

Chilin kemiaa: Kapsaisiini ja sen johdokset

Tekijä: Toni Rantaniitty

Kandidaatintutkielma

Kemian opettajankoulutusyksikkö

Kemian laitos

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

Pvm: 3.1.2013

Ohjaajat:

Mikko Oivanen

Maija Aksela

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET – UNIVERSITY OF HELSINKI		
Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty/Section		Laitos – Institution – Department
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Kemian laitos
Tekijä – Författare – Author		
Toni Rantaniitty		
Työn nimi – Arbetets titel – Title		
Chilin kemiaa: Kapsaisiini ja sen johdokset		
Oppiaine – Läroämne – Subject		
Kemia (kemian opettajan suuntautumisvaihtoehto)		
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages
Kandidaatintutkielma	1/2013	35
Tiivistelmä – Referat – Abstract		
<p>Tässä tutkielmassa tarkastellaan yleiskuvallisesti kapsaisiinin ja sen johdoksia seitsemän kappaleen verran. Tarkastelun kohteena ovat keskeisessä osassa kapsaisiinin ja johdosten kemialliset ominaisuudet sekä niiden eristys- ja määritysmenetelmät. Ensimmäinen kappale on johdanto chilin historiasta ja sen käytöstä lääkinnässä. Toisessa kappaleessa tutustutaan erilaisiin kapsaisiinijohdoksiin sekä niiden sisältämien funktionaalisten ryhmien kemiallisiin vaikutuksiin kalsiumionien läpäisykyvyn indusoinnissa. Kolmannessa kappaleessa käsitellään kapsaisiinijohdoksien valmistamista. Esimerkkeinä toimivat kyseisessä kappaleessa kapsaisinoideista kapsaisiini ja kapsinoideista kapsiaatti.</p> <p>Neljännessä kappaleessa keskitytään kapsaisiinin eristykseen asetonitriilillä ja kromatografisesti. Menetelmistä tarkastelun kohteena ovat ohutkerros-, pylväs- ja nestekromatografia. Viidennessä kappaleessa käsitellään kapsaisiinin ja johdosten määrittämistä Threshin menetelmästä Scovillen organoleptisen testin kautta analyttisiin menetelmiin. Kuudennessä kappaleessa tarkastellaan maantieteellisen kasvupaikan vaikutusta kapsaisiinipitoisuuteen Afrikassa ja Aasiassa. Seitsemännessä kappaleessa tutkielman keskeisistä asioista on muodostettu yhteenveto, jossa pohditaan chilin aseman muutosta elintarvikkeesta lääkekemialliseksi raaka-aineeksi, ja kapsaisiinin tutkimisessa käytettyjen analyttisten menetelmien historiallista kehitystä 1800–2000-luvuilla.</p> <p>Tutkimuksen tulosten perusteella aktiivisimmat kapsaisiinijohdosryhmät olivat 3-alkoksi-4-substituenttiryhmän sisältänyt aromaattinen rengas, CH₂NHCO tai CH₂CONH -ryhmän sisältäneet amidit sekä N-(4-hydroksi-3-metoksibentsyyli)-N'-oktyyliurea. Kapsaisiinin eristyksessä isomeerit erottuivat toisistaan, kun hopeanitraattia lisättiin HPTLC-levyn sijasta ajoliuokseen. Kapsaisiinin määrittämisessä parhaat tulokset saatiin kromatografisesti käyttämällä uutossa metanolia tai asetonitriiliä. Kolorimetrisesti parhaat tulokset saatiin etyyliasetaatilla ja ravistelemalla näytettä 10 minuuttia asetonissa. Chili- ja paprikanäytteiden sisältämät kapsaisinoidit erottuivat, kun analyysissä käytettiin HPTLC-CI-MS-menetelmää.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords		
Chili, Kapsaisiini, Kapsaisiinijohdokset		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
Kemian laitos; Kumpulan kampuskirjasto		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		
Ohjaajat: Mikko Oivanen & Maija Aksela		

Sisällysluettelo

1. Johdanto	5
1.1. Chilin historiaa	5
1.1. Elintarvikkeesta kemian tutkimuskohteeksi	6
2. Kapsaisiin ja johdosten kemialliset ominaisuudet	7
2.1. Erilaisia kapsaisiiniryhmiä	7
2.1.1. Kapsaisiini	7
2.1.2. Kapsaisinoidit	8
2.1.3. Kapsinoidit	9
2.1.4. Muut kapsaisiinijohdokset	9
2.1.4.1. Kapsikoninoidit	9
2.1.4.2. Kapsazepiini	10
2.2. Kapsaisiin ja johdosten kemiallisten ominaisuuksien tutkimus	10
2.2.1. Ca ²⁺ -läpäisykyvyn riippuvuus kapsaisiinijohdosten ominaisuuksista	10
2.2.2. Aromaattisen osan tutkiminen	11
2.2.3. Amidiosan tutkiminen	11
2.2.4. Alifaattisen hiiliketjuosan tutkiminen	12
3. Kapsaisiin ja sen johdosten valmistus	13
3.1. Kapsaisiinin valmistus	13
3.2. Kapsiaatin valmistus	14
4. Kapsaisiinin eristys	15
4.1. Kapsaisiinin isomeerien eristys	15
4.2. Kapsaisiinin eristys muilla kromatografisilla menetelmillä	16
4.2.1. Kapsaisiinin eristys lääkekemiassa	16
4.2.1.1. Kapsaisiinin eristykseen liittyvät ongelmat lääkekemiassa	17
4.2.2. Kapsaisiinin eristys asetonitriilillä	18
5. Kapsaisiinin määrittäminen	19
5.1. Kapsaisiinin rakenneanalyysin historiaa	19
5.2. Kapsaisiinin määrittäminen aistihavaintojen avulla	19
5.3. Kapsaisiinin määrittäminen spektrofotometrialla	20

5.4. Kapsaisiinin määrittäminen kromatografisilla menetelmillä	21
5.4.1. Kapsaisiinin määrittäminen kaasukromatografialla	21
5.4.2. Kapsaisiinin määrittäminen nestekromatografialla	21
5.4.3. Kapsaisiinin määrittäminen kaasunestekromatografialla	23
5.5. Kapsaisiinin määrittäminen kolorimetrisesti	24
5.5.1. Kapsaisiinin määrittäminen Folin-Ciocalteu –reagenssilla	24
5.5.2. Kapsaisiinin määrittäminen diatsoniumsuoloilla	25
5.6. Muut kapsaisiinin määrittämenetelmät	26
5.6.1. Kapsaisinoidien määrittäminen HPLC-EI-MS ja HPLC-CI-MS –menetelmillä	26
6. Kasvupaikan vaikutus kasvien kapsaisiinipitoisuuteen	28
6.1. Kasvupaikkana Afrikka	28
6.2. Kasvupaikkana Aasia	28
7. Yhteenveto	29
Viiteluettelo	32

1. Johdanto

1.1. Chilin historiaa

Chiliä on käytetty Keski- ja Etelä-Amerikassa tuhansien vuosien ajan sen antaman tulisen maun vuoksi. Atsteekit käyttivät chiliä ruoanvalmistuksen lisäksi myös sota- ja vaaratilanteissa, jolloin he sokeuttivat vastustajansa kuivatulla chilijauheella. Chilin käyttö levisi Christopher Kolumbuksen löytöretkien ansiosta Eurooppaan, jossa sitä kasvatettiin aluksi luostareissa. Käytön lisäksi myös atsteekkien käyttämä sana ”chili” levisi Eurooppaan. Lajikenimen *Capsicum chili* sai kasvitieteilijä Joseph Pitton de Tournefortilta, jonka on arveltu käyttäneen nimen lähteinä kahta eri lähestymistapaa: kreikankielistä puremista tarkoittavaa sanaa ”kapto”, kun kasvin ominaisuuksia kuvailtiin tulisen makuuainavalla ja latinankielistä laatikkoa tarkoittavaa sanaa ”capsa”, kun kasvipalkoa kuvailtiin siementen säilytysastiana.^{1,2}

1800-luvun lopulla kemisti John Clough Thresh eristi laboratorio-olosuhteissa chilin tulisuuden aiheuttaneen kemiallisen ainesosan ja nimesi sen kapsaisiiniksi. Kapsaisiinin rakenteen ja muiden kemiallis-fysikaalisten ominaisuuksien tutkiminen alkoi suuremmissa mittakaavassa 1900-luvun puolivälissä, jolloin analyttiset menetelmät kehittyivät riittävän tarkoin pienten ainemäärien määrittämistä varten. Chilissä pieninä pitoisuuksina esiintyneet kapsaisiinijohdokset kyettiin myös eristämään. Myöhemmin 1900-luvun lopussa ja 2010-luvun alussa tutkimuksen kohteena ovat olleet myös chilistä jalostetut lajikkeet ja niiden sisältämät kapsaisiinijohdokset.²⁻⁷

1.2. Chili lääketieteessä

Kiinnostuksen lisääntyminen kapsaisiinia kohtaan johtuu sen fysiologisista vaikutuksista. Vaikutukset voidaan jakaa kolmeen eri kategoriaan: 1) absorptio suolistossa, 2) lämmöntuotanto, verenkierto ja aineenvaihdunta sekä 3) ruoansulatus. Absorptiolla tarkoitetaan kapsaisiinin kohdalla sen kykyä imeytyä suolistoon ja sieltä kehon muihin osiin. Kawadan ja hänen tutkimusryhmänsä wistar–rotilla tekemien rottakokeiden perusteella kapsaisiini ja dihydrokapsaisiini imeytyivät mahan ja suoliston (Gastrointestinal, GI) alueella muutamassa tunnissa. He mittasivat jäljelle jääneet kapsaisiini- ja dihydrokapsaisiinimäärät kyseiseltä alueelta ja vertasivat tulosta alkuperäiseen annostukseen. Lisäksi absorption varmentamiseksi he ruiskuttivat tritiumipitoista dihydrokapsaisiinia ja seurasivat sen kulkeutumista laskimoveren valkuaisaineryhmien mukana kehon muihin osiin.⁸

Kapsaisiinin on havaittu lisäävän kehon lämmöntuotantoa aktivoimalla primäärisiä hermosoluja sekä vapauttamalla substanssi P:ksi (Substance P) nimettyä hermovälittäjäainetta, joka hajottaa polysakkarideihin luokiteltua glykogeenia maksa- ja rasvasoluissa. Kapsaisiinin aiheuttaman sympaattisen hermoston (Sympathetic Nervous System) aktivoitumisen ja katekoliamiinien erityksen johdosta glykogeeni hajoaa disakkaridiseksi glukoosiksi ja vapaiksi rasvahapoiksi. Reaktion lisäksi myös verenkierto lisääntyy, minkä seurauksena kehon lämpötila nousee ja ihon viilentämiseen vaikuttava hikoileminen lisääntyy.⁸

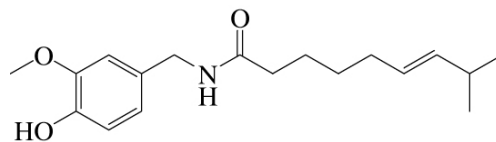
Kapsaisiini vaikuttaa eri tavoin ruoansulatukseen. Kemiallisesta näkökulmasta kapsaisiini lisää mahanesteiden, syljen ja katekoliaamiinien eritystä. Fysikaalisesta näkökulmasta ruoansulatus lisääntyy suoliston toiminnan liikkeen ja absorptiokyvyn nopeutuessa. Seurauksena ovat tällöin lämmöntuotannon lisääntyminen, vapaiden rasvojen hapettuminen ja painon putoaminen, minkä vuoksi kapsaisiinia käytetään painonpudotuksessa ja -hallinnassa. Vaikka kapsaisiinilla on terveyttä parantavia vaikutuksia, sen liiallinen käyttö aiheuttaa mahaan ja suolistoon liittyviä haavaumia ja sairauksia kuten maksakuoliota. Haavaumat syntyvät mahanesteiden ja entsyymien liiallisen erityksen seurauksena. Eläimillä voi esiintyä myös myrkytysvaikutuksia. Kapsaisiinin haittavaikutuksia on pyritty ehkäisemään tutkimalla sen johdoksiin kuuluvia kapsinoideja. Tutkimustulosten perusteella kapsinoideja sisältävällä CH-19 Makealla (CH-19 Sweet) on kapsaisiinin kaltaisia ominaisuuksia, vaikka sen Scoville-arvot ovat alhaisemmat kuin kapsaisiinilla.⁸⁻¹⁰

2. Kapsaisiinin ja johdosten kemialliset ominaisuudet

2.1. Erilaisia kapsaisiiniryhmiä

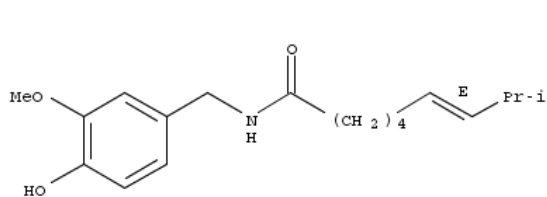
2.1.1. Kapsaisiini

Kapsaisiini on amidi, jolle CAS (Chemistry Abstracts Service) on antanut kemialliseksi nimeksi (6*E*)-*N*-[(4-Hydroksi-3-metoksifenyyli)metyyli]-8-metyyli-6-noneeniamidi ja jonka molekyylikaava on C₁₈H₂₇NO₃. Kiderakenteeltaan kapsaisiini on monokliinistä, ja se esiintyy huoneenlämpötilassa joko lastuina tai hiutaleina. Kapsaisiini ei liukene veteen, mutta se liukenee orgaanisiin liuottimiin, kuten etanoliin, petrolieetteriin ja bentseeniin sekä väkevään suolahappoon.¹¹

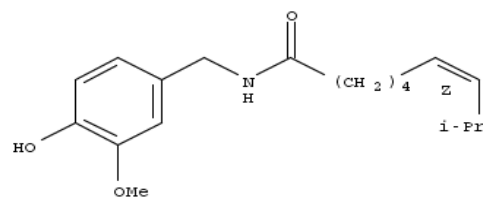


Kapsaisiini (CAS 404-86-4).

Molekyylin alifaattisen hiiliketjun kuudennen ja seitsemännen hiilen välillä esiintyvän kaksoissidoksen vuoksi kapsaisiini voi esiintyä kahdessa eri isomeriamuodossa.^{12, 13} Luonnossa kasvavissa chileissä kapsaisiini esiintyy *E*-muodossa. *Z*-isomeeria valmistetaan synteettisesti ja käytetään raakalääkkeiden valmistuksessa.^{14, 15}



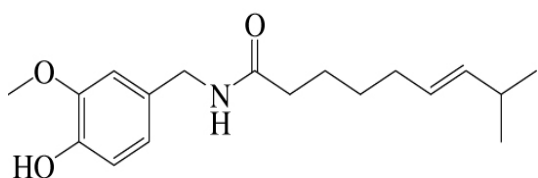
E-kapsaisiini (CAS 404-86-4).



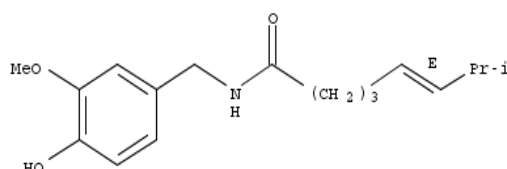
Z-kapsaisiini (CAS 25775-90-0).

2.1.2. Kapsaisinoidit

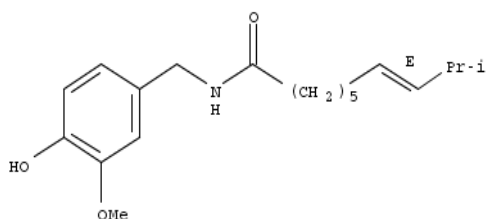
Kapsaisinoideiksi kutsutaan kapsaisiinijohdoksia, joissa alifaattisen hiiliketjun pituus vaihtelee. Kapsaisinoideja saadaan luonnossa kasvavista chilikasveista, mutta niitä voidaan myös valmistaa erilaisten synteesien avulla. Chilikasveissa tunnetuimmat kapsaisinoidit ovat kapsaisiinin ohella dihydrokapsaisiini, nordihydrokapsaisiini, homokapsaisiini ja homodihydrokapsaisiini. Syntetisoituja kapsaisinoideja ovat puolestaan esimerkiksi nonivamidi ja fenyyliasetyyylirinvaniili.¹⁵⁻¹⁹



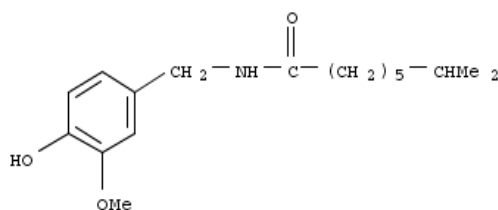
Kapsaisiini (CAS 404-86-4).



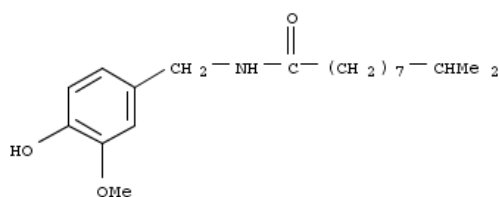
Norkapsaisiini (CAS 61229-08-1).



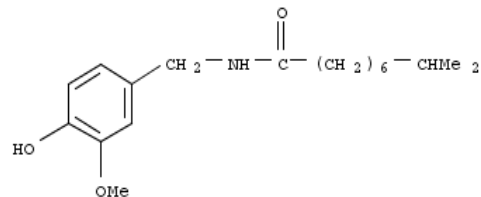
Homokapsaisiini (CAS 58493-48-4).



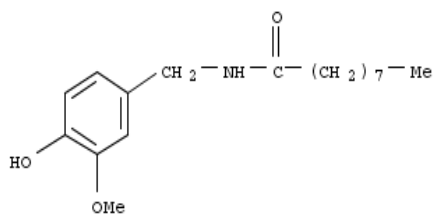
Nordihydrokapsaisiini (CAS 28789-35-7).



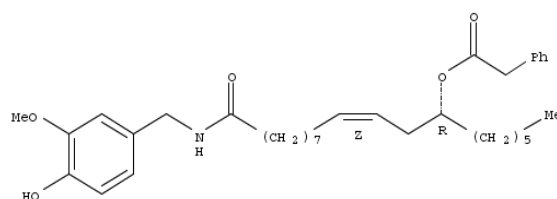
Homodihydrokapsaisiini (CAS 20279-06-5).



Dihydrokapsaisiini (CAS 19408-84-5).



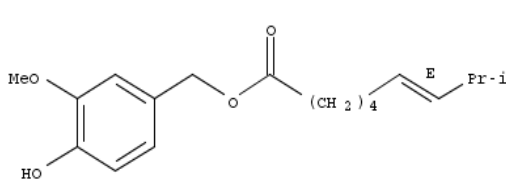
Nonivamidi (CAS 2444-46-4).



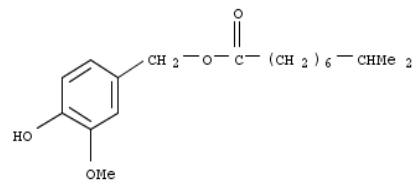
Fenyyliasetyyylirinvaniili (CAS 849343-53-9).

2.1.3. Kapsinoidit

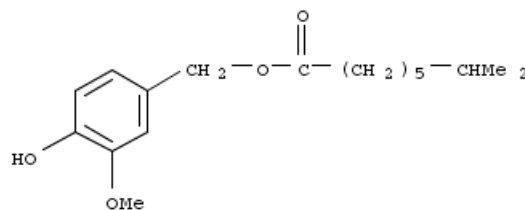
Kapsinoideiksi kutsutaan kapsaisiinijohdoksia, joissa esteriryhmä on korvannut amidiryhmän ja joissa alifaattisen hiiliketjun pituus vaihtelee. Kapsinoideja saadaan jalostetuista chilikasveista, mutta niitä voidaan myös valmistaa erilaisten synteesien avulla. Chilikasveissa tunnetuimmat kapsinoidit ovat kapsiaatin ohella dihydrokapsiaatti, nordihydrokapsiaatti, homokapsiaatti ja homodihydrokapsiaatti. Koska kapsinoideissa ei ole amidiryhmää, ne ovat tulisuusasteeltaan miedompia kuin kapsaisinoidit. Kapsinoideilla on kuitenkin samanlaisia käyttötarkoituksia kuin kapsaisinoideilla.^{5, 6, 20-22}



Kapsiaatti (CAS 205687-01-0).



Dihydrokapsiaatti (CAS 205687-03-2).

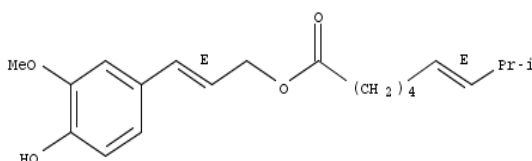


Nordihydrokapsiaatti (CAS 220012-53-3).

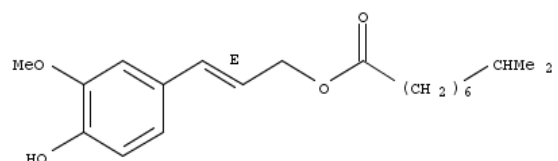
2.1.4. Muut kapsaisiinijohdokset

2.1.4.1. Kapsikoninoidit

Kapsikoninoideiksi kutsutaan 2000-luvun lopulla löydettyjä kapsaisiinijohdoksia, joissa koniferyyliesteriryhmä on korvannut amidiryhmän ja joissa alifaattisen hiiliketjun pituus vaihtelee. Kapsikoninoideja saadaan jalostetuista chilikasveista, mutta niitä voidaan myös valmistaa koniferyylialkoholeista ja rasvahapoista. Tunnetuimmat kapsikoninoidit ovat kapsikoniaatti ja dihydrokapsikoniaatti. Kapsikoninoidit eivät ole tulisia, koska ne eivät sisällä amidiryhmää. Vaikka kapsikoninoideista ei ole paljoa tutkimustietoa, on oletettu, että kapsikoninoideilla olisi samanlaisia käyttötarkoituksia kuin kapsaisinoideilla ja kapsinoideilla.^{7, 23}



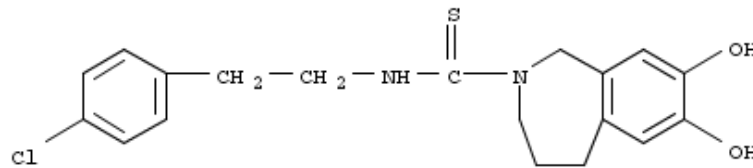
Kapsikoniaatti (CAS 946572-73-2).



Dihydrokapsikoniaatti (CAS 946572-74-3).

2.1.4.2. Kapsazepiini

Kapsazepiini on kapsaisiinijohdos, jossa tioketoni- ja bentsazepiiniryhmät ovat korvanneet hiilen ja hapen välisen kaksoissidoksen sekä alifaattisen hiiliketjun. Kapsazepiiniä voidaan valmistaa erilaisten synteesien avulla. Kapsazepiiniä käytetään lääketieteessä ja -teollisuudessa kapsaisinoidien ja kapsinoidien antagonistina, koska se estää niiden toiminnan sympaattisessa hermostossa sijaitsevassa kapsaisiinireseptorissa. Ihmiskehossa kapsazepiini lievittää kapsaisinoidien ja kapsinoidien aiheuttamaa poltteen tunnetta.^{24, 25}

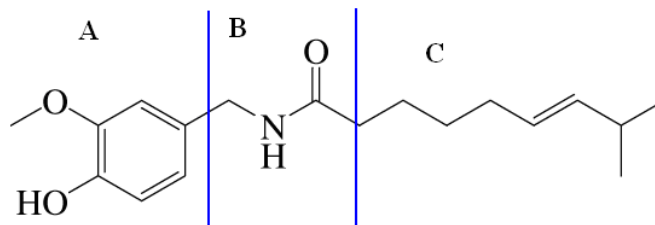


Kapsazepiini (CAS 138977-28-3).

2.2. Kapsaisiinin ja johdosten kemiallisten ominaisuuksien tutkimus

2.2.1. Ca²⁺ -läpäisykyvyn riippuvuus kapsaisiinijohdosten ominaisuuksista

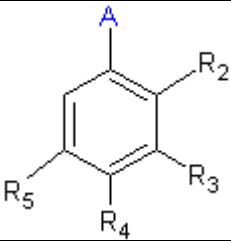
Kapsaisiinin kemiallisista ominaisuuksista on olemassa useita tutkimuksia. Walpole ja hänen tutkimusryhmänsä määrittivät kapsaisiinin ja sen johdosten kemiallisia vaikutuksia kalsiumionien Ca²⁺ läpäisykykyyn hermosolukertymien soluissa. He tutkivat läpäisykykyä, koska kalsiumionit välittävät hermosolujen lähettämiä viestejä lihaksiin ja koska kapsaisiinin on havaittu indusoivan kyseisten ionien kulkeutumista. He mittasivat kapsaisiinijohdosten vaikutuskyvyt tutkittavista näytteistä käyttämällä suurena puolimaksimaalista efektiivistä konsentraatiota (half maximal effective concentration, EC₅₀).¹⁶ Tutkimus suoritettiin siten, että Walpole ja hänen tutkimusryhmänsä jakoivat kapsaisiinin rakennekaavan kolmeen osaan: A) aromaattinen osa, B) amidiosa ja C) alifaattinen hiiliketjuosa. Jokaista osaa tutkittiin erikseen ja tutkimustulokset tiivistettiin myöhemmin yhdeksi raportiksi.²⁶



Kuva 1. Kapsaisiinijohdoksista tutkitut funktionaaliset ryhmät.^{16, 27, 28}

2.2.2. Aromaattisen osan tutkiminen

Walpole ja hänen tutkimusryhmänsä määrittivät aromaattisen renkaan ja siihen lisättyjen substituenttien vaikutukset kalsiumionin läpäisykykyyn hermosolukertymissä. Muiden sivuryhmien vaikutuksen minimoimiseksi sivuketjun funktionaalinen ryhmä yksinkertaistettiin oktyyliksi. He valmistivat kapsaisiinijohdosnäytteet ja määrittivät niistä puolimaksimaaliset efektiiviset konsentraatiot käyttämällä analyyttisiä menetelmiä, kuten kromatografiaa ja spektrofotometriä. Tulosten perusteella 3-alkoksi-4-substituenttiryhmän sisältänyt aromaattinen rengas oli aktiivisimpia johdoksia, koska sen vaikutus näkyi pienilläkin konsentraatioilla. Sen sijaan renkaan 2-, 5- ja 6-hiilen vetyjen korvaaminen substitueilla tai 4-hiilen hydroksyyli-ryhmän poistaminen laskivat kapsaisiinijohdosten aktiivisuutta.^{2, 16, 26}

				
R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	EC ₅₀ (μM)
H	H	H	H	> 100
H	OCH ₃	OH	H	0,55 ± 0,08
H	OCH ₃	H	H	> 100
H	OCH ₃	OCH ₃	H	6,41 ± 0,14
OH	OH	OH	H	7,64 ± 1,09
H	OCH ₃	NO ₂	H	7,91 ± 1,95

Taulukko 1. Kapsaisiinijohdosten aromaattisen osan vaikutus Ca²⁺-ionien läpäisykykyyn.¹⁶

2.2.3. Amidiosan tutkiminen

Tutkiessaan amidiosan vaikutusta kapsaisiininiin ja johdosten kemiallisiin ominaisuuksiin Walpole ja hänen tutkimusryhmänsä pitivät aromaattisen renkaan sekä alifaattisen hiiliketjun vakiona. He määrittivät amidiosan vaikutuksen vertailemalla sitä muihin funktionaalisiin ryhmiin. Funktionaaliset ryhmät jaettiin neljään kategoriaan: 1) Vanillyyliamidit ja -esterit, 2) Homovanilliinihappoamidit ja -esterit, 3) Ureat ja tioureat sekä 4) Muut, esimerkiksi ketonijohdokset.^{26, 27}

Tulosten perusteella CH₂NHCO tai CH₂CONH -ryhmän sisältäneet amidit sekä *N*-(4-hydroksi-3-metoksibentsyyli)-*N'*-oktyyliurea olivat tehokkaimpia. Sen sijaan aktiivisuus laski kapsaisiinijohdoksilla, kun dipolisia rakenneosia ja vetysidosten välisiä vuorovaikutuksia pyrittiin korvaamaan metylaatiolla. Lisäksi aromaattisen ja amidiosan yhdistävässä kohdassa Walpole ja hänen tutkimusryhmänsä havaitsivat sopivaksi silloitusryhmäksi sp³-hybridisoituneen yksihilisen ryhmän, koska se oli riittävän aktiivinen.^{26, 27}

R	EC ₅₀ (μM)
CH ₂ NHCSNH	0,06 ± 0,01
CH ₂ NHCS	0,28 ± 0,02
CH ₂ CONH	0,30 ± 0,01
CH ₂ NHCO	0,55 ± 0,08
CH ₂ CH ₂ CH ₂	> 100
CH ₂ OCO	14,20 ± 0,06
(CH ₂) ₂ NHCO	18,30 ± 2,80

Taulukko 2. Kapsaisiinijohdosten amidiosan ja sen korvaajien vaikutus Ca²⁺ -ionien läpäisykykyyn.²⁷

2.2.4. Alifaattisen hiiliketjuosan tutkiminen

Walpolen ja hänen tutkimusryhmänsä kolmannessa tutkimuksessa tarkasteltiin alifaattisen hiiliketjun vaikutusta kapsaisiiniyhdisteiden ominaisuuksiin. He pitivät aromaattisen ja amidiosan vakiona koko tutkimuksen ajan käyttämällä vanillyyliamideja. Aikaisemmin suoritettujen kapsaisiinijohdosten aromaattisen ja amidiosan tutkimusten perusteella Walpole ja hänen tutkimusryhmänsä käyttivät alifaattisen hiiliketjun tutkimuksessa samaa menetelmää. He valmistivat jälleen itse kapsaisiinijohdosnäytteet sekä määrittivät niiden kemiallisten ominaisuuksien vaikutukset kalsiumionien läpäisykykyyn hermosolukertymissä.^{26, 28}

Walpole ja hänen tutkijaryhmänsä päättelivät, että alifaattisen ketjun koko ja hydrofobisuus sekä ketjussa olevan substituentin vaikutus yhdisteen mooliseen taitekertoimeen (Molar Refraction, MR) vaikuttavat aktiivisuuteen. Lisäksi he päättelivät, että rajoitetun kokoisen alifaattisen ketjun tietty osa toimii sitoutumisalueena (Binding Site) ja että konformaatiolla on merkitystä aromaattisten substituenttien asettuessa alifaattiseen hiiliketjuun. Sen sijaan Walpole ja hänen tutkimusryhmänsä eivät löytäneet aktiivisuuden syytä kahdelle yhdisteelle, joissa esiintyi pitkiä alifaattisia monotydyttymättömiä sivuketjuja. Muut yhdisteet, jotka sisälsivät alifaattisessa ketjussa kyseiset ominaisuudet, olivat epäaktiivisia.^{26, 28}

R	EC ₅₀ (μM)
(CH ₂) ₇ -(Z)-CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0,17 ± 0,03
(CH ₂) ₆ CH(CH ₃) ₂	0,19 ± 0,02
(CH ₂) ₄ -(E)-CH=CHCH(CH ₃) ₂	0,30 ± 0,04
(CH ₂) ₆ NHBoc	79,80 ± 10,70
CH ₂ Br	> 100
CH ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	> 100

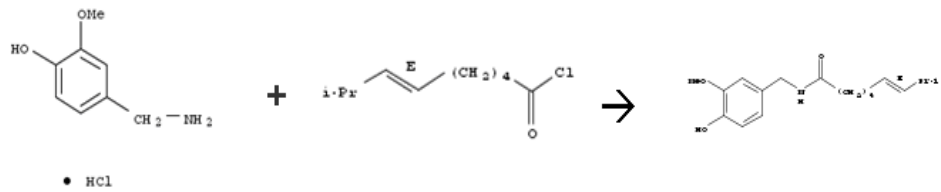
Taulukko 3. Kapsaisiinijohdosten alifaattisen osan vaikutus Ca²⁺ -ionien läpäisykykyyn.²⁸

3. Kapsaisiinin ja sen johdosten valmistus

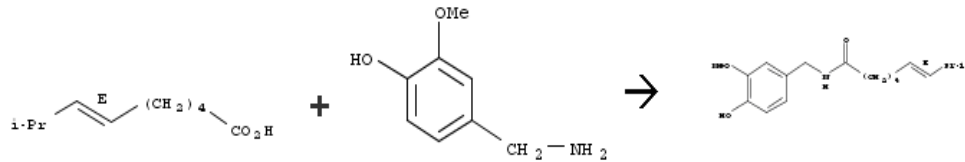
Kapsaisiinia ja sen johdoksia voidaan valmistaa erilaisilla menetelmillä. Kappaleissa 3.1. ja 3.2. käsitellään esimerkkeinä kapsaisiinin ja kapsiaatin valmistusta, koska kapsaisiini on yleisin kapsaisinoidi ja kapsiaatti yleisin kapsinoidi.

3.1. Kapsaisiinin valmistus

McIlvain ja hänen tutkimusryhmänsä valmistivat kapsaisiinia asylointireaktiolla. Reaktiossa bentsyyliamiinijohdos reagoi happohalidin kanssa. Liuottimina käytettiin natriumhydroksidin vesiliuosta, dimetyyliformamidia (DMF) ja dietyylieetteriä.²⁹ Kananovich ja hänen tutkimusryhmänsä sen sijaan syntetisoivat kapsaisiinin käyttämällä lähtöaineina bentsyyliamiinijohdosta ja karboksyylihappoa. Liuottimina käytettiin bentseeniä, jossa oli oksalyylkloridia ja trietyyliamiinia.³⁰



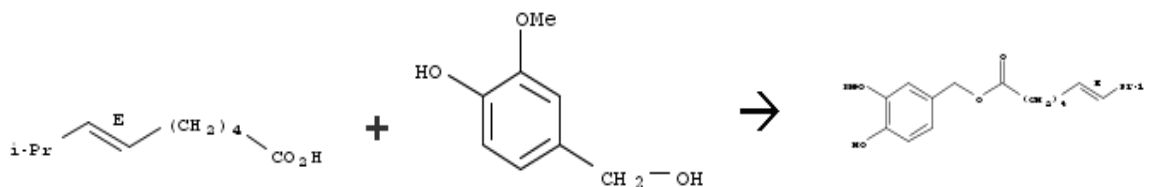
Kapsaisiin valmistus McIlvainin tutkimusryhmän menetelmällä.²⁹



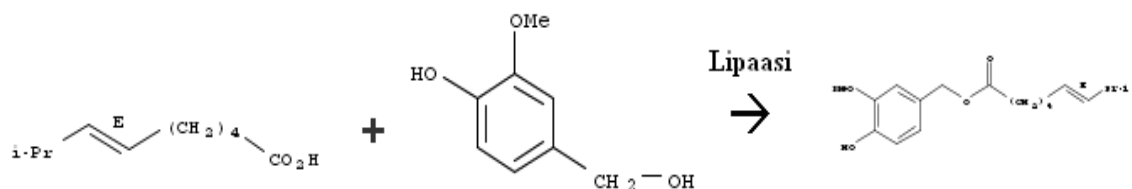
Kapsaisiin valmistus Kananovichin tutkimusryhmän menetelmällä.³⁰

3.2. Kapsiaatin valmistus

Appendino ja hänen tutkimusryhmänsä valmistivat kapsiaattia Mitsunobun reaktiolla. Reaktiossa vanilliinialkoholi reagoi karboksyylihapon kanssa, jolloin muodostunut esteri on kapsiaattia. Liuottimena käytettiin tetrahydrofuraania (THF), jossa oli diisopropyylisodikarboksylaattia (DIAD) ja trifenyylifosfinia (PPh₃).³¹ Amino ja hänen tutkimusryhmänsä kehittivät myöhemmin esteröitymisreaktioon perustuvan synteesimenetelmän, jossa kapsiaattia valmistettiin käyttämällä katalyyttinä lipaasientsyymiä. Lämpötila oli reaktiossa 50 °C.³²



Kapsiaatin valmistus Appendinon menetelmällä.³¹



Kapsiaatin valmistus Aminon tutkimusryhmän menetelmällä.³²

4. Kapsaisiinin eristys

4.1. Kapsaisiinin isomeerien eristys

Kapsaisiinin *cis*- ja *trans*-isomeerit voidaan erottaa toisistaan analyttisin menetelmin. Wall käytti kapsaisiinitutkimuksissaan korkeasuorituskykyistä ohutkerroskromatografiaa (High-Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC), jossa erotus perustuu käänteisfaasiin (Reversed-Phase). Kapsaisiinin molempien isomeerien poolittomuudesta johtuen niiden erottaminen normaaliin faasiin perustuvilla menetelmillä on vaikeaa. Käänteisfaasissa isomeerien erottuminen saadaan aikaiseksi kyllästämällä silikageelikerros hopeanitraatilla, jolloin hopeaionit vuorovaikuttavat alkyyliketjun π -sidosten kanssa. Määrittämissä Wall käytti ajoliuoksena metanolin ja veden seosta.¹⁵

Vuorovaikutuksesta ja kapsaisiini-isomeerien eri poolisuusasteesta johtuvat isomeerien R_f -arvojen (Retention Factor) erot tulivat esille, kun levyt käsiteltiin jodihöyryssä kehittämisen jälkeen. Lisäksi Wall tutki eri tekijöiden vaikutusta erottamistulokseen lisäämällä ajoliuokseen *orto*-boorihappoa ja hopeanitraattia, muuttamalla metanoli-vesiseoksen koostumusta sekä käyttämällä erilaisia ohutlevyjä. Tulosten perusteella *orto*-boorihapon lisäys ei vaikuttanut tilastollisesti merkittävästi tulokseen, metanolipitoisuus 50-60-tilavuusprosentilla antoi parhaimman erotustuloksen vähiten hiiltä sisältäneessä ohutlevyissä. Hopeanitraatin lisäys ajoliuokseen levyn kyllästämisen sijasta oli sekä halvempi, nopeampi että tehokkaampi vaihtoehto.¹⁵

Hopeanitraatin määrä (V-%)	Hopeanitraattikyllästys		Hopeanitraattilisäys ajoliuokseen	
	R_f (<i>cis</i>)	R_f (<i>trans</i>)	R_f (<i>cis</i>)	R_f (<i>trans</i>)
0,5	-	-	0,4	0,42
1,0	-	-	0,54	0,46
1,5	-	-	0,56	0,48
2,0	0,46	0,43	0,66	0,57
3,0	-	-	0,69	0,60
4,0	0,73	0,68	-	-

Taulukko 4. Kapsaisiini-isomeerien erotuksesta saadut tulokset (80 + 20) V-% metanoli-vesiajoliuoksella.¹⁵

4.2. Kapsaisiinin eristys muilla kromatografisilla menetelmillä

4.2.1. Kapsaisiinin eristys lääkekemiassa

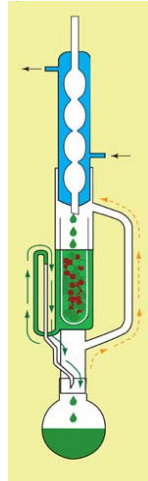
Lääketeollisuudessa kapsaisiini voidaan eristää erilaisin analyttisin menetelmin. Yksi eristyskeinoista on kromatografisten menetelmien hyödyntäminen, jossa apuvälineinä toimivat kromatografiaan tarkoitettu pylväs tai putki, johon on liitetty lasisintterialusta, sekä liuotinastiallinen suppilo. Kapsaisiinia sisältävä näyteliuos kaadetaan pylvääseen tai putkeen, jossa on alumiinioksidia ja 5 cm:n kerros metanolia. Näyte valuu putken läpi, ja näyte uutetaan metanolilla, jotta näytteen seassa olevat muut yhdisteet eivät siirtyisi kapsaisiinin mukana tutkittavaan eluaattiin. Näytteen käsittely kyseisellä menetelmällä kestää 4-5 tuntia, jolloin näytteestä saadun eluaatin määrä on 450 ml. Saadun eluaatin nestemäärää vähennetään haihuttamalla sitä 50 ml:ksi, jonka jälkeen liuos laimennetaan metanolilla mittapullossa 100 ml:ksi muihin käyttötarkoituksiin.³³

Näyte	Kapsaisiinin määrä (m-%)	Näytteen määrä analyysissä	Kapsaisiinipitoisuus metanoliliuoksessa (µg/ml)
Kapsaisiini	0,5 - 1	5 g	25 - 50
Chilikasvista valmistettu hartsi	8 - 12	3 g	48 - 72
Chilikasvista valmistettu tinktuura	0,025 – 0,05	10 ml	25 - 50
Chilivoide	0,14 – 0,16	3 g	42 - 48
Paprikavilla	0,03 – 0,07	10 g	30 - 70

Taulukko 5. Erilaiset kapsaisiinin lähteet ja niiden käyttömäärät.³³

Ennen eristyksen suorittamista kapsaisiininäytettä punnitaan, esimerkiksi paprika- tai chilikasvista, analyysiä varten 5 g, minkä jälkeen näytettä täytyy esikäsitellä jauhamalla sitä survimen avulla huumareessa hienojakoiseksi jauheeksi, jotta näyte olisi homogeeninen. Näytteen uutto suoritetaan Soxhlet-laitteistolla, jossa uuttoaaineena käytetään 100 % metanolia. Uuttamisen kestolle on olemassa kaksi vaihtoehtoa, joista toinen perustuu minimiaikarajana toimivaan 6 tuntiin, ja toinen puolestaan metanolin kulumiseen sen haihtuessa Soxhlet-laitteistoon kiinnitetystä refluksointilaitteistosta huolimatta. Uuttamisen jälkeen kiinteässä tai liuosmuodossa saatu kapsaisiiniuute vaatii laimennuksen, mikä tapahtuu 100 ml:n mittapullossa. Laimennukseen käytetään uuton tavoin metanolia.^{33, 34}

Aikaisemmin kapsasiinin uutossa käytettiin kylmää 96 %:sta etanolia, kunnes havaittiin suodatusjäännöksen sisältävän kapsasiinia etanolipesusta huolimatta. Näytteen esikäsittelystä, metanolin käytöstä ja kromatografisten menetelmien kehittymisestä huolimatta kapsasiinin kromatografista eluaattiliuosta joudutaan hylkäämään suodatuksessa ja tislauksessa, jotta epäpuhtausriskit olisivat mahdollisimman matalat.^{33, 34}



Kuva 2. Kapsasiininäytteen esikäsittelyyn vaadittava Soxhlet-laitteisto.³⁵

4.2.1.1. Kapsasiinin eristykseen liittyvät ongelmat lääkekemiassa

Kapsasiinin kromatografisessa erottamisessa pelkän näytteen esikäsittelyminen ei riitä, koska myös käytettävien kemikaalien täytyy olla analyttisesti puhtaita. Kapsasiinin uuttoaaineena käytettävän metanolin puhdistaminen tapahtui aikaisemmin tiputtamalla sitä alumiinioksidista muodostetun pylvään läpi.³⁴ Metanolin epäpuhtausongelmaan löydettiin myöhemmin ratkaisu, kun hopeaoksidi havaittiin tehokkaammaksi puhdistusaineeksi kuin alumiinioksidipylväs.³³

Metanolin puhdistusaine valmistetaan liuottamalla aluksi emäksistä natriumhydroksidia metanoliin, jonka jälkeen lisätään niukkaliukoista hopeanitraattia. Puhdistusaineen valmistukseen käytettävien lähtöaineiden lisäämisen lisäksi prosessi vaatii kolme tuntia kestävästä kiehuamis-refluksointiprosessista, jonka jälkeen seoksen sisältämä metanoli täytyy tislata pois. Tislattu metanoli tarkistetaan spektrofotometrillä ja absorbanssi-arvon on oltava alle 0,010.³³

Kromatografialaitteistossa käytettävän alumiinioksidipylvään valmistamisessa on havaittu ongelmia liittyen lisäaineiden käyttöön. Pylvään valmistuksessa käytetään alumiinioksidin lisäksi myös aktiivihiihtä ja piimaata, jotta häiritsevät hydrofobiset ja hydrofiiliset aineet poistuisivat kapsaisiinin eristämisen aikana. Aktiivihiihtien kohdalla on havaittu, että häiritsevien aineiden ja ylimääräisten värien poiston lisäksi liuoksesta poistuu myös osa kapsaisiinista. Ongelmasta johtuen aktiivihiihtien määrää on pyritty vähentämään kapsaisiininäytteen puhdistuksessa. Aktiivihiihtien vähentäminen voi kuitenkin aiheuttaa pienen häiritsevien aineiden määrän läpäisyn kromatografisen pylvään lävitse, jolloin eluaateista saadut tulokset muuttuvat kelvottomiksi. Lisäksi eluaatti ei saa läpäistä pylvästä toista kertaa, koska kapsaisiini voi adsorboitua puhtaasta liuoksesta pylväsmateriaaliin.³³

4.2.2. Kapsaisiinin eristys asetonitriilillä

Collins ja hänen tutkimusryhmänsä pyrkivät parempiin analyttisiin tuloksiin käyttämällä uuttoaaineena perinteisten kemikaalien sijasta asetonitriiliä, koska se oli saantonopeussuhteeltaan parempi kuin aikaisempien tutkimusten käyttämä etanoliliuos. Ennen uuttoa asetonitriilin vesiliuos puhdistettiin käänteisosmoosilla ja tislauksella. Lisäksi chilikasveja kuivattiin usean päivän ajan ennen uuton suorittamista. Uutosliuoksia pidettiin 80 °C lämpöisessä vesihautteessa neljä tuntia, minkä jälkeen näytteestä käytettiin mahdollisen saostuman tai seoksen yläpuolinen nestekerros. Collinsin ja hänen tutkimusryhmänsä tekemien esikokeiden perusteella vähintään 1 g:n kokoiset uutetut ja puhdistetut näytteet antoivat parhaimman tuloksen. Näytteet analysoitiin suodatuksen, liuoksen kaasunpoiston (Degasification) ja jäädytyksen jälkeen nestekromatografisesti (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC). Määrittelyssä käytettiin käänteisfaasikolonnia (silika, C18). Ajoliuoksena käytettiin puhdasta metanolia sekä metanolin vesiliuosta.³⁶

5. Kapsaisiinin määrittäminen

5.1. Kapsaisiinin rakenneanalyysin historiaa

John Clough Thresh oli ensimmäisiä henkilöitä, joka määrittä chileistä tulisuuden aiheuttaneen yhdisteen nimeltään kapsaisiini ja sen kemiallisen kaavan. Kokeessa hän käytti aluksi kapsaisiinin liuottamiseen potaskan vesiliuosta, minkä jälkeen tutkittava näyte saostettiin hiilihapolla. Näyte liuotettiin tämän jälkeen petrolieetteriin uudelleenkiteyttämistä varten, minkä jälkeen kiteet liuotettiin alkoholiin ja veteen. Kun näyte oli kiteytetty ja kuivattu, puhdas kapsaisiininäyte vakio painotettiin vesihaudelämmityksen avulla. Vakio painoinen kapsaisiininäyte poltettiin tämän jälkeen, ja tulosten perusteella laskettiin lopuksi alkuaineiden prosenttiosuudet yhdisteestä. Thresh sai kapsaisiinin empiiriseksi kaavaksi $C_9H_{14}O_2$, kun sen molekyylikaavaksi on nykyisin määritetty $C_{18}H_{27}NO_3$. Threshin saama tulos eroaa nykyisin käytössä olevasta molekyylikaavasta, koska palamisreaktiossa käytetyillä menetelmillä saatiin määritettyä palamistuotteista vain hiilidioksidin ja veden määrä. Tästä johtuen kapsaisiinin sisältämän tyypin määrä jäi määrittäksen ulkopuolelle.^{3, 12}

5.2. Kapsaisiinin määrittäminen aistihavaintojen avulla

Kapsaisiinin määrittäksessä on aikojen saatossa käytetty useita erilaisia määrittästapoja, joista ensimmäisiä maistamiskokeita oli Scovillen koe. Scoville perusteli kielen käyttämistä fysiologisin perustein, koska hänen mukaansa makuaistin herkkyys aistii pitoisuudet tarkemmin kuin vaaka. Tästä johtuen prosenttiosuuksien määrän sijasta paprikakasvien suhdeluvut ratkaisevat. Kokeessa paprikakasvinäyte seiso i yön yli etanolissa, jonka jälkeen liuos siirrettiin makeaan vesiliuokseen. Scoville tutki näytteen poltetta kielellä ja määrittä laimennustulosten perusteella Scovillen tulisuusasteikon.³⁷

Elintarviketeollisuudessa chilien ja paprikakasvien Scovillen tulisuusasteet määritetään viiden koemaistajan avulla. Maistajat nauttivat samanmassaisista kuivatuista chileistä valmistettuja sokerivedellä laimennettuja alkoholiliuoksia, minkä jälkeen enemmistön päätös ratkaisee chilin tulisuusasteen. Tulisuusasteet ilmoitetaan Scovillen asteikolla yksikössä SHU (Scoville Heat Unit), jossa paprikakasvin arvo on 0 SHU ja puhtaan eristetyn kapsaisiinin 16 milj. SHU. Maistamiseen sekä subjektiiviseen arviointiin perustuvasta koemenettelystä johtuen Scovillen kokeen käyttö on kielletty joillakin kemiaan liittyvillä aloilla, koska analyttisen kemian kromatografiset määritysmenetelmät ovat antaneet tarkempia ja objektiivisempia mittaustuloksia.^{4, 37, 38}

5.3. Kapsaisiinin määrittäminen spektrofotometrialla

Suzuki ja hänen tutkimusryhmänsä määrittivät kapsaisiinin chilikasveista spektrofotometrisesti. Ennen analyysin suorittamista he valmistivat näytteen puhdistamista varten kolonnin, joka koostui emäksisestä ja happamasta alumiinioksidista sekä puuhiilestä. Kolonnin aktivointiin he käyttivät pesuaineena etyyliasettaattiliuosta, jossa metanolin pitoisuus oli 1 %. Näytteet liuotettiin 1 % metanolin etyyliasettaattiliuokseen ja puhdistettiin kolonnissa. Näytteiden sisältämä kapsaisiini uutettiin puhtaalla metanolilla. Kapsaisiinin metanoliliuokset analysoitiin spektrofotometrisesti UV-valon aallonpituusalueella 280 nm. Chilikasvien sisältämän kapsaisiinin analysoinnin lisäksi Suzuki ja hänen tutkimusryhmänsä vertasivat tuloksiaan Scovillen aistihavainnoilla saatuihin tuloksiin.³⁹

Chilikasvi	Scovillen tulisuusarvot (SHU)	Näytteestä laskettu kapsaisiinimäärä (%)
Hontaka	50 000	-
Mombasa	120 000	0,8
Santana chilipippuri	8 400	0,058
Uganda	127 000	0,85
Turkkilainen	12 300	0,083
Meksikolaiset Pequinot	40 000	0,26
Abessinialaiset chilit	11 000	0,075
Japanilainen Santaka	38 000	0,253

Taulukko 6. Chilikasvien kapsaisiinimäärät.³⁹

Näytteen numero	Scovillen menetelmä	Spektrofotometria
1	425 000	538 000
3	970 000	876 000
7	345 000	412 500
11	236 000	183 000
15	52 000	40 000
19	845 000	892 000
20	1 025 000	1 035 000

Taulukko 7. Kahdella eri menetelmällä määritetyt tulisuusasteet.³⁹

5.4. Kapsaisiinin määrittäminen kromatografisilla menetelmillä

5.4.1. Kapsaisiinin määrittäminen kaasukromatografialla

Elintarviketeollisuudessa kapsaisiinin määrä voidaan määrittää kaasukromatografisin menetelmin, esimerkiksi korealaisesta Gochujang-mausteseoksesta, jonka kapsaisiinipitoisuuden on oltava kansainvälisten standardien mukaan vähintään 10,0 ppm. Määrittämisessä tutkittava näyte uutetaan 100 %:iin metanolia, minkä jälkeen kapsaisiinerostuma uutetaan dikloorimetaanilla (DCM) ja natriumkloridin kylläisellä liuoksella. Uutteen väkevöittämiseen käytetään pyörrehaihdutinta ja jäljelle jäänyt liuosmäärä liuotetaan skvaleenia sisältävään dikloorimetaaniliuokseen. Lopuksi näytteen kapsaisiinipitoisuus määritetään liekki-ionisaatiohavaittimen (FID) omaavalla kaasukromatografialla. Tarkemman määrittämiseksi kapsaisiininäyte on käsiteltävä metanoli-heksaani -fraktiointimenetelmällä, jotta Gochujangissa esiintyvät hydrofobiset ja hydrofiiliset eivät häiritse kromatografimittauksissa. Fraktioinnilla häiritsevät yhdisteet voidaan erottaa näytteestä käyttämällä erotussupplia, ja näytteessä mahdollisesti esiintyvä vesi voidaan poistaa käyttämällä suodatinpaperia ja kuivausaineena natriumsulfaattia.⁴⁰

5.4.2. Kapsaisiinin määrittäminen nestekromatografialla

Kapsaisinoidien määrän voi määrittää chilikasveista nestekromatografisesti, jolloin määrittäminen perustuu kapsaisinoidien poolisuuteen ja piikkien pidättymisaikaan (Retention Time). Collins ja hänen tutkimusryhmänsä määrittivät New Mexican yliopistossa kasvatetuista erilaisista chililajikkeista niissä esiintyvien kapsaisinoidien pitoisuudet nestekromatografisesti aikaisemmin valmistettujen standardiliuosten avulla. He tekivät kapsaisinoidien määrittämisen kahdessa eri vaiheessa, koska heidän tavoitteenaan oli määrittää näytteissä pääasiallisesti esiintyvien kapsaisiinin ja dihydrokapsaisiinin lisäksi myös vähemmistönä olevien muiden kapsaisinoidien pitoisuudet.³⁶

Ensimmäisessä vaiheessa pääkapsaisinoidit määritettiin käyttämällä vakiona pysyvää ajoliuosta, jotta kapsaisiini ja dihydrokapsaisiini kerääntyisivät aluksi omiksi rypäiksi. Ajoliuos sisälsi 70 % pullosta B otettua puhdasta metanolia ja 30 % pullosta A otettua metanolin 10-tilavuusprosenttista vesiliuosta. Liuokset sekoittuivat keskenään pumppausvaiheessa ja muodostivat seoksen, jolla tasoitettiin analyysissä tapahtuneita muutoksia. Toisessa vaiheessa vähemmistö-kapsaisinoidit määritettiin käyttämällä koostumukseltaan vaihtelevaa ajoliuosta, jotta niiden analyttiset piikit saatiin näkyville pääkapsaisinoidien jälkeen. Ajoliuos koostui edelleen puhtaasta metanolista ja metanolin vesiliuoksesta, mutta niiden prosenttiosuudet vaihtelivat laitteiston ajoon käytetyn ajan perusteella. Tulosten perusteella Collins ja hänen tutkimusryhmänsä päättelivät, että menetelmä oli halvempi, nopeampi ja tehokkaampi kuin aikaisemmin käytetyt määritysmenetelmät ja että menetelmä soveltui myös vähemmistö-kapsaisinoidien määrittämiseen.³⁶

Tutkittavat kapsaisinoidit	Ajoliuos		Ajon kesto (min)	Pidättymisaika (min)
	Metanolin osuus (%)	10 % Metanolin vesiliuoksen osuus (%)		
Kapsaisiini	70	30	7	3,2
	57 (10 min) ja 68 (10 min)	43 (10 min) ja 32 (10min)	20	9,3
Dihydro-kapsaisiini	70	30	7	4,3
	57 (10 min) ja 68 (10 min)	43 (10 min) ja 32 (10min)	20	14,3
Nordihydro-kapsaisiini	57 (10 min) ja 68 (10 min)	43 (10 min) ja 32 (10min)	20	8,4
Homodihydro-kapsaisiini	57 (10 min) ja 68 (10 min)	43 (10 min) ja 32 (10min)	20	17,7

Taulukko 8. Chilien pää- ja sivukapsaisinoidien analyttisen määrittämisen tulokset.³⁶

5.4.3. Kapsaisiinin määrittäminen kaasunestekromatografialla

DiCecco määrittäi kapsaisiinin määrän paprikanäytteistä kaasunestekromatografisesti (Gas-Liquid Chromatography, GLC). Menetelmässä hän aluksi uutti kapsaisiinin paprikanäytteistä asetonilla, minkä jälkeen näytteet puhdistettiin alumiinioksidipylväässä asetonilla. Kapsaisiini eluointiin alumiinioksidipylvästä liuoksella, joka sisälsi asetonia, metanolia ja vettä. Kaasunestekromatografista määrittämistä varten DiCecco haihdutti eluointiaineen pyörrehaihduttimella ja käytti liuottimena asetonin sijasta piperiinin kloroformiliuosta. Piperiinin tarkoitus analyysissä oli toimia määrittämisen sisäisenä standardina. Kapsaisiininäytteet analysoitiin kaasunestekromatografisesti. Kantajakaasuna käytettiin typpeä. Näyte kulki laitteistossa polyetyleeniglykolista (PEG) ja teflonista valmistetun pylvään läpi.⁴¹

Kapsaisiinin määrän DiCecco laski analyysissä Hewlett-Packardin tietokoneohjelmalla, jolla hän määrittäi kapsaisiinin ja piperiinin kerääntymisajat ja laski kuvaajista niiden pinta-alat. Paprikanäytteiden lisäksi DiCecco määrittäi kapsaisiinin myös mausteseoksista kuten grillikastikkeista, mutta niiden sisältämät kapsaisiinimäärät olivat merkittävästi pienempiä kuin paprikanäytteistä saadut tulokset. Analyysin loppuvaiheessa DiCecco lisäsi näytteisiin kapsaisiinin standardiliuosta, ja hän seurasi, millä tarkkuudella alkuperäinen ja lisätty kapsaisiinimäärä näkyivät mittaustuloksissa. Hän käytti laskuissa palautumisprosenttia (Per Cent Recovery).^{41, 42}

Näyte	Kapsaisiininipitoisuus (mg/g)			Palautumisprosentti (%)
	Alkuperäisessä näytteessä	Standardiliuoksessa	Käsitellyssä näytteessä	
Paprikanäyte A	0,192	0,067	0,263	106,0
Paprikanäyte B	1,132	0,667	1,760	94,2
Paprikanäyte C	3,024	1,667	4,680	99,3
Paprikanäyte D	0,0735	0,100	0,1804	106,9
Paprikanäyte E	0,0735	2,000	2,0725	100,0
Paprikanäyte F	0,0735	5,000	5,0702	99,9
Mausteseos A	0,00219	0,00330	0,00539	97,0
Mausteseos B	0,00629	0,00660	0,01296	101,1

Taulukko 9. Kapsaisiininäytteiden palautumisprosentin mittaustulokset.⁴¹

5.5. Kapsaisiinin määrittäminen kolorimetrisesti

5.5.1. Kapsaisiinin määrittäminen Folin-Ciocalteu -reagenssilla

Kapsaisiinin voi määrittää myös kolorimetrisin menetelmin. Kaasu- ja nestekromatografisista menetelmistä poiketen kolorimetriassa käytetään erilaisia väriaineita, jotka reagoivat kapsaisiinin fenoliryhmän kanssa ja muodostavat värillisiä liuoksia. Bajaj ja Kaur määrittivät kapsaisiinin paprikakasveista käyttämällä värinmuodostuksessa Folin-Ciocalteu-reagenssia. Reagenssin valmistukseen he käyttivät vettä, natriumwolfraattia Na_2WO_4 , natriummolybdaattia Na_2MoO_4 , 85 %:sta fosforihappoa ja väkevää suolahappoa, jotka sekoitettiin keskenään. Reagenssin viimeistelyyn he käyttivät litiumsulfaattia ja bromia. Käytettyjen epäorgaanisten suolojen kohdalla vaatimuksena oli, että ne sisälsivät kidevettä.⁴³

Kapsaisiinin standardiliuoksen Bajaj ja Kaur valmistivat 10 mg:sta kapsaisiinia, jonka he liuottivat metanoliin. He lisäsivät liuokseen Folin-Ciocalteu-reagenssia ja kylläistä natriumkarbonaattiliuosta, ja määrittivät kapsaisiinin sinisen värin saaneesta liuoksesta absorbanssimittauksilla. Varsinaisen näytteen Bajaj ja Kaur valmistivat kuivatusta paprikakasvin jauheesta käyttämällä uutossa erilaisia liuottimia ja vertasivat niiden toimivuutta määrittämisessä. Lisäksi he tutkivat uuttoaajan vaikutusta asetonin kohdalla ja vertasivat tuloksia keskenään. Parhaat tulokset saatiin käyttämällä uutossa etyyliasettaattia ja asetonia. Uuttoaikojen vertailun perusteella asetonin ravistelu 10 minuutin ajan antoi parhaimman tuloksen.⁴³

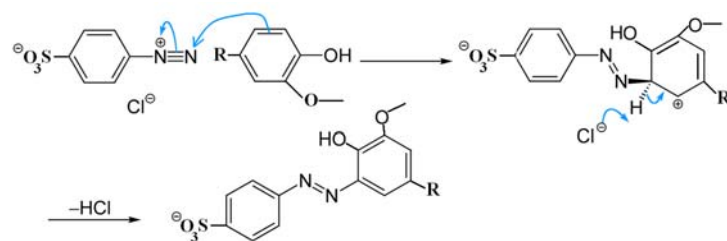
Uuttomenetelmä	Häiritsevien aineiden osuus (%)
50 % Metanolin vesiliuos	1,76
Asetoni (1 h refluksointi)	2,00
Asetoni (1 h refluksointi ja Norit-käsittely)	1,02
Asetoni (10min ravistelu)	0,68
70 % Etanolin vesiliuos	1,23
Etyyliasettaatti	0,70

Taulukko 10. Kapsaisiiniuutossa käytetyt liuottimet ja menetelmissä esiintyneiden häiritsevien aineiden osuus.⁴³

Kolorimetrisessä määrittäksessä Bajaj ja Kaur pyrkivät Folin-Ciocalteu-reagenssin käytöllä saamaan pitkään säilyvän värin, koska muiden tutkijaryhmien aikaisemmin käyttämät kolorimetriset menetelmät ovat aiheuttaneet ongelmia värinmuodostuksen, värin pysyvyyden ja liuosten sameuden vuoksi. Myös tulosten toistaminen on ollut vaikeaa aikaisemmillä menetelmillä. Sen sijaan Bajaj'n ja Kaurin menetelmän vaatimuksena oli käytettävien reagenssien analyyttinen puhtaus. Ennen määrittäksen suorittamista liuottimet täytyi tislata ja kuivata. Lisäksi Bajaj ja Kaur havaitsivat, että metanolin ja etanolin vesiliuokset eivät soveltuneet näytteen uuttamiseen, koska ne reagoivat uutuksessa mahdollisesti esiintyvien pigmenttien kanssa ja koska näytteen puhdistukseen käytettävä alumiinioksidipylväs menettää aktiivisuutensa. Tästä johtuen analyyttisesti puhtaan tuloksen saamiseksi näytteen eluointi on tehtävä metanoli-asetoni-vesisekoituksella.⁴³

5.5.2. Kapsaisiinin määrittäys diatsoniumsuoloilla

Kapsaisiinin kolorimetrisessä määrittäksessä voi käyttää myös diatsobentseenisulfonihaposta valmistettuja värillisiä diatsoniumsuoloja. Menetelmässä käytetään 0,4 %:sta diatsobentseenisulfonihappoa, joka on valmistettu liuottamalla sitä laimeaan 0,25-normaaliseen suolahappoliuokseen. Kyseistä liuosta lisätään näyteliuokseen, jossa kapsaisiini on uutettu metanoliin ja käsitelty pienellä annoksella natriumhydroksidia. Tämän jälkeen liuokseen lisätään natriumjodidin vesiliuosta ja suolahappoa, ja liuosta lämmitetään vesihauteessa, jolloin muodostuu värillinen liuos, joka laimennetaan natriumhydroksidilla absorbanssimittauksia varten.³³ Värinmuodostus diatsoniumsuolan avulla perustuu diatsoniumkytkentään (Azo Coupling), jossa diatsoniumioni reagoi elektrofiilinä fenolisen yhdisteen kanssa ja korvaa sen rengasrakenteessa esiintyvän vetyatomin.⁴⁴



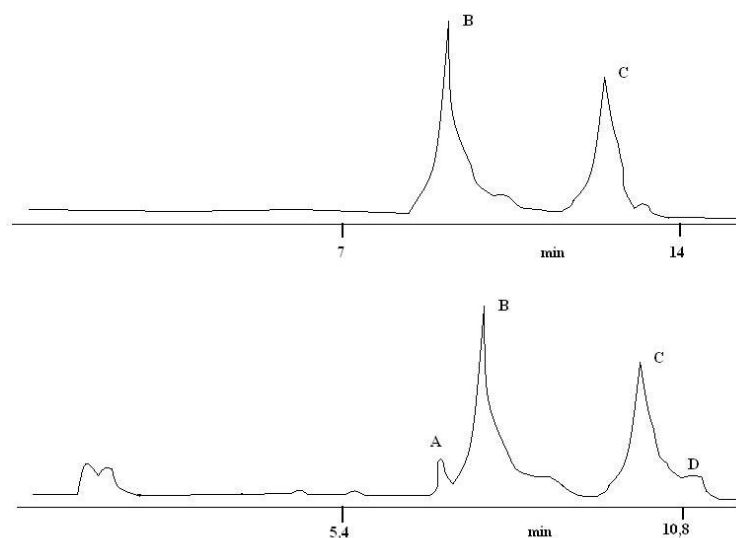
Diatsoniumkytkentä. Reaktioyhtälössä R = kapsaisiinin amidiketju.⁴⁴

Kapsaisiinin tapauksessa diatsoniumioni korvaa bentseenirenkaassa hydroksyyli-ryhmästä katsottuna orto-asemassa sijaitsevan vetyatomin, koska para-asemassa sijaitseva amidiketju on korvannut bentseenirenkaan vetyatomin.^{44,45} Diatsoniumionin värinmuodostusreaktioissa vaikuttavat myös reaktio-olosuhteet. Reaktio täytyy suorittaa emäksisissä liuoksissa käyttämällä natriumhydroksidia, jotta diatsoniumionin ja fenoliryhmän sisältävät yhdisteet ovat riittävän reaktiivisia. Lisäksi reaktiossa käytettävät aineet täytyy lisätä hitaasti pieninä annoksina jääkylmiin tai jäähauteessa oleviin astioihin, koska diatsoniumsuolojen pysymättömyydestä johtuen reagenssit täytyy valmistaa laboratoriossa ennen määrittystä.^{33, 43, 46}

5.6. Muut kapsaisiinin määrittämenetelmät

5.6.1. Kapsaisinoidien määrittäminen HPLC-EI-MS ja HPLC-CI-MS -menetelmillä

Kapsaisinoidien määrittämisessä on käytetty myös erilaisia analysointimenetelmien yhdistelmiä. Games ja hänen tutkimusryhmänsä analysoivat kapsaisinoideja nestekromatografisesti ja massaspektrometrisesti. He analysoivat paprikanäytteissä esiintyvät kapsaisinoidit nestekromatografisesti ja määrittivät niiden massa-varausjakaumat m/z massaspektrometrisesti. Analyysissä massaspektrometriset menetelmät jaettiin kahteen osaan: EI-MS eli elektroni-ionisaatioon perustuva menetelmä ja CI-MS eli kemialliseen ionisaatioon perustuva menetelmä.⁴⁷



Kuva 3. EI-MS ja CI-MS –menetelmien tunnistamat kapsaisinoidit.

Kuvassa A = nordihydrokapsaisiini, B = kapsaisiini,

C = dihydrokapsaisiini ja D = homokapsaisiini.⁴⁷

EI-MS -menetelmässä Games ja hänen tutkimusryhmänsä uuttivat paprikanäytteiden sisältämät kapsaisinoidit Spherisorb ODS-kolonnissa käyttämällä eluointiaineena metanolin, veden ja etikkahapon liuosta. He kuumensivat näytteitä 180-250 °C lämpötilassa ja 0,8 µTorr paineessa. Kun elektroneja oli kiihdytetty sähkökentässä, ne törmäsivät kaasuuntuneen näytteen molekyylin kanssa ja poistivat niistä elektroneja. Ionisoituneet kapsaisinoidit analysoitiin massaspektrometrisesti.⁴⁷

CI-MS –menetelmässä paprikanäytteiden sisältämät kapsaisinoidit uutettiin Hypersil ODS -kolonnissa käyttämällä eluointiaineena etanolin, veden ja etikkahapon liuosta. Näytteitä kuumennettiin 150 °C lämpötilassa ja 24 µTorr paineessa. Games ja hänen tutkimusryhmänsä käyttivät analyysissä reagenssikaasuna ammoniakkaa. Kun reagenssikaasun molekyylit oli ionisoitu, ne törmäsivät kaasuuntuneen näytteen molekyylin kanssa ja siirsivät niihin sähkövarausta. Ionisoituneet kapsaisinoidit analysoitiin massaspektrometrisesti.⁴⁷

Kapsaisinoidipiikki	Ionisaatio	Kapsaisinoidien massa-varausjakaumat <i>m/z</i> (sulussa % suhteellinen intensiteetti)
A = Nordihydro-kapsaisiini	CI	294 (14); 175 (87); 158 (65); 152 (49); 137 (100)
B = Kapsaisiini	EI	305 (6); 195 (2); 152 (10); 137 (100); 122 (6)
	CI	306 (36); 187 (20); 170 (51); 154 (22); 152 (2); 137 (100)
C = Dihydro-kapsaisiini	EI	307 (11); 195 (5); 152 (10); 137 (100); 122 (6)
	CI	308 (31); 189 (54); 172 (47); 154 (20); 152 (33); 137 (100)
D = Homokapsaisiini	CI	320 (4); 201 (31); 184 (100)

Taulukko 11. Kapsaisinoidien spektritulukset.⁴⁷

6. Kasvupaikan vaikutus kasvien kapsaisiinipitoisuuteen

6.1. Kasvupaikkana Afrikka

Elintarvikkeina käytettävien chilipippureiden sisältämä kapsaisiinin määrä ei ole aina sama tietyn kasvin kohdalla, koska myös maantieteellinen sijainti ja kasvuolosuhteet vaikuttavat muodostuvan kapsaisiinin määrään. Nwokem ja hänen tutkimusryhmänsä määrittivät Nigeriassa kasvavien chilipippureiden sisältämät kapsaisiinipitoisuudet. He käyttivät määrittämenetelmänä kaasukromatografiaa, jonka kvantitatiivisessa osuudessa oli mukana myös massaspektrometria (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GCMS). Näytteitä varten Nwokem ja hänen tutkimusryhmänsä hankkivat vähittäistukusta viisi eri chilipippurikasvilajiketta, joita kasvatettiin eri puolilla Nigeriaa.³⁸

Näytteiden sisältämät kapsaisiinimäärät uutettiin metanolilla, ja saadut liuokset ruiskutettiin kaasukromatografilaitteiston pylväskoloniin. Massaspektrometrinen osion tarkoituksena oli määrittää kapsaisiinin suhteellinen kaavamassa elektroni-ionisaation (Electron Ionisation, EI) eli positiivisesti varautuneen ionin muodostumisen avulla. Näytteistä saatuja kapsaisiinin kerääntymisarvoja Nwokem ja hänen tutkimusryhmänsä vertasivat standardiliuoksista saatuihin arvoihin. Tulosten perusteella Kaakkois-Nigeriassa viljelty keltainen chilipippuri Nsukka sisälsi eniten kapsaisiinia ja oli Scovillen asteikolla mitattuna tulisin.³⁸

6.2. Kasvupaikkana Aasia

Al Othman ja hänen tutkimusryhmänsä määrittivät kapsaisiinipitoisuudet chili- ja paprikakasveista nestekromatografisesti. He uutivat kapsaisiinin ja dihydrokapsaisiinin etanolilla kuudesta eri paprikalajikkeesta, jotka oli hankittu riadilaisista lähikaupoista. Näytteet injisoitiin Betasil C₁₈-pylväaseen ja analysoitiin kapsaisiinin ja dihydrokapsaisiinin maksimiabsorbanssia vastaavalla UV-valon aallonpituudella 222 nm. Ajoliuoksena Al Othman ja hänen tutkimusryhmänsä käyttivät vesi-asetonitriililiuosta.⁴⁸

Näytteiden absorbanssiarvoja ja kerääntymisaikoja verrattiin standardiliuosten arvoihin, minkä jälkeen kapsaisiinimäärät määritettiin piikkien pinta-alan perusteella, ja paprikakasvinäytteistä määritettiin niiden tulisuus Scovillen asteikolla. Tulosten perusteella eniten kapsaisiinia sisältänyt tulinen chili (Hot Chili) oli myös tulisin, kun taas ei-tulisissa kelta- ja punapaprikoissa ei havaittu kapsaisiinia ja dihydrokapsaisiinia.

Kapsaisiinipitoisuuksien lisäksi Al Othman ja hänen tutkimusryhmänsä määrittivät kyselyn avulla riadilaisperheiden chili- ja paprikakasvien kulutusta, jonka tulosten perusteella he havaitsivat, että kaupunkilaisten saama päiväannos 7,584 mg ylitti suositeltavan päiväsaannin 2,640 mg.⁴⁸

Kasvi	Kasvista määritetty kapsaisiinipitoisuus (µg/g)	Kasvin Scoville-arvo (SHU)	Päivittäinen kasvin käyttö (g)	Kasvista saatava keskimääräinen kapsaisiiniannos (mg/henkilö/päivä)
Tulinen chili	4249,0 ± 190,3	67984,60	1,5	6,374
Punainen chili	309,3 ± 4,2	4949,08	3	0,928
Vihreä chili	138,5 ± 5,2	2216,58	2	0,277
Viherpaprika	1,0 ± 0,9	15,83	5	0,005
Punapaprika	0	0	2	0
Keltapaprika	0	0	2	0

Taulukko 12. Riadilaisperheiden keskimääräinen chili- ja paprikakasvien kulutus.⁴⁸

7. Yhteenveto

Chilin käyttö on muuttunut aikojen saatossa. Etelä-Amerikassa tuhansien vuosien aikana kasvatetusta elintarvikkeesta on tullut lääketieteellisyydelle tärkeä raaka-aine, koska chilikasveista saatava kemiallinen yhdiste nimeltään kapsaisiini on osoittautunut hyväksi painonhallintalääkkeeksi. Lääkekäytön ohella kapsaisiinia käytetään myös torjunta-aseissa ja itsepuolustusvälineissä kuten pippurisumutteissa. Etelä-Amerikan intiaanikansat hyödynsivät sen polttavia ja näkökykyä väliaikaisesti heikentäviä ominaisuuksia savutulissa tuhansien vuosien ajan. Lisäksi kapsaisiinia käytetään linnunruoan säilönnässä, koska sen on havaittu karkottavan jo pienillä pitoisuuksilla ruokavarantoja tyhjentäviä oravia.^{1, 2, 49, 50}

Lääketeollisuudessa on kuitenkin tutkittu jo 1980-luvun lopulta lähtien erilaisia kapsaisiinijohdoksia, koska chilikasveista uutettujen kapsaisiinien ja kapsinoidien on havaittu aiheuttavan liian suurina annoksina mahahaavoja ja suolistosairauksia. Tutkimusten perusteella sopivia kapsaisiinijohdoksia on löydetty jalostetuista ja mutaation läpikäyneistä chili- ja paprikakasveista, joista ensimmäisiä oli CH-19 ”Makea”, joka sisälsi kapsaisiinin amidiryhmän esteriryhmällä korvanneita kapsinoideja. Vaikka kapsinoidit ovat tulisuusasteeltaan miedompia kuin kapsaisiini ja kapsainoidit, ne ovat yhtä tehokkaita painonhallintalääkkeissä. Myöhemmin löydettyillä kapsikoninoidella on oletettu olevan sekä kapsainoidien että kapsinoidien kaltaisia ominaisuuksia.⁴⁻¹⁰

Kapsaisiinin eristykseen on käytetty erilaisia menetelmiä, joita tässä tutkielmassa on käsitelty yleiskatsauksellisesti kromatografisesta näkökulmasta. Joint Committee of the Pharmaceutical Society for Analytical Chemistry suositti kapsaisiinin eristyksessä 1950-1960-luvuilla standardimenetelmää, jossa käytetään alumiinioksidista valmistettua kolonnia. Aluksi komitea käytti uuttoaaineena etanolia, mutta merkittävien kapsaisiinimäärien jäädessä kasviin uuttoaine muutettiin metanoliksi. Collins et al. sen sijaan eristivät kapsaisiinin nestekromatografisesti 1990-luvun puolivälissä käyttämällä ajoliuoksena asetonitriiliä ja kolonnina C18-käänteisfaasikolonnia. Wall eristi kapsaisiinin kaksi isomeriamuotoa 1990-luvun lopussa käyttämällä hopeanitraattiliuosta, jonka vaikutuksia hän kokeili lisäämällä sitä ohutkerroskromatografiassa käytettävään silikageelilevyyn ja ajoliuokseen. Suora lisäys ajoliuokseen osoittautui paremmaksi vaihtoehdoksi.^{15, 33, 33, 34, 36}

Kapsaisiinin määritysmenetelmät ovat eristysmenetelmien ohella muuttuneet merkittävästi. 1800-luvun lopussa kapsaisiinin määrittäminen perustui liekkireaktioihin, joissa yhdistettä poltettiin ja sen empiirinen kaava laskettiin palamistuotteiden avulla. John Clough Threshin laatimista kapsaisiinin määrittämisestä on kuitenkin vaikeaa saada selvää, mitä alkoholeja hän käytti uuttoaikana. Lisäksi tiivistelmissä esiintyvistä sanoista Petroleum on vaikeaa saada selvää tarkoittiko hän kyseisellä sanalla petroleetteriä vai petroolia. On myös käyty keskustelua Threshin suhtautumisesta typen olemassaoloon kapsaisiinissa. Joidenkin tiedemiesten mukaan Thresh olisi tiennyt typen esiintymisestä kapsaisiinissa, mutta olisi kieltäytynyt hyväksymästä sitä yhdisteen empiiriseen kaavaan.^{3,}

Threshin suorittamien kokeiden jälkeen Wilbur Scoville pyrki määrittämään kapsaisiinin makuaistiin perustuvan organoleptisen kokeen avulla 1900-luvun alussa. Menetelmässä alkoholiin uutettua kapsaisiinia tiputetaan kielen päälle ja laimennetaan, kunnes poltetta ei enää havaita. Analyytiset menetelmät ovat kuitenkin korvanneet organoleptisen kokeen 1950-luvulta lähtien, koska makuaisti on biologisista syistä johtuen erilainen jokaisella ihmisellä. Analyytiset menetelmät antavat myös tarkempia kvantitatiivisempia tuloksia pienillä pitoisuuksilla. Spektrofotometriset, kromatografiset ja kolorimetriset menetelmät ovat yleisesti käytettyjä kapsaisiinin ja kapsaisinoidien määrittämismenetelmiä, mutta niiden käyttäminen samanaikaisesti analyysissä on mahdollista.^{36, 37, 39-41, 43, 47}

Kapsaisiinin ja kapsaisinoidien määrä ei ole vakio kaikissa chili- ja paprikakasveissa, koska myös kasvupaikalla on vaikutusta muodostuvan kapsaisiinin ja kapsaisinoidien määrään. Nwokem et al. määrittivät kaasukromatografisesti kapsaisiinin Afrikassa kasvavista chili- ja paprikakasveista, joita myytiin paikallisissa vähittäistukiuissa. Tulosten perusteella Kaakkois-Nigeriassa kasvava keltainen chilipippuri Nsukka oli Scovillen asteikolla mitattuna tulisin. Al Othman et al. sen sijaan määrittivät kapsaisiinin Aasiassa kasvavista chili- ja paprikakasveista nestekromatografisesti ja tutkivat kyselylomakkeen avulla riadilaisperheiden keskimääräistä chili- ja paprikakasvien kulutusta. Tulosten perusteella tulinen chili (Hot Chili) oli Scovillen asteikolla mitattuna tulisin, ja riadilaisperheiden päivittäinen kapsaisiiniannos 7,584 mg oli yli suositeltavan päiväsaannin 2,640 mg.^{38, 48}

Viiteluettelo

- 1 L. Perry and K. V. Flannery, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**, 11905-11909.
- 2 A. Szallasi and P. M. Blumberg, *Pharmacological Reviews*, 1999, **51**, 159-212.
- 3 J. C. Thresh, in *Year-Book of Pharmacy, Comprising Abstracts of Papers Relating to Pharmacy, Materia Medica and Chemistry Contributed to British and Foreign Journals with Transactions of the British Pharmaceutical Conference*, ed. anonymous, London, United Kingdom, 1877, p. 24-25.
- 4 T. G. Berke and S. C. Shieh, in *Handbook of Herbs and Spices*, ed. K. V. Peter, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 2001, p. 111-122.
- 5 K. Kobata, T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai and T. Watanabe, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 1695-1697 (DOI:10.1021/jf980135c).
- 6 S. Haramizu, F. Kawabata, K. Ohnuki, N. Inoue, T. Watanabe, S. Yazawa and T. Fushiki, *Biomed. Res.*, 2011, **32**, 279-284 (DOI:10.2220/biomedres.32.279).
- 7 Y. Tanaka, M. Hosokawa, K. Otsu, T. Watanabe and S. Yazawa, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 5407-5412 (DOI:10.1021/jf900634s).
- 8 *Spice Science and Technology*, ed. M. Takemasa and K. Hiraku, CRC Press, 1998, p. 141-162.
- 9 Smeets, Astrid J. P. G. and M. Westerterp-Plantenga, in *Weight Control and Slimming Ingredients in Food Technology*, ed. S. S. Cho, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2010; 2009, p. 201-211.
- 10 Kun-Young Park and In-Sook Ahn, in *Functional Foods of the East*, ed. F. Shahidi, CRC Press, 2010, p. 313-341.
- 11 W. M. Haynes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 2012-2013.
- 12 *The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Merck, Whitehouse Station, NJ :, 2006.
- 13 J. McMurry, in *Organic Chemistry*, ed. J. McMurry, Brooks/Cole, Thomson Learning Inc., 2008, p. 180-184.
- 14 J. Lu and M. Cwik, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, **701**, 135-139 (DOI:10.1016/S0378-4347(97)00347-2).
- 15 P. E. Wall, *Journal of Planar Chromatography*, 1997, **10**, 4-9.
- 16 C. S. J. Walpole, R. Wigglesworth, S. Bevan, E. A. Campbell, A. Dray, I. F. James, M. N. Perkins, D. J. Reid and J. Winter, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 2362-2372 (DOI:10.1021/jm00068a014).

- 17 A. M. Krajewska and J. J. Powers, *Journal of Chromatography A*, 1987, **409**, 223-233 (DOI:10.1016/S0021-9673(01)86798-4).
- 18 E. Castillo, I. Regla, P. Demare, A. Luviano-Jardón and A. López-Munguía, *Synlett*, 2008, , 2869-2873.
- 19 H. L. Constant, G. A. Cordell, D. P. West and J. H. Johnson, *Journal of Natural Products*, 1995, **58**, 1925-1928.
- 20 K. Kobata, K. Sutoh, T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai and T. Watanabe, *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**, 335-336 (DOI:10.1021/np9803373).
- 21 K. Kobata, M. Kawaguchi and T. Watanabe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, **66**, 319-327.
- 22 S. Yazawa, H. Yoneda, M. Hosokawa, T. Fushiki and T. Watanabe, *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 2004, **23**, 17-20.
- 23 K. Kobata, M. Mimura, M. Sugawara and T. Watanabe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, **75**, 1611-1614.
- 24 C. S. J. Walpole, S. Bevan, G. Bovermann, J. J. Boelsterli, R. Breckenridge, J. W. Davies, G. A. Hughes, I. James and L. Oberer, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 1942-1954 (DOI:10.1021/jm00039a006).
- 25 M. F. Dalence-Guzman, M. Berglund, S. Skogvall and O. Sterner, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 2499-2512 (DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.11.055>).
- 26 R. Wrigglesworth, C. S. J. Walpole, S. Bevan, E. A. Campbell, A. Dray, G. A. Hughes, I. James, K. J. Masdin and J. Winter, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 4942-4951 (DOI:10.1021/jm960512h).
- 27 C. S. J. Walpole, R. Wrigglesworth, S. Bevan, E. A. Campbell, A. Dray, I. F. James, K. J. Masdin, M. N. Perkins and J. Winter, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 2373-2380 (DOI:10.1021/jm00068a015).
- 28 C. S. J. Walpole, R. Wrigglesworth, S. Bevan, E. A. Campbell, A. Dray, I. F. James, K. J. Masdin, M. N. Perkins and J. Winter, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 2381-2389 (DOI:10.1021/jm00068a016).
- 29 S. S. McIlvain, W. Chen, P. H. Ramiya, R. Burch, R. B. Carter and T. A. Anderson, *Preparation and Purification of Synthetic Capsaicin*, USA, 2004.
- 30 D. G. Kananovich, D. M. Zubrytski and O. G. Kulinkovich, *Synlett*, 2010, , 1043-1046.
- 31 G. Appendino, A. Minassi, N. Daddario, F. Bianchi and G. C. Tron, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 3839-3841 (DOI:10.1021/ol0266471).

- 32 Y. Amino, W. Kurosawa, T. Nakano and K. Hirasawa, *Production Method of Capsinoid by Dehydrating Condensation, Stabilizing Method of Capsinoid and Capsinoid Composition*, 2007.
- 33 *Analyst*, 1964, **89**, 377-388.
- 34 *Analyst*, 1959, **84**, 603-617.
- 35 A. Sella, *Chemistry World*, 2007, **4**.
- 36 M. D. Collins, L. M. Wasmund and P. W. Bosland, *HortScience*, 1995, **30**, 137-139.
- 37 W. L. Scoville, *The Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1912, **1**, 453-454.
- 38 C. O. Nwokem, E. B. Agbaji, J. A. Kagbu and E. J. Ekanem, *New York Science Journal*, 2010, **3**, 17-21.
- 39 J. I. Suzuki, F. Tausig and R. E. Morse, *Food Technology*, 1957, **11**, 100-104.
- 40 *Codex Alimentarius*, ed. anonymous, The Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009; 2010.
- 41 J. J. DiCecco, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1976, **59**, 1-4.
- 42 *Anal. Chem.*, 1970, **42**, 19A-19A (DOI:10.1021/ac60293a716).
- 43 K. L. Bajaj and G. Kaur, *Microchimica Acta*, 1979, **71**, 81-86 (DOI:10.1007/BF01197523).
- 44 *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, ed. M. B. Smith and J. March, John Wiley & Sons, New York, USA, 2007, p. 691-692.
- 45 J. McMurry, in *Organic Chemistry*, ed. J. McMurry, Brooks/Cole, Thomson Learning Inc., 2008, p. 570-571.
- 46 M. S. Karawya, S. I. Balbaa, A. N. Girgis and N. Z. Youssef, *Analyst*, 1967, **92**, 581-583.
- 47 D. E. Games, N. J. Alcock, J. van der Greef, L. M. Nyssen, H. Maarse, M. C. Ten and N. de Brauw, *Journal of Chromatography A*, 1984, **294**, 269-279 (DOI:10.1016/S0021-9673(01)96133-3).
- 48 Z. A. Al Othman, Y. B. H. Ahmed, M. A. Habila and A. A. Ghafar, *Molecules*, 2011, **16**, 8919-8929 (DOI:10.3390/molecules16108919).
- 49 C. S. Fitzgerald, P. D. Curtis, M. E. Richmond and J. A. Dunn, *Effectiveness of Capsaicin as a Repellent to Bird Seed Consumption by Gray Squirrels*, University of Nebraska - Lincoln, 1995.

50 F. Czarnecki, *Clinics in Occupational and Environmental Medicine*, 2003, **3**, 443-456.

51 E. K. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1919, **41**, 1115-1121 (DOI:10.1021/ja02228a011).