

碱法提取辣椒素工艺条件的优化

孙 净, 李存芝, 彭 宁, 黄雪松*
(暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘 要: 以干辣椒为原料, 利用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计研究 pH 值、乙醇体积分数、温度、时间对辣椒素提取率的影响, 并利用气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)测定不同提取条件下的辣椒素含量。结果表明: 高于 50℃ 辣椒素易受热破坏; 微碱性 pH 值有利于辣椒素提取; 影响辣椒素提取量的因素依次为: 温度 > 乙醇体积分数 > pH 值 > 时间, 其最佳工艺条件为 pH8、乙醇体积分数 70%、50℃ 浸提 3.5h, 该组合条件下的平均提取量为 6.812mg/g。

关键词: 辣椒素; 辣椒; 碱性提取; 气相色谱-质谱法

Optimization of Alkaline Extraction Process for Capsaicin from Chili Pepper

SUN Jing, LI Cun-zhi, PENG Ning, HUANG Xue-song*
(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to obtain the maximum extraction yield of capsaicin, extraction parameters such as pH, ethanol concentration, extraction time and temperature were optimized using an $L_9(3^4)$ orthogonal array design. Capsaicin content was determined by GC-MS. The results showed that capsaicin was decomposed at temperatures above 50 °C. Slightly alkaline pH values were beneficial to the extraction of capsaicin. The extraction parameters could be ranked in decreasing order of importance in their effect on the extraction yield of capsaicin as follows: temperature > ethanol concentration > pH > extraction time. The optimal conditions of pH, ethanol concentration, temperature and extraction time were 8, 70%, 50 °C and 3.5 h, respectively. Under these conditions, the average extraction yield of capsaicin were 6.812 mg/g ($n = 4$).

Key words: capsaicin; hot pepper (*Capsicum frutescens* L.); alkaline extraction; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0082-04

辣椒素(辣椒碱类化合物), 是从辣椒(*Capsicum frutescens* L.)中提取的酚羟基类生物碱混合物, 其主要成分是辣椒碱, 其次是二氢辣椒碱, 其余为壬酸香草酰胺、降二氢辣椒碱、高辣椒碱以及高二氢辣椒碱^[1-3](结构式见图 1)等。辣椒素在食品加工^[4]、抗菌镇痛^[5]、生物农药^[6]和防暴防身等领域有广泛应用。目前, 全世界辣椒碱年产量仅有 1200 吨左右, 年需求量超过 5000 吨, 市场缺口约 4000 吨; 我国辣椒碱产量只有 200 多吨, 市场缺口 300 吨, 主要依赖进口^[7]。因此, 提高辣椒碱的提取率对辣椒碱的生产具有巨大的经济效益。

目前辣椒素的提取以有机溶剂提取法为主, 使用的有机溶剂主要有乙醇、丙酮、乙酸乙酯等^[8], 或使用设备投资较高的超临界二氧化碳为溶剂萃取^[9]。为减少溶剂成本和设备投资, 人们探讨了用碱性水溶液提取辣椒素的方法。此外, 超声波、微波等辅助技术^[10-12]也

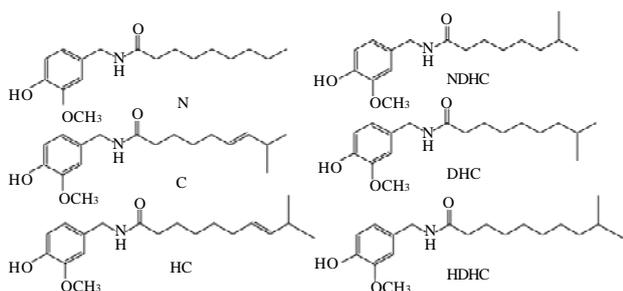
被广泛应用于辣椒素的提取。虽然胡震^[13]、李鑫^[14]等均证实碱性水溶液对提取干辣椒中的辣椒素有显著效果且实验采用了价格更低廉的碱性水溶液为提取剂, 经济性较好, 但其不足之处是辣椒素的提取率不高, 在后续的工序中还增加了因碱性提取液黏度高而难以过滤等问题。为克服此困难, 张郁松等^[15]采用碱性乙醇为溶剂获得了较高的提取率。但其加碱量并不能直接反映 pH 值的变化。因此, 有必要进一步优化碱法提取辣椒素的 pH 值、乙醇体积分数、提取温度等生产工艺参数。本实验利用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计综合研究 pH 值、乙醇体积分数、温度、时间对辣椒素提取率的影响, 用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)检测方法测定提取液中的辣椒素含量, 再通过正交试验结果的极差和方差分析, 以获得最优化的碱性乙醇提取辣椒的工艺参数。

收稿日期: 2011-01-29

基金项目: 广东省高校科技成果产业化项目(cgzhzd0806)

作者简介: 孙净(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能食品。E-mail: tracy.zxsj@163.com

* 通信作者: 黄雪松(1957—), 男, 教授, 研究方向为功能食品。E-mail: thxs@jnu.edu.cn



N.壬酸香草酰胺; NDHC.降二氢辣椒碱; C.辣椒碱; DHC.二氢辣椒碱; HC.高辣椒碱; HDHC.高二氢辣椒碱。

图1 辣椒碱类化合物结构式
Fig.1 The structures of capsaicin

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器与试剂

干辣椒 市售; 壬酸香草酰胺(Nonivamide)(标准品) 郑州荔诺生物科技有限公司; 甲醇(色谱纯) 美国 Dima 公司; 氢氧化钠、盐酸、乙醇均为分析纯。

GC(7890)-MS(5975C) 美国安捷伦公司; PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; RE-52 AAB 型旋转蒸发仪 上海嘉鹏科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 不同酸碱条件下提取辣椒素

将干辣椒粉碎后分别过 50、80 目筛, 取 50~80 目部分, 准确称取 1.000g 辣椒粉于 50mL 锥形瓶中, 加入 20mL 体积分数 50% 乙醇溶液, 用 0.1mol/L NaOH 溶液将 pH 值分别调至酸性(pH6)、中性(pH7)和碱性(pH8), 在 50℃ 提取 1.5h。提取完毕后抽滤, 将滤液中和, 减压浓缩至干, 用甲醇定容到 50mL 过 0.45 μm 滤膜后待测。

1.2.2 正交试验提取辣椒碱类物质

取 9 份 50~80 目的辣椒干粉 1.000g, 以乙醇体积分数、pH 值、提取时间、提取温度为 4 个因素, 根据辣椒碱乙醇提取法常用条件^[16]以及在 1.2.1 节试验基础上分别设定 3 个水平, 按照表 1 的 L₉(3⁴)正交试验进行辣椒油树脂提取, 后续处理与 1.2.1 节同。

表1 辣椒碱类物质提取工艺条件 L₉(3⁴)正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design L₉(3⁴)

水平	A 乙醇体积分数/%	B pH	C 提取时间/h	D 提取温度/℃
1	50	8	1.5	50
2	70	10	2.5	60
3	90	12	3.5	70

1.2.3 辣椒素最佳提取工艺条件的验证

取 4 份 50~80 目的辣椒干粉 1.000g, 采用 1.2.2 节正交试验所筛选的最佳工艺参数进行辣椒油树脂提取, 后续处理与 1.2.1 节同。

1.3 GC-MS 条件

1.3.1 气相色谱分析条件

HP-5 色谱柱(30m × 0.25mm, 0.25 μm), 载气为高纯氦气(1mL/min, 进样口温度 250℃, 接口温度 260℃)。可编程毛细管进样器(PSS)进样口设定为不分流进样方式, 进样量 1.0 μL, 柱温箱升温程序: 初始温度 120℃, 以 5℃/min 的升温速率升至 210℃, 再以 3℃/min 的升温速率升至 225℃, 然后以 8℃/min 的升温速率升至 270℃ 保持 10min。

1.3.2 质谱分析条件

EI 电子源, 电子能量 70eV, 质量扫描范围 35~400u, 全扫描方式, NIST 和 Wiley 谱库检索。

1.4 定性与定量分析

1.4.1 定性方法

通过 NIST 和 Wiley 谱库检索以及特征离子碎片对辣椒碱类化合物进行定性分析, 即确定辣椒碱类化合物的种类。

1.4.2 定量方法

以 Nonivamide 为标准品绘制标准曲线(n = 6), 用 GC-MS 测定其含量。通过各辣椒碱类化合物总离子色谱的相对丰度值及 m/z 值, 得到各化合物的平均摩尔质量, 再根据 Nonivamide 标准曲线计算出 N、C、DHC、HDHC 等辣椒碱类化合物含量。

标准曲线回归方程为: $Y = 1.52 \times 10^7 C + 494060$, $R^2 = 0.9993$ 。

式中: C 为壬酸香草酰胺的质量浓度/(10⁻⁵g/mL); Y 为峰面积; R 为相关性系数。

2 结果与分析

2.1 辣椒素的定性分析结果

通过 GC-MS 所装配 NIST 和 Wiley 谱库检索和产生特征碎片开裂规律的分析, 共确定了 5 种辣椒碱类化合物(表 2)。

表2 辣椒碱类化合物定性分析结果

Table 2 Results of qualitative analysis of capsaicin and other related compounds

种类	出峰时间/min	分子式	匹配度/%	特征离子碎片(m/z)
壬酸香草酰胺	26.114	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃	97	137、195、293
降二氢辣椒碱	26.717	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃	90	137、207、293
辣椒碱	27.295	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	94	137、195、305
二氢辣椒碱	27.574	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	98	137、195、307
高二氢辣椒碱	28.867	C ₁₉ H ₃₁ NO ₃	未检索到(根据特征离子碎片定性)	137、195、321

2.2 干辣椒在酸性、中性与碱性条件下提取辣椒碱类化合物的效果比较

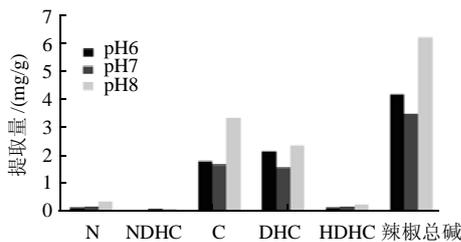


图2 不同pH值条件下辣椒碱类化合物的提取量
Fig.2 Effect of pH on the extraction yield of capsaicin

由图2可知, NDHC、HDHC所占比例很低, 不超过辣椒总碱含量的5%。在3种不同pH值条件下, C、DHC、N以及辣椒总碱的提取效果均为 $m_{\text{碱性}} > m_{\text{酸性}} > m_{\text{中性}}$ (m 为提取量), 其中DHC在酸性和碱性条件下提取量分别为2.133mg和2.324mg, 效果差异不明显; C在酸性、中性和碱性条件下的提取量取量分别为1.778、1.627mg和3.306mg, 即在碱性条件下的提取量比酸性和中性条件下的高近1倍; 从总的提取效果上看, 在碱性条件下的提取效果明显优于酸性和中性条件。这是由于在辣椒素苯环上有一个酚羟基(图1), 为弱极性偏酸性化合物, 在碱性条件下易于成盐溶出, 从而增加了辣椒素的提取率; 同时在辣椒素分子内还存在一个亚氨基, 在酸性环境下该基团同样可以电离成正离子, 也对辣椒素的溶出有利, 但是亚氨基被电离的程度很弱, 辣椒素的溶出很有限。

2.3 碱性乙醇提取辣椒碱的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果分析

表3 正交试验结果及其极差分析

Table 3 Orthogonal array design arrangement and results

试验号	A	B	C	D	辣椒总碱提取量/(mg/g)
1	1	1	1	1	6.201
2	1	2	2	2	3.610
3	1	3	3	3	5.010
4	2	1	2	3	5.626
5	2	2	3	1	6.627
6	2	3	1	2	5.014
7	3	1	3	2	4.972
8	3	2	1	3	4.273
9	3	3	2	1	6.313
K_1	14.821	16.798	15.487	19.141	
K_2	17.267	14.509	15.549	13.595	
K_3	15.558	16.338	16.609	14.909	
k_1	4.940	5.599	5.162	6.380	
k_2	5.755	4.836	5.183	4.532	
k_3	5.186	5.446	5.536	4.970	
R	0.815	0.763	0.374	1.849	

表4 正交试验结果方差分析表

Table 4 Results of variance analysis for the experimental results of orthogonal array design

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	1.049	2	0.525	3.945	0.202
B	0.977	2	0.489	3.674	0.214
C	0.265	2	0.133	0.997	0.501
D	5.599	2	2.799	21.049	0.045
误差	0.265	2	0.133		
总和	7.891	8	0.986		

由表3极差分析可知, 碱性乙醇法提取辣椒碱的最佳工艺条件为 $A_2B_1C_3D_1$, 即加入pH8、70%乙醇溶液、提取温度50℃、提取时间3.5h。由R值可以看出, 4个因素对试验指标的影响依次为温度>体积分数>pH值>时间。由表4可知, 4个因素对辣椒碱提取的影响程度依次为 $D > A > B > C$, 即温度>体积分数>pH值>时间。

结合表3、4可以看出: 因素D(提取温度)对辣椒素提取效果的影响极显著($P = 0.045 < 0.05$, 差异显著水平为95%), D_1 水平处理效应最强, 而 D_2 、 D_3 水平提取量低且差异不大, 即在较低温度下, 提取辣椒碱效应较强, 该现象不符合温度越高、分子运动越快而提高提取率的一般规律, 这可能与温度升高时辣椒素稳定性受到破坏有关, 因此, 为了减少提取过程中这一情况的发生, 应当采用较低的提取温度。因素A(乙醇体积分数, $P = 0.202$)和因素B(pH值, $P = 0.214$)对辣椒素提取量的影响不太显著。其中, A_2 水平的处理效果最好, A_1 、 A_3 处理的效果均不理想, 可能原因是在乙醇体积分数较低时, 乙醇渗入辣椒组织内部的量有限, 使得大量的辣椒素仍包埋于组织内部无法溶出, 而乙醇体积分数也并非越高越好, 当体积分数达到90%时, 会有大量的低极性物质(如辣椒红色素)溶出反而阻碍了辣椒素的提取; B_1 水平的处理效果较 B_2 、 B_3 更好, 即微弱的碱性条件更有利于辣椒素的溶出, 可能原因是随溶液碱性的增强会导致辣椒中的大量脂肪酸成盐, 对辣椒素的成盐溶出起到阻碍作用, 而当碱性继续增大到一定程度时, 这些脂肪酸类物质达到了成盐的平衡, 辣椒素又开始继续溶出, 但是溶出的效应仍不及弱碱性条件; 由此可见, 虽然辣椒碱的酚羟基有利于辣椒碱的溶出, 但并非碱性越高越好。因素C(提取时间, $P = 0.501$)对辣椒素提取效果的影响最不显著, 虽然 C_3 水平的提取量最高但是与 C_1 、 C_2 两个水平的差异不大, 可能原因是在50~80目的粉碎粒度和碱性提取条件的综合影响下, 对于辣椒素的快速溶出非常有利, 在1.5h时已经基本溶出完全, 继续延长对辣椒素提取量大小的差异不明显。

上述结果与前人^[15]所研究的碱性乙醇提取结果比较, 温度明显降低而溶剂体积分数明显升高, 其差异可能包含以下几种原因: ①两种试验所采用的辣椒素的测定方法不同: 前人采用的是以香草素为标准品的分光光度法, 本实验采用的是以壬酸香草酰胺为标准品的GC-MS分析测定方法, 其分辨率和灵敏度较高, 使得二者误差不同, 测定结果也有较大差异; ②温度可能在一定程度上对溶液体系的pH值产生影响, 在两个因素的交互作用下影响了辣椒碱的溶出率, 从而使pH8、温度50℃达到了最佳的匹配; ③在实际操作过程中发现以50%乙醇溶液作为提取剂会导致部分水溶性果胶、黏液质和糖类物质溶解在提取液中, 不但影响了辣椒素的溶

出而且导致了提取液黏度的增大,给抽滤带来了很大困难;④对于碱性的调节方法,前人^[13-15]采用的均是加入不同体积分数的碱液,但是随辣椒粉加入量的改变,溶液的缓冲体系发生了变化,使得加碱量与pH值并不呈线性变化,而pH值才是衡量溶液酸碱度的标准,因而加碱量不能准确反映溶液体系的酸碱度。在工业应用中,由于辣椒粉的加入量大大提高,这种方法可能会给酸碱性的调节带来误差,本实验通过在加入辣椒粉后的溶液体系中调节pH值,避免了溶液体系的缓冲容量带来的影响,且能准确地反映体系的酸性,可以为工业的生产应用提供确切的依据。

2.4 正交试验中辣椒碱类化合物各组分含量与总量的比较

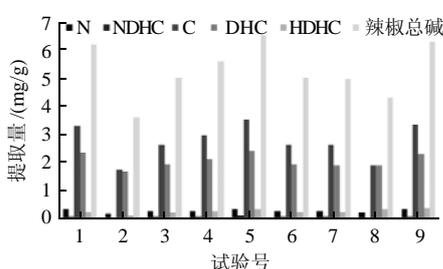


图3 不同辣椒碱类化合物及辣椒总碱的提取量比较
Fig.3 Comparison of extraction yields of individual and total capsaicin compounds under 9 orthogonal array design runs

在9组试验中共检测出了5种辣椒碱类化合物,结果如图3所示。由图3可知,随提取条件的改变,辣椒素总量的变化为:2号>8号>7号>3号>6号>4号>1号>9号>5号,结合图3可以看出,C、DHC占到了总碱含量的90%,其中,C约占总碱量的55%,DHC约占总碱量的35%。随着提取条件的改变,C、DHC的提取量变化趋势与总碱提取量的趋势基本一致,其中,C随提取条件的改变波动明显,而DHC随提取条件的改变波动不太明显,即提取条件的改变对C的提取量影响显著而对DHC的影响不显著。

2.5 验证实验

为验证上述正交试验结果的准确性,保证辣椒素提取工艺的合理可行,按上述已确定的工艺条件A₂B₁C₃D₁安排重复试验,结果见表5。

表5 最佳工艺条件下辣椒碱类物质的提取结果(n=4)
Table 5 Average extraction yields of individual and total capsaicin compounds under optimal extraction conditions (n=4)

辣椒素种类	N	NDHC	C	DHC	HDHC	辣椒总碱
提取量/(mg/g)	0.324	0.083	3.653	2.447	0.305	6.812
RSD/%	5.53	5.91	0.67	1.96	2.35	0.38

按上述试验得出的最佳提取工艺进行验证实验,共4次,辣椒总碱的平均提取量为6.812mg/g,相对标准偏差(RSD)为0.38%,提取量高于正交表中9个试验结果中的最高量。由上述结果可以看出,所筛选出来的工

艺合理可行,稳定可靠,具有可操作性和重现性。

从辣椒素的提取效果看,胡震等^[13]以质量分数为20%的NaOH溶液浸提,得到的辣椒素提取量仅为12.9422mg/15g,即0.8628mg/g,证实了碱液对辣椒素具有一定的提取效果,但提取量远小于本实验的结果。这是由于单一的碱水溶液难以渗入辣椒粉细胞的内部,无法与辣椒素充分接触反应并使其溶出,因而单以碱水溶液提取辣椒素的效果并不理想。本实验在孙平^[8]、张晶^[6]等有机溶剂提取辣椒素的基础上,将碱提取与有机溶剂提取相结合,并通过pH值指标控制,证实了碱性乙醇具有良好的浸提效果。

3 结 论

本实验利用测定精度高、测定物质成分多的GC-MS法测定提取液中的辣椒碱成分,采用正交实验优化碱性乙醇提取辣椒素工艺参数,通过极差和方差分析得到如下结论:确定了碱性乙醇有利于辣椒素的提取;得出碱性乙醇提取辣椒素的最佳工艺条件为:用pH8、体积分数70%的乙醇溶液,在50℃提取3.5h,得到的辣椒素提取量为6.812mg/g,相对标准偏差(RSD)为0.38%;在4个因素的相互作用下,以50~80目的粉碎粒度,温度对提取效果的影响最显著,时间对辣椒素提取量的影响最不显著,在工业生产中应严格控制提取温度,为提高提取效率可适当缩短提取时间。

参考文献:

- OLIVER S, ALMIRALL J R. Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics[J]. Talanta, 2005, 67(2): 377-382.
- 刘可春, 宋广运, 刘昌衡, 等. 辣椒碱的分离纯化及分析[J]. 山东科学, 2000, 13(1): 25-28.
- 朱晓兰, 刘百战, 宗若雯, 等. 辣椒油化学成分的气相色谱-质谱分析[J]. 分析测试学报, 2000, 22(1): 67-70.
- 刘可春, 石俊英. 辣椒碱应用研究概况[J]. 山东科学, 2006, 19(3): 22-26.
- 巩倩, 陈夫山. 含辣椒碱的抗菌高吸水树脂的合成[J]. 精细石油化工进展, 2006, 7(12): 35-38.
- 邹华娇. 9%辣椒碱烟碱微乳剂防治菜青虫和菜蚜效果试验[J]. 植物保护, 2002, 28(1): 45-47.
- 贾洪峰, 贺稚非, 刘丽娜, 等. 辣椒碱的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(7): 210-212.
- 孙平, 唐小华, 卜庆珍, 等. 辣椒素提取工艺的比较[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 238-240.
- 狄云, 蒋健箴, 石正强. 辣椒果实中的辣椒碱类物质研究进展[J]. 食品科学, 1999, 20(6): 30-32.
- 张郁松. 辣椒碱不同提取方法的比较研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(3): 88-90.
- BARBERO G F, LIAZID A, PALMA M. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers[J]. Talanta, 2008, 75(5): 1332-1337.
- BARBERO G F, PALMA M, BARROSO C G. Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 578(2): 227-233.
- 胡震, 张利, 于海莲. 辣椒碱的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 87-90.
- 李鑫, 马斌强, 胡晓娟, 等. 辣椒素的提取与分析工艺研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(3): 139-141.
- 张郁松. 碱性乙醇法提取辣椒碱的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(1): 70-73.
- 张晶, 石磊岭, 李慧萍, 等. 辣椒油树脂、辣椒红素及辣椒素提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 60-62.