

制备型高效液相色谱法制备纯化 3 种辣椒素单体

董新荣^{1,2}, 刘仲华², 李本祥¹, 王坤波²

(1. 湖南农业大学理学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘要 利用制备型反相高效液相色谱法从辣椒素类物质中制备了 3 种辣椒素单体。在 PRC-ODS 色谱柱 (250 mm × 21.5 mm, 13 μm) 上, 以甲醇-水 (体积比为 70:30) 为流动相, 流速为 15 mL/min, 采用等度洗脱方式, 从 80% 的辣椒素类物质中制备了 3 种辣椒素单体。经核磁共振氢谱 (¹H NMR) 及电子轰击离子源质谱 (EI-MS) 分析, 确认它们分别为降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素, 收率分别为 60.1%, 58.9% 和 72.3%。高效液相色谱分析表明所制备的 3 种化合物的纯度分别达到了 98.12%, 99.93% 及 100.7%。

关键词 制备高效液相色谱法 降二氢辣椒素 辣椒素 二氢辣椒素 辣椒素类物质

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-8713(2008)03-0366-04 栏目类别 研究论文

Preparation of three capsaicinoid components using preparative high performance liquid chromatography

DONG Xinrong^{1,2}, LIU Zhonghua², LI Benxiang¹, WANG Kunbo²

(1. College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Natural Product Research Center, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

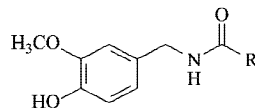
Abstract : A method was established for the isolation of three capsaicinoid components from capsaicinoids using preparative high performance liquid chromatography (Pre-HPLC). A preparative PRC-ODS column (250 mm × 21.5 mm, 13 μm) was used in the preparation process. By isocratic elution with methanol-water (70:30, v/v) as the mobile phase at a flow rate of 15 mL/min followed by concentration, three capsaicinoid components were obtained from 80% capsaicinoids, and subsequently identified by ¹H NMR (nuclear magnetic resonance) and EI-MS (electron impact-mass spectrometry) as nordihydrocapsaicin, capsaicin and dihydrocapsaicin, and the purities of the three components analyzed by HPLC were 98.12%, 99.93% and 100.7% with yields of 60.1%, 58.9% and 72.3%, respectively.

Key words : preparative high performance liquid chromatography (Pre-HPLC); nordihydrocapsaicin; capsaicin; dihydrocapsaicin; capsaicinoids

辣椒素是辣椒 (*Capsicum frutescens* L.) 的果实中所含有的结构为 *N*-香草基酰胺的一类生物碱^[1], 是辣椒的呈味物质, 具有镇痛、抗炎、促进食欲、改善消化、抗菌杀虫及对神经递质的选择性等活性^[2], 近来的研究还认为辣椒素具有抗氧化及清除自由基作用^[3,4]、抗癌^[5-7]及抑制动物体内脂肪的积累^[8-10]等广泛的生物活性和应用价值。

辣椒素类物质中含有十多种成分^[11-13], 主要为辣椒素 (capsaicin, C, 60% ~ 70%)、二氢辣椒素 (dihydrocapsaicin, DC, 20% ~ 30%)、降二氢辣椒素 (nordihydrocapsaicin, NDC, 约 6%), 以及高辣椒素

和高二氢辣椒素各 1% 左右。主要成分的化学结构如图 1 所示。



Capsaicin: R = -(CH₂)₄CH = CHCH(CH₃)₂

Dihydrocapsaicin: R = -(CH₂)₆CH(CH₃)₂

Nordihydrocapsaicin: R = -(CH₂)₅CH(CH₃)₂

图 1 主要辣椒素类物质的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of major capsaicinoids

收稿日期 2007-08-24

第一作者 董新荣, 博士, 副教授. E-mail: xinrong108@yahoo.com.cn.

通讯联系人 刘仲华, 教授, 博士生导师. Tel: (0731) 4635304, E-mail: larkin-liu@163.com.

基金项目 科技部“十五”科技重点项目 (No. 2004BA542C) 和湖南省发展和改革委员会项目 (No. 2004714-16).

辣椒素的提取一般采用低碳醇类或丙酮等有机溶剂抽提,得到含辣椒素的浸膏,再经酸、碱及盐析等方法纯化处理可提高辣椒素的含量。高纯的辣椒素则用硅胶、氧化铝等柱色谱方法分离制备^[14],但所得产物仍为以上多个组分的混合物。Yao等^[15]用中压反相液相色谱法从含辣椒素及二氢辣椒素的混合物中分离两者。但尚未见含量较低、一般在定量分析型高效液相色谱中都较难实现基线分离的降二氢辣椒素与辣椒素的分离报道。目前,降二氢辣椒素作为分析使用的对照品也难于买到。本文结合大孔吸附树脂柱色谱初步分离,发展了一种有效实现NDC与C分离制备的制备型高效液相色谱(Pre-HPLC)方法,从含80%辣椒素类物质的粗产品中分离得到了NDC、C及DC。该方法上样量大,重现性好,适合于NDC、C及DC的大量制备。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津 SCL-10AVp 制备型高效液相色谱仪, LC-8A 泵, SPD-20A 监测器, FRC-10A 分步收集器, LC Solution 色谱工作站。日本岛津 LC-10ATVp 分析型高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器。INO-VA-400 型核磁共振仪; Finnigan MAT 95 XP 高分辨质谱仪。

辣椒素与二氢辣椒素对照品购自美国 Sigma 公司, 非极性大孔吸附树脂(南开大学化工厂); 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

制备型 HPLC: PRC-ODC 色谱柱(250 mm × 21.5 mm, 13 μm) 流动相为甲醇-水(体积比为 70:30), 流速为 15 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 25 °C, 进样体积为 1 mL。

分析型 HPLC: Vp-ODS 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(体积比为 65:35), 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 35 °C, 检测波长为 280 nm, 进样体积为 20 μL。

辣椒素及降二氢辣椒素以辣椒素峰面积外标法计算含量, 二氢辣椒素以其峰面积外标法计算含量^[16]。

1.3 样品处理

辣椒素粗品按文献[17]制备。其中辣椒素类化合物的含量为 81.03% (其中辣椒素 49.24%, 二氢辣椒素 24.37%, 降二氢辣椒素 7.41%)。

1.4 纯样品的制备

将 180 mg 辣椒素粗样品溶于 12 mL 甲醇中, 超声溶解, 经 0.45 μm 滤膜抽滤后进行制备型高效

液相色谱分离, 按“1.2”节色谱条件洗脱。分别收集相应的流出液, 减压蒸除甲醇后, 用乙酸乙酯萃取水相, 并用无水硫酸钠干燥, 回收溶剂, 分别得到相应的单体化合物 NDC 6.5 mg (收率 60.1%), C 42.3 mg (收率 58.9%), DC 25.7 mg (收率 72.3%)。

2 结果与讨论

2.1 制备样品的纯度

图 2-a 为粗品辣椒素类物质的分析型高效液相色谱图, 其中 NDC 与 C 较好地实现了基线分离。图 2-b 为分离后的单体化合物 NDC 的色谱图。从图 2-b 中可看出其中仍然残留少量的化合物 C, NDC 的含量为 98.12% (NDC 与 C 采用中切法切割分离)。另外, 所制备的单体化合物 C 的含量为 99.93%, DC 的含量为 100.7%。

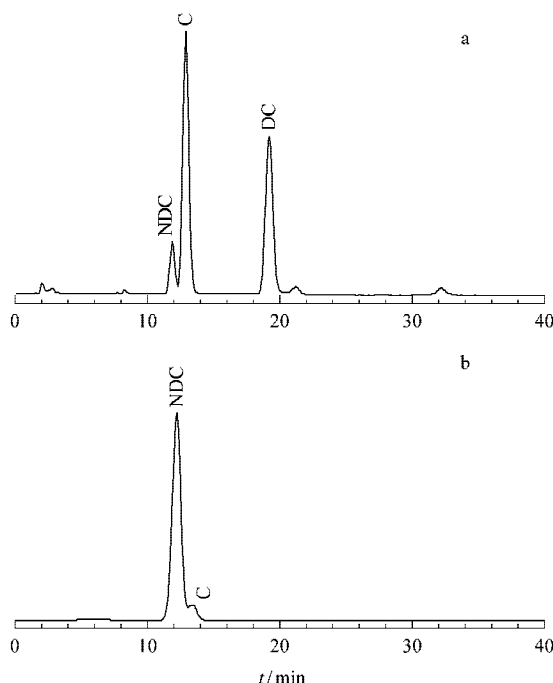


图 2 (a) 辣椒素类物质及 (b) 制备的降二氢辣椒素的分析型 HPLC 色谱图

Fig. 2 Analytical HPLC chromatograms of (a) capsaicinoids and (b) prepared nordihydrocapsaicin

2.2 结构鉴定

2.2.1 降二氢辣椒素的结构测定

¹H NMR (CDCl₃) 分析结果(δ) 8.86 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.81 (1H, s), 6.76 (1H, d, J = 8.0 Hz), 5.66 (1H, s, br.), 4.36 (2H, s), 3.88 (3H, s), 2.20 (2H, t, J = 7.6 Hz), 1.66 (2H, m), 1.50 (1H, m), 1.29 (4H, m), 1.13 (2H, m), 0.85 (6H, d, J = 6.8 Hz)。EI-MS 分析结果(m/z (相对丰度)): 293 (M⁺, 9.5%), 195 (9.5%), 152 (14.6%), 137 (100%), 122, 109, 94, 69, 55, 41。¹H NMR 的表征

数据与文献[15]报道的化合物 DC 数据比对,仅在 $\delta = 1.29$ 的信号处少 2 个氢原子(即脂肪酰基链中少 1 个 $-\text{CH}_2-$),而 EI-MS 分析表明其相对分子质量为 293,因此鉴定为降二氢辣椒素。

2.2.2 辣椒素的结构测定

HPLC 分析制备的辣椒素的保留时间与辣椒素对照样品一致。 ^1H NMR (CDCl_3) 分析结果(δ): 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.80 (1H, s), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.74 (1H, s, br.), 5.34 (2H, m), 4.35 (2H, s), 3.87 (3H, s), 2.21 (3H, m), 1.98 (2H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.65 (2H, m), 1.38 (2H, m), 0.94 (6H, d, $J = 6.8$ Hz)。EI-MS 分析结果(m/z (相对丰度)): 305 (M^+ , 5.5%), 195 (3.2%), 168 (2.1%), 152 (12.1%), 137 (100%), 122, 109, 94, 69, 55, 41。 ^1H NMR 及 EI-MS 的分析结果与文献[15]报道的辣椒素数据相符合。

2.2.3 二氢辣椒素的结构测定

HPLC 分析制备的二氢辣椒素的保留时间与二氢辣椒素对照样品一致。 ^1H NMR (CDCl_3) 分析结果(δ): 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.80 (1H, s), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.72 (1H, s, br.), 4.35 (2H, s), 3.88 (3H, s), 2.20 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.63 (2H, m), 1.50 (1H, m), 1.28 (6H, m), 1.13 (2H, m), 0.85 (6H, d, $J = 6.4$ Hz)。EI-MS 分析结果(m/z (相对丰度)): 307 (M^+ , 9.5%), 195 (9.5%), 152 (14.6%), 137 (100%), 122, 109, 94, 69, 55, 41。 ^1H NMR 及 EI-MS 的分析结果与文献[15]报道的二氢辣椒素数据相符合。

2.3 制备型高效液相色谱分离条件的选择

辣椒素类物质中同系物达十多个,由于结构的相似性,常规硅胶柱色谱分离一般只能得到上述几个单体的混合物。辣椒素类物质单体的分离十分困难,特别是 NDC 与 C,在定量分析型高效液相色谱中较难实现基线分离。本文在分析型高效液相色谱条件的基础上,利用反相色谱方法,通过调整流动相中甲醇的比例,实现了 3 种主要辣椒素类物质单体的分离(见图 3)。当以 65% 甲醇洗脱时,难分离的化合物 NDC 及化合物 C 基本可实现基线分离(见图 3-a),分离效果与分析型色谱基本相当,但分离时间较长,需要 70 min 才能完成一个洗脱单元(流速 15 mL/min),这对于制备型色谱来说意味着制备效率下降及需要耗费大量的有机溶剂;当以 70% 甲醇洗脱时,化合物 NDC 及化合物 C 基本可实现分离(见图 3-b),完成一个洗脱单元的分离时间可缩短至 40 min(流速 15 mL/min)。

分离的效果还与进样量有关。以 70% 甲醇洗

脱时,当进样量在 15 mg 时,NDC 及 C 基本可分离(图 3-b(1));当进样量在 30 mg 时,NDC 及 C 的分离效果显著下降(图 3-b(2)),难以实现两者分离。

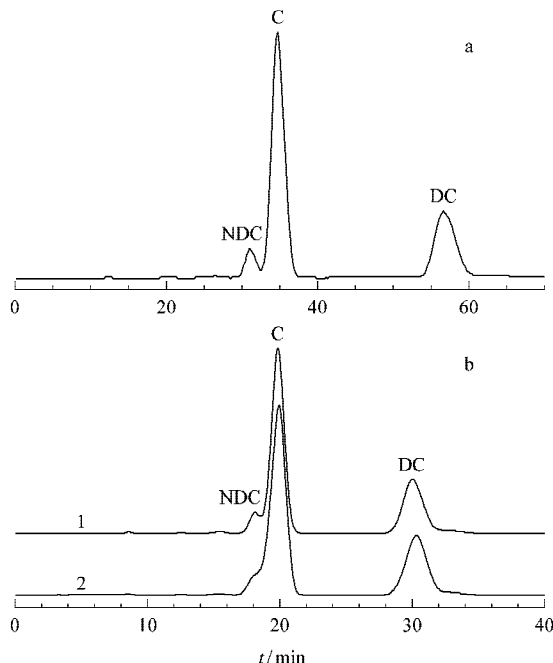


图 3 样品的制备 HPLC 色谱图

Fig. 3 Preparative HPLC chromatogram of capsaicinoids
Mobile phase: a. $V(\text{methanol}) : V(\text{water}) = 65 : 35$;
b. $V(\text{methanol}) : V(\text{water}) = 70 : 30$.
Injection size: 1. 15 mg; 2. 30 mg.

综合考虑,本文采用 70% 的甲醇洗脱,流速为 15 mL/min,每次进样量为 15 mg。

3 结论

由于制备型高效液相色谱流动相流速大,溶剂消耗量大,因此,用此法进行物质的分离纯化时,既要求所分离的物质有较好的分离度,又要求进样量大、收率高、实验运行时间短,以降低运行成本。本文在 PRC-ODS 制备色谱柱上,以甲醇-水(体积比为 70:30)为流动相,流速为 15 mL/min,采用等度洗脱方式,从含 80% 辣椒素类物质的粗品中制备了 3 种辣椒素单体。经 ^1H NMR 及 EI-MS 分析,确认它们分别为降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素,收率分别为 60.1%, 58.9% 和 72.3%。高效液相色谱分析表明所制备的 3 种化合物的纯度分别达到了 98.12%, 99.93% 和 100.7%。

降二氢辣椒素与辣椒素一般在定量分析型高效液相色谱中都较难实现基线分离,特别是 NDC 的含量又低,作为分析使用的对照品也难于购买。本文通过调整色谱条件,有效地实现了两者的分离制备。该法具有操作方便、产率高的特点,制备的产品可作为对照品。

致谢 感谢湖南大学测试中心于正英老师、吴又群老师帮助完成核磁共振谱及质谱测定。

参考文献：

- [1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese medicine. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers (江苏新医学院. 中药大辞典. 上海 : 上海科学技术出版社), 1977 : 2 570
- [2] Li W S, Chen X. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine (黎万寿, 陈幸. 中国中医药信息杂志), 2002, 9(3) : 82
- [3] Kogure K, Goto S, Nishimura M, et al. Biochim Biophys Acta, 2002, 1 573 : 84
- [4] Nakamura T, Ooi T, Kogure K, et al. Tetrahedron Lett, 2002, 43 : 8 181
- [5] Dorai T, Aggarwal B B. Cancer Lett, 2004, 215 : 129
- [6] Shimizu M, Weinstein I B. Mutat Res, 2005, 591 : 147
- [7] Zhang J, Nagasaki M, Tanaka Y, et al. Leuk Res, 2003, 27 : 275
- [8] Kawada T, Hagihara K, Iwai K. J Nutr, 1986, 116 : 1 272
- [9] Kawada T, Watanabe T, Takaishi T. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1986, 183 : 250
- [10] Hwang J T, Park I J, Shin J I, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338 : 694
- [11] Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H. Agric Biol Chem, 1979, 43 : 2 493
- [12] Suzuki T, Kawada T, Iwai K. J Chromatogr, 1980, 198 : 217
- [13] Thomas B V, Schreiber A A, Weisskopf C P. J Agric Food Chem, 1998, 46 : 2 655
- [14] Dong X R, Liu Z H, Yang J K, et al. Natural Product Research and Development (董新荣, 刘仲华, 杨建奎, 等. 天然产物研究与开发), 2004, 16(5) : 486
- [15] Yao J P, Nair M G, Chandra A. J Agric Food Chem, 1994, 42 : 1 303
- [16] Dong X R, Shi G R, Jiang H X, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (董新荣, 石国荣, 姜辉霞, 等. 分析试验室), 2006, 25 (Suppl) : 5
- [17] Dong X R, Liu Z H, Guo D Y, et al. Chinese Journal of Applied Chemistry (董新荣, 刘仲华, 郭德音, 等. 应用化学), 2007, 24(11) : 1 245

会议报道

第十四届四川省色谱及相关分离技术交流会暨 分析仪器展览会在成都胜利召开

第十四届四川省色谱及相关分离技术交流会暨分析仪器展览会于 2008 年 4 月 8 - 9 日在成都胜利召开。这次会议首次与会展机构合作尝试新的办会模式,得到了相关单位的大力支持,拓展了交流平台,使与会代表接触到了更多的仪器设备。

参加本次会议的正式注册代表 122 人,与会代表中有参加了第一届四川省色谱学术会议的老专家,也有战斗在科研生产第一线的中青年色谱工作者,更有许多刚涉足色谱专业的年轻学子,让我们看到了四川省色谱领域长江后浪推前浪的喜人局面。

参加本次会议的还有国内外著名的分析仪器制造商 21 家,他们为大会带来了色谱仪器及应用方面的新技术新进展,进一步活跃了本次会议的学术内容。

四川省色谱学会常务副理事长、成都理工大学材料与化学化工学院李崇瑛教授、四川大学华西药学院蒋学华教授等多位专家为本次学术会议做了精彩的大会专题报告,让与会者开阔了视野。

本次会议共收到论文 57 篇(其中液相色谱 43 篇、气相色谱 8 篇、其他 6 篇)。编辑出版了论文集,评选出了一、二、三等奖及优秀论文奖,并为获奖者颁发了奖金及证书。论文内容涉及色谱理论研究、固定相制备、色谱技术应用等众多方面,不少论文内容涉及生物医药、药代动力学、药品质检、环境检测等热门领域,较全面地反映了色谱技术在四川的活跃程度。不少年轻色谱工作者写出了高水平的论文,一代新人的涌现给我省色谱技术发展增添了希望。

四川省色谱学会

徐小平、李崇瑛

2008 年 4 月 10 日