

UPLC同时测定辣椒胎座中辣椒素和二氢辣椒素

郭茜茜¹, 吴鹏^{1*}, 刘志洋², 赵凌侠³, 杨慧¹

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院/抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 哈尔滨市农业科学院, 哈尔滨 150028; 3. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要:建立超高效液相色谱(UPLC)仪同时测定京椒一号辣椒胎座中辣椒素和二氢辣椒素的方法,并检测辣椒素和二氢辣椒素含量积累动态变化。确定的色谱条件为甲醇:水(70:30)的流动相,流速为1.0 mL/min, EcLipse XDB-C₁₈色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm),柱温为30 °C,进样量为1 μL,运行时间为5 min。结果表明,辣椒素和二氢辣椒素的保留时间分别为0.8 min和1.1 min,在选定的范围内线性关系良好,平均加标回收率为98.2%和105.5%,RSD为2.24%和3.15%。京椒一号辣椒素和二氢辣椒素含量都表现为波动性增加,最高点均出现在开花后40 d。采用UPLC法操作简便,分离效果及重复性好,且快速、准确,可作为辣椒素和二氢辣椒素的准确定量方法。

关键词:辣椒;辣椒素;二氢辣椒素;UPLC

中图分类号:S641.3

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2023)06-0141-04

Simultaneous Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Pepper Placenta Based on UPLC

GUO Qianqian¹, WU Peng^{1*}, LIU Zhiyang², ZHAO Lingxia³, YANG Hui¹

(1. College of Life Science, Agriculture and Forest, Qiqihar University/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Protection of Biodiversity in Cold Areas, Qiqihar 161006; 2. Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150028; 3. College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: This study established a method for simultaneous determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in the placenta of Jingjiao 1 by ultra high performance liquid chromatography (UPLC), and detected the dynamic changes in the accumulation of capsaicin and dihydrocapsaicin content. The determined chromatographic conditions were the mobile phase of methanol vs water (70:30) with a flow rate of 1.0 mL/min and an Eclipse XDB-C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), column temperature is 30 °C, injection volume is 1 μL. The running time was 5 min. The results showed that the retention times of capsaicin and dihydrocapsaicin were 0.8 min and 1.1 min, respectively, with good linear relationships within the selected range. The average spiked recovery rates were 98.2% and 105.5%, and the RSD was 2.24% and 3.15%. The content of capsaicin and dihydrocapsaicin in Jingjiao 1 showed fluctuating increases, with the highest points occurring 40 days after flowering. The UPLC method was easy to operate, had good separation effect and repeatability, and was fast and accurate. It can be used as an accurate quantitative method for capsaicin and dihydrocapsaicin.

Key words: Pepper; Capsaicin; Dihydrocapsaicin; UPLC

收稿日期:2022-10-12

基金项目:黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目(145209143);黑龙江省自然科学基金项目(LH2019C067);齐齐哈尔大学学位与研究生教育教学改革研究项目(JGXMQUG2019013、JGXMQUG2022017)

作者简介:郭茜茜(1983-),女,讲师,博士,从事植物次生代谢机理研究。

通讯作者:吴鹏,男,博士,副教授,E-mail: xxguo19850502@126.com

辣椒中辣味物质主要是辣椒素和二氢辣椒素,还有少量高二氢辣椒素、降二氢辣椒素和高辣素等19种同系物^[1]。辣椒胎座是辣椒素类物质合成和积累的主要部位,辣椒胎座和隔膜中辣椒素含量最多,可达干物重的2%左右,果肉次之,种子最少^[2-3]。因此,本研究以辣椒素含量最高的部位(辣椒胎座)为检测材料具有很强的实际应用价值。

辣椒素作为天然次生代谢产物,其测定方法和研究技术在科研和教学方面已有较多报道^[4-6]。辣椒素和二氢辣椒素如果使用液相色谱法(HPLC)检测,其出峰时间一般为15 min左右,而本试验选择超高效液相色谱法(UPLC)对辣椒素与二氢辣椒素进行定量分析,5 min内可完成分析,相比HPLC节约1/3的时间,操作也更加便捷。UPLC的检测速度、灵敏度及分离度分别是HPLC的9倍、3倍及1.7倍。目前,UPLC在植物次生代谢物和天然产物检测方面应用较多,刘洁等^[7]利用UPLC法测定加味逍遥提取物及制剂中柴胡皂苷b₂含量;韩燕全等^[8]基于UPLC特征指纹图谱和指标成分定量测定炮姜的主要成分。

本研究以辣椒胎座为检测部位,利用UPLC技术进行辣椒素和二氢辣椒素含量测定,在测定部位和技术选择上具有一定的创新性。另外,本试验研究了辣椒果实发育成熟过程中辣椒素和二氢辣椒素的含量动态变化规律,确定辣椒素含量最低值和最高值,为后续人工提取辣椒素及辣椒素分子调控网络构建奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

AgiLent TechoLogies 1290 Infinity II型超高效液相色谱仪(UPLC)、AgiLent EcLipse XDB-C₁₈色谱柱,美国AgiLent TechoLogies公司;KQ3200DB型超声波清洗仪,昆山超声仪器有限公司;KS-100AS型烘干箱,广州康恒仪器有限公司;FA214电子天平,上海海康精密电子仪器厂;PuLverisette14型高速粉碎机,德国FRTSCH分析仪器有限公司。SCAA-104型有机相针式滤器,上海TROODY有限公司。辣椒素和二氢辣椒素标准品,批号分别为B20693-20 mg和B20361-20 mg 19408-84-5,上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙醇为色谱纯,美国Sigma公司;试验用水为重蒸水;其他试剂均为分析纯。京椒一号采自黑龙江省齐齐哈尔市克东县蔬菜种植园。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备

辣椒开花时挂牌标记,15 d后进行第一次采样,之后每隔5 d采样一次,直到辣椒果实完全转红,达到红熟期,共采集8次样品。将取样辣椒按采摘时期和长度进行分类,取胎座部分烘干后,使用电动粉碎机粉碎至粉末状,全部通过0.18 mm孔径的样品筛,得到均匀的辣椒粉末,室温下

保存,备用。

1.2.2 辣椒素和二氢辣椒素UPLC图谱

1.2.2.1 色谱条件

色谱柱为AgiLent EcLipse XDB-C₁₈柱(50 mm×2.1 mm,1.8 μm),流动相为甲醇-水(70:30),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为280 nm,进样量为1.0 μL,运行时间为5 min。

1.2.2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取辣椒素和二氢辣椒素对照品10 mg,甲醇溶解,配制成浓度为1 mg/mL的对照品母液冷藏备用;再分别吸取一定量对照品母液,配制成混合对照品储备液,密封,-20 ℃下保存备用。

1.2.2.3 供试品溶液的制备

分别取各时期干辣椒胎座适量,使用万分之一电子天平精密称量辣椒粉末0.002 g,倒入离心管中,加入甲醇1 mL,盖塞密封,称量并记录,超声30 min,自然降温,第二次称量离心管内剩余总重量,加甲醇补足蒸发缺失的重量,摇匀,0.2 μm滤膜过滤,取过滤液作为供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 重复性试验

取制备好的样品6份,按1.2.2.3方法制备供试品溶液,按照2.2.1色谱条件进样分析,进行重复性试验。测定各色谱峰的峰面积,计算RSD,2种成分RSD分别为2.05%、0.89%,表明方法的重复性良好。

2.2 稳定性试验

取供试品溶液,按照1.2.2.1色谱条件在0、2、4、8、12、24 h进样分析,记录色谱图,测定各色谱峰的峰面积,计算2种成分RSD分别为1.18%、1.67%,表明供试品溶液中2种成分在24 h内稳定。

2.3 加标回收率试验

取1.2.2.2对照品储备液,配制成辣椒素和二氢辣椒素的混合对照品溶液,分别精密量取混合对照品溶液1.0 mL和已知浓度的供试品溶液1.0 mL 6份,置于10 mL容量瓶中,以超纯水定容,制备6份加样回收样品。按1.2.2.1色谱条件测定色谱峰峰面积,分别计算回收率。辣椒素和二氢辣椒素的平均回收率分别为98.2%、105.5%,RSD分别为2.24%、3.15%。

2.4 线性关系考察

精密吸取1.2.2.2对照品储备液,配制成含辣椒素和二氢辣椒素的质量浓度分别为0.5、1、2、

5、10、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$ 的梯度混合对照品溶液,以甲醇稀释,得到系列对照品溶液。采用外标法定量,自动进样器进样,测定峰面积,以浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,峰面积($\text{mAU}\times\text{S}$)为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,得回归方程:辣椒素 $Y=1.153\ 3X+0.637\ 1(r=0.999\ 8)$,二氢辣椒素 $Y=0.985\ 8X+0.482\ 1(r=0.999\ 8)$,结果表明,0.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 辣椒素和二氢辣椒素浓度和峰面积呈良好的线性关系。

2.5 辣椒素和二氢辣椒素定量测定

按照1.2.2.1色谱条件,分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各2 μL ,自动进样器进样,记录色谱图,试验重复3次。采用Office 2003和SPSS 13.0进行数据分析处理及图表制作。对照品和京椒一号开花后25、40、50 d UPLC图谱见图1。结果表明,辣椒素出峰保留时间为0.8 min,二氢辣椒素出峰保留时间为1.1 min。辣椒素和二氢辣椒素峰形左右对称,辣椒素的峰形较窄,说明辣椒素与二氢辣椒素的分

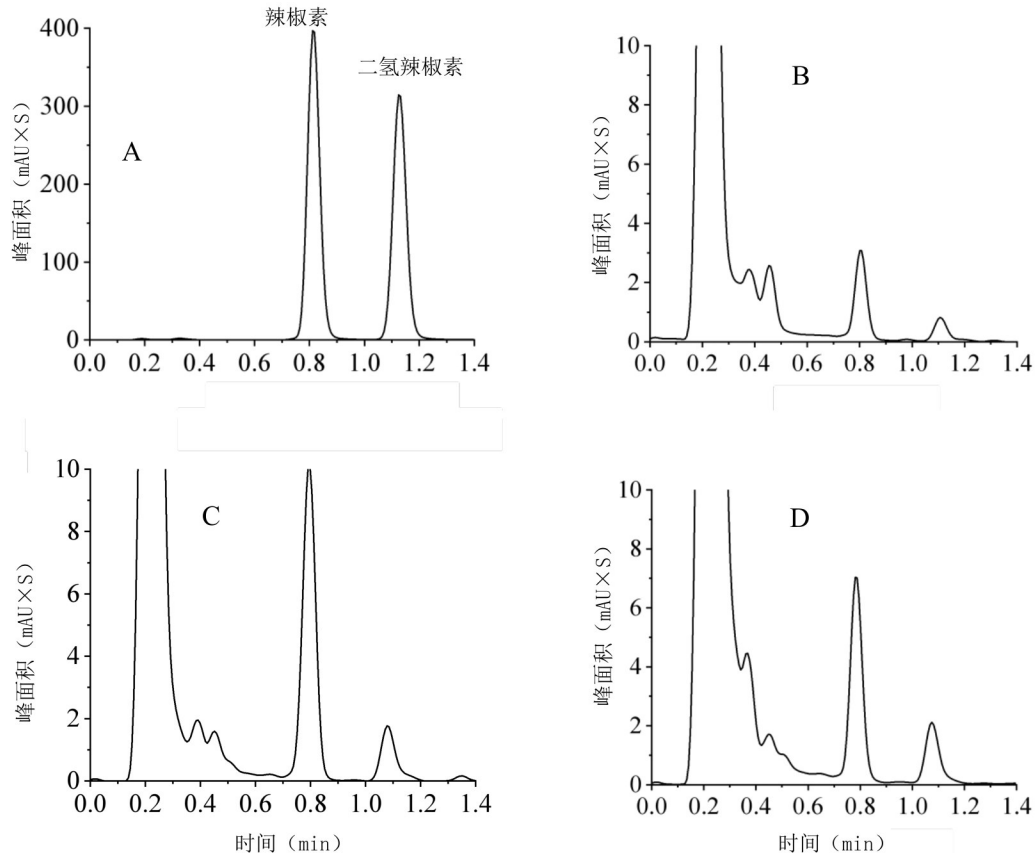


图1 对照品(A)和京椒一号25 d、40 d和50 d(B、C、D) UPLC色谱图

离度好,没有其他峰干扰,说明在此色谱条件下辣椒素和二氢辣椒素与其他成分分离度良好。

分别取京椒一号开花后15、20、25、30、35、40、45、50 d胎座部分,按1.2.2.3方法制备供试品溶液,在1.2.2.1色谱条件下进样,记录色谱峰面积,以外标法计算每份样品中辣椒素和二氢辣椒素2种指标成分的含量,测定结果见表1。结果表

明,京椒一号辣椒素和二氢辣椒素含量均表现为先增加后下降的变化趋势,15、20 d辣椒素和二氢辣椒素含量变化较小,差异不显著,25、30、35、40、45、50 d均表现出抛物线状含量变化趋势,最高点均出现在开花后40 d,达到显著水平,说明辣椒素和二氢辣椒素含量在果实转红之前达到最高,转红后含量下降。

表1 京椒一号15、20、25、30、35、40、45、50 d胎座部分辣椒素与二氢辣椒素含量

含量(mg/g)	京椒一号胎座							
	15 d	20 d	25 d	30 d	35 d	40 d	45 d	50 d
辣椒素	0.533 8a	0.568 5a	0.623 6a	0.945 5b	1.432 6b	1.773 4c	1.554 3b	1.002 6b
二氢辣椒素	0.134 5a	0.218 7a	0.230 9b	0.298 6b	0.322 3b	0.478 1c	0.426 7c	0.387 2b

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), $n=3$

3 讨论与结论

本试验建立了UPLC法同时测定辣椒素和二氢辣椒素2种指标成分的方法,并对京椒一号不同生长期胎座部分进行辣椒素和二氢辣椒素含量的测定。由于采用1.8 μm 的AgiLent EcLipse XDB-C₁₈色谱柱,具有较高的分析通量,良好的准确度、精密度和可靠性,方法简便,分析时间短,全部出峰时间仅为5 min,相比普通高效液相色谱法而言,每个样品节约10 min,提高了测定效率,在大批量的样品分析中能节省大量的时间和成本,具有较强实际应用价值。同时溶剂消耗少,不仅适用于园艺作物次生代谢物检测,在中药复方多指标成分的定量检测方面也有较好应用^[9]。

在样品取样方面,因辣椒胎座维管束中含有大量粗纤维,如果取样时粗纤维比例较多,对检测结果会有影响。本研究结果表明,在辣椒生长发育过程中,辣椒素和二氢辣椒素含量变化差异较大,前期含量低,后期含量较高,特别是开花后25、30、35、40、45、50 d,表现出抛物线状变化趋势,在40 d含量达到最高峰。对辣椒素和二氢辣椒素含量的动态变化分析为后续辣椒素代谢机制调控研究奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] 李倩. 辣椒酰基辅酶A合成酶基因的挖掘及其与辣椒素合成关系的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [2] Estrada B, Bernal M A, Diazi J, et al. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annuum* L. in relation to fruiting[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 1188-1191.
- [3] 毛光志, 刘彦珍, 李奇阳. 激素和外植体对辣椒愈伤组织诱导的影响[J]. 东北农业科学, 2013, 38(1): 72-74.
- [4] 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): 244-247.
- [5] 崔桂娟, 谢秋涛, 张群, 等. 辣椒中辣椒素提取方法与应用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 306-311.
- [6] 李小沛, 张亚玉, 赵立春, 等. 正交试验优选白花延龄草薯蓣皂苷元提取工艺研究[J]. 东北农业科学, 2018, 43(3): 56-60.
- [7] 刘洁, 周梦鸽, 文甜甜. UPLC法测定加味逍遥提取物及制剂中柴胡皂苷b₂含量研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(10): 68-71.
- [8] 韩燕全, 洪燕, 高家荣, 等. 基于UPLC特征指纹图谱和指标成分定量测定研究炮姜的炮制工艺[J]. 中草药, 2013, 44(1): 42-47.
- [9] 侯晓芳, 施迎娣, 王嗣岑. 中药及保健品中非法添加物的分析技术研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(1): 33-40.

(责任编辑: 王昱)

(上接第124页)

- [11] Tang Y L, Ma X, Li M, et al. The effect of temperature and light on strawberry production in a solar greenhouse[J]. Solar Energy, 2020, 195: 318-328.
- [12] Rachael W, Wu B S, Sarah M, et al. A review of strawberry photobiology and fruit flavonoids in controlled environments[J]. Frontiers in Plant Science, 2021: 611893.
- [13] 郭宏亮, 黄帅, 聂楚楚, 等. 基于分光吸收特性的辣椒叶片叶绿素含量测量方法研究[J]. 东北农业科学, 2021, 46(5): 82-86.
- [14] Mikko T, Michele G, Markus N, et al. Regulation of the photosynthetic apparatus under fluctuating growth light[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367(1608): 3486-3493.
- [15] Wang X Y, Xu X M, Cui J. The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of *Cucumis sativus* grown under weak light[J]. Photosynthetica, 2015, 53(2): 213-222.
- [16] Kochetova G V, Avercheva O V, Bassarskaya E M, et al. Light quality as a driver of photosynthetic apparatus development[J]. Biophysical Reviews, 2022, 14(4): 779-803.
- [17] 吴鹏飞, 王丽娟, 刘昭, 等. LED补光对设施草莓生长及果实品质的影响[J]. 北方园艺, 2016(21): 48-50.
- [18] 岳高峰, 王丽萍, 韩志强. 不同补光时长对草莓开花及产量品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(18): 144-148.
- [19] 杨肖芳, 张豫超, 苗立祥, 等. LED补光对不同设施栽培草莓品种营养生长与果实品质的影响[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(4): 864-869.
- [20] Smith B J, Stafne E T, Sakhanokho H F, et al. Intensity of Supplemental Greenhouse Lighting Affects Strawberry Plant Growth, Anthracnose Infection Response, and Colletotrichum Pathogen Development in Culture[J]. HortScience, 2023, 58(1): 127-133.

(责任编辑: 范杰英)