

# 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\*

张晶<sup>1</sup>, 孙长波<sup>1</sup>, 石磊岭<sup>1</sup>, 金莎<sup>1</sup>, 韩玉珠<sup>2</sup>

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118 & 2 吉林农业大学园艺学院, 长春 130118)

**摘要** 目的: 建立反相高效液相色谱法同时测定辣椒中辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素含量。方法: 采用 Nucleosil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 280 nm, 柱温 45 °C, 外标法定量。结果: 3个辣椒碱的线性关系良好, 线性范围均为 1.0~160.0 μg·mL<sup>-1</sup>, 相关系数在 0.9991~0.9995之间; 精密性、稳定性试验的 RSD 均低于 3%; 辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素平均回收率 (n=6) 分别为 96.4%, 98.1%, 99.3%, RSD 分别为 2.6%, 2.1%, 1.2%; 检出限分别为 0.2, 0.1, 0.1 μg·mL<sup>-1</sup>。结论: 该方法简便快捷, 应用本方法测定了 10个品种辣椒中 3个辣椒碱的含量, 结果稳定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 辣椒; 辣椒素; 二氢辣椒素; 降二氢辣椒素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0244-03

## RP-HPLC simultaneous determination of three capsaicinoids constituents in fruits of *Capsicum annuum*\*

ZHANG Jing<sup>1</sup>, SUN Chang-bo<sup>1</sup>, SHI Lei-ling<sup>1</sup>, JIN Sha<sup>1</sup>, HAN Yu-zhu<sup>2</sup>

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

(2. Horticultural Department of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract Objective** To develop a reversed-phase HPLC method for the determination of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin in fruits of *Capsicum annuum*. **Methods** Nucleosil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used at 45 °C with the mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution). The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was 280 nm. **Results** The linear response ranged from 1.0 to 160.0 μg·mL<sup>-1</sup> with coefficient correlation of 0.9991-0.9995, RSDs of precision and stability test were lower than 3%; The average recoveries were 96.4% with RSD of 2.6% for capsaicin, 98.1% with RSD of 2.1% for dihydrocapsaicin and 99.3% with RSD of 1.2% for nordihydrocapsaicin. Detection limits of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin are 0.2, 0.1, 0.1 μg·mL<sup>-1</sup> respectively. **Conclusion** The method is quick, simple and repeatable for determination of three capsaicin constituents in fruits of 10 *Capsicum annuum* varieties.

**Key words** HPLC; *Capsicum annuum*; capsaicin; dihydrocapsaicin; nordihydrocapsaicin

辣椒 (*Capsicum annuum* L. 是茄科 Solanaceae 辣椒属 *Capsicum* 植物, 又名番椒、海椒、红辣椒、辣子、辣茄等, 以果实、根和茎枝入药<sup>[1]</sup>。我国是最早将辣椒作为药物使用的国家之一。辣椒味辛、性热, 归心、脾经。《药性考》称其“温中散寒, 除风发汗去冷癖, 行痰逐湿”, 因此, 中医用辣椒治疗胃寒、风湿疼痛等症。辣椒根可活血消肿, 外用治冻疮。现代研究表明<sup>[2]</sup>, 辣椒具有多种生理活性, 在美国和加拿大, 辣椒已被 FDA (Food and Drug Administration

批准为 OTC 药, 辣椒素是已批准的辣椒辣素乳膏 (Zostrix) 的活性成分。

辣椒中已发现的化学成分主要有萜、生物碱、甾、黄酮、不饱和脂肪酸等类型化学成分, 其中生物碱类物质是辣椒中的主要活性成分, 也是辣椒中辣味的来源, 其主要包括辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素等, 三者占辣椒总碱的 90% 以上, 其含量的高低直接影响到辣椒及其制品的辣度, 同时也是现代中药研究开发热点所在。对 3个成分含量的准确

\* 吉林省教育厅资助项目 (No. 2008-63)  
第一作者 Tel: (0431) 84533087 E-mail: zhjzj070@163.com

测定可作为评价辣椒及其制品质量的重要依据, 并为寻找有效成分含量高的辣椒品种提供科学参数。本文以自制辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素为对照品, 采用超声辅助提取, 以乙腈-水为流动相, 进行程序洗脱, 建立了 RP-HPLC法同时检测 3 个辣椒碱的含量, 并对该法进行了方法学试验, 对 10 个辣椒品种的测定结果稳定、准确。

### 1 仪器与试剂

岛津 LC-2010 液相色谱仪(日本岛津公司), SPD-20Avp 紫外检测器, LC-Solution 色谱工作站; KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素(自制, 系从辣椒的提取物中分离得到, 并经  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS、IR 和 UV 等光谱法鉴定其结构; 按本方法色谱条件, 归一化法测得它们的纯度均  $\geq 98\%$ ; 辣椒样品, 由吉林农业大学园艺学院韩玉珠副教授提供, 为茄科 Solanaceae 辣椒属 *Capsicum* 辣椒 *Capsicum annuum* L 的 10 个栽培品种, 烘干至恒重后, 磨碎, 过 60 目筛; 甲醇为分析纯, 乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司), 纯净水(杭州娃哈哈)。

### 2 方法与结果

**2.1 系列混合对照品溶液的配制** 精密称取对照品辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素各 5 mg 分别置于 5 mL 量瓶中, 以乙腈定容, 制成  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品储备液。分别精密量取上述各对照品储备液均 1, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{L}$ , 一一对应分别置于同一 1 mL 量瓶中, 以乙腈定容, 制成系列混合对照品溶液, 待用。

**2.2 供试品溶液** 称取各辣椒样品粉末 2.0 g 精密称定, 置于 50 mL 锥形瓶中, 以甲醇为溶剂, 室温超声(250W, 40 kHz)提取 3 次(甲醇用量分别为 30 mL, 20 mL, 20 mL), 每次 30 min, 合并提取液, 减压浓缩近干, 以乙腈分别定容于 10 mL 量瓶中。测定前用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

**2.3 色谱条件** 采用 Nucleosil C<sub>18</sub> (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 采用二元梯度洗脱(0~30 min, 乙腈-水由 42:58 线性变为 45:50) 30.1 min 结束测定, 流速  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 检测波长 280 nm, 柱温 45  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.4 线性关系考察及检测限测定** 按“2.1”项下方法制备辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素浓度均分别为 1.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的系列混合对照品溶液。按照“2.3”项下色谱条件进样测定, 以色谱峰面积  $Y$  为纵坐标, 进样浓

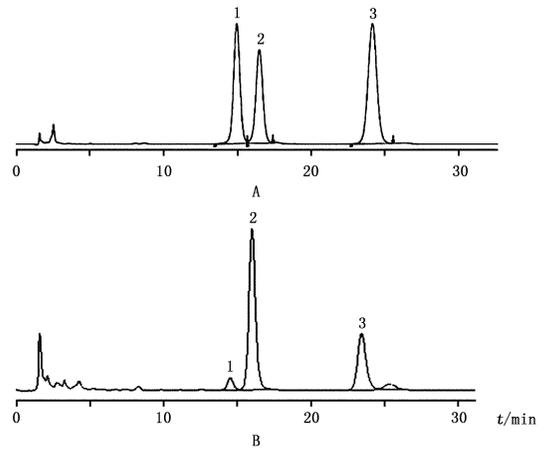


图 1 混合对照品(A)与辛香王子朝天椒样品(B)的 HPLC 图  
Fig 1 HPLC chromatograms of mixed standard(A) and Xinxiang Wangzi Chaotianjiao(B)

1. 降二氢辣椒素(nordhydrocapsaicin) 2. 辣椒素(capsaicin) 3. 二氢辣椒素(dihydrocapsaicin)

度  $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$  为横坐标, 进行回归, 得到辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素回归方程分别为:

$$Y = 5.506 \times 10^5 X + 1 \times 10^6 \quad r = 0.9991$$

$$Y = 6.248 \times 10^6 X - 4.232 \times 10^5 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 5.153 \times 10^5 X + 1 \times 10^6 \quad r = 0.9991$$

线性范围均为  $1.0\sim 160.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取  $1.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  混合对照品溶液逐步稀释并分析, 以 3 倍信噪比计算辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素检测限分别为 0.2, 0.1, 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.5 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 20  $\mu\text{L}$  连续进样 5 次, 计算辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素峰面积的 RSD ( $n=5$  分别为 2.0%, 2.3%, 2.8%)。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样测定。测得辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素峰面积的 RSD ( $n=5$  分别为 1.3%, 1.5%, 1.5%)。

**2.7 重复性试验** 称取辛香王子朝天椒样品粉末 2.0 g 共 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。计算辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素含量平均值 ( $n=6$  分别为 0.29%, 0.12%, 0.018%; RSD 分别为 1.3%, 1.6%, 1.9%)。

**2.8 加样回收率试验** 取已知辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素含量分别为 0.29%, 0.12%, 0.018% 的样品约 1.0 g 平行 6 份, 精密称定, 分别精确加入辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素浓度分别为 1.0, 1.0, 0.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液 1 mL, 按“2.2”项下方法制备供试溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素

的加样回收率 ( $n = 6$  分别为 96.4%, 98.1%, 99.3%; RSD 分别为 2.6%, 2.1%, 1.2%。

## 2.9 样品含量测定 分别精密吸取辣椒样品的供

试品溶液各 20  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 按外标法计算样品中辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素的含量, 结果见表 1。

表 1 不同辣椒品种中 3 个辣椒碱的含量测定

Tab 1 Contents of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin in fruits of *Capsicum annuum*

序号 (No)	样品 (sample)	含量 (content %)			含量比值 (ratio of content)	
		辣椒素 (capsaicin)	二氢辣椒素 (dihydrocapsaicin)	降二氢辣椒素 (nordihydrocapsaicin)	辣椒素 (capsaicin) 降二氢辣椒素 (nordihydrocapsaicin)	辣椒素 (capsaicin) 二氢辣椒素 (dihydrocapsaicin)
1	辛香王子朝天椒 (Xinxiang Wangzi Chaotianjiao)	0.29	0.12	0.018	16.11	2.42
2	福康五号尖椒 (Fukang V Jianjiao)	0.032	0.015	0.0041	7.80	2.13
3	可人辣椒 (Keren Lajiao)	0.14	0.049	0.0072	19.44	2.86
4	9794	0.091	0.039	0.0074	12.30	2.33
5	美玉 (Meiyu)	0.082	0.040	0.0070	11.71	2.05
6	红塔 (Hongta)	0.033	0.019	0.0027	12.22	1.74
7	红福 (Hongfu)	0.073	0.036	0.0057	12.81	2.03
8	大椒王 (Dajiaowang)	0.034	0.016	0.0024	14.17	2.13
9	大为 (Dawei)	0.26	0.12	0.036	7.22	2.17
10	富祥 (Fuxiang)	0.073	0.050	0.010	7.30	1.46

## 3 讨论

辣椒碱类物质高温下不稳定, 因此本文选用了超声辅助法对其进行提取, 避免高温处理的损失, 并与国家标准 GB10783-2008<sup>[3]</sup> 中辣椒素含量测定方法 (以 70% 甲醇为溶剂, 振荡提取 30 min 进行加样回收率比较, 采用 HPLC 法测定, 结果超声法中辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素回收率分别为 96.4%, 98.1%, 99.3%, 而标准法的回收率分别为 82.3%, 84.5%, 87.1%。故本实验选择超声辅助提取法, 以甲醇为溶剂, 按照常规提取法, 提取 3 次。按此方法提取制备的供试品溶液在测定指标区域内峰型简单, 没有其他成分峰的干扰。

文献中所报道的色谱流动相多用于辣椒素和二氢辣椒素的分析<sup>[4-6]</sup>。对于 3 个辣椒碱的含量分析则少有报道, 其主要原因是降二氢辣椒素的对照品难获得。本研究以自制辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素为对照, 参照文献 [4], 测定波长设置为 280 nm, 考察了甲醇-水、乙腈-水系统在 Nucleosil C<sub>18</sub> 色谱柱上对其分离情况, 在等度洗脱时, 均无法将降二氢辣椒素和辣椒素完全分离, 且甲醇-水系统洗脱峰形有拖尾现象, 因此选用乙腈-水系统为流动相, 调整配比, 采用程序洗脱, 所得谱图简单, 使 3 个辣椒碱达到完全分离。比较了 35  $^{\circ}$ C、40  $^{\circ}$ C 和 45  $^{\circ}$ C 柱温测定结果, 以 45  $^{\circ}$ C 时出峰时间最短, 25 min 可完全出峰, 并达到完全分离。鉴于以上测试条件的优化结果, 确定了本实验对 3 种辣椒碱的含量测定的色谱条件为: Nucleosil C<sub>18</sub> (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 采用二元梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 柱温 45  $^{\circ}$ C。

从测定的 10 个样品结果 (表 1 可见, 所测定的辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素 3 个指标在各辣椒品种中含量差异较大, 以辛香王子朝天椒和大为 2 个品种的辣椒碱含量较高, 福康五号尖椒、红塔、大椒王中辣椒碱含量偏低; 但辣椒素与二氢辣椒素的含量比例大多数接近 2:1, 降二氢辣椒素含量则相对前者低得多。此结果可为评价辣椒质量, 寻找高辣椒碱含量的辣椒品种提供依据。

## 参考文献

- 1 Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences (中国科学院中国植物志编委会). Flora of China (中国植物志). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1978: 61
- 2 Plant Medicinal Database (植物药数据库). 058 capsicum (辣椒). World Phytomed (国外医药 植物药分册), 2005, 20(1): 41
- 3 National Standards of the People's Republic of China (中华人民共和国国家标准). GB10783-2008 Food Additive • capsanthin (食品添加剂 • 辣椒红)
- 4 ISO 7543-2 Chillies and chilli oleoresins—Determination of total capsaicinoid content part 2 Method using high-performance liquid chromatography, 1993 E
- 5 ZHU Shu-ping (朱书平), LITian-bao (李添宝). Determination of capsaicinoids by high performance liquid chromatography (高效液相色谱法测定辣椒碱). J Nat Sci Hunan Norm Univ (湖南师范大学自然科学学报), 2005, 28(4): 63
- 6 WANG Sui-ping (王穗萍), XIA Yan-bin (夏延斌), PENG Jin (彭进), et al Determination of capsaicinoids in highly oil-containing pepper products by high performance liquid chromatography (高效液相色谱法测定富含油脂辣椒制品中的辣椒素类物质). Chin J Anal Lab (分析试验室), 2007, 26(12): 39

(本文于 2010 年 3 月 18 日收到)