

CHROM. 5647

2. MITT. STUDIEN ÜBER DIE INHALTSSTOFFE VON CAPSICUM
QUANTITATIVE GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG EINZELNER
HOMOLOGE UND ANALOGE VON CAPSAICINOID-GEMISCHEN
NATÜRLICHER HERKUNFT UND DES
PELARGONSÄUREVANILLYLAMIDS ALS VERFÄLSCHUNG

Frl. A. MÜLLER-STOCK, R. K. JOSHI UND J. BÜCHI

Pharmazeutisch-chemischen Abteilung des Pharmazeutischen Institutes der Eidgenössige Technischen Hochschule Zürich (Schweiz)

(Eingegangen am 17. August 1971)

SUMMARY

II. Study of the components of capsaicin. Quantitative gas chromatographic determination of individual homologs and analogs of capsaicin in mixtures from a natural source and of vanillyl pelargonic amide as adulteration.

A gas chromatographic method is presented for the quantitative determination of the homologs and analogs of capsaicin in the isolated capsaicinoid mixtures on the market as well as in the drug. The method includes a new procedure for quantitative extraction of capsaicinoids from the powdered drug, trimethylsilylization of isolated capsaicinoid or of the residue from a measured quantity of drug extract, and a subsequent gas chromatographic separation on 1 % or 3 % JXR. Furthermore, a rapid gas chromatographic method for the detection and quantitative estimation of vanillyl-N-nonylamid (PSVD), which is frequently used as an adulterant of pungent ingredients in the drug, is given.

EINLEITUNG

In einer vorhergehenden Veröffentlichung¹ haben wir über die gaschromatographische Trennung von Capsaicinoid-Gemischen auf verschiedenen Trennsäulen berichtet. Die prozentualen Anteile dieser verschiedenen Homologen und Analogen des Capsaicins zu errechnen, war bisher nur auf Grund der Intensität der Molekül-Ionen-Peaks der Massenspektren² reiner Capsaicinoid-Gemische möglich.

In der vorliegenden Arbeit können wir nun eine schnelle, reproduzierbare Methode zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Capsaicinoide nach Trimethylsilylierung und anschliessender Gaschromatographie auf JXR 1 % oder 3 % geben.

TABELLE I

ÜBERSICHT ÜBER DIE PROZENTUALEN ANTEILE AN ANALOGEN UND HOMOLOGEN DES CAPSAICINS VON REINEN CAPSAICINOID-GEMISCHEN UND DES DROGEN-PULVERS VON *Capsicum frutescens*

Peak I, Capsaicin; peak II, Dihydrocapsaicin; peak III, Nordihydrocapsaicin; peak IV, Nonylsäurevanillylamid.

Substanz	Integrierte Fläche ^a				IV ∑ I	%				Mittelwert (%)			
	I	II	III	IV		I	II	III	IV	I	II	III	IV
CM-69	64 840	19 210	2 081		86 131	75.2	22.4	2.4		75.1	22.5	2.4	
	66 750	20 080	2 166		88 996	75.0	22.5	2.4					
CF-65	64 790	16 710	1 965		83 465	77.6	20.1	2.3		77.1	20.5	2.4	
	66 760	18 210	2 168		87 138	76.6	20.8	2.5					
CF-69	39 660	33 450	10 020	1883	85 013	46.6	39.3	11.8	2.2	46.3	39.6	11.8	2.3
	35 060	30 460	9 127	1718	76 365	45.9	39.8	11.9	2.3				
CF-70	42 840	33 540	7 882	1326	85 588	50.0	39.1	9.2	1.6	49.4	39.9	9.2	1.5
	37 740	31 730	7 232	1104	77 806	48.6	40.7	9.2	1.4				
CF-71	34 300	26 910	6 494	955	68 659	49.9	39.1	9.4	1.4	50.1	38.9	9.5	1.5
	40 030	30 640	7 706	1200	79 576	50.3	38.6	9.6	1.5				
Droge (<i>Capsicum frutescens</i>)	132 300	37 570	8 333	8786	186 989	70.7	20.0	4.5	4.7	69.9	21.0	4.5	4.6
	144 500	39 520	9 073	9840	202 933	71.2	19.4	4.5	4.8				
	92 410	30 300	5 880	5497	134 087	69.0	22.5	4.4	4.1				
	98 450	31 870	6 755	6864	143 939	68.4	22.1	4.7	4.8				

^a Der TMS-Derivate.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unter den unten angegebenen Bedingungen werden die Peakflächen der Trimethylsilyl-Derivate des Capsaicins (I), des Dihydrocapsaicins (II), des Nordihydrocapsaicins (III) und des Nonylsäurevanillylamids (IV) (siehe Fig. 1) einzeln integriert

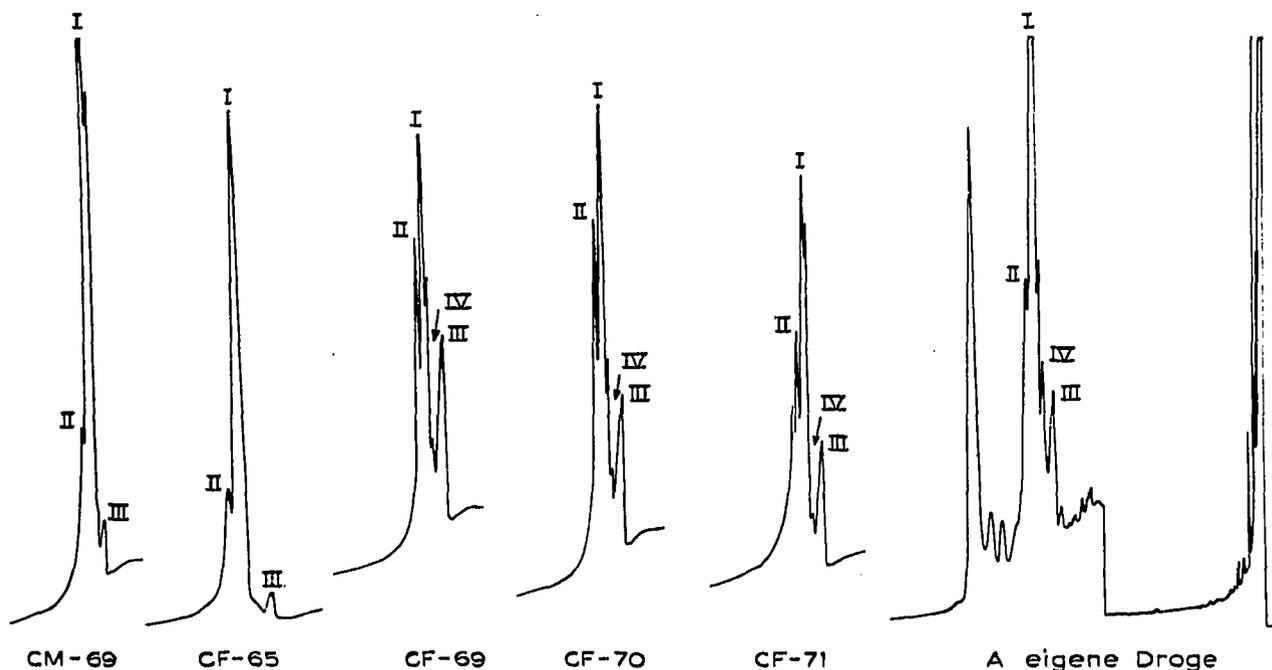
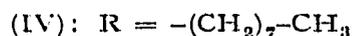
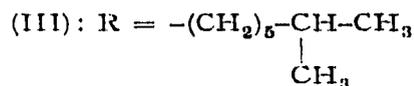
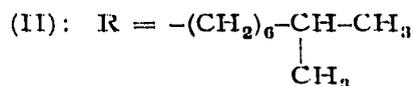
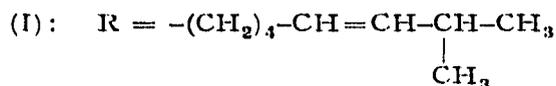
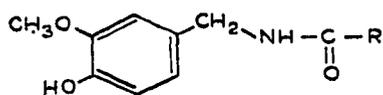


Fig. 1. Gaschromatogramme verschiedener Capsaicinoid-Gemische als Trimethylsilyl-Derivate (JNR 1% und 3%). I, TMS-Derivat von Capsaicin; II, TMS-Derivat von Dihydrocapsaicin; III, TMS-Derivat von Nordihydrocapsaicin; IV, TMS-Derivat von Nonylsäurevanillylamid.

und erlauben dadurch eine schnelle Ausrechnung der prozentualen Zusammensetzung. In Tabelle I sind die prozentualen Anteile der fünf von uns untersuchten, reinen Capsaicinoid-Gemische und die der Droge aufgezeichnet.



Da wir als Lösungsmittel zur Trimethylsilylierung Dimethylformamid verwendeten, konnte nach dem Zentrifugieren und anschliessendem, etwa 20-min Stehen eine klare Lösung erhalten werden. Spritzten wir die Lösung der TMS-Derivate erst nach 8 h ein, wie es HARTMAN³ zulässt, erzielten wir bei der Gaschromatographie (GC) unter denselben Bedingungen keine klare Trennung mehr in die einzelnen Peaks.

Es muss also innerhalb dieser Zeit eine Veränderung erfolgt sein. Am besten war die Einspritzung innerhalb der nächsten 2 h nach der Derivatbildung.

Eine neue Extraktionsmethode zur Reinigung der Capsaicinoide von störenden Begleitstoffen aus der Pflanze ermöglichte uns auch, die quantitative Bestimmung der einzelnen Capsaicinoide aus Drogenmaterial durchzuführen. Ein grosser Vorteil dieses Essigsäure-Ausschüttel-Verfahrens ist, dass es nicht zu der so störenden Emulsionsbildung zwischen der organischen und wässrigen Phase kommt. Ausserdem werden fast alle niedermolekularen Verunreinigungen der Capsaicinoid-Gemische abgetrennt, was Fig. 1 (A) zu entnehmen ist. Die prozentualen Anteile der Capsaicinoide in dem von uns untersuchten Drogenpulver von *Capsicum frutescens* sind in Tabelle I wiedergegeben.

Die Zahlen zeigen, dass die Anteile der Homologen und Analogen in den natürlichen Capsaicinoid-Gemischen sehr stark schwanken. Bei unseren Proben liegen die Capsaicin-Mengen zwischen 46 und 77 %, die Anteile des Dihydrocapsaicins dagegen erhöhen sich von 20 auf 40 %, also bis zum doppelten Gehalt. Bis zur fünf-fachen Menge weicht der Gehalt an Nordihydrocapsaicin ab, nämlich von 2,4 bis 12 %. Nonylsäurevanillylamid, wenn erfassbar vorhanden, schwankt zwischen 1.5 und 4.6 %. Diese grossen Unterschiede der prozentualen Anteile können eventuell von verschiedenen Isolierungsmethoden der Hersteller herrühren. Unser Drogenpulver zeigt nach obigem, einfachen Extraktionsverfahren einen Gehalt von 70 % Capsaicin, 21 % Dihydrocapsaicin, 4.5 % Nordihydrocapsaicin und 4.6 % Nonylsäurevanillylamid.

Die beschriebene Extraktions- und Reinigungsmethode wird z.Z. auch zur quantitativen Bestimmung der Gesamtcapsaicinoide von Droge und anderen galenischen Präparaten ausgearbeitet⁴.

Peak IV (siehe Fig. 1), der in unserer vorhergehenden Veröffentlichung¹ noch nicht identifiziert werden konnte, zeigt bei der GC auf SE-30 (3 %) die gleiche Retentionszeit wie das Vanillylamid der Nonylsäure, der sog. Pelargonsäure. Beim Einspritzen einer Lösung von natürlichem Capsaicinoid-Gemisch + synthetischem Nonylsäurevanillylamid zeigte sich auch ein Anwachsen des Peaks IV. Deshalb identifizierten wir diesen Peak IV als Nonylsäurevanillylamid.

Ein Versuch, Pelargonsäurevanillylamid, das häufig zur Anreicherung der Scharfstoffe den pulverisierten Capsicum-Früchten beigemischt wird, weil es annähernd denselben Scharfwert wie Capsaicin zeigt⁵, neben den natürlichen Capsaicinoid-Gemischen zu erkennen und quantitativ zu erfassen, ist früher durchgeführt worden⁶⁻⁸. DATTA UND SUSI⁸ geben die Methode, aus den IR-Spektren auf Grund der Bande bei 970 cm^{-1} für die Transkonfiguration die Beimengung des gesättigten Pelargonsäurevanillylamids zu errechnen. Diese Methode ist anwendbar, jedoch sehr ungenau; denn das natürliche Capsaicinoid-Gemisch enthält noch weitere gesättigte Anteile wie Dihydrocapsaicin, Nordihydrocapsaicin und andere.

Wenn wir unter den unten aufgeführten Bedingungen Lösungen von natürlichem, reinem Capsaicinoid-Gemisch mit in verschiedenen Konzentrationen zugefügtem Pelargonsäurevanillylamid auf SE-30 (3 %) gaschromatographisch trennten, erhielten wir die theoretischen Mengen der Verfälschung zurück, wie es Tabelle II zu entnehmen ist. Fig. 2 zeigt die GC Bilder nach Beimengung der unterschiedlichen Mengen von Nonylsäurevanillylamid. Somit ist es uns gelungen, die Hauptverfälschung der Scharfstoffe der Capsicum-Droge quantitativ zu erfassen.

TABELLE II

VERGLEICHENDE ÜBERSICHT DER THEORETISCHEN UND GEFUNDENEN ANTEILE DER VERFÄLSCHUNG PELARGONSÄUREVANILLYLAMID ZU EINEM REINEN CAPSAICINOID-GEMISCH

Peak I, Capsaicin; peak II, Dihydrocapsaicin; peak III, Nordihydrocapsaicin; peak PSVD. Pelargonsäurevanillylamid (PSVD); CF-71. Natürliches Capsaicinoid-Gemisch.

No.	Einwaage mg/ml ^a		Integrierte Fläche			III Σ I	PSVD (%)		
	CF-71	PSVD	I + II	PSVD	III		Gefunden x		Theoretisch x̄
P1	4.118	0.262	59 260	3 225	4127	66 612	4.8	5.1	5.9
			65 900	3 945	4766	74 611	5.3		
P2	4.118	0.523	61 610	8 282	4522	74 414	11.1	11.2	11.2
			58 720	7 982	4359	71 061	11.2		
P3	4.118	1.046	60 880	16 970	4400	82 250	20.6	20.6	20.2
			60 580	16 990	4456	82 026	20.7		
P4	4.118	1.569	61 990	26 250	4410	92 650	28.3	28.0	27.5
			64 100	26 410	4668	95 178	27.7		
P5	4.118	2.092	61 280	35 250	3810	100 340	35.1	34.5	33.6
			62 190	34 010	3558	99 758	34.0		

^a Herstellung durch Pipettieren von Stammlösungen.

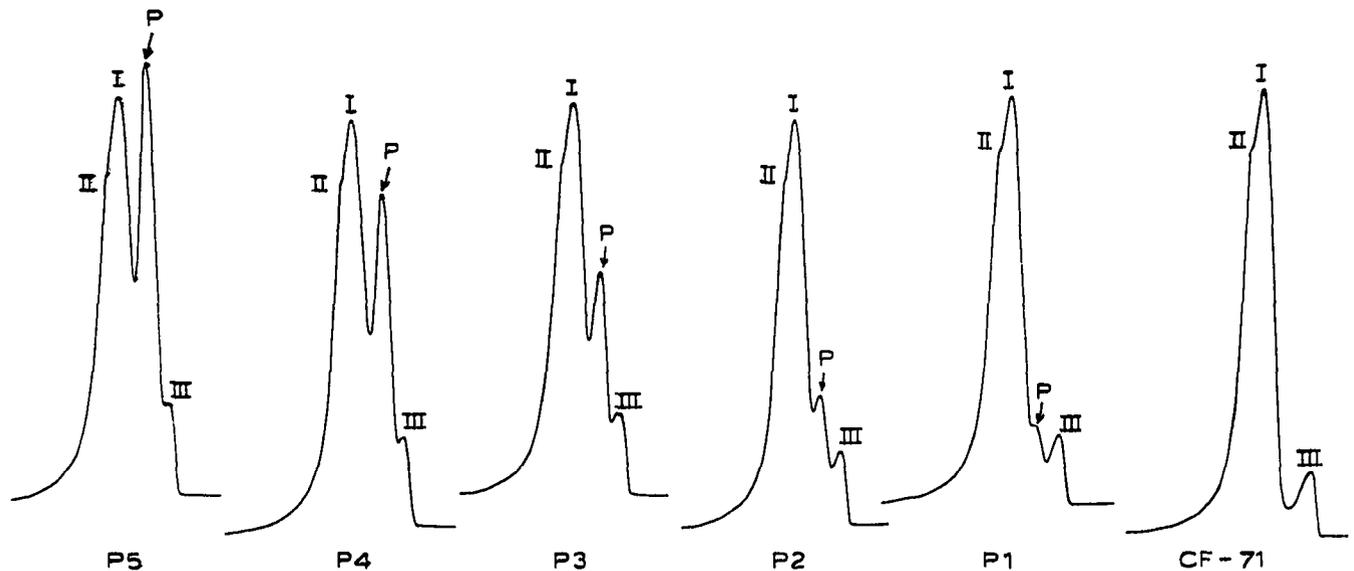


Fig. 2. Gaschromatographische Darstellung des natürlichen Capsaicinoid-Gemisches CF-71 mit Pelargonsäurevanillylamid als Verfälschung in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle II). I, Capsaicin; II, Dihydrocapsaicin; III, Nordihydrocapsaicin; P, Pelargonsäurevanillylamid (PSVD).

EXPERIMENTELLER TEIL

Extraktion der Capsaicinoide aus der Droge

Das Filtrat eines 2-h Soxhlet-Extraktes von 7.50 g *Fructus Capsici pulvis* (315/200) mit 100 ml Methanol wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Den erhaltenen öligen Rückstand spült man vorsichtig mit 40 ml Essigsäure

(70 %) im einem Schütteltrichter und reinigt diese Lösung durch dreimaliges Ausschütteln mit je 50 ml Petroläther (S.P. 40°–60°). Die gesamten Petroläther-Auszüge werden mit 10 ml Essigsäure (70 %) gewaschen. Die vereinigten Essigsäurelösungen verdünnt man mit 100 ml destilliertem Wasser und extrahiert diese Lösung viermal mit je 50 ml Dichlormethan. Nach zweimaligem Waschen der Dichlormethanlösung mit je 50 ml destilliertem Wasser wird die organische Phase mit 1.0 g Natriumsulfat, wasserfrei, und 150 mg Carbo adsorbens pulvis versetzt, kräftig geschüttelt und nach 15-min Stehen filtriert. Am Rotationsverdampfer wird dann das Filtrat vom Lösungsmittel befreit. Den trockenen Rückstand spült man vorsichtig mit Dichlormethan in einem 10-ml Messkolben und ergänzt mit dem gleichen Lösungsmittel bis zu Marke. 5 ml dieser Lösung werden erneut zur Trockne eingedampft und der erhaltene Rückstand wird zur Trimethylsilylierung mit 1 ml Dimethylformamid und den erforderlichen Reagentien versetzt (siehe *Trimethylsilylierung*).

Trimethylsilylierung

10 mg der getrockneten Capsaicinoid-Gemische werden in 1 ml Dimethylformamid gelöst und mit 1 ml Hexamethyldisilazan und 0.5 ml Trimethylchlorsilan versetzt. Nach 40 sec-langem, kräftigem Schütteln wird die Lösung 10 min stehen gelassen. Anschliessend zentrifugiert man diese Probe 5 min und giesst die kolloide Lösung ab, die nach weiterem 20-min Stehen klar wird.

Gaschromatographie

Gaschromatograph: Perkin-Elmer Gaschromatograph, Modell 881 mit Flammionisationsdetektor; Säulen: Länge 2 m, Innendurchmesser 3 mm; Eingespritzte Menge: 1 µl.

Bedingungen für Versuch 1. Säulenfüllung: JXR (1 %) auf Gas-Chrom Q, 100–120 mesh, und JXR (3 %) auf Gas-Chrom Q, 100–120 mesh; Trägergas: N₂, 34.6 ml/min; Temperatur: Injektor, 230°; Säule, 150–230° (6°/min); Detektor, 250°.

Bedingungen für Versuch 2. Säulenfüllung: SE-30 (3 %) auf Gas-Chrom P, 80–100 mesh; Trägergas: N₂, 36.2 ml/min; Temperatur: Injektor, 220°; Säule, 180–240° (6°/min); Detektor, 250°.

Integrations

Integrator: Hewlett-Packard Co., Modell 3370 B/71B; noise suppression, – 2; up-slope sensitivity, – 0.03; down-slope sensitivity, – 0.01; BL reset delay, – 0.4; area threshold, – 1; front shoulder, on; rear shoulder, – 0.1.

Auswertung

Die Summe der einzelnen, integrierten Peakflächen setzen wir als 100 % an. Aus diesem Verhältnis errechneten wir den prozentualen Anteil der einzelnen Homologen und Analogen:

$$\sum_{i=1}^{i=N} I_{iPP} :: 100 = I_{iPP} :: X$$

$$X = \frac{I_{iPP} \cdot 100}{\sum_{i=1}^{i=N} I_{iPP}}$$

I_{iPP} = integrierte Fläche des Peaks, dessen prozentualer Anteil gesucht ist.

Mit derselben Formel ermittelten wir den prozentualen Gehalt der Verfälschung Pelargonsäurevanillylamid.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine schnelle, reproduzierbare Methode gegeben, mit der im natürlichen Capsaicinoid-Gemischen der Anteil an Capsaicin, Dihydrocapsaicin, Nordihydrocapsaicin und Nonylsäurevanillylamid quantitativ erfasst werden. Die Bestimmung erfolgt nach Trimethylsilylierung und anschliessender gaschromatographischer Trennung auf JXR 1 % oder 3 %. Mit dieser Methode überprüften wir fünf, reine natürliche Capsaicinoid-Gemische des Handels und direkt einen Drogenextrakt, den wir nach einem neuen Essigsäure-Ausschüttel-Verfahren erhielten. Ausserdem ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Pelargonsäurevanillylamid als Verfälschung der Scharfstoffe der Capsicum-Droge beschrieben.

LITERATUR

- 1 A. MÜLLER-STOCK, R. K. JOSHI UND J. BÜCHI, *Pharm. Acta Helv.*, im Druck.
- 2 D. J. BENNET UND G. W. KIRBY, *J. Chem. Soc. C*, (1968) 442.
- 3 K. T. HARTMAN, *J. Food Sci.*, 35 (1970) 543.
- 4 A. MÜLLER-STOCK, *Dissertation*, Eidgenössige Technische Hochschule, Zürich, im Vorbereitung.
- 5 E. K. NELSON, *J. Amer. Chem. Soc.*, 41 (1919) 2121.
- 6 P. H. TODD, *Food Technol.*, 12 (1958) 468.
- 7 R. RANGOONWALA UND G. SEITZ, *Deut. Apoth. Ztg.*, 110 (1970) 1946.
- 8 P. R. DATTA UND H. SUSI, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 148.