

反相高效液相色谱法测定辣椒中 4 种 辣椒碱类成分的含量

韩玉珠¹, 石磊岭², 金莎³, 张晶^{3,*}

(1. 吉林农业大学园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 新疆中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002;

3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 目的: 建立同时测定辣椒中辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素和高辣椒素 4 种辣椒碱类成分的反相高效液相色谱方法, 并对 30 个辣椒品种中辣椒碱含量进行比较。方法: 采用 Nucleosil C₁₈ 色谱柱(4.6mm × 250mm, 5 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 柱温 45℃; 流速 1.0mL/min; 检测波长 280nm。结果: 辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素和高辣椒素的线性关系良好, 范围均为 1.0~160.0 μg/mL, 相关系数在 0.9965~0.9993 之间, 精密度、稳定性实验的相对标准偏差均低于 2.7%, 加标回收率介于 97%~99%。辣椒碱在不同辣椒品种中含量差异显著。结论: 对 30 个样品测定结果稳定, 重现性好。当辣椒素和二氢辣椒素含量大于 0.1% 时, 辣椒有明显的辣感。

关键词: 辣椒; 反相高效液相色谱; 辣椒素; 二氢辣椒素; 降二氢辣椒素; 高辣椒素

RP-HPLC Determination of 4 Capsaicinoids in Chili Peppers

HAN Yu-zhu¹, SHI Lei-ling², JIN Sha³, ZHANG Jing^{3,*}

(1. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnodrug, Ürümqi 830002, China;

3. College of Chinese Medicine Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Objective: A reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was established to simultaneously determine 4 capsaicinoids including capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homocapsaicin in chili peppers. Methods: Capsaicinoids were separated on a Nucleosil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using a mobile phase composed of acetonitrile and water through gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 280 nm. Results: An excellent linear relationship between peak areas and concentrations of 4 capsaicinoids in the range of 1.0 — 160.0 μg/mL with correlation coefficients of 0.9965—0.9993 was observed. The precision and stability RSD (%) of this method were lower than 2.7%. The average recovery rates of 4 capsaicinoids was 97% — 99% (n=6). The contents of 4 capsaicinoids in 30 chili pepper varieties revealed an obvious difference. Conclusion: This method has been successfully used to determine 30 chili pepper varieties with stable and reproducible results. Moreover, piquancy taste is obvious when the total content of capsaicin and dihydrocapsaicin is more than 0.1%.

Key words: chili peppers; reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); capsaicin; dihydrocapsaicin; nordihydrocapsaicin; homocapsaicin

中图分类号: TS255.7; TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)16-0257-04

辣椒, 为茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*)植物, 在世界范围广泛栽培, 属药食同源植物, 为重要的蔬菜和调味品, 干燥成熟果实更可入药, 归心、脾经。具有温中散寒, 开胃消食之功效, 用于寒滞腹痛, 呕

吐、泻痢、冻疮等症^[1]。我国是辣椒生产大国, 又是辣椒食用大国, 有 5 个栽培种^[2], 其中辣椒(*Capsicum annuum* L.)在我国广为栽培, 已经培育了众多的品种。本实验以其中 07-4 川椒等 30 个品种作为研究对象。

收稿日期: 2011-08-07

基金项目: 吉林省财政厅科研育种专项

作者简介: 韩玉珠(1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为蔬菜育种与安全生产。E-mail: hanyzh2003@126.com

* 通信作者: 张晶(1971—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: zhjing0701@163.com

辣椒碱是辣椒产生辛辣味道的主要成分,是一系列同源支链碱基香草胺的混合物,包括辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素、高辣椒素等。辣椒碱亦是辣椒中主要活性成分,具有镇痛^[3]、抗癌^[4]、调节心血管压力^[5]、保护胃黏膜^[6]、减肥^[7]、刺激毛发生长^[8]等功能。辣椒碱含量不仅反映了辣椒及其制品的风味,而且可以作为衡量其质量的指标,是选择富含活性物质的辣椒品种,提高辣椒附加值的依据。

本实验以自制辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素和高辣椒素为对照品,采用超声辅助溶剂提取法对样品进行处理,建立反相高效液相色谱(resersed-phase high performance liquid chromatography, HPLC)法同时检测4种辣椒碱含量的条件,并对该法进行方法学实验,检测并比较了30个辣椒品种中4种辣椒碱的含量,测定结果稳定、准确。结果显示,辣椒品种不同,其中的各辣椒碱含量差异较大。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用辣椒样品均采自吉林农业大学园艺学院实验田,为茄科(Solanaceae)辣椒属辣椒(*Capsicum annuum* L.)的30个栽培品种。

辣椒素(CA)、降二氢辣椒素(NDC)、二氢辣椒素(DC)、高辣椒素(HC)对照品(采用UV、MS、NMR等波谱学方法确定其结构,经HPLC法测定其纯度不低于98%(归一化法)) 自制;乙腈(色谱纯) 美国Fisher公司;丙酮(分析纯) 北京化工厂。

1.2 仪器与设备

LC-2010液相色谱仪(SPD-20Avp紫外检测器、柱温箱、化学工作站) 日本岛津公司; Nucleosil C₁₈ ODS色谱柱(4.6mm × 250mm, 5μm) 美国Agilent公司; UV2450紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; KQ-250DB型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 对照品溶液的制备

精密称取CA、NDC、DC和HC各5mg,分别置于5mL容量瓶中,乙腈定容,制成1mg/mL对照品溶液。

1.3.2 样品溶液的制备

准确称取各样品粉末2.0g于50mL锥形瓶中,以丙酮室温条件下超声提取3次(丙酮用量分别为30、20、20mL),每次20min,合并提取液,浓缩至干,用乙腈分别定容于10mL容量瓶,制成样品溶液。测定前用0.45μm微孔滤膜过滤。

1.3.3 色谱条件

Nucleosil C₁₈ ODS色谱柱(4.6mm × 250mm, 5μm); 柱温: 45℃; 检测波长: 280nm; 进样量: 20μL; 流动相: 乙腈(A)、蒸馏水(B); 梯度等速洗脱; 流速: 1.0mL/min; 梯度洗脱程序为: 0~30min, 40%~44% A; 30.1min, 40% A。

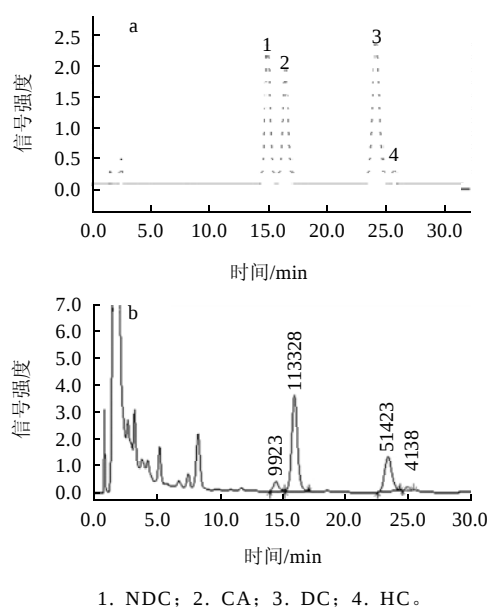
1.3.4 线性关系考察

分别精密量取对照品溶液1、10、20、40、80、160μL混合,用乙腈定容于1mL容量瓶,制成系列混合标准品溶液。

分别吸取6个不同质量浓度梯度的混合标准品溶液20μL进样,测定4种辣椒碱峰面积,以各辣椒碱浓度为横坐标(x)、积分面积值为纵坐标(y),进行线性回归计算,得混合标准品溶液中4种不同辣椒碱的回归方程。

2 结果与分析

2.1 混合标准品溶液及尖辣椒样品的HPLC分析



1. NDC; 2. CA; 3. DC; 4. HC。
图1 4种辣椒碱混合标准品(a)及尖辣椒(b)样品的HPLC图谱
Fig.1 HPLC chromatograms of mixed standard capsaicinoids (a) and chili pepper extract

由图1可知,4种辣椒碱色谱峰的保留时间分别为14.81、16.53、24.02、25.69min。由于样品过多,图1中选取了有代表性的尖辣椒样品谱图。

2.2 混合标准品溶液中辣椒碱回归方程

4种辣椒碱的线性回归方程为: $y_{\text{NDC}} = 538424x + 106$, $R^2 = 0.9931$; $y_{\text{CA}} = 546287x + 106$, $R^2 = 0.998$; $y_{\text{DC}} = 6378591x - 41973$, $R^2 = 0.9987$; $y_{\text{HC}} = 742039x - 346632$, $R^2 = 0.9974$ 。线性关系良好,线性范围均为1.0~160.0μg/mL。

2.3 辣椒碱稳定性实验

按 1.3.3 节条件, 取辣椒素混合标准品, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行各辣椒碱含量的测定。结果表明, 标准品溶液于 24 h 内, 色谱峰面积无明显变化, NDC、CA、DC 和 HC 的色谱峰面积 RSD 值分别为 2.39%、1.98%、2.23%、2.62%。

2.4 重复性实验

取同一辣椒样品溶液, 在 1.3.3 节条件下连续进样 6 次, NDC、CA、DC 和 HC 色谱峰面积的 RSD 分别为: 1.55%、1.28%、1.53%、1.38% ($n = 6$)。表明本方法重复性较好。

2.5 加标回收率实验

精密量取对照液于 5 份已知各辣椒碱含量的辣椒样品粉末中, 按 1.3.2 节进行处理, 在 1.3.3 节条件下进行测定。结果见表 1。

表 1 4 种辣椒碱的加标回收率实验结果 ($n = 6$)

Table 1 Average spike recovery rates of 4 capsaicinoids in a known sample ($n = 6$)

辣椒碱	辣椒中辣椒碱质量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
NDC	0.36	0.50	0.850	97.92	1.08
CA	2.02	2.00	3.984	98.21	1.69
DC	1.96	2.00	3.913	97.64	2.01
HC	0.24	0.30	0.534	98.11	1.86

结果表明, 本实验提取及处理方法对于各单体辣椒素回收率介于 97%~99%, 符合测定要求。

2.6 辣椒样品中 4 种辣椒碱含量的测定

表 2 辣椒样品中的 4 种辣椒碱含量

Table 2 Contents of 4 capsaicinoids in 30 chili pepper varieties

样品	CA	DC	NDC	HC	(CA+DC)占 4 种辣椒素总量的比例 %	CA 占 4 种辣椒素总量的比例 %
07-4 川椒	0.017	0.0067	0.0013	0.00078	91.93	65.94
07-6	0.021	0.016	0.0042	0.0011	87.47	49.65
长顺 3318	0.034	0.014	0.0046	0.00073	90.01	63.75
朝研 85-10	0.047	0.025	0.0034	0.00095	94.30	61.56
A185F2	0.012	0.0037	0.00051	0.0001	96.26	73.57
湘辣 4 号自交系	0.014	0.0051	0.0013	0.0005	91.39	66.99
A185	0.16	0.069	0.017	0.0042	91.53	63.95
07-9	0.22	0.10	0.026	0.0088	90.19	62.01
湘辣 4 号	0.027	0.036	0.0052	0.00093	91.13	39.06
九龙长虹自交系	0.015	0.0056	0.00053	0.00012	96.94	70.59
九龙长虹	0.017	0.0054	0.0014	0.0011	89.96	68.27
金塔	0.019	0.0069	0.0017	0.00098	90.62	66.48
尖辣椒	0.085	0.049	0.0098	0.0024	91.66	58.14
曼迪	0.069	0.0057	0.0074	0.0021	88.72	81.95
方舟	0.012	0.0071	0.0013	0.0010	89.25	56.07
甜椒长方	0.019	0.11	0.0073	0.0037	92.14	13.57
巴莱姆	0.071	0.048	0.0036	0.0022	95.35	56.89
九香辣椒	0.015	0.035	0.0030	0.0016	91.58	27.47
一代天椒	0.0062	0.0074	0.00097	0.00049	90.31	41.17
京辣 4 号	0.032	0.052	0.0069	0.0037	88.79	33.83

续表 2

样品	CA	DC	NDC	HC	(CA+DC)占 4 种辣椒素总量的比例 %	CA 占 4 种辣椒素总量的比例 %
萨菲罗	0.057	0.025	0.0046	0.0034	91.11	63.33
红英达	0.013	0.0084	0.00077	0.00032	95.15	57.80
金武士彩椒	0.093	0.0023	0.0078	0.0056	87.67	85.56
银河	0.067	0.013	0.0053	0.0012	92.49	77.46
普利特	0.0042	0.016	0.00085	0.00037	94.30	19.61
先锋	0.0075	0.0025	0.0021	0.00089	76.98	57.74
帝王	0.0069	0.034	0.00042	0.000167	98.59	16.63
百耐	0.0079	0.041	0.00056	0.00021	98.45	15.90
红罗丹甜椒	0.0010	0.0029	0.00047	0.00032	83.16	21.32
萧新九号	0.053	0.0021	0.0036	0.0018	91.07	87.60

注: $*(CA+DC)$ 占 4 种辣椒素总含量比例的计算公式: 比例 % = $\frac{CA+DC}{CA+DC+NDC+HC} \times 100$; CA 同理。

对 30 个辣椒品种中的 4 种辣椒碱(NDC、CA、DC 和 HC)含量进行测定, 由表 2 可知, 各成分含量在不同的辣椒样品中差异显著。其中, 辣椒素在 07-9 中含量最高为 0.22%, 红罗丹甜椒中含量最低为 0.001%, 相差 220 倍; DC 在甜椒长方中含量最高为 0.11%, 萧新九号中含量最低为 0.0021%, 相差 50 倍; NDC 在 07-9 中含量最高为 0.018%, 帝王中含量最低为 0.0042%, 相差 4.5 倍; HC 在 07-9 中含量最高为 0.0088%, A185F2 中含量最低为 0.0001%, 相差 88 倍。4 种成分中, 以 NDC 在辣椒样品中含量差距最小。

3 讨论与结论

由于辣椒碱类物质对热不稳定, 因此本实验参照国家标准 GB 10783—2008《食品添加剂辣椒红》中辣椒素提取方式, 采用超声辅助法, 在室温下对样品中辣椒碱进行提取, 避免高温对待测成分的影响^[9]。按此提取方法制备的样品溶液在测定指标区域内峰型简单, 无其他成分峰干扰。

对于辣椒中辣椒碱类成分含量的检测方法, 以单一辣椒素或同时测定辣椒素和 DC 含量报道居多^[10-11]。其主要原因在于 NDC、HC 等标准品难以获得, 本实验以自制的 4 种辣椒碱为标准品, 在前期工作基础上^[12], 建立了 HPLC 法同时测定辣椒中的 4 种辣椒碱类物质的条件, 且分离度高、测定结果准确, 不仅可为较全面地控制和评价辣椒及其制品的品质提供方法, 同时也为辣椒碱在食品添加剂监测和控制等方面提供量化参考。

采用本实验建立的方法对不同的辣椒栽培品种进行了初步评价, 结果显示, 不同品种辣椒果实中 4 种辣椒碱类成分含量有较大差异, 且与已有报道“辣椒素约占辣椒碱的 46%~77%”^[13]的结果存在出入, 如在甜椒长方品种中, CA 含量只占辣椒碱的 13.57%, 而 DC 的含量却很高, 成为此品种辣椒产生辣味的主要成分; 但与 CA 和 DC 之和和约占辣椒碱的 90%^[14]的报道结论相吻

合。结合各辣椒果实的外观及辣度口感发现, 外观为牛角或者羊角形, 且口感较辣的辣椒品种, 其 CA 和 DC 含量之和基本大于等于 0.1%, 如 A185、07-9、尖辣椒、甜椒长方、巴莱姆、金武士彩椒等品种果实辣度强于其他品种。

辣椒的应用范围极广, 对于辣椒品种的筛选必然要以其内在质量为依据。根据不同的需求选择适当的品种, 可充分提高辣椒的利用价值。

参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 347.
- [2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 61-63.
- [3] 佚名. 辣椒[J]. 国外医药: 植物药分册, 2005, 20(1): 41.
- [4] ATHANASIOU A, SMITH P A, VAKILPOUR S. Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: how vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(1): 50-55.
- [5] O'SULLIVAN S E, KENDALL D A, RANDALL M D. Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries[J]. *Br J Pharm*, 2004, 142(3): 435-442.
- [6] SATHYANARAYNA M N, SOURCE M I. Capsaicin and gastric ulcers[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006, 46(4): 275-328.
- [7] KASBIA G S. Functional foods and nutraceuticals in the management of obesity[J]. *Nutr Food Sci*, 2005, 35(5): 344-352.
- [8] BODÓ E, BÍRÍ T, TELEK A, et al. A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor- 1(VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(4): 985-988.
- [9] BARBERO G F, LIAZID A, PALMA M, et al. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers[J]. *Talanta*, 2008, 75(5): 1332-1337.
- [10] 王旭, 王富华, 钟红舰, 等. 高效液相色谱法测定食品中的辣椒素、二氢辣椒素[J]. *食品科学*, 2008, 29(7): 378-381.
- [11] 周丽, 连运河, 程远欣, 等. HPLC 法检测辣椒不同部位中辣椒碱和二氢辣椒碱的含量[J]. *中国食品添加剂*, 2011(2): 231-234.
- [12] 张晶, 孙长波, 石磊岭, 等. RP- HPLC 法测定辣椒中辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素含量[J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(2): 244-246.
- [13] 郑龙辉, 陆红佳, 刘雄. 辣椒素生理功能研究进展[J]. *食品科学*, 2011, 32(3): 262-265.
- [14] SADAYOSHI K, KURUTA M. Study on the pungent principle of capsicum. X IV. Chemical constitution of the pungent principle[J]. *Agric Boil Chem*, 1970, 34(2): 248-256.