

# EXTRAKCE KAPSAICINOIDŮ Z CHILLI PAPRIČEK PODKRITICKOU VODOU

**Daniel Kremr, Tomáš Bajer, Petra Bajerová, Aleš Eisner, Karel Ventura**

*Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie,*

*Studentská 573, Pardubice 532 10, +420466037398*

*Daniel.Kremr@student.upce.cz*

## **Abstrakt**

Hlavním cílem této práce bylo vyvinout metodu s dostatečnou extrakční účinností pro extrakci kapsaicinoidů z chilli papriček, která by zároveň naplňovala principy zelené analytické chemie. Pro tento účel byla zvolena extrakce podkritickou vodou (Pressurised Hot Water Extraction – PHWE), při které je jako extrakční činidlo používána přehřátá voda za vysokého tlaku. Nejprve byla provedena optimalizace extrakce na základě Centrálně Kompozitního Designu (CCD), poté byly analyzovány jednotlivé reálné vzorky. Separace a identifikace jednotlivých kapsaicinoidů byla provedena pomocí systému reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (RP-HPLC/MS). Kvantifikovány byly čtyři alkaloidy: kapsaicin, dihydrokapsaicin, nordihydrokapsaicin a nonivamid.

***Klíčová slova:*** kapsaicin; extrakce; PHWE; HPLC

## **Úvod**

Chilli papričky, plody rostlin patřících do rodu *Capsicum*, se vyznačují různými stupni pálivosti a od pradávna jsou používány jako dochucovadla u mnoha druhů pokrmů. Za jejich pálivost jsou zodpovědné alkaloidy, tzv. kapsaicinoidy. Z šesti přírodně se vyskytujících kapsaicinoidů mají v chilli papričkách nejvyšší zastoupení kapsaicin a dihydrokapsaicin (celkem cca 90%, z toho kapsaicin až 70 %) Dalšími, minoritními, kapsaicinoidy jsou nordihydrokapsaicin, homokapsaicin, homodihydrokapsaicin a nonivamid. Pálivost chilli papriček se vyjadřuje pomocí tzv. SHU jednotek (Scoville heat units). Čistý kapsaicin má 16 000 000 SHU, čistý dihydrokapsaicin 15 000 000 SHU, ostatní kapsaicinoidy mají pálivost menší než 10 000 000 SHU. Kapsaicinoidy jsou látky za laboratorních podmínek špatně rozpustné ve vodě, zato však dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a tucích, jsou bez barvy a zápachu a mají antimikrobiální a protinádorové účinky [1, 2]. V kontaktu se sliznicí vyvolávají nepříjemné pálení spojené s bolestí, což je způsobeno jejich vazbou na receptory tepla [3]. Pálivost chilli papriček není dána pouze druhem, ale roste s dobou zrání a podmínkami při pěstování [4].

## **Materiály a metody**

### Standardy a rozpouštědla

Standardy kapsaicinu (čistota 95 %), dihydrokapsaicinu (90 %) a nonivamidu (97 %) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Všechny byly uskladněny při teplotě 5 °C a jejich zásobní roztoky, rozpuštěné v metanolu, o koncentraci 1 mg/ml, byly uskladněny při teplotě – 20 °C.

Methanol (HPLC grade) byl rovněž zakoupen u firmy Sigma-Aldrich.

### Vzorky

K dispozici bylo celkem 10 reálných vzorků, z nichž 7 byly sušené podomácku vypěstované chilli papričky, které byly následně namlety na jemný prášek pomocí kulového vibračního mlýnku WIG-L-BUG 30 (Crescent Dental, USA). Zbývající 3 vzorky byly získány již jako koření od soukromých pěstitelů. Přehled jednotlivých vzorků je zobrazen v Tabulce 1.

**Tabulka 1.** Seznam reálných vzorků pro extrakci kapsaicinoidů

Vzorek č.	Název vzorku	Rod
1	Trinidad Scorpion Moruga	<i>C.chinenses</i>
2	Yellow Bedder	<i>C.annuum</i>
3	Ring Of Fire	<i>C.annuum</i>
4	Jamaican Hot Red	<i>C.chinenses</i>
5	Yellow Habanero	<i>C.chinenses</i>
6	Tabasco	<i>C.frutescens</i>
7	Chiltepin	<i>C.annuum</i>
8	Bhut Jolokia - koření	<i>C.chinenses</i>
9	Trinidad Scorpion Moruga - koření	<i>C.chinenses</i>
10	Fatalii Red - koření	<i>C.chinenses</i>

#### Extrakce podkritickou vodou

0,1 g vzorku bylo smícháno s inertním laboratorním pískem a směs byla vložena do ocelové parTony. Naplněná patrona byla umístěna do extraktoru. Vzorek byl extrahován při teplotě 200 °C a tlaku 210 bar ve dvou extrakčních krocích 20+10 minut ve statickém módu. Po ukončení extrakce byly extrakty z obou extrakčních kroků zchlazeny na laboratorní teplotu, smíchány a doplněny demineralizovanou vodou po rysku v 50 ml odměrné baňce. Takto připravené extrakty byly podle potřeby naředěny a poté analyzovány.

#### Chromatografický systém

Extrakty byly analyzovány pomocí HPLC-MS, s užitím chromatografického systému LCMS-2010 skládajícího se ze systémového kontroleru SCL-10AVP, vysokotlakých pump LC-10ADVP, degasseru DGU-14A, autosampler SIL-10ADVP, termostatu CTO-10ASVP a hmotnostního detektoru QP-20 (vše Shimadzu, Tokyo, Japonsko).

Množství vzorku pro analýzu bylo 20 µl. Separace byla provedena na koloně LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm) 250×3 mm s předkolonou LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm) 10×3 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Kolona byla temperovaná na 30 °C. Mobilní fáze A byla voda s přídavkem kys. octové (0.1 % V/V). Mobilní fáze B pak metanol s přídavkem kys. octové (0.1 % V/V). Pro účinnou separaci byla použita následující gradientová eluce: 0 – 30 min z 30 % na 75 % mobilní fáze B, 30 – 35 min ze 75 % na 100 % mobilní fáze B, 35 – 45 min 100 % mobilní fáze B. Průtok byl udržován na 0.5 ml/min. Identifikace látek proběhla na hmotnostním spektrometru s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (ACPI) v iontově selektivním módu (SIM). Byly sledovány ionty s těmito hodnotami m/z: kapsaicin 306, dihydrokapsaicin 308, nonivamid a nordihydrokapsaicin 294.

#### **Výsledky a diskuse**

Pro určení obsahu kapsaicinoidů v jednotlivých vzorcích byly sestaveny osmibodové kalibrační závislosti pro kapsaicin (CAP), dihydrokapsaicin (DHC) a nonivamid (PAVA) v koncentračním rozmezí 0,005 až 5 µg/ml. Pro stanovení obsahu nordihydrokapsaicinu (NDHC) byla použita kalibrační závislost nonivamidu. Nonivamid a nordihydrokapsaicin mají stejnou molekulovou hmotnost a téměř stejný strukturní vzorec, bylo tedy předpokládáno, že i odezva na hmotnostním detektoru bude velmi podobná. Identifikace jednotlivých kapsaicinoidů byla provedena na základě hmotnostních spekter a retenčního času. Přehled chromatografických charakteristik sledovaných alkaloidů je zobrazen v Tabulce 2.

**Tabulka 2.** Chromatografické charakteristiky sledovaných látek

Alkaloid	T <sub>R</sub> (min)	LoQ (ng/ml)	RSD* (%)	Rovnice kalibrace**	R <sup>2</sup>
Nonivamid	36,3	5	18,22	y = 1231714 x + 1399	0,9999
Kapsaicin	36,1	5	10,48	y = 1630003 x + 9140	0,9998
Dihydrokapsaicin	38,0	5	15,62	y = 1209682 x + 5820	0,9999

\* RSD – relativní směrodatná odchylka LoQ hodnot

\*\* Kalibrační rovnice byla spočítána v rozmezí 5 – 5·10<sup>-3</sup> ng/ml

Optimalizace PHWE byla provedena na vzorku chilli koření z papriček Trinidad Scorpion Moruga na základně CCD, kdy byly sledovány 2 faktory, a to extrakční teplota v rozmezí od 110 do 240 °C a extrakční čas 5-60 min. Jakožto optimální podmínky byly vyhodnoceny teplota 200 °C a čas 20 minut. Poté byla ještě otestována možnost zvýšení počtu extrakčních kroků, tj. byly porovnány extrakce s extrakčním časem 10+10 a 20+20 minut. Jako optimální byla nakonec zvolena extrakce složená ze dvou extrakčních kroků, a to 20 minut první krok a 10 minut druhý krok.

Koncentrace jednotlivých kapsaicinoidů byly sečteny a přepočteny na jednotky SHU, což jsou jednotky o koncentraci v řádu ppm vynásobené 16x. Analyzované, v ČR vypěstované, papričky měly širokou škálu pálivosti. Nejpálivější analyzovaná paprika byla Moruga o síle 1 010 224 SHU nejméně pálivá pak byla Chiltepin s „pouhými“ 9 809 jednotkami SHU. V Tabulce 2 jsou zobrazeny koncentrace jednotlivých analyzovaných kapsaicinoidů reálných vzorků a hodnota jejich pálivosti. Pro srovnání, nejpálivější paprika na světě – Carolina Reaper patřící do rodu *C. chinenses* má hodnotu 2 200 000 SHU [5, 6].

**Tabulka 3.** Srovnání koncentrací kapsaicinoidů u jednotlivých vzorků, n=3

Vzorek	NDHC* [μg/g]	PAVA [μg/g]	CAP [μg/g]	DHC [μg/g]	SHU	NDHC/PAVA
1 (c)	295 ± 25	855 ± 39	46451 ± 410	15538 ± 161	1010224	0,3
2 (a)	501 ± 28	73 ± 17	3964 ± 91	3100 ± 93	122236	6,8
3 (a)	608 ± 31	56 ± 21	1855 ± 62	1816 ± 37	69366	10,9
4 (c)	259 ± 18	74 ± 12	2550 ± 83	1345 ± 53	67636	3,5
5 (c)	24 ± 8	5 ± 2	739 ± 25	506 ± 24	20382	5,0
6 (f)	1073 ± 46	165 ± 13	3936 ± 43	2703 ± 89	126032	6,5
7 (a)	80 ± 13	1 ± 0,2	308 ± 19	224 ± 25	9809	213,9
8 (c)	219 ± 23	232 ± 16	9127 ± 75	4831 ± 84	230542	0,9
9 (c)	520 ± 34	415 ± 29	20264 ± 211	10565 ± 101	508220	1,3
10 (c)	137 ± 11	80 ± 12	12394 ± 103	3116 ± 88	251627	1,7

\* NDHC – nordihydrokapsaicin, PAVA – nonivamid, CAP – kapsaicin, DHC – dihydrokapsaicin, SHU – Scoville Heat Units

Z Tabulky 3 je patrné, že papriky rodu *C. chinenses* (c) mají daleko vyšší pálivost než papriky rodu *C. annuum* (a) a *C. frutescens* (f). Drtivá většina nejpálivějších paprik na světě patří právě do prvně zmíněného rodu. Za povšimnutí však stojí také poslední sloupec, v němž je zobrazen poměr nordihydrokapsaicinu ku nonivamidu. Papriky rodu *C. annuum* mají tento poměr daleko vyšší než ostatní. Na základě tohoto údaje by tak prakticky bylo při analýze neznámého vzorku možné určit, do kterého rodu vzorek patří. *C. chinenses* má tuto hodnotu maximálně 5. Hodnoty, které jsou vyšší, by indikovaly, že se spíše jedná o rod *C. annuum*.

## Závěr

Extrakce podkritickou vodou se zdá být účinnou metodou pro extrakci kapsaicinoidů z chilli papriček. Jejimi obrovskými výhodami však jsou nízká cena rozpouštědla a jeho šetrnost k životnímu prostředí a zapadá tak do zásad zelené analytické chemie.

## Literatura

- [1.] BARBERO, GF, LIAZID, A, PALMA, M, BARROSO, CG. *Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column*. Food Chemistry. 2008. roč. 107, č. 3, s. 1276-82.
- [2.] AL OTHMAN, ZA, AHMED, YBH, HABILA, MA, GHAFAR, AA. *Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography*. Molecules. 2011. roč. 16, č. 10, s. 8919-29.
- [3.] REILLY, CA, CROUCH, DJ, YOST, GS, FATAH, AA. *Determination of capsaicin, nonivamide, and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol. 2002. roč. 26, č. 6, s. 313-9.
- [4.] CHINN, MS, SHARMA-SHIVAPPA, RR, COTTER, JL. *Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from Capsicum chinense*. Food and Bioproducts Processing. 2011. roč. 89, č. C4, s. 340-5.
- [5.] <http://www.crazyhotseeds.com/TOP-10-WORLDS-HOTTEST-PEPPERS/> (staženo dne 19.3.2014)
- [6.] <http://www.guinnessworldrecords.com/WORLD-RECORDS/1/HOTTEST-CHILI> (staženo dne 19.3.2014)

## Abstract

The main aim of this work was introduction of a method with sufficient extract efficiency for extraction of capsaicinoids from chilli. The main requirement was to fill up the principles of green analytical chemistry. For this reason, Pressurised Hot Water Extraction (PHWE) was chosen. As an extract reagent, hot water under high pressure was used. Firstly, optimisation of the extraction based on Central Composite Design was carried out. Then, individual real samples were analysed. Separation and identification of individual capsaicinoids were performed by using Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (RP-HPLC/MS). Four alkaloids were quantified: capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and nonivamide.