

# OPTIMIZING OF RAPID, LOW-COST AND SENSITIVE METHOD FOR DETECTION OF CAPSAICIN IN CULTIVARS OF PEPPERS

## OPTIMALIZACE RYCHLÉ, LEVNÉ A CITLIVÉ METODY PRO DETEKCI KAPSAICINU U RŮZNÝCH DRUHŮ PAPRIK

Šupálková V.<sup>1,2)</sup>, Hlávka F.<sup>1)</sup>, Stavělíková H.<sup>3)</sup>, Křížková S.<sup>2)</sup>, Adam V.<sup>2)</sup>, Horna A.<sup>4)</sup>, Havel L.<sup>1)</sup>, Kizek R.<sup>2)</sup>

<sup>1</sup>Ústav chemie a biochemie, a <sup>2</sup>Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; <sup>3</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, Oddělení genové banky, pracoviště Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice; <sup>4</sup>Radanal s.r.o., Okružní 613, 53003 Pardubice

E-mail: vevek@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

---

### ABSTRACT

The burning taste of a pepper is caused, most of all, by capsaicin (phenylalkylamide alkaloid), which has been widely using in different branches. Here, we aimed on capsaicin determination in fruit parts (ovary, upper and bottom flesh, and seeds) of different capsicum species and on study of the changes of this compound in the tissues of interest. The analysis of capsaicin was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection. The detection limit of capsaicin was about 9 nM. Based on the analysis of biological samples, pepper is hotter, pepper contains more capsaicin. We also found out that the parts of peppers cultivars fruits analysed had different content of capsicum. The highest content was determined in ovary (cultivar Takanotsume – 227 mg of capsaicin per 100 g of fresh weight – FW), the lowest one in seeds (Takanotsume – 6 mg/100 mg FW).

**Keywords:** capsaicin, electrochemical analysis, capsicum species.

### ABSTRAKT

Pálivá chuť papriky je vyvolána kapsaicinem (fenylalkylamidovým alkaloidem), který je využíván v celé řadě oblastí. Cílem naší práce bylo stanovit kapsaicin v částech plodů (semeník, dolní a dolní dužnina a semínka) různých odrůd paprik a studovat změny jeho obsahu v těchto částech. Naše analýza byla provedena pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Detekční limit použité techniky byl 9 nM kapsaicinu. Z výsledků plyne, že čím je plod pálivější, tím obsahuje i vyšší koncentraci kapsaicinu. Zjistili jsme, že jednotlivé části plodů paprik mají rozdílný obsah kapsaicinu. Nejvyšší koncentrace kapsaicinu jsou v semeníku (odrůda Takanotsume – 227 mg kapsaicinu ve 100 g svěží hmoty), nejméně kapsaicinu obsahují semínka (Takanotsume – 6 mg kapsaicinu ve 100 g svěží hmoty).

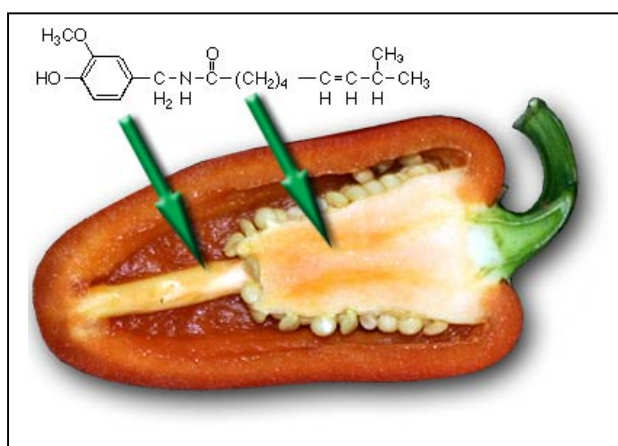
**Klíčová slova:** kapsaicin, elektrochemická analýza, paprika.

## ÚVOD

Paprika (*Capsicum*, *Solanaceae*) je jednoletá teplomilná rostlina známá již více než čtyři tisíce let pocházející, podobně jako třeba rajčata a brambory z Jižní a Střední Ameriky. Do Evropy ji přivezli Španělé, její plody se staly velmi rychle oblíbenou součástí našeho jídelníčku a jen těžko bychom se bez nich dnes obešli. Je oblíbená pro svou vůni i chuť, která je u jednotlivých botanických druhů, ale i odrůd značně odlišná – od sladké až po ďábelsky ostrou. Mletá sušená paprika je nejen pikantním kořením, ale i přírodním barvivem [1-5]. Pálivá chuť papriky je vyvolána společným účinkem asi šesti chemicky příbuzných látek ze skupiny fenylalkylamidových alkaloidů označovaných společným názvem kapsaicinoidy, z nichž nejsilnější účinky má kromě samotného kapsaicinu jeho derivát dihydrokapsaicin. Kapsaicin byl poprvé z papriky izolován v roce 1816 a za dalších třicet let dostal svoje jméno.

Papriky si kapsaicin vyvinuly jako účinnou obranu proti býložravcům (Obr.1). Pravděpodobně nejpálivějším druhem papriky je habanero (*Capsicum chinense*). Pro své vlastnosti je kapsaicin využíván v celé řadě oblastí např. proti bolestem zad nebo v pepřových sprejích sloužících k osobní obraně [6-12]. Letos v březnu byl prokázán léčebný efekt kapsaicinu na rakovinné buňky u nádoru prostaty [13].

Obr 1. Rozložení nejvyššího obsahu kapsaicinu v paprice



Cílem naší práce bylo stanovit čistý kapsaicin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) s využitím detektoru ESA (CoulochemIII). Následně pak studovat kapsaicin v reálných vzorcích paprik. Konkrétně jsme sledovali změny jeho obsahu v částech plodů (semeník, dolní dužnina, horní dužnina a semínka) různých odrůd paprik (Jubila, Novoselská Kapie, Cecei Fellallo, Takantosome, Bogyiszloi Vastaghusu). Dále jsme se zaměřili na porovnání získaných výsledků s pálivostí daného druhu papriky.

## **MATERIÁL A METODIKA**

### ***Chemikálie***

Kapsaicin byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Základní elektrolyt-acetátový pufr (0.1 M CH<sub>3</sub>COOH + 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa, pH 4.0) a ostatní použité chemikálie byly získány v čistotě ACS od společnosti Sigma Aldrich. Zásobní roztok standardu kapsaicinu 1 mg.ml<sup>-1</sup> byl připraven za využití ACS metanolu (Sigma-Aldrich, USA) a uložen ve tmě při -20 °C. Pracovní standardní roztoky byly vždy připravovány denně a to naředěním ze zásobního roztoku.

### ***pH stanovení***

Hodnota pH byla naměřena pomocí přístroje WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), který byl řízen osobním počítačem a programem (MultiLab Pilot; Weilheim, Germany). pH-elektroda (SenTix- H, pH 0–14/3M KCl) byla pravidelně kalibrována soupravou WTW pufrů (Weilheim, Německo).

### ***Příprava biologických vzorků pro stanovení kapsaicinu***

Vzorky papriky byly získány z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, Oddělení genové banky, pracoviště Olomouc, Česká republika. Z jednotlivých paprik byly připraveny vždy 4 vzorky ze semeníku, semene, dužniny horní a spodní části plodu. Bylo vždy odváženo 100 mg pletiva, která byla následně přenesena do kapalného dusíku a poté homogenizována v třecí misce s 1 ml methanolu. Získaný homogenát byl centrifugován při 4 °C, 14 000 g po dobu 20 min. (Eppendorf 5402, USA). Získaný supernatant byl využit pro vlastní detekci kapsaicinu.

### ***Elektrochemické stanovení ve stacionárním systému***

Stacionární elektrochemické stanovení kapsaicinu bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda. Referentní elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka. Základním elektrolytem byl acetátový pufr 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH + 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa, pH 4.0. Parametry CV byly následující: iniciační potenciál -0.5 V, potenciál prvního bodu obratu 1.2 V, potenciál druhého bodu obratu -0.5 V, teplota 20°C.

### ***Elektrochemické stanovení v průtokovém systému***

Analýza pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí byla provedena na přístroji CoulochemIII (ESA, Inc.). V elektrochemické cele o objemu 50 µl byly umístěna referenční hydrogenpaladiová elektroda, pomocná uhlíková elektroda a pracovní elektroda ze skelného uhlíku. Separace v reálných vzorcích byla uskutečněna na koloně Polaris C18-A, 150 × 4,6 mm, průměr částic 3 µm (Varian, Inc.) s použitím předkolony.

Dávkovací smyčkou byl aplikován vzorek o objemu 5  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze byl 0,40  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Čistý kapsaicin je elektroaktivní látka, proto jsme se v našich experimentech nejdříve zaměřili na studium základního elektrochemického chování čistého kapsaicinu pomocí cyklické voltametrie na přístroji AUTOLAB analyzátor. Charakterizace a optimalizace stanovení kapsaicinu pak byla provedena pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem ESA (HPLC-ED) nejdříve bez zařazení kolony v tzv. průtokovém systému (průtoková injekční analýza – FIA), a poté byla aplikována na vhodné chromatografické kolony.

Cyklická voltametrie je jednou ze standardních elektrochemických technik, která je velmi často používána pro studium základních elektrochemických procesů a chování [14-16]. Potvrdili jsme, že stanovovaná látka je elektroaktivní a poskytuje svůj elektrochemický signál při potenciálu okolo 0.6 V. Tyto výsledky jsme následně použili při optimalizaci stanovení kapsaicinu pomocí průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí. Ze závislosti výšky signálu a aplikovaného potenciálu jsme sestrojili hydrodynamický voltamogram, pomocí kterého jsme vybrali nejvhodnější potenciál aplikovaný na elektrody (800 mV). Dalším velmi důležitým parametrem chromatografické analýzy je výběr a složení mobilní fáze. Z našich výsledků vyplývá, že nejvhodnější mobilní fází byla směs acetátového pufru (pH 4) a methanolu v poměru 40:60 (v/v, %). Detekční limit naší techniky byl 5 pmolů kapsaicinu na nástřík (5  $\mu\text{l}$ ).

Tab. 2 Obsahy kapsaicinu v jednotlivých částech v mg/100g čerstvé hmoty u různých odrůd paprik

	semeník	dolní dužnia	horní dužnina	semínka
<b>Takanotsume (ČP)</b>	227.475	122.094	21.565	6.171
<b>Ceci Fellallo (ČP)</b>	19.314	2.662	1.830	2.246
<b>Novoselská kapie (ČP)</b>	0.704	1.138	0.809	0.614
<b>Novoselská kapie (ZP)</b>	2.148	0.935	0.818	1.063
<b>Bogyiszloi Vastaghusu (ČP)</b>	1.263	0.978	0.875	0.773
<b>Jubila (CP)</b>	1.382	1.328	1.080	0.824

ČP – červená paprika, ZP – zelená paprika

Optimalizovanou metodu jsme dále použili pro analýzu rozdílů v obsahu kapsaicinu u jednotlivých sbírkových odrůd paprik (Tab. 1). Z výsledků vyplývá, že jednotlivé části plodu papriky obsahují rozdílné množství kapsaicinu. Obecně nejvyšší koncentrace kapsaicinu jsou v semeníku a dolní dužnině, mnohonásobně nižší koncentrace jsou v horní části dužniny a

nejméně kapsaicinu obsahují semínka. Srovnání obsahů kapsaicinu u jednotlivých odrůd paprik je znázorněno v tabulce 2.

Dalším naším cílem bylo porovnat pálivost se zjištěným množstvím kapsaicinu. Nejpálivější analyzovanou odrůdou paprik byla Takanotsume. Ve vzorcích získaných z této odrůdy jsme kvantifikovali nejvíce kapsaicinu ze všech analyzovaných vzorků.

## ZÁVĚR

Obecně lze z našich výsledků usoudit, že čím je plod papriky pálivější, obsahuje i vyšší koncentraci kapsaicinu a naopak. Závěrem můžeme konstatovat, že se nám podařilo vyvinout nový způsob detekce kapsaicinu založený na použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem ESA. Námi navržený postup bude dále využit pro charakterizaci jednotlivých odrůd papriky uložených v genové bance s ohledem na obsah kapsaicinu.

## LITERATURA

- [1] V.S. Govindarajan Capsicum-Production, Technology, Chemistry, and Quality .1. History, Botany, Cultivation, and Primary Processing, Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition 22 (1985) 109-176.
- [2] V.S. Govindarajan Capsicum - Production, Technology, Chemistry, and Quality .3. Chemistry of the Color, Aroma, and Pungency Stimuli, Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition 24 (1986) 245-355.
- [3] V.S. Govindarajan Capsicum - Production, Technology, Chemistry, and Quality - .2. Processed Products, Standards, World Production and Trade, Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition 23 (1986) 207-288.
- [4] V.S. Govindarajan, D. Rajalakshmi and N. Chand Capsicum - Production, Technology, Chemistry, and Quality .4. Evaluation of Quality, Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition 25 (1987) 185-282.
- [5] V.S. Govindarajan and M.N. Sathyanarayana Capsicum - Production, Technology, Chemistry, and Quality .5. Impact on Physiology, Pharmacology, Nutrition, and Metabolism - Structure, Pungency, Pain, and Desensitization Sequences, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 29 (1991) 435-474.
- [6] S. Buratti, N. Pellegrini, O.V. Brenna and S. Mannino Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts, Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (2001) 5136-5141.
- [7] M. Contreras-Padilla and E.M. Yahia Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 2075-2079.

- [8] D.E. Henderson, A.M. Slickman and S.K. Henderson Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: A comparative study against BHT and melatonin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 2563-2570.
- [9] T. Kawada, T. Watanabe, K. Katsura, H. Takami and K. Iwai Formation and Metabolism of Pungent Principle of Capsicum Fruits .15. Microdetermination of Capsaicin by High-Performance Liquid-Chromatography with Electrochemical Detection, *Journal of Chromatography* 329 (1985) 99-105.
- [10] J. Patocka Proč paprika pálí?, *Vesmir* 84 (2005) 711-711.
- [11] A. Tiwari, M.P. Kaushik, K.S. Pandey and R.S. Dangi Adaptability and production of hottest chilli variety under Gwalior agro-climatic conditions, *Current Science* 88 (2005) 1545-1546.
- [12] J. Szolcsanyi Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology, *Neuropeptides* 38 (2004) 377-384.
- [13] A. Mori, S. Lehmann, J. O'Kelly, T. Kumagai, J.C. Desmond, M. Pervan, W.H. McBride, M. Kizaki and H.P. Koeffler Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 3222-3229.
- [14] J. Vitecek, J. Petrlova, J. Petrek, V. Adam, D. Potesil, J. Havel, R. Mikelova, L. Trnkova and R. Kizek Electrochemical study of S nitrosoglutathione and nitric oxide by carbon fibre NO sensor and cyclic voltammetry - possible way of monitoring of nitric oxide, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5087-5094
- [15] J. Petrlova, D. Potesil, R. Mikelova, O. Blastik, V. Adam, L. Trnkova, F. Jelen, R. Prusa, J. Kukacka and R. Kizek Attomole voltammetric determination of metallothionein, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5112-5119.
- [16] R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova and F. Jelen Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 19-24.

**Poděkování:** Práce na tomto projektu byla podporována granty: Radanal 1/2006, 1M06030 a Projektem Genové banky Olomouc (VURV 1/2006).