

Kapszaicin-meghatározási módszer kidolgozása oleorezin és más nagy hatóanyag-tartalmú készítmények minősítésére

BLAZOVICH MÁRTA és SPANYÁR PÁL

Központi Élelmiszeripari Kutatóintézet, Budapest

Az oleorezin minták kapszaicin-tartalmának meghatározására, fűszerpaprika-minták vizsgálatához hasonlóan, a legutóbbi időkig szinte kizárólag a fotometriás módszereket alkalmazták. Ezek a kapszaicin valamilyen színreakcióját használják fel. A legelterjedtebb közülük a kapszaicinnek diazotált-benzolszulfonsavval alkotott színreakcióján alapul (*Schulte & Krüger*, (1); *Spanyár et al.*, (2, 3, 4)], de alkalmaznak reagensként foszformolibdénsavat (*North*, 5 és vanádiumoxikloridot is [*Jordan & Rebol*, (6)]).

A fotometriás módszerek közös hibája, hogy hosszadalmasak, nem elég érzékenyek, és az oleorezin minták viszonylag nagy festéktartalma következtében még több előkészítő műveletet igényelnek, mint a fűszerpaprika minták vizsgálata esetében.

Az utóbbi években – kapszaicin-elválasztására és minőségi kimutatására is – egyre inkább elterjednek a rétegekromatográfiás eljárások. A rétegekromatogramok mennyiségi kiértékelésével azonban igen kevés helyen találkozunk. *Heusser* (5) alkalmazza a pereparatív Kieselgel H réteget oleorezinben levő kapszaicin tisztítására, majd a kapszaicin zóna lekaparása után fotometriás módszerrel határozza meg a rétegegyenéből kioldott hatóanyagot. A módszer hátránya, hogy az alkalmazott színreakció érzéketlensége miatt viszonylag nagy mennyiségű kapszaicint tartalmazó oldatot kell a rétegre felvinni, és még így sem elemezhető a 300 mg%-nál alacsonyabb kapszaicin-tartalmú minták. Hasonló eljárást ajánlanak *Karawya* és munkatársai (6), csak míg *Heusser* (5) foszformolibdénsavat, utóbbiak diazotált benzolszulfonsavat alkalmaznak reagensként a fotometriás meghatározásnál. A rétegen történő közvetlen kiértékelésre kapszaicin meghatározásával kapcsolatban nem találtunk utalást az irodalomban.

Feladatunk az volt, hogy az általunk fűszerpaprika kapszaicin-tartalmának meghatározására kidolgozott rétegekromatográfiás eljárást [*Blazovich*, (9)] oleorezin-minták vizsgálatára alkalmazzuk.

1. Anyagok és módszerek

Az oleorezin festéktartalma általában nagyobb, mint a fűszerpaprika mintáké, még a kapszaicin-tartalomra vonatkoztatva is. Így a kapszaicin-tartalom pontos meghatározásához gondoskodni kell a festéktől való minél tökéletesebb elválasztásról.

Megkíséreltük a megfelelő töménységűre hígított oleorezin-oldatot a 0,2 mm vastag Kieselgel G rétegre felvinni elválasztás és a kapszaicin meghatározása céljából. Azt tapasztaltuk azonban, hogy az egyszeri futtatás (futtató: kloroform, etilalkohol = 99 : 1) nem elegendő a festékanyagok elválasztására, a kapszaicin-foltok elnyúltak, nehezen értékelhetők, a kapszaicin-tartalom így csak nagy szórással határozható meg.

A hatékonyabb tisztítás céljából megkíséreltük a festékanyagokat preparatív (0,7 mm vastag) Kieselgel G rétegen elválasztani, a kapszaicint tartalmazó sá-

vozt lekaparni, majd a kapszaicin kioldása után annak mennyiségét vékony rétegen, a szokásos módon meghatározni. Az elválasztás így sem tökéletes, de a kromatografálásra szánt oldat itt már nem sötétvörös, csak erősen narancssárga színű, az ebből keletkező foltok sokkal biztonságosabban kiértékelhetők.

A továbbiakban megkíséreltük preparatív réteggel Kieselgel G helyett a MN Kieselgel N – HR/UV 254 réteget alkalmazni, mivel ezzel a rétegganyaggal fűszerpaprika kivonatok kromatografálásánál jó tapasztalataink voltak. Az elválasztás itt valóban jobbnak bizonyult, mint a Kieselgel G rétegen, így további vizsgálatainkhoz ezt a rétegganyagot használtuk.

A vizsgálati módszer leírása

Kémszerek:

éter p.a., peroxidmentes (2%-os ferroszulfáttal peroxidmentesítve)

kloroform p.a.,

0,01 mg/ml-es éteres kapszaicin-oldat

200 × 200 mm-es, 0,75 mm rétegvastagságú, 105 °C-on 30 percig aktivált MN-Kieselgel N – HR rétegek

200 × 200 mm-es, 0,25 mm rétegvastagságú, 105 °C-on 30 percig aktivált Kieselgel G rétegek

0,5%-os vizes káliumferricianid-oldat

15%-os vizes ferriklorid-oldat

(A két utóbbi oldatot közvetlenül használat előtt 1 : 1 arányban elegyítjük és az így nyert oldatot használjuk előhívóként.)

A meghatározás menete:

Az előzetesen jól homogenizált mintából, a kapszaicin-tartalomtól függően bemérünk 0,5–5,0 g-ot, éterben feloldjuk és olyan mértékben hígítjuk, hogy az oldat 0,1–0,2 µg kapszaicint tartalmazzon ml-enként. Ebből az oldatból, az előzetesen előkészített preparatív rétegekre mikropipettával (0,1 ml-es 100-as beosztású) csík formájában felviszünk 0,5 ml-t (a csík hossza kb. 13 cm, a réteg alsó szélétől kb. 2,5 cm-re, bal oldali szélétől kb. 4 cm-re). A réteg bal oldalára, a felvitt csíkkal egyvonalban a modell kapszaicin-oldatból felviszünk 0,1 ml-t, majd a következő futtatókeverékben futtatjuk: kloroform, metanol, ecetsav (95 : 5 : 1). Amikor az oldószerszint a réteg felső szélét elérte, a réteget kivesszük a futtatókádból, és az oldószert elpárologtatjuk. A rétegnek azt a részét, amelyen a szétválasztott festékcíkok találhatók, üveglappal letakarjuk, a kapszaicin foltjának megfelelő felületet a ferriklorid-káliumferricianid reagenssel bepermetezzük. A kapszaicin foltja így láthatóvá válik, és ennek megfelelően bejelölhetjük a festékcíkok közé a kapszaicin-zóna helyzetét. Ezután erről a felületről a rétegganyagot spatulával, tölcseren keresztül jódszámlombikba kaparjuk, és 10–15 ml éterrel megnedvesítjük. Ugyanebbe a jódszámlombikba még egy hasonlóképpen készült réteg kapszaicin-zónáját gyűjtjük össze. (A két réteg ugyanabban a futtatóban egyidejűleg futtatható.) Többszörű rázógatással a rétegganyagról a kapszaicin mintegy 10–15 perc alatt leoldódik. A szuszpenziót ezután szűrőpapíron leszűrjük, a tölcseren maradt anyagot éterrel többször utánamossuk mindaddig, míg a lecsepegő oldat teljesen szintelen. Az oldat egy részét vízlég-szivattyúval elpároljuk, és végül 25 ml-es mérőlombikba mossuk, majd éterrel jelig töltjük. Ezt az oldatot használjuk a réteggromatográfiás meghatározáshoz. A továbbiakban úgy járunk el, mint a fűszerpaprika kapszaicin-tartalmának meghatározásánál.

2. Eredmények és következtetések

Az ismertetett módszer felhasználásával számos kísérletet végeztünk annak eldöntésére, hogy az a gyakorlatban miként válik be.

Egy minta elemzési ideje mintegy 3 óra, mivel azonban ebben 2×40 perc futtatási idő is benne foglaltatik, egy nap alatt – részben párhuzamosan – 5–6 minta elemezhető.

Igen lényeges volt annak eldöntése, hogy a vastag rétegen való futtatás és leoldás során, főleg a nagy festéktartalmú minták esetén, mekkora kapszaicin-vesztésekkel kell számolnunk. Ennek eldöntésére 227 mg% kapszaicint tartalmazó oleorezin-mintához 50 és 100 mg%-nak megfelelő kapszaicint adtunk és a mintákat az ismertetett módon elemeztük. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Oleorezinhez hozzáadott kapszaicin meghatározása rétegekromatográfiásan és fotometriásan
(A minta eredeti kapszaicin-tartalma 227 mg%)

Hozzá tett kapszaicin mg %	Visszakapott kapszaicin Kieselgel G-n mg %	Visszakapott kapszaicin MN-Kieselgel NHR-en mg %	Visszakapott kapszaicin fotometriásan mg %
50	37,6	50,6	45,0
	37,6	42,3	60,0
	50,8	50,6	47,3
	46,6	63,1	54,4
100	118,6	104,0	90,0
	32,6	107,0	102,0
	49,4	95,0	106,5
	32,6	95,0	91,7

Annak igazolására, hogy a hozzáadott kapszaicin-értékek a visszakapott értékektől szignifikánsan nem különböznek, mindkét hozzáadott mennyiségre, a három használt módszer esetében t-próbát számítottunk. Az eredmények tanúsága szerint a Kieselgel G vastag rétegen elválasztott 100 mg% hozzáadott mennyiség esetét kivéve, a hozzáadott és visszakapott mennyiségek között szignifikáns különbség nincs. A legjobb egyezést a MN-Kieselgel N – HR vastag rétegen való elválasztás után kaptuk.

A 2. táblázatban azokat az eredményeket foglaltuk össze, melyeket egy homogén oleorezin-minta különböző módszerekkel történő vizsgálatánál kaptunk.

Az általunk javasolt, a Kieselgel G vastag rétegen szétválasztott és a közvetlen vékony rétegen végzett meghatározásokhoz 20–20, az összehasonlító fotometriás módszerrel (Spanyár et al., 1957) végzett elemzéshez 10–10 párhuzamos bemérést készítettünk. A táblázatban megadjuk az eredmények átlagértékeit és a módszerek pontosságát jellemző relatív szórásértékeket is (v%). „t” próbával igazoltuk, hogy az általunk javasolt és a fotometriás módszerrel kapott eredmények átlagértékei között szingifikáns különbség nincs. A másik két módszerrel kapott értékek átlagai azonban szignifikánsan különböznek az említett módszerrel nyert átlagértéktől.

Mindezek alapján megállapítható, hogy az új eljárás pontossága közel azonos a fotometriás módszer pontosságával, a két módszerrel kapott értékek között szingifikáns különbség nincs, gyorsabb és egyszerűbb volta tehát indokoltá teszi az új eljárást alkalmazását. További előnye, hogy a vizsgálandó anyag festéktartalma a módszert nem zavarja, míg a fotometriás módszerrel egyes nagy festéktartalmú minták esetén a vártnál kisebb értékeket kaptunk, mint ezt a 3. táblázat 1. mintájának eredményei is igazolják.

Oleorezin minta kapszaicin tartalma különböző módszerekkel

Közvetlen Kieselgel G vékony réteg			Kieselgel G vastag réteg			MN-Kieselgel N – HR vastag réteg			Fotometriás módszer		
Kapszaicin-tartalom mg%	Átlagtól való eltérés mg%	Variációs koefficiens v%	Kapszaicin-tartalom mg%	Átlagtól való eltérés mg%	Variációs koefficiens v%	Kapszaicin-tartalom mg%	Átlagtól való eltérés mg%	Variációs koefficiens v%	Kapszaicin-tartalom mg%	Átlagtól való eltérés mg%	Variációs koefficiens v%
340,4	44,1		289,7	13,7		205,1	22,0		223,6	2,4	
262,5	33,8		281,5	21,9		217,3	9,7		253,4	32,2	
282,0	14,3		247,6	55,8		229,5	2,5		235,4	14,2	
271,9	24,4		251,8	51,6		198,7	28,3		235,4	14,2	
324,2	27,9		296,2	7,2		242,0	15,0		205,3	15,9	
232,9	63,4		280,0	23,4		204,6	22,4		215,3	5,9	
271,3	25,0		292,0	10,5		234,1	7,1		205,9	15,3	
263,0	33,3		311,2	7,8		229,5	2,5		217,1	4,1	
280,3	16,0		286,8	16,6		249,5	22,5		211,0	10,2	
350,0	53,7	10,34	303,8	0,4	8,94	225,1	1,9	7,63	210,0	11,2	7,09
329,2	32,9		328,5	25,1		191,3	35,7				
302,9	6,6		332,0	28,6		222,2	4,8				
301,9	5,6		347,7	44,3		226,1	0,9				
259,3	37,0		292,7	10,7		235,2	8,2				
295,3	1,0		302,3	1,1		238,2	11,2				
299,7	3,4		305,8	2,4		240,2	13,2				
321,2	24,9		337,0	33,6		262,6	35,6				
325,6	29,3		314,4	11,0		224,1	2,9				
299,2	2,9		328,6	25,2		236,1	9,1				
312,3	16,0		336,5	33,1		228,5	1,5				
átl.: 296,3			átl.: 303,4			átl.: 227,0			átl.: 221,2		

A 3. táblázatban három magyar és két angol (4. és 5. minta) oleorezin minta fotometriás és rétegekromatográfiás módszerrel nyert elemzési adatait közöljük. Mint az adatokból kitűnik, és amint az előző számításaink alapján várható is volt, a fentebb már említett egy eseten kívül a kétféle eljárással kapott eredmények között szignifikáns különbség nincs.

Végül szeretnénk köszönetet mondani *Dr. H. Heath* úrnak, a *Bush Boake Allen Ltd.* munkatársának az oleorezin-mintákért és *Polyák Ottónénak* a kísérletek lelkiismeretes elvégzéséért.

3. táblázat

Különböző oleorezin-minták kapszaicin-tartalmának meghatározása rétegekromatográfiás és fotometriás módszerrel

Minta	Kapszaicin-tartalom rétegekromatográfiás módszerrel mg %	Kapszaicin-tartalom fotometriás módszerrel mg %	Az átlagértékek közötti eltérés mg %
1.	213	164	45,6***
	225	168	
	235	179	
	192	172	
	átl.: 216,3	átl.: 170,7	
2.	107	105	5,0
	111	106	
	119	96	
	107	117	
	átl.: 111,0	átl.: 106,0	
3.	60,0	54,7	4,0
	63,0	63,7	
	78,0	64,1	
	66,0	68,7	
	átl.: 66,8	átl.: 62,8	
4.	2 375	2 200	241,5*
	2 375	1 900	
	2 350	2 100	
	2 266	2 200	
	átl.: 2 341,5	átl.: 2 100	
5.	13 300	11 400	625,0
	12 800	13 100	
	13 400	11 600	
	12 200	13 100	
	átl.: 12 925	átl.: 12 300	

* $t_{95,0} < t_{szám} < t_{99,0}$

** $t_{99,9} < t_{szám}$

I R O D A L O M

- [1] *Schulte, K. E., Krüger, M.*: Z. Anal. Chem. 147, 266, 1955.
- [2] *Spanyár, P., Kevei, E., Kiszél, M.*: Acta Chimica 11, 137, 1957.
- [3] *Spanyár, P., Blazovich, M.*: Analyst, Közlés alatt.
- [4] *Spanyár, P., Blazovich, M.*: ÉVIKE, 15, 196, 1969.
- [5] *North, H.*: Anal. Chem. 27, 934, 1949.
- [6] *Jordan, C. G., Rebol, E. W.*: Bull. Natl. Formulary Comm. 10, 49, 1942. ref.
- [7] *Heusser, D.*: Planta Med. 12, 237, 1964.
- [8] *Karawya, M. D., Balbaa, S. J., Girgis, A. V., Youssef, N. Z.*: Analyst 92, 581, 1967.
- [9] *Blazovich M.*: Központi Élelmiszeripari Kutatóintézet Kutatási Beszámoló. 16 p, 1968.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАПСАИЦИНА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ПРОДУКТОВ С СОДЕРЖАНИЕМ ОЛЕОРЕЗИНА И ДРУГИХ АГЕНТОВ

М. Блазович и П. Шнапяр

Авторы разработали новый метод слоистой хроматографии для определения содержания капсаицина в олеорезине. Принцип метода заключается в том, что капсаицин имеющийся в эфирном растворе олеорезина отделяется от красящих веществ на препаративном слое (толщина 0,7 мм) N-Кieselгел N-HR. Зону капсаицина, намеченную на основании капсаицин сопровождающих пятен, из слоя оскрабливают, а из материала извлекается эфиром слой капсаицина, потом наводкой на Кieselгел Г и сравнением пятна из раствора стандартного капсаицина отделяется его количество.

Метод испытали при анализе отечественных и заграничных образцов олеорезина концентрации 60–13 000 мг%. Относительный рассев метода $v = 7,63\%$.

Испытали, что какими потерями получим обратно капсаицин добавленный к образцам олеорезина. Между добавленной и полученной обратно величиной не находили сигнификантной разницы.

Сравнивая результаты испытаний с результатами получаемых традиционными фотометрическими методами, в большинстве случаев не находим сигнификантной разницы. Этот метод является быстрее и более простым чем до сих пор использованные методы определения.

AUSARBEITUNG EINER BESTIMMUNGSMETHODE FÜR CAPSAICIN ZWECKS QUALIFIZIERUNG VON OLEORESIN UND ANDEREN WIRKSTOFFREICHEN PRÄPARATEN

M. Blazovich und P. Spányár

Die Verfasser arbeiteten ein neues dünn-schicht-chromatographisches Verfahren zur Bestimmung des capsaicingehaltes von Oleoresin aus. Prinzip der Methode: Das in der ätherischen Lösung des Oleoresins enthaltene capsaicin wird an einer präparativen (0,7 mm dicken) MN-Kieselgel N-HR Schicht von den Farbstoffen getrennt, die aufgrund des Begleitfleckes von capsaicin umrandete Capsaicinzone von der Schicht abgeschabt, aus dieser Schicht das Capsaicin vermittle Äther herausgelöst; auf einer Kieselgel-G Schicht entwickelt und die Flecke mit – aus einer Standard – Capsaicinlösung erhaltenen – Flecken verglichen kann hernach die Capsaicinmenge bestimmt werden.

Das Verfahren wurde in einem Konzentrationsbereich von 60–13 000 mg% bei der Analyse von mehreren einheimischen und ausländischen Oleoresinen erprobt. Seine relative Streuung betrug $v = 7,63\%$. Es wurde auch geprüft, mit welchem Verlust das zur Oleoresinprobe hinzugefügte Capsaicin zurückgewonnen werden kann. Zwischen den zugefügten und zurückgewonnenen Mengen wurde kein signifikanter Unterschied gefunden.

Die Versuchsergebnisse mit den Resultaten der traditionellen photometrischen Methode verglichen ergaben in den meisten Fällen auch keinen signifikanten Unterschied.

Das Verfahren ist rascher und einfacher als die bisher angewandten Bestimmungsmethoden.

A METHOD FOR DETERMINING CAPSAICIN IN OLEORESIN AND SOME OTHER PREPARATIONS CONTAINING LARGE AMOUNTS OF ACTIVE PRINCIPLE

M. Blazovich and P. Spanyár

A new thin-layer chromatographic method was developed for determining the capsaicin content of oleoresin. The method is based on the following principle: the capsaicin present in the ether solution of oleoresin is separated from the pigments on a preparative layer (0,7 mm thick) of MN-Kieselgel N-HR. The capsaicin zone is marked with the aid of a standard capsaicin sample run on the same plate, is then scraped off and the capsaicin is extracted from the layer material by ether. Subsequently it is run on a Kieselgel G layer and the amount present determined by comparison with the stains obtained by running standard capsaicin solutions on the same plate.

The method was tested by analysing several oleoresin samples of Hungarian and foreign origin in the concentration interval from 60 to 13 000 mg%. The variation coefficient of the method was found to be 7.63%.

The capsaicin recovery was studied by adding known amounts of capsaicin to test oleoresin samples. No significant differences were obtained between the added and recovered quantities.

No significant differences were revealed either in most cases by a comparison with the results of the traditional photometric method. The method outlined above proved to be quicker and simpler than those hitherto employed.

LE DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE POUR DOSER LA CAPSAÏCINE DANS L'OLÉORESINE ET D'AUTRES PRODUITS À HAUTE TENEUR EN AGENT

M. Blazovich et P. Spanyár

Les auteurs ont développé une nouvelle méthode de chromatographie en couche mince afin de doser la teneur en capsaïcine de l'oléoresine. Le principe de la méthode est le suivant: on sépare la capsaïcine des pigments présents en développent une solution étherique de l'oléoresine sur une couche préparative (d'une épaisseur de 0,7 mm) de MN-Kieselgel N-HR. Ensuite on ripe la zone de capsaïcine marquée à l'aide d'un témoin de capsaïcine et extrait la capsaïcine avec de l'éther. Après un second développement chromatographique sur une couche de Kieselgel G le dosage de la capsaïcine s'effectue par comparaison à des taches obtenues à l'aide des solutions standards développées sur la même couche.

On a mis à l'épreuve la méthode à l'aide de plusieurs échantillons d'oléoresine d'origine hongroise et étrangère dans le domaine de concentration entre 60 et 13 000 mg p.c. Le coefficient de variation de la méthode était 7,63 p.c.

On a étudié les pertes des quantités de capsaïcine ajoutées aux échantillons d'oléoresine. On n'a pas trouvé des différences significantes entre les quantités ajoutée et récupérée.

En comparant les résultats obtenus avec ceux de la méthode traditionnelle photométrique, on n'a, dans la plupart des cas, obtenu non plus des différences significantes. La nouvelle méthode est plus vite et plus simple que les méthodes de dosage jusqu'à présent employées.