

天然结晶辣椒碱的 NMR 谱研究^{*}

林东海 吴明光 廖新丽 吴饮义

(厦门大学化学系, 厦门大学核磁共振实验室, 厦门 361005)

摘 要 用一维¹H NMR 谱、¹H-¹H COSY 谱和一维¹³C NMR 谱、DEPT 谱研究辣椒碱分子和二氢辣椒碱分子及其混合物, 得到¹H 和¹³C 的化学位移, 采用¹H NMR 谱测定天然辣椒碱中辣椒碱和二氢辣椒碱的相对含量.

关键词 ¹H 和¹³C NMR 谱, 辣椒碱, 二氢辣椒碱

1 前言

从辣椒果实中提取的天然辣椒碱含有多种辛辣成份, 具有极其复杂的生物活性, 能耗竭某些神经群中的 P-物质而起强力持续的镇痛消炎作用, 能暂时性扩张血管降低血压, 促进脂肪代谢及催泪催嚏作用^[1]. 动物药理研究表明, 辣椒碱能减轻吗啡类药物的戒断综合症^[2], 可防止阿司匹林对胃道的损伤和出血副作用^[3], 能促进经皮肤药物的吸收, 可用于治疗以疼痛为主要症状的综合症, 如严重难治性带状疱疹后神经痛, 重症风湿性关节炎, 乳腺癌和肺癌切除手术后的疼痛等^[4, 5]. 由于其复杂的生物活性和多种功效, 辣椒碱各种辛辣成份的分离提取和结构研究受到了广泛的重视. 本文作者之一(吴明光)曾提出一种多阶式分离技术, 从辣椒果实中制取分离结晶性辛辣化学成份, 并对其组成进行了鉴定和分析^[4]. 该项技术已申报专利, 但对辣椒碱分子结构的 NMR 研究尚未见报道.

天然辣椒碱有两种主要的辛辣成份: 辣椒碱和二氢辣椒碱, 具有不同的生物活性和药物功效, 结构差别仅在于酰胺基侧链的-C³-C⁴-, 辣椒碱为烯键-CH=CH-, 二氢辣椒碱为饱和键-CH₂-CH₂-, 参见图 1, 因而用一般的分析方法很难测定这两种辛辣成份的相对含量. 本文用¹H 和¹³C NMR 谱研究这两种成份的结构, 利用特征谱线测定天然辣椒碱中辣椒碱与二氢辣椒碱的相对含量.

* 收稿日期 1997-07-21 收修改稿日期 1997-09-08

国家自然科学基金资助项目

林东海, 男, 33 岁, 博士, 副教授.

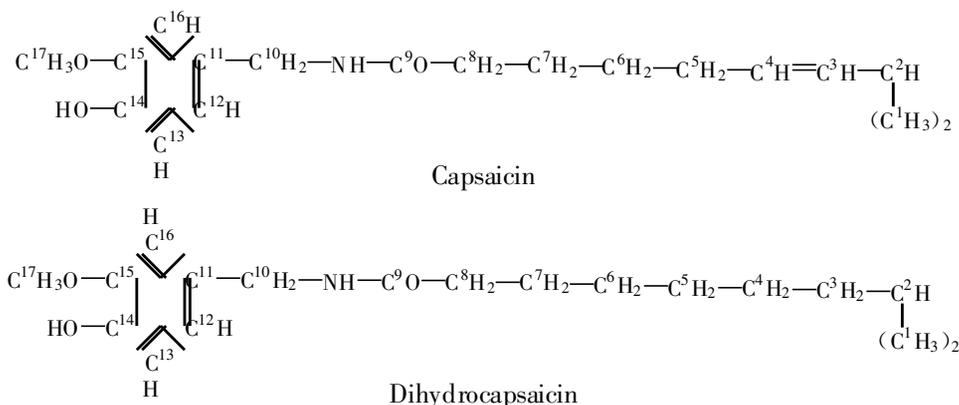


图 1 辣椒碱和二氢辣椒碱的分子结构

Fig. 1 The Molecular structures of capsaicin and dihydrocapsaicin

2 实验部分

2.1 样品制备

(1) NMR 溶剂: 含 0.03% TMS 的氘代 CDCl_3 , 室温配制样品.

(2) 标准样品: 标准辣椒碱 CAP (Capsaicin), 含量为 98%, 标准二氢辣椒碱 DCAP (Dihydrocapsaicin), 含量为 90%, 购自 Sigma Chemical Co, 天然辣椒碱 MCAP, 其中 CAP 含量为 ~65%, DCAP 含量为 ~35%, 购自 Fluka Chemic AG Co. 称取 CAP 5.20mg, DCAP 5.50mg, MCAP 5.10mg, 分别溶于 0.6mL 的 CDCl_3 中, 得到样品 CAP_S, DCAP_S, MCAP_F. 样品 MCAP_{S1} ~ MCAP_{S7} 为 CAP 标准样品与 DCAP 标准样品的混合品, 重量比值 CAP/DCAP (mg/mg) 分别为 3.46/0.99, 3.08/1.32, 2.31/1.32, 3.03/2.45, 1.54/2.64, 1.15/2.97, 0.92/3.16, 相对含量 (纯 CAP : 纯 DCAP) 分别为 3.81 : 1, 2.54 : 1, 1.91 : 1, 1.35 : 1, 1 : 1.71, 1 : 2.58, 1 : 3.43.

(3) 自制样品: 辣椒果实购自福建连城县和河南太康县. 用多阶式分离技术^[4] 从辣椒果实中分离制取天然结晶辣椒碱, 熔点为 63.5 ~ 64 °C. 称取连城天然辣椒碱 5.15mg、太康天然辣椒碱 5.30mg, 分别溶于 0.6mL 的 CDCl_3 中, 得到样品 MCAP_{连城}、MCAP_{太康}.

2.2 实验仪器

采用 Varian 公司生产的 Unity⁺-500 进行 NMR 实验, 采用 SW 宽带探头、5mm 样品管, 实验温度为 21 °C. 在射频脉冲功率 tpwr 采用 58dB 时, 对该类样品测得 ^1H 90° 脉冲宽度 ~ 8.4 μs , ^{13}C 90° 脉冲宽度 ~ 6.5 μs . 为选择合适的弛豫延迟时间以确保 ^1H 谱线强度无畸变, 用反转回法实验测得质子 T_1 弛豫时间 ~ 1.6s.

3 结果与讨论

3.1 ^1H NMR 研究

(1) 一维 ^1H NMR 谱, 采样时间 1.4s, 弛豫延迟 5s, 谱宽 4200Hz, 累加 32 次, FT 变

换点数 32k. 射频脉冲功率 58dB, 脉冲宽度 60° . FT 变换时不加任何窗函数以保证积分强度的准确性. 图 2(a), (b), (c) 分别为样品 CAP_S, DCAP_S, MCAP_F 的 ^1H NMR 谱.

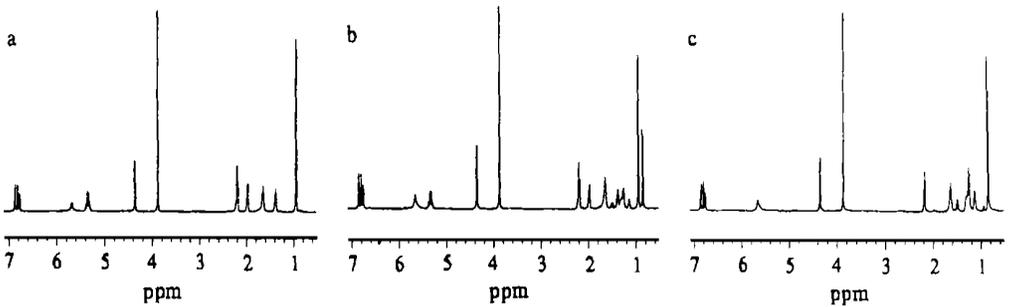


图 2 辣椒碱一维 ^1H NMR 谱 (a) 辣椒碱 CAP_S,
(b) 天然辣椒碱 MCAP_F(CAP: DCAP ~ 1.68: 1);
(c) 二氢辣椒碱 DCAP_S.

Fig. 2 $1\text{D}^1\text{H-NMR}$ spectra of capsaicins (a) capsaicin CAP_S;
(b) natural capsaicin MCAP_F(CAP: DCAP ~ 1.68: 1);
(c) dihydrocapsaicin DCAP_S.

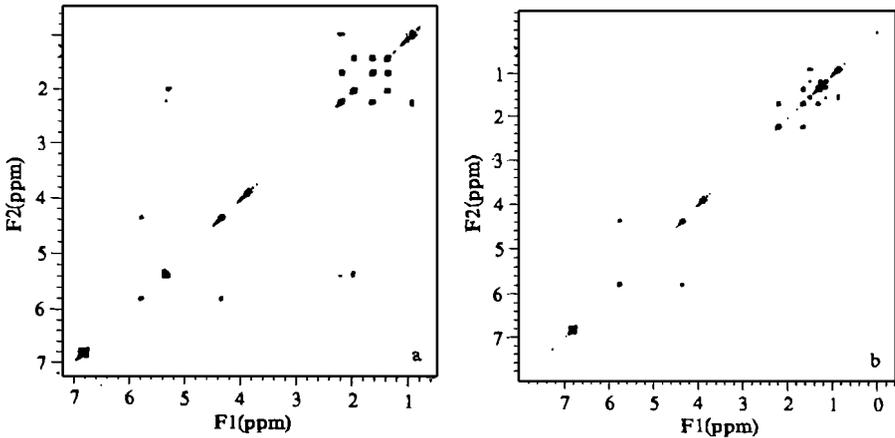


图 3 辣椒碱和二氢辣椒碱的 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱 (a) 辣椒碱 CAP_S; (b) 二氢辣椒碱 DCAP_S

Fig. 3 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectra of capsaicin and dihydrocapsaicin (a) capsaicin CAP_S; (b) dihydrocapsaicin DCAP_S.

(2) $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱: 采样时间 0.244s, 弛豫延迟 1s, t_1 维和 t_2 维谱宽均为 4200Hz, t_1 维点数 512, t_2 维点数 1024, 每个 t_1 点重复累加 8 次. FT 变换点数 2048×2048 . t_1 维和 t_2 维均加 Sine Bell 窗函数, 时间因子分别为 0.030s 和 0.122s. 图 3(a), (b) 分别为样品 CAP_S, DCAP_S 的二维 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱.

结合图 2 与图 3, 归属 CAP_S 和 DCAP_S ^1H NMR 谱线, 得到辣椒碱分子和二氢辣椒碱分子的 ^1H 质子化学位移, 列于表 1. 图 2(c) 表明辣椒碱和二氢辣椒碱苯环质子、甲氧基

质子、酰胺基质子、 C^7 位和 C^8 位质子的谱线几乎重叠, 而 C^1 位甲基质子谱线相差 0.1ppm, 可明显地从天然辣椒碱的一维 1H 谱中区别出来。酰胺基侧链上的 C^3 - C^4 位的质子谱线位置差别最大, 高达 4ppm。CAP 和 DCAP 分子中 C^2 位的质子谱线差别 0.73ppm, C^5 位质子谱线差别 0.66ppm, 它们受 C^3 - C^4 键性质的影响是比较明显的。

表 1 辣椒碱和二氢辣椒碱的 1H 与 ^{13}C 原子化学位移(ppm)

Tab. 1 1H , ^{13}C chemical shifts of capsaicin and dihydrocapsaicin(ppm)

原子位置	辣椒碱		二氢辣椒碱	
	1H	^{13}C	1H	^{13}C
C^1H_3	0.95	22.60	0.85	22.60
C^2H	2.23	30.92	1.50	27.90
C^3H	~ 5.31	138.01		
C^3H_2			1.14	38.89
C^4H	~ 5.35	126.41		
C^4H_2			1.26	27.21
C^5H_2	1.97	32.19	1.31	29.58
C^6H_2	1.38	29.22	1.32	29.32
C^7H_2	1.65	25.24	1.65	25.77
C^8H_2	2.20	36.65	2.20	36.83
C^9O		172.85		172.95
NH	5.68		5.67	
$C^{10}H_2$	4.35	43.47	4.36	43.47
C^{11}		130.24		130.28
$C^{12}H$	6.76	120.70	6.77	120.71
$C^{13}H$	6.86	114.31	6.87	114.31
C^{14}		145.05		145.04
C^{15}		146.65		146.64
$C^{16}H$	6.81	110.60	6.81	110.61
$C^{17}H_3O$	3.88	55.86	3.88	55.86

3.2 ^{13}C NMR 研究

(1) 一维 ^{13}C NMR 谱: 采样时间 1s, 弛豫延迟 $d1=6s$, $d2=1s$, 谱宽 25kHz, 重复累加 1024 次, 射频脉冲功率 58dB, 脉冲宽度 65° . 去偶功率 42dB, 弛豫延迟 $d2$ 段和采样期间加 Waltz-16 门控宽带去偶. FT 变换点数 64k, 采用 Lorentz 线型展宽窗函数改善谱线的灵敏度, 展宽因子 $LB=2.0Hz$. 图 4(a), (b) 分别为样品 CAPs、DCAPs 的 ^{13}C NMR 谱。

CAP ^{13}C 谱中 172.85, 55.86, 43.47, 36.65, 22.60ppm 的五条谱线对应 C^9 , C^{17} , C^{10} , C^8 , C^1 , 146.65, 145.05, 130.24, 120.70, 114.31, 110.60ppm 的六条谱线对应苯环上六个 C 原子, 138.01 和 126.41ppm 的两条谱线对应烯键 C 原子- $C^3=C^4$, 25 ~ 45ppm 范围内的六条谱线对应酰胺基侧链上六个烷基 C 原子。

DCAP_s¹³C 谱中 172.95, 55.86, 43.47, 36.83, 22.60ppm 的五条谱线对应 C⁹, C¹⁷, C¹⁰, C⁸, C¹, 146.64, 145.04, 130.28, 120.71, 114.31, 110.61ppm 的六条谱线对应苯环上六个 C 原子, 38.89, 27.90 和 27.21ppm 的三条谱线对应 C³, C⁴ 和 C²(其顺序由下面的计算和 DEPT 谱确定)。

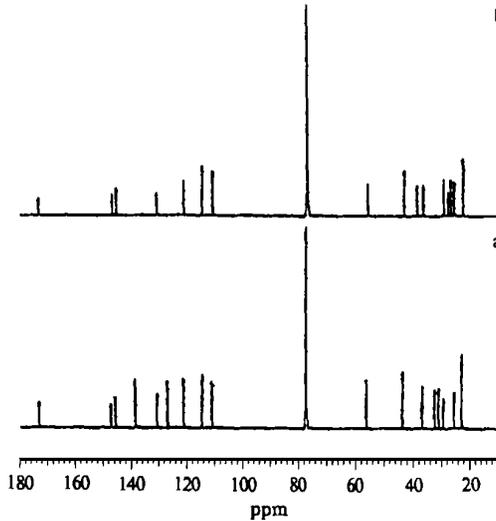


图 4 辣椒碱和二氢辣椒碱的一维¹³C NMR 谱

(a) 辣椒碱 CAP_s (b) 二氢辣椒碱 DCAP_s

Fig. 4 1D¹³C-NMR spectra of capsaicin and dihydrocapsaicin

(a) capsaicin CAP_s; (b) dihydrocapsaicin DCAP_s.

(2) ¹³C DEPT 谱: 脉冲序列[$\pi/2_x(H)-\tau-\pi_x(H), \pi/2(C)-\tau-\theta_y(H), \pi(C)-\tau-Acq(C)$], θ 取四个值: $\pi/4, \pi/2, \pi/2, 3\pi/4$. 采样时间 0.5s, 弛豫延迟 2s, 谱宽 25k Hz, 重复累加 1024 次. 射频脉冲功率 58dB, 去偶功率 42dB, 采样期间加 Waltz-16 门控宽带去偶. FT 变换点数 64k, 采用 Lorentz 线型展宽窗函数改善谱线的灵敏度, 展宽因子 LB=2.0Hz. DEPT 谱(图略)表明: CAP_s¹³C NMR 谱中 146.65, 145.05, 130.24ppm 的谱线对应苯环上 C¹¹, C¹⁴, C¹⁵(其顺序由下面的计算确定), 30.92ppm 的谱线对应 C², DCAP_s的¹³C NMR 谱中 146.64, 145.04, 130.28ppm 的谱线对应 C¹¹, C¹⁴, C¹⁵(其顺序由下面的计算定), 27.90ppm 的谱线对应 C².

(3) ¹³C 化学位移计算: 由计算烯烃-C=C-的¹³C 化学位移的经验公式^[6]

$$\delta = 123.3 + \sum_i A_i + \sum_i A_i' + \sum_j S_j \quad (1)$$

计算 CAP 的 C³ 和 C⁴ 化学位移, 得到

$$\delta(C^3) = 139.1, \quad \delta(C^4) = 127.4$$

表明¹³C NMR 谱中 δ 38.01 和 126.41 的谱线对应 C³ 和 C⁴.

由计算苯环¹³C 化学位移的经验公式^[6]

$$\delta = 128.5 + \sum_i A_i \quad (2)$$

计算 CAP 和 DCAP 的 $C^{11} \sim C^{16}$ 的化学位移, 得到

$$\begin{aligned} \delta(C^{11}) &= 131.4, & \delta(C^{12}) &= 122.4, & \delta(C^{13}) &= 116.7, \\ \delta(C^{14}) &= 137.3, & \delta(C^{15}) &= 147.2, & \delta(C^{16}) &= 115.5. \end{aligned}$$

因而可确认 CAP 的 ^{13}C 谱中 δ 46.65, 145.05, 130.24, 120.70, 114.31, 110.60 的六条谱线, 以及 DCAP 的 ^{13}C 谱中 δ 46.64, 145.04, 130.28, 120.71, 114.31, 110.61 的六条谱线对应 C^{15} , C^{14} , C^{11} , C^{12} , C^{13} , C^{16} .

由计算烷烃 ^{13}C 化学位移的经验公式^[6]

$$\delta = A_n + N_0 a_{n0} + N_1 a_{n1} + N_2 a_{n2} + N_3 \gamma_n + N_4 \delta \quad (3)$$

$$\delta = -2.3 + \sum_i Z_i + S + K \quad (4)$$

计算 DCAP 的 $C^3 \sim C^7$ 的化学位移, 得到

$$\delta(C^3) = 39.4, \quad \delta(C^4) = 27.0, \quad \delta(C^5) = 30.2, \quad \delta(C^6) = 29.7, \quad \delta(C^7) = 21.3.$$

计算 CAP 的 C^5, C^6, C^7 的化学位移, 得到

$$\delta(C^5) = 29.1 > \delta(C^6) = 27.4 > \delta(C^7) = 24.3.$$

综合上面的结果, 可以认定

DCAP 中 $\delta(C^3) = 38.89, \delta(C^4) = 27.21, \delta(C^5) = 29.58, \delta(C^6) = 29.32, \delta(C^7) = 25.77,$

CAP 中 $\delta(C^5) = 32.19, \delta(C^6) = 29.22, \delta(C^7) = 25.24.$

CAP 分子和 DCAP 分子中所有碳原子的 ^{13}C 化学位移列于表 1.

3.3 辣椒碱与二氢辣椒碱相对含量的测定

图 2 表明天然结晶辣椒碱中 CAP 分子与 DCAP 分子甲基 C^1H_3 质子化学位移相差 0.1ppm, 在一维 1H NMR 谱中其谱线处于最右侧(高场区, TMS 峰除外), 分得较开, 而且峰强度大, 谱线尖锐, 是表征 CAP 与 DCAP 的存在和相对含量的特征峰, 可由这两个谱峰的积分强度比值测定天然辣椒碱中辣椒碱与二氢辣椒碱的相对含量. 表 2 给出用这种方法测定样品 MCAP_{S1} ~ MCAP_{S7} 和 MCAP_F、MCAP_{连城}、MCAP_{太康} 中 CAP 与 DCAP 相对含量的结果. 表中期望值为配制标准样品所用的纯 CAP 与纯 DCAP 的重量比例, 其标记形式:

当含量 CAP \geq DCAP 期望值 = CAP/DCAP \div 1.00

当含量 CAP < DCAP 期望值 = 1.00 \div DCAP/CAP

测定值也采用同样的记法, 以减少有效数字表示上的误差. 平均相对偏差 $\Delta C/C$ 定义为:

$$\begin{aligned} \Delta C/C &= (1/N) \left\{ \sum_{i=1}^{N_1} \left| \frac{\text{测定值}_i - \text{期望值}_i}{\text{期望值}_i} \right| \quad \text{改善} \right. \\ &\quad \left. + \sum_{i=N_1+1}^N \left| \frac{1/\text{测定值}_i - 1/\text{期望值}_i}{1/\text{期望值}_i} \right| \right\} \quad (5) \end{aligned}$$

其中, $i = 1 \sim N_1$ 对应含量 CAP \geq DCAP 的样品, $i = N_1 + 1 \sim N$ 对应含量 CAP < DCAP 的样品. 7 个标准测试样品 MCAP_{S1} ~ MCAP_{S7} 平均相对偏差为 4.3%, 表明这种方法的可行性和准确性.

表 2 辣椒碱与二氢辣椒碱相对含量测定结果

Tab. 2 The relative contents of capsaicin to dihydrocapsaicin

辣椒碱	期望值 CAP:DCAP	测定值 CAP:DCAP	相对偏差(%)
MCAP _{S1}	3.81:1.00	3.61:1.00	-5.2
MCAP _{S2}	2.54:1.00	2.61:1.00	+2.7
MCAP _{S3}	1.91:1.00	1.89:1.00	-1.0
MCAP _{S4}	1.35:1.00	1.30:1.00	-3.7
MCAP _{S5}	1.00:1.71	1.00:1.61	-5.8
MCAP _{S6}	1.00:2.58	1.00:2.72	+5.4
MCAP _{S7}	1.00:3.43	1.00:3.22	-6.1
MCAP _F	~1.86:1.00	1.68:1.00	~-9.7
MCAP _{连城}		2.93:1.00	
MCAP _{太康}		1.80:1.00	

参 考 文 献

- 1 Stephen H B. Pharmacological Reviews, 1986, 38: 179
- 2 Lawrence G S, Jaffe J H. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1989, 33: 899
- 3 Holzer P, Pabst M A, Lippe I T. Gastroenterology, 1989, 96: 1425
- 4 吴明光, 王金茂, 吴兵, 洪居端. 厦门大学学报, 1993, 32: 749
- 5 Peter C, Watson N, Evans R J, Watt V R. Pain, 1989, 38: 177
- 6 杨文火, 王宏钧, 卢葛覃. 核磁共振原理及其在结构化学中的应用, 福州: 福建科学技术出版社, 1994.

NMR STUDIES ON NATURAL CAPSAICINS

Lin Donghai, Wu Mingguang, Liao Xinli and Wu Qinyi

(Laboratory of Nuclear Magnetic Resonance, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract

Capsaicin, dihydrocapsaicin and their mixtures were studied by 1D ^1H NMR spectra, ^1H - ^1H COSY spectra, 1D ^{13}C NMR spectra and DEPT spectra. The ^1H and ^{13}C chemical shifts were obtained. A method based on NMR spectra was employed to determine the relative content of capsaicin to dihydrocapsaicin in natural capsaicins.

Key words ^1H NMR spectra, ^{13}C NMR spectra, Capsaicin, Dihydrocapsaicin.