坛坛乡精制剁椒 1[#], 坛坛乡脆鲜剁青椒 2[#], 坛坛乡风味辣椒萝卜 3[#]), 按“1.3 样品制备方法处理样品, 进样 20 μ L。另取标准对照溶液作标准曲线计算含量, 结果见表 2。

表 2 供试品含量的测定结果 (HPLC 法和 FAO 法)
Table 2 Determination results of the sample by HPLC method and FAO - UV method

Sample	HPLC method / ($g \cdot L^{-1}$)				FAO - UV method		
	NDC	C	DC	SHU	w /% (248 nm)	w /% (296 nm)	SHU
1 [#] (2005. 8. 4)	0.002 28	0.014 5	0.006 46	3 586. 6	0.057 3	0.015 7	-
2 [#] (2005. 09. 17)	0.003 52	0.014 2	0.006 34	3 634. 3	0.063 7	-	-
3 [#] (2005. 11. 25)	0.000 446	0.003 66	0.001 53	877. 07	0.052	0.011 8	-

2.9 HPLC 法与 FAO 紫外双比色法的比较

取供试样品 3 批, 按 FAO 紫外双比色法操作步骤, 结果见表 2。实验表明: 基质复杂的辣椒制品经多次重复试验, 两个波长下结果偏差大于 10%, 无法用 FAO 紫外双比色法定量。分析原因: FAO 紫外双比色法根据色素和辣椒素在酸性和碱性介质中的吸光特性差异定量, 检出限较高, 只适合于简单基质中辣椒素类物质的定量。

参考文献:

- [1] 凌关庭. 天然食品添加剂 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 57.
- [2] 吴艳阳, 陈开勋, 邵纪生. 辣椒素的制备工艺及分析方法 [J]. 化学世界, 2004, 4: 218 - 221.

(下转第 576 页)

2.4 精密度与检出限

对三甲胺标准溶液 7 个浓度平行 5 次进样所测定的峰面积、峰高求精密度。当三甲胺质量浓度在 1 mg/L 以上时, 峰面积、峰高对应的精密度的相对标准偏差 (RSD) 分别在 2.2%、1.1% 以内; 当其质量浓度低于 1 mg/L 时, 峰面积、峰高的 RSD 大于 10%, 需多次重复测定。

对样品平行 5 次进样, 峰面积、峰高的 RSD 分别为 0.38%、1.4%。

以基线噪声的 3 倍为判断标准, 吸收液中三甲胺的检出限为 0.1 mg/L。折算成大气中三甲胺的检出限, 与吸收液体积、采样速率和采样时间有关。吸收液体积越小, 采样速率越大, 采样时间越长, 三甲胺的检出限越低。本文中采样速率较小, 采样时间较短, 检出限为 1 mg/m³。

参考文献:

- [1] GB/T 14676 - 1993 空气质量 三甲胺的测定 气相色谱法 [S].
- [2] GB/T 160.69 - 2004 工作场所空气中脂肪族类化合物的测定方法 [S].
- [3] 冯 忆, 顾海东, 周振梅. 环境中三甲胺的气相色谱测定 [J]. 环境监测管理与技术, 1999, 11(2): 28 - 29.
- [4] 朱仁康, 王逸虹, 侯定远. 甲胺、二甲胺及三甲胺的气相色谱测定 [J]. 中国环境监测, 2000, 165(1): 20 - 22.
- [5] 丁永胜, 牟世芬. 离子色谱法测定饲料中氯化胆碱和三甲胺的含量 [J]. 色谱, 2004, 22(2): 174 - 176.
- [6] 郑 波. 离子色谱法测定大气中氨及低级脂肪胺 [J]. 石化技术, 1998, 5(2): 108 - 111.

(上接第 573 页)

- [3] BETTS T A. Pungency quantitation of hot pepper sauces using HPLC [J]. Journal of Chemical Education, 1999, 76(2): 240 - 244.
- [4] ISO3513: 1995(E). Chillies - determination of scoville index [S].
- [5] 郑新荣, 袁西恩, 胡宜亮. 辣椒及其制品中辣味素含量测定方法 [J]. 河南科学, 1991, 9(1): 63 - 66.
- [6] 王吉祥, 刘惠蓉, 王志恒. 辣椒素含量测定法 [J]. 陕西农业科学, 1995, 5: 18 - 19.
- [7] 高 蓝, 李浩明, 赵爱云. 从辣椒精中分离辣味物质方法的研究 [J]. 西北植物学报, 1997, 17(3): 387 - 391.
- [8] 刘散兰, 陈连文. 减压柱层析——分光光度法分离和测定辣椒色素中的辣椒素 [J]. 化学研究与应用, 1995, 7(3): 318 - 320.
- [9] 欧阳华学, 胡谟彪, 王凌志, 等. 反相液相色谱法测定辣椒果实中辣椒素含量 [J]. 分析化学, 1998, 26(12): 1521.
- [10] MATHUR R. The hottest chilli variety in India [J]. Current Science, 2000, 79(3): 287 - 288.
- [11] WAIK. Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1979, 172(2): 303 - 311.
- [12] RELLY C A. Analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsicum and pepper spray products [J]. Forensic Science, 2001, 46(3): 502 - 509.
- [13] ISO7543 - 2(1993) E. Chillies and chilli oleoresins - Determination of total capsaicinoid content part 2: Method using high-performance liquid chromatography [S].
- [14] AOAC Official Method 995.03. Capsaicinoids in capsicums and their extractives liquid chromatographic method final action 1998 [S].
- [15] 孙进平, 杨更亮, 陈 义. 辣椒碱主要组分的 RP - HPLC 法测定 [J]. 河北大学学报, 2002, 22(2): 145 - 147.
- [16] GB10465 - 89. 辣椒干 [S].