

## 辣椒生物碱的高速逆流色谱分离及抗炎活性测定

陈田<sup>1</sup>, 商婷婷<sup>1</sup>, 何珍<sup>1</sup>, 崔亚丽<sup>1</sup>, 陆英<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 以干辣椒为材料, 正己烷为溶剂, 提取辣椒中的生物碱, 采用高速逆流色谱法进行分离、纯化, 利用质谱和核磁共振鉴定化合物的结构, 测定其抗炎活性。结果表明: 采用正己烷、乙酸乙酯、甲醇、水、冰乙酸的体积比 15 : 15 : 20 : 20 : 7.5 为溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 流速 2 mL/min, 主机转速 850 r/min, 分离温度 25 °C, 检测波长为 270 nm, 300 min 内连续 2 次进样, 每次进样 300 mg, 获得 22 mg、纯度为 98.2% 的化合物 1, 16 mg、纯度为 98.0% 的化合物 2; 经质谱及核磁共振鉴定, 化合物 1 为二氢辣椒素, 化合物 2 为辣椒素; 二氢辣椒素、辣椒素对巨噬细胞 RAW264.7 的活力没有影响, 对巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的半抑制浓度分别为 (42.66±4.88)、(25.68±3.86) μmol/L, 明显低于阳性对照吲哚美辛 ((127.88±2.45) μmol/L), 辣椒素和二氢辣椒素对巨噬细胞 RAW264.7 的抗炎作用均明显强于吲哚美辛, 且辣椒素的抗炎效果好于二氢辣椒素。

**关键词:** 辣椒; 高速逆流色谱; 辣椒碱; 抗炎活性

中图分类号: S641.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)01-0056-06

## Separation of capsaicinoids from chili (*Capsicum annuum* L.) by high-speed counter-current chromatograph and determination of anti-inflammatory activity

CHEN Tian<sup>1</sup>, SHANG Tingting<sup>1</sup>, HE Zhen<sup>1</sup>, CUI Yali<sup>1</sup>, LU Ying<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients From Botanicals, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** Capsaicin and dihydrocapsaicin were extracted from dry chili with the solvent of n-hexane as and separated by high-speed countercurrent chromatography. Chemical structures of capsaicin and dihydrocapsaicin were determined by LC-MS and NMR. Anti-inflammatory activity of the two compounds were evaluated by examining the effect on NO release of RAW264.7 macrophages. The result showed that the best solvent system was n-hexane: ethyl acetate: methanol: water: ice acetic acid = 15 : 15 : 20 : 20 : 7.5 (V/V). The upper phase was used as the stationary phase and the lower phase was used as the mobile phase, which was performed at a flow rate of 2 mL/min. The apparatus rotated at 850 r/min, detected at 270 nm and the separation temperature was 25 °C. Within 300 min, the crude extract was injected for twice with 300 mg at each time. 22 mg compound 1 with a purity of 98.2% and 16 mg compound 2 with a purity of 98.0% were obtained. The mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR) indicated that compound 1 was dihydro capsaicin and that compound 2 was capsaicin. The  $IC_{50}$  inhibitory effects of dihydrocapsaicin and capsaicin on the NO release of RAW264.7 macrophages were (42.66 ± 4.88) and (25.68 ± 3.86) μmol/L, respectively, both were lower than that of the positive control indomethacin (127.88 ± 2.45) μmol/L. Therefore, the anti-inflammatory effect of capsaicin was the best, dihydrocapsaicin second and indomethacin the worst.

**Keywords:** capsicum; high-speed counter-current chromatograph; capsaicinoids; dihydro capsaicin

辣椒生物碱目前已知的成分约 19 种, 其中辣椒素和二氢辣椒素占辣椒碱类化合物总量的 90% 以上<sup>[1-3]</sup>。研究表明, 辣椒素可阻止有毒物质侵害人体细胞 DNA, 降低细胞癌变发生<sup>[4]</sup>, 保护心血管<sup>[5]</sup>, 抗氧化<sup>[6]</sup>, 抑菌, 加快脂肪代谢与分解, 促进能量消耗<sup>[7]</sup>, 对三叉神经痛<sup>[8]</sup>、糖尿病性神经痛有显著疗效; 可防治动物的腹泻、炎症等疾病<sup>[9]</sup>; 同时, 辣椒素作为新型绿色农药, 可用于水果、蔬菜及谷物害虫的防治<sup>[10]</sup>。近年来, 国内外对辣椒生物碱的提取、富集及纯化等方面的研究较多<sup>[11-13]</sup>, 辣椒生物碱各单体组分结构及理化性质非常相似, 如辣椒素和二氢辣椒素只是碳链第 6 位单双键的差别<sup>[9]</sup>, 因此分离难度较大。目前, 对辣椒生物碱单体的制备主要采用制备液相、薄层色谱、硅胶柱层析、纸色谱等, 这些方法存在工序复杂繁琐, 重现性差, 制备量小等缺点。文献[14]中运用高速逆流色谱方法分离辣椒素, 但样品前处理需经过提取、大孔吸附树脂纯化等过程, 操作复杂, 损耗多, 成本高。本研究中, 以干辣椒为材料, 采用简单的样品前处理方法, 筛选并优化高速逆流分离体系, 同时采用连续进样方式, 实现辣椒生物碱中 2 种主要生物碱的快速制备, 并对 2 个化合物的抗炎活性进行初步研究, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试红干辣椒购于湖南省吉首市; 巨噬细胞 RAW264.7 购买于暨南大学。

主要试剂: 乙酸、正己烷、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司产品); 乙腈色谱醇(天地公司产品); DMEM 培养基、新生牛血清(Gibco 产品); 青-链霉素(Hyclone 产品)、胎牛血清(杭州四季青公司产品); MTT、DMSO(Sigma 产品); Griess 试剂(上海碧云天生物技术有限公司产品)。

主要仪器与设备: MODULYOD-230 冷冻干燥机(Thermo Fisher Scientific, 美国); HPLC-20A 高效液相色谱(Shimadzu, 日本), 色谱柱 GL Science WondasilTM C<sub>18</sub>(5 μm, 4.6 mm×250 mm); 高速逆流色谱(TBE-300A 聚四氟乙烯柱, 内径 1.6 mm, 柱容积 280 mL, 转速 0~1 000 r/min, 上海同田公司);

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific, 美国); CKX41 倒置显微镜(Olympus, 日本); MK3 型酶标仪(Bio-Rad, 芬兰); Agilent 1260 UPLC-G 6530 QTOF 质谱联用仪(Agilent, 美国); Bruke 400M 核磁共振仪(Bruke, 瑞士)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 辣椒生物碱提取溶剂的确定

取辣椒粉, 分别用甲醇、乙醇、乙酸乙酯、正己烷等不同极性溶剂对红辣椒原料进行提取。提取液进行 HPLC 分析。流动相 A 为 0.2% 磷酸, 流动相 B 为乙腈。梯度洗脱: 0~5 min, 50%→50% B; 5~20 min, 50%→70% B; 流速 1 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 280 nm。根据色谱峰的 UV 光谱特征确定目标化合物, 以 HPLC 图谱选择最佳提取溶剂。

#### 1.2.2 辣椒生物碱的高速逆流色谱(HSCCC)分离

1) 粗提物的制备。取 0.5 kg 辣椒粉, 采用 1.2.1 中确定的溶剂为提取剂, 60 °C 下回流浸提 1 h, 过滤, 滤渣再次在同等条件下浸提 2 次, 合并滤液, 40 °C 减压浓缩至膏状, 得粗提物。

2) 最佳溶剂体系的选择。设正己烷、乙酸乙酯、甲醇、水、冰乙酸体积比分别为 15 15 20 20 4、15 15 20 20 3.5、10 15 20 20 4、15 15 20 20 6、15 15 20 20 7.5, 振摇后静置分层。移取 3 mL 下相加入少量上述膏状粗提物, 用等体积上相进行萃取, 分别测定萃前和萃后下相中目标峰面积, 按下式计算出各组分的分配系数。选择  $K$  值适合的溶剂体系作为 HSCCC 的溶剂体系。 $K$  值的计算:  $K = \frac{S_1 - S_2}{S_2}$ 。式中  $K$  为各组分分配系数;  $S_1$  为萃取前的目标峰面积;  $S_2$  为萃取后的目标峰面积。

3) HSCCC 分离效果的考察。选取上述确定的最佳溶剂体系, 静置过夜, 两相分离后超声脱气 30 min。上相作固定相, 下相作流动相。将固定相以 20 mL/min 的流速泵满管路, 850 r/min 正转, 流速 2 mL/min 的条件泵入流动相, 温度 25 °C, 检测波长 280 nm, 计算保留率  $P$ 。取 40 mL 下相溶解膏状粗提物 600 mg, 第 1 次进样 20 mL 后进行数据采集, 150~160 min, 进行第 2 次进样(20 mL)。根据色谱图分步收集 110~130、138~159、251~271、280~299 min

时的流出物,合并相同化合物流出液,55℃减压浓缩,冷冻、干燥,得干粉。取干粉,加少量甲醇溶解,HPLC进样,采用峰面积归一法计算组分纯度。

$$P = \frac{V_1 - V_2}{V_3} \times 100\%$$

式中: $P$ 为保留率; $V_1$ 为总体积;

$V_2$ 为推出固定相体积; $V_3$ 为管路体积。

4) 化合物结构的鉴定。制备所得的2个化合物通过质谱和核磁共振确定结构。

### 1.2.3 化合物抗炎活性的测定

1) 细胞培养。通过脂多糖(LPS)诱导构建炎症模型。设以下处理:正常对照组(细胞);PS模型组(细胞+LPS);试验组1(细胞+LPS+化合物1);试验组2(细胞+LPS+化合物2);阳性对照组(细胞+LPS+吲哚美辛)。巨噬细胞RAW264.7采用DMEM培养基(含10%小牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL)培养,置于37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中,根据细胞的生长状态,每1~3 d换1次培养液。

2) 细胞活力的检测。采用MTT检测细胞活力。取对数生长期的巨噬细胞RAW264.7以4×10<sup>4</sup>个/孔板铺于96孔板,100 μL/孔,培养箱中培养24 h,模型组和试验组均加100 ng/mL LPS,1 h后,试验组1、试验组2分别加化合物1、化合物2。2种化合物设置6个浓度,分别为3.1、6.3、12.5、25、50、100 μmol/L,吲哚美辛试验组浓度为10 μmol/L。每个浓度3个复孔,培养48 h。移除培养基,加入30 μL MTT,继续培养4 h,弃去上清液,加200 μL

DMSO溶解反应产物,避光轻微振荡10 min,待结晶完全溶解后,用酶标仪在波长570 nm处测定各孔吸光度值,计算细胞存活率。

3) NO释放量的测定。采用Griess法测定NO释放量。培养及铺板方法同细胞活力检测中的方法。模型组和试验组均加100 ng/mL LPS,1 h后,试验组1、2分别加化合物1、化合物2。2种药物设置6个浓度,分别为3.1、6.3、12.5、25、50、100 μmol/L,吲哚美辛浓度为10 μmol/L,每个浓度3个复孔,培养48 h。用DMEM稀释NO检测试剂盒中的标准品NaNO<sub>2</sub>,分别配制成50 μL 0、1、2、5、10、20、40、60、100 μmol/L的标准品溶液。孔板在培养箱中继续培养24 h,室温放置10 min,采用Griess法,各孔均加等体积的Griess试剂,用酶标仪540 nm处测定各孔吸光度值,参照标准品的标准曲线及回归方程求出待测样本NO浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取溶剂对辣椒生物碱提取效果的HPLC分析结果

在1.2.1条件下对提取液进行HPLC分析,结果显示正己烷提取效果最佳,杂峰少,HPLC图谱(图1)显示主要有2个色谱峰,在227、280 nm有较大吸收,符合辣椒生物碱的UV光谱特征,确定为辣椒生物碱,故选择以正己烷为提取溶剂。

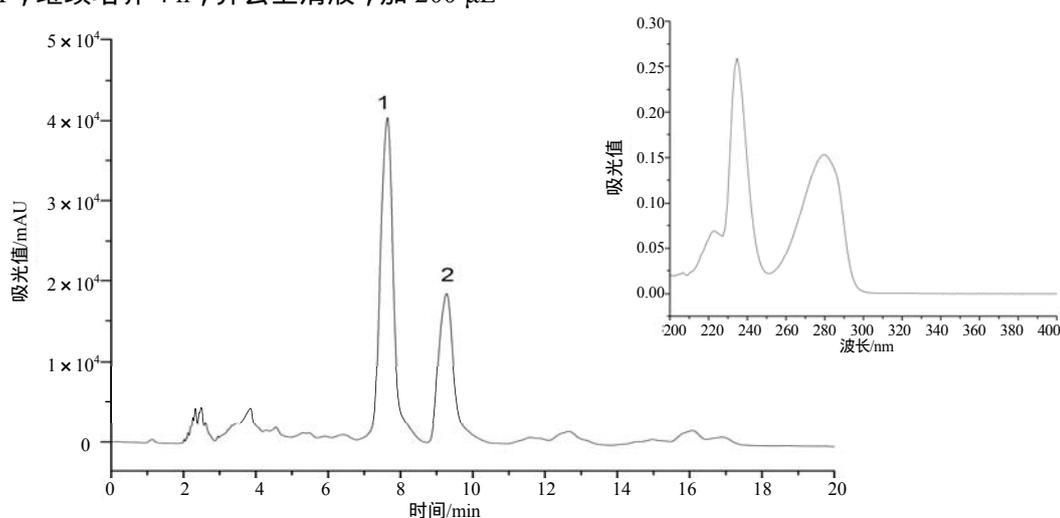


图1 正己烷提取物的HPLC图及UV光谱图

Fig.1 HPLC chromatogram and UV spectrum of extract obtained by *n*-hexane

## 2.2 辣椒生物碱的高速逆流色谱(HSCCC)分离结果

### 2.2.1 HSCCC 两相溶剂体系的确定

多个不同配比的溶剂体系的  $K$  值测定结果(表 1)

表 1 不同溶剂体系的  $K$  值及分离度

Table 1  $K$ -values and resolutions of the compounds in different two-phase solvent systems

体系	正己烷		乙酸乙酯		$K$ 值	分离度		
	甲醇	水	冰乙酸(V/V)			组分 I	组分 II	
1	15	15	20	20	4	3.68	5.34	1.45
2	15	15	20	20	3.5	3.70	5.70	1.54
3	10	15	20	20	4	3.69	5.94	1.61
4	15	15	20	20	6	2.10	2.90	1.38
5	15	15	20	20	7.5	1.80	2.99	1.66

表明,体系 5 即正己烷、乙酸乙酯、甲醇、水、冰乙酸体积比为 15 15 20 20 7.5 时,化合物 1、化合物 2 的  $K$  值较小,分离度值最大,可作为后续分离体系。

### 2.3 HSCCC 分离条件优化及分离效果

2 次进样收集的流出液 I、II, HSCCC 分离色谱图见图 2。经 HPLC 检测分别为化合物 1、化合物 2, 见图 3、图 4。得到纯度为 98.2% 的化合物 1 干粉 22 mg, 纯度为 98.0% 的化合物 2 干粉 16 mg。

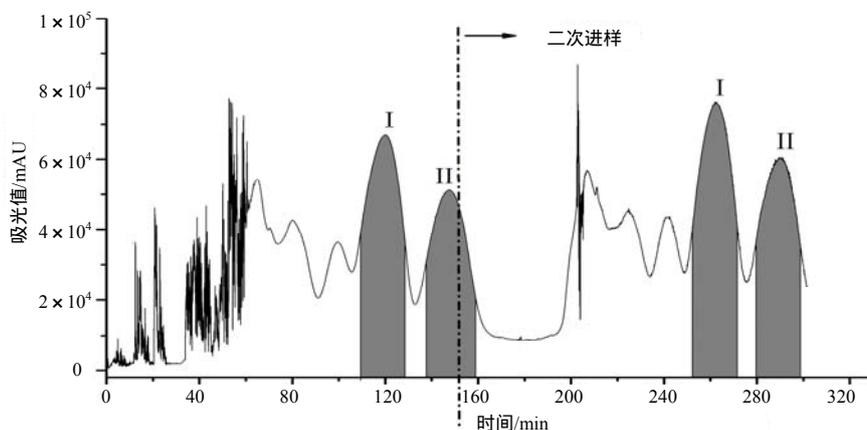


图2 HSCCC分离色谱图

Fig.2 HSCCC chromatogram of the purification of capsaicinoids from capsicum

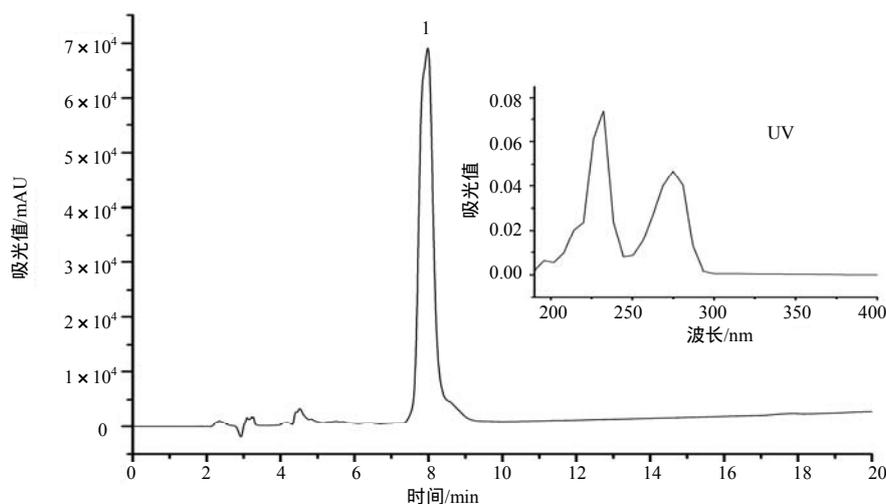


图3 化合物1的 HPLC 检测图谱及UV图

Fig.3 HPLC chromatogram and UV spectrum of compound 1

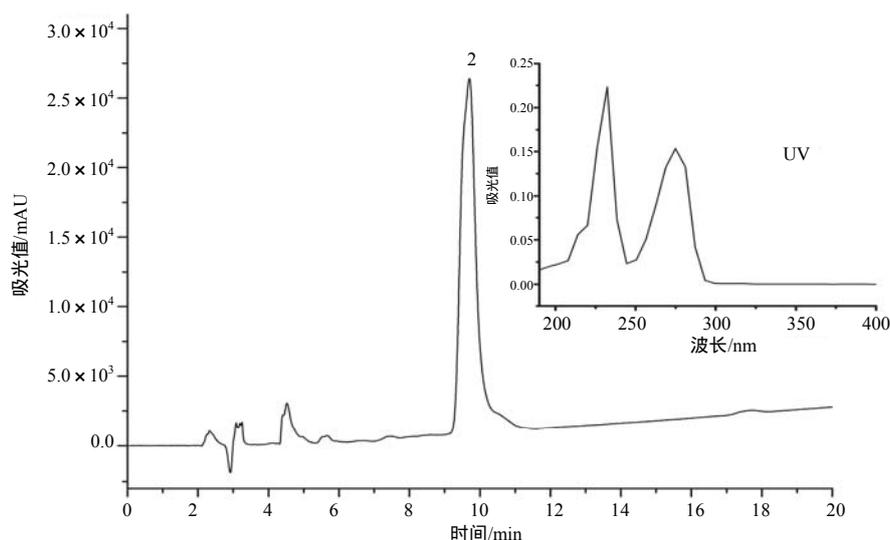


图4 化合物2的HPLC图和UV光谱图

Fig.4 HPLC chromatogram and UV spectrum of compound 2

## 2.4 化合物结构的鉴定结果

得到的化合物 1、化合物 2 均为白色粉末，正离子模式 ESI-MS， $m/z$  分别为 308.226  $7[M+H]^+$ 、

306.216  $2[M+H]^+$ ，其核磁共振 H 谱与 C 谱信息如表 2 所示。结合文献[15]，确定化合物 1、化合物 2 分别为二氢辣椒素和辣椒素，其结构式如图 5 所示。

表2 二氢辣椒素和辣椒素核磁共振H谱与C谱信息

Table 2  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic datas for capsaicin and dihydrocapsaicin.

	化合物 1			化合物 2		
	$^{13}\text{C}$ NMR	DEPT	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	DEPT	$^1\text{H}$ NMR
1	130.577	C	—	131.545	C	4.33 (d, 5.4)
2	110.840	CH	6.76(s)	112.489	CH	6.79(d,1.8)
3	146.842	C	—	148.992	C	—
4	145.281	C	—	146.814	C	—
5	114.507	CH	6.84(d,8.4)	116.088	CH	6.84(d,8.4)
6	120.967	CH	6.74(d,8.4)	121.411	CH	6.74(dd,1.8,8.4)
7	43.685	CH <sub>2</sub>	4.33(d,5.4)	43.956	CH <sub>2</sub>	4.33 (d, 5.4)
8	—	—	5.93(br s)	—	—	5.90 (br s)
9	173.020	C	—	175.945	C	—
10	37.037	CH <sub>2</sub>	2.19(t,7.8)	36.979	CH <sub>2</sub>	2.20 (t, 7.8)
11	25.944	CH <sub>2</sub>	1.64(q,7.2)	26.585	CH <sub>2</sub>	1.64 (q, 7.8)
12	29.509	CH <sub>2</sub>	1.31(m)	30.291	CH <sub>2</sub>	1.38 (q, 7.8)
13	29.767	CH <sub>2</sub>	1.29(m)	32.269	CH <sub>2</sub>	1.98 (q, 7.2)
14	27.382	CH <sub>2</sub>	1.26(m)	127.863	CH	5.35 (m)
15	39.099	CH <sub>2</sub>	1.13(m)	139.100	CH	5.30 (m)
16	28.088	CH	1.50(m)	33.250	CH	1.29 (s)
17	22.767	CH <sub>3</sub>	0.84(d,6.0)	23.108	CH <sub>3</sub>	0.95 (d, 6.6)
18	22.767	CH <sub>3</sub>	0.85(d,6.0)	23.108	CH <sub>3</sub>	0.94 (d, 6.6)
OCH <sub>3</sub>	56.091	CH <sub>3</sub>	3.85(s)	56.355	CH <sub>3</sub>	3.85 (s)
OH	—	—	5.89(br s)	—	—	5.86 (br s)

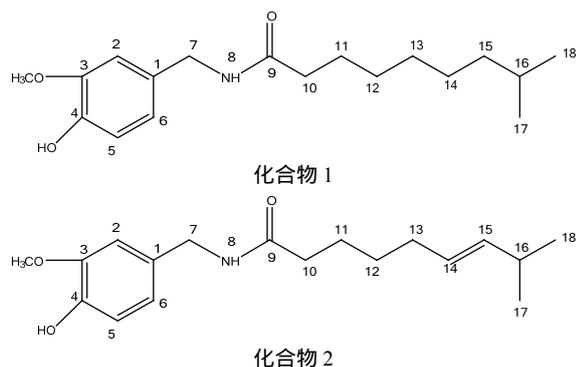


图5 化合物1、化合物2的化学结构式

Fig. 5 Structures of compound 1 and 2

## 2.5 2 个化合物的抗炎活性

1) 化合物对细胞活力的影响。经二氢辣椒素、辣椒素处理后的巨噬细胞 RAW264.7 活力与空白组、模型组无明显差异,且随着二氢辣椒素、辣椒素浓度的增高,巨噬细胞 RAW264.7 的活力基本不变。由表 3 可知,在 3.1 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  范围内,二氢辣椒素和辣椒素对巨噬细胞 RAW264.7 活力没有影响,对巨噬细胞 RAW264.7 没有毒性。

表3 不同浓度的二氢辣椒素和辣椒素对RAW264.7细胞活力的影响

Table 3 Effect of different concentrations of capsaicin and dihydrocapsaicin on RAW264.7 cell viability

各浓度组别	RAW264.7 存活率%	
	化合物 1	化合物 2
100.0 $\mu\text{mol/L}$	99.8	99.4
50.0 $\mu\text{mol/L}$	96.2	97.6
25.0 $\mu\text{mol/L}$	102.7	99.4
12.5 $\mu\text{mol/L}$	100.8	100.5
6.3 $\mu\text{mol/L}$	97.7	101.9
3.1 $\mu\text{mol/L}$	100.7	101.9
空白组	100.0	100.0
模型组	100.6	103.6

2) 化合物对炎症细胞 NO 释放量的影响。二氢辣椒素、辣椒素和阳性对照吲哚美辛对巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的  $IC_{50}$  分别为(42.66 $\pm$ 4.88)、(25.68 $\pm$ 3.86)、(127.88  $\pm$  2.45)  $\mu\text{mol/L}$ ; 因此,辣椒素和二氢辣椒素的抗炎作用均明显强于吲哚美辛,且辣椒素的抗炎效果好于二氢辣椒素。

## 3 结论

通过正己烷回流提取干辣椒粉的生物碱,采用正己烷、乙酸乙酯、甲醇、水、冰乙酸的体积比 15 : 15 : 20 : 20 : 7.5 为溶剂系统,上相为固定相,下相为流动相,流速 2 mL/min,主机转速 850 r/min,分离温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长为 270 nm,600 mg 样品

采用高速逆流色谱分 2 次连续进样,获得 22 mg、纯度为 98.2%二氢辣椒素和 16 mg、纯度为 98.0%的辣椒素。二氢辣椒素、辣椒素对巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的  $IC_{50}$  分别为(42.66 $\pm$ 4.88)、(25.68 $\pm$ 3.86)  $\mu\text{mol/L}$ ,明显低于阳性对照吲哚美辛;因此,辣椒素和二氢辣椒素对巨噬细胞 RAW264.7 的抗炎作用均明显强于吲哚美辛,且辣椒素的抗炎效果好于二氢辣椒素。

## 参考文献:

- [1] 张玲,吴凤娜.辣椒的营养保健功能及功能成分研究进展[J].山东食品发酵,2011(4):39-42.
- [2] 詹家荣.辣椒素的制备技术以及应用前景[J].化学试剂,2010,32(5):28-30.
- [3] 康雅.辣椒提取物的分离纯化及生物活性研究[D].重庆:西南大学,2011.
- [4] 吴艳阳,陈开勋,邵纪生.辣椒素的制备工艺及分析方法[J].化学世界,2004,45(4):218-221.
- [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]. British Journal of Pharmacology, 2004, 142(3): 435-442.
- [6] 党元野,陈修平,张庆文,等.辣椒碱的药理作用研究进展[J].中药药理与临床,2009(4):84-89.
- [7] 郭丽,王巧珍,朱林.辣椒碱抗病原菌活性及其在番茄酱防腐中的应用[J].合肥工业大学学报(自然科学版),2006,29(1):117-121.
- [8] HURTADO-LÓPEZ P, MURDAN S. Formulation and characterisation of zein microspheres as delivery vehicles[J]. Journal of Drug Delivery Science & Technology, 2005, 15(4): 267-272.
- [9] TANDA R, LEWIS G A, BADGER G B, et al. Topical capsaicin in painful diabetic neuropathy. Effect on sensory function[J]. Survey of Anesthesiology, 1992, 36(5): 311.
- [10] 艾秀珍.辣椒碱类化合物及辣椒碱单体的提取与纯化[D].杭州:浙江大学,2007.
- [11] 张正海,毛胜利,王立浩,等.辣椒的辣味遗传控制与辣椒素生物合成研究进展[J].园艺学报,2014,41(9):1821-1832.
- [12] 吴丽威,孙颖,孙秀敏,等.无溶剂微波预处理 NaOH 溶液搅拌法提取干辣椒中的辣椒素[J].分析化学,2010,38(11):1661-1664.
- [13] 孙平,唐小华,卜庆珍,等.辣椒素提取工艺的比较[J].食品科学,2008,29(8):238-240.
- [14] 熊科,夏延斌.辣椒素提取方法研究进展[J].中国食品添加剂,2007,7(3):88-91.
- [15] LI F, LIN Y, WANG X, et al. Preparative isolation and purification of capsaicinoids from capsicum frutescens using high-speed counter-current chromatography[J]. Separation & Purification Technology, 2009, 64(3): 304-308.

责任编辑:尹小红

英文编辑:梁和