

고속 액체크로마토그래피에 의한 고추종의 신미성분 분석

이충영·우상규·이운수·권익부

롯데그룹 중앙연구소

Analysis of Pungent Principles of Capsicum Fruit by HPLC

Choong-Young Lee, Sang-Kyu Woo, Youn-Soo Lee and Ik-Boo Kwon

Lotte Group R & D Center, Seoul, Korea

ABSTRACT-The analysis condition for determination of capsaicin and dihydrocapsaicin, major pungent principles of capsicum fruit, with high performance liquid chromatography was studied and the difference of those content according to species, cultivated region and drying method was investigated.

The capsaicins were extracted effectively with 70% ethanol for 1 hr at 60°C. As a result of reproducibility and recovery test, the calculation of analysis data was reasonable based on the peak area.

The content of capsaicins was different with species, cultivated region and drying method, respectively. Especially, the difference depending on drying method was remarkable; the sun dried sample showed higher value than that of the oven dried sample, about maximum 80% for capsaicin and 60% for dihydrocapsaicin.

Keyword □ HPLC, Analysis, Capsaicin, Dihydrocapsaicin

한국인의 기호에 있어 중요한 위치를 차지하고 있는 고추는 향신료로서 뿐만 아니라 건위제, 방부제, 색상효과 등으로 다양하게 이용되고 있다.

일반적으로 고추는 품종, 재배조건 또는 건조방법에 따라서 품질 및 신미도에 많은 차이를 나타내게 된다.^{1,2)}

고추의 주요 성분으로는 capsanthin, capsorubin 등의 carotenoid 색소 당류, vitamin, capsaicin, 유기산 등이 있으며³⁻⁵⁾ 그 중 고추의 독특한 신미는 주로 capsaicin 에 기인되는^{1,4,6,7)} 것으로 알려져 있다. Capsaicin 에는 몇 가지의 유도체가 존재하며 고추에 있어 천연적으로 생성될 수 있는 capsaicin 에는 capsaicin, dihy-

drocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin, homodihydrocapsaicin 등이 있으며 그 중에서도 고추의 신미는 주로 capsaicin 및 dihydrocapsaicin 에 기인된다.^{7,8)}

Capsaicin 의 정량법으로는 기본적인 미각비교법 및 각종 발색시약과 정색반응을 이용하는 방법으로 colorimetry,^{9,10)} spectrometry,^{11,12)} paper chromatography,¹³⁾ thin-layer chromatography 법^{14,15)} 등이 있으나 이들 분석방법은 여러 단계의 추출조작 등 복잡한 전처리로 인하여 오차의 범위가 커지며 분석에 장시간이 소요되는 단점이 있다. 근래에 들어서면서 각종 분석기기의 발전과 더불어 여러 가지 분석방법이 개발되었다. 여기에는 GC,^{11,16)} GC-MS,^{17,18)} HPLC^{7,8,19,20)} 등이 있으며 GC 법은 HPLC 법에 비하여 장시간의 분석시간이 소요되며 분석조건에 따라 유도체화의 복잡한

Received for publication 18 November, 1989
Reprint request; Dr. I.B. Kwon at above address

전 처리가 필요하다.

한편 고추의 품질평가 방법으로는 주로 외관에 의존하는 방법이 채택되고 있다. 그러나 고추의 특징이 신미에 있음을 감안할 때 고추의 품질을 평가하기 위한 방법의 일환으로 고추 중의 capsaicin 분석은 매우 중요하다.

본 연구에서는 고추의 품질평가 방법의 일환으로 HPLC를 이용하여 고추중의 주요 신미성분인 capsaicin 및 dihydrocapsaicin의 분석방법을 검토하고 품종, 재배지역 또는 건조방법에 따른 차이점을 비교 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료—전국 주요 고추생산지에서 8월 말 수확한 상품을 현지 구매하였으며 일광 또는 기계 건조한 후 종자와 태좌를 제거하고 과피만 분말화 하였으며 실험에 들어가기 전에 60°C에서 3시간 건조시켰다.

시약—Capsaicin 표준시약은 Sigma 제였으며 시료추출 및 eluent 조제용 용매는 Merk 제, potassium dihydrophosphate 및 phosphoric acid는 Wako 제 특급시약이었다. 전처리된 시료 용액 및 eluent는 0.45 μm membrane filter로 여과하였으며 eluent는 질소가스를 통하여 용존가스를 제거하였다.

장치 및 분석조건—HPLC는 Waters사 M510 pump, U6k injector, M490 multiwavelength UV Detector, M740 data module로 구성하였으며 사전 시험을 통하여 최적 분석조건을 검토하여 그 결과는 Table 1에 요약하였다.

추출—일반적으로 capsaicin은 alcohol, chloro-

form, acetone, ether 등에 쉽게 용해된다. 그러나 예비시험을 통하여 확인하여 본 결과 chloroform, acetone, methanol, ether 등을 추출용매로 사용하였을 경우에는 ethanol을 사용하였을 경우에 비하여 지방질 또는 과도한 색소의 용출로 말미암아 capsaicin의 분리도(resolution)가 낮아짐을 볼 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 위의 결과를 토대로 ethanol을 추출용 용매로 선정하였으며 최적 추출용매의 농도, 추출온도, 추출시간 등을 검토하고 그 결과로부터 구한 최적 추출조건에서 capsaicin의 첨가회수시험을 행하였다.

검량선 작성 및 시료분석—전항에서 검토된 바와 동일한 조성의 용매에 일정량의 capsaicin 표준품을 용해시켜 표준용액을 조제하고 각각 10 μl씩 HPLC에 주입하여 얻어진 크로마토그램의 감응도로부터 검량선을 작성하였다. 표준용액의 크로마토그램 및 검량선은 Fig. 1 및 2와 같다.

시료의 분석은 위의 추출조건에서 추출된 시료 용액을 검량선 작성시와 동일한 조건으로 분석하였으며 얻어진 결과를 중량퍼센트로 환산하였다.

각종 시료용액의 4회 분석결과를 산술평균하여 데이터로 하였으며 그 결과로부터 고추의 품종, 재배지역 또는 건조방법에 대한 함량의 차이를 비교 검토하였다.

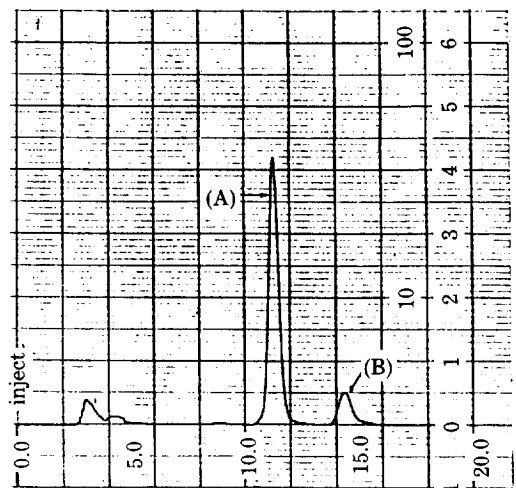


Fig. 1. Standard chromatogram of capsaicins. (A) Capsaicin; (B) Dihydrocapsaicin.

Table 1. Analytical condition of HPLC.

Column	μ-Bondapak C ₁₈ (waters)
Mobil phase	45% CH ₃ CN in 0.3% KH ₂ PO ₄ (pH 4.0)
Flow rate	1.2 ml/min
Pressure	1400 psi
Inj. volume	10 μl
Detector	UV 280 nm, Atten: 128, 0.5 AUFS

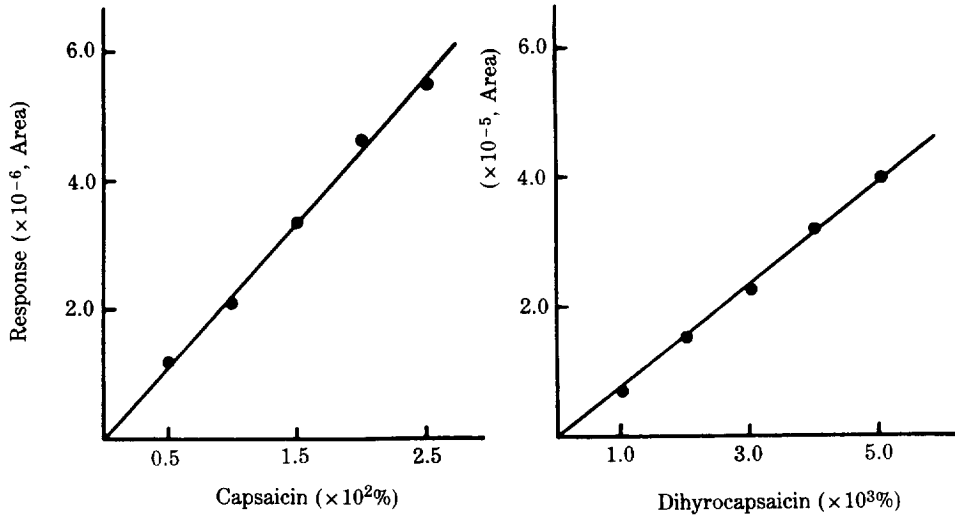


Fig. 2. Calibration curves of capsaicin and dihydrocapsaicin.

결과 및 고찰

추출용매의 조성—Capsaicin은 ethanol에 쉽게 용해되지만 고추의 과피 중에는 앞에서 열거한 성분 이외에도 섬유질 또는 각종 탄수화물이 다량 함유되어 있다. 따라서 이들의 혼합상태로부터 효율적으로 capsaicin을 추출해 내기 위해서는 적절한 용매의 조성이 필요하다. Fig. 3은 ethanol의 최

적 농도를 설정하기 위하여 특정 시료에 각 조성의 ethanol을 사용하여 얻어진 결과로부터 계산한 capsaicin의 함량변화를 나타낸 것이다. 추출온도 및 시간은 임의로 40°C, 1시간으로 하였으며 그 결과 70% ethanol의 경우가 가장 좋은 추출효과가 있음을 알 수 있다. 이는 추출용매에 적당량의 물이 존재함으로써 시료 중의 당성분을 비롯한 수용성 성분들이 쉽게 용해되어 시료분말 중의 용매 침투가 용이해짐에 기인하는 것으로 생각된다. 육안으로 관찰할 경우 ethanol의 함량이 증가할수록 색소가 쉽게 용출되는 것으로 나타났으나 capsaicin 분석에 있어 추출효과는 낮아지는 것을 알 수 있다.

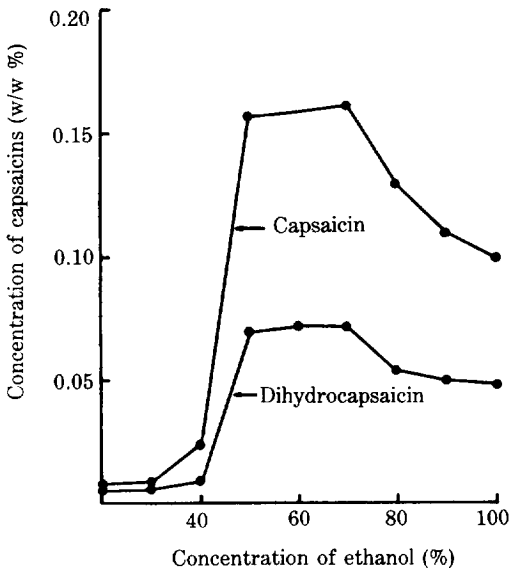


Fig. 3. Effect of solvent composition on the capsaicins concentration, extracted for 1 hr at 40°C.

추출온도—고추 분말로부터 capsaicin을 추출할 경우 최적 추출온도를 설정하기 위하여 70% ethanol을 사용하여 각각의 온도에서 1시간 동안 추출한 시료용액을 주입하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같으며 50°C 이하의 온도에서는 온도가 상승함에 따라 추출효과가 증가하나 50°C 이상의 온도에서는 거의 일정한 값이 얻어짐을 알 수 있다. 본 연구에서는 위의 결과를 토대로 시료 추출온도를 60°C로 고정하여 실험하였다.

추출시간—앞의 용매 및 온도조건에서 추출시간을 검토하기 위하여 동일한 방법으로 분석하여 본 결과는 Fig. 5와 같으며 30분 이상에서는 capsaicin 함량에 큰 차이가 없음을 알 수 있다. 이는 위의

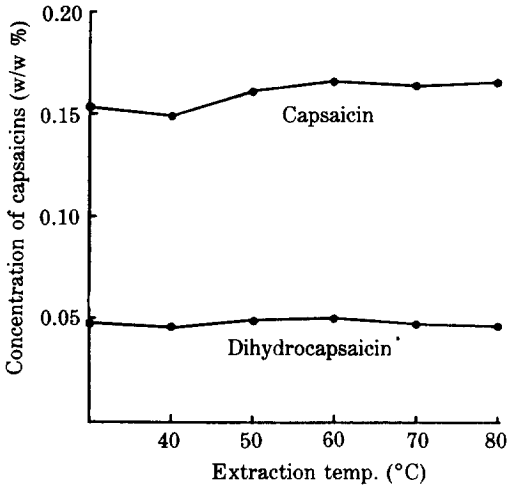


Fig. 4. Effect of extraction temp. on the capsaicins concentration, extracted with 70% ethanol for 1 hr.

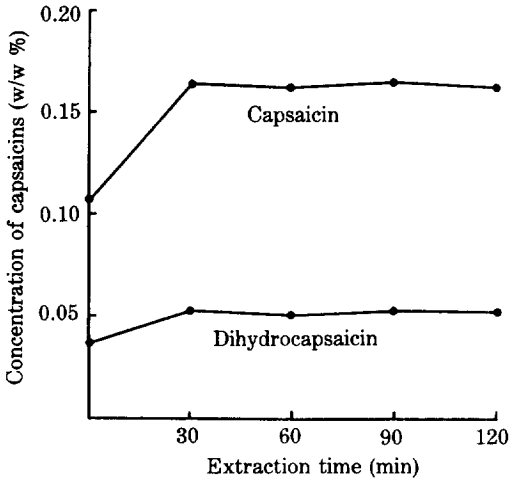


Fig. 5. Effect of extraction time on the capsaicins concentration, extracted with 70% ethanol at 60°C.

추출조건에서 capsaicin 이 초기에 거리가 용출되는 것을 의미하는 것으로 본 연구에서의 추출시간은 1시간으로 설정하였다.

재현성 및 회수율—위의 추출조건에서 특정 시료 2g을 채취하여 30ml의 용매로 추출하고 일정량으로 한 후 0.45µm membrane filter로 여과하여 주입한 결과로부터 재현성을 검토하였으며 동일시료에 소량의 표준시약을 첨가하고 잘 섞은 후 추출하여 분석한 결과에 의하여 첨가회수율을 계산하였다. 그 결과는 Table 2에 종합하였다. Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 분석결과는 크로마토그램의 피이크 면적을 기준으로 계산하는 경우와 피이크 높이를 기준으로 하는 경우로 나누어서 검토할 수 있는데 변동계수(C.V.)를 볼 때 피이크의 면적을 기준으로하여 계산한 경우의 재현성이 높이를 기준으로 한 경우보다 양호한 재현성을 보임을 알 수 있다. 또한 첨가회수율 면에서도 면적을 기준으로하였을 경우가 높이를 기준으로 하였을 경우에 비하여 월등히 좋은 결과가 나타남을 알 수 있다. 이로부터 본 연구에서의 분석결

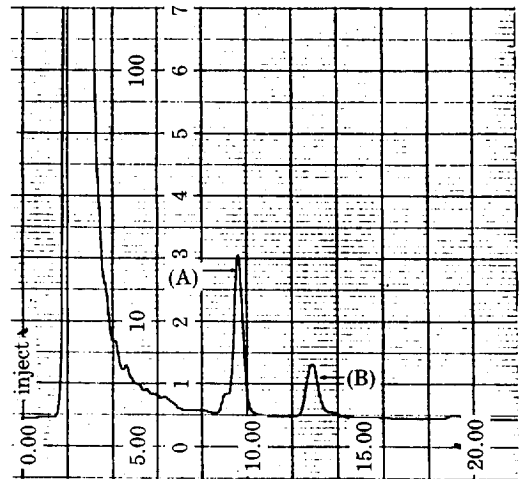


Fig. 6. Chromatogram of capsicum extract. Chromatographic condition: µ-Bondapak C₁₈ col; 45% acetonitrile in 0.3% phosphate, pH 4.0; flow rate, 1.2 ml/min; UV detection: 280 nm (A) Capsaicin; (B) Dihydrocapsaicin.

Table 2. Reproducibility and recovery of determination.

Calculation method	Capsaicins concentration					
	Capsaicin			Dihydrocapsaicin		
	Mean ± S.D	C.V (%)	Recovery (%)	Mean ± S.D	C.V (%)	Recovery (%)
Peak height	0.052 ± 0.002	3.85	54.67	0.034 ± 0.002	5.88	58.96
Peak area	0.120 ± 0.001	0.83	106.82	0.054 ± 0.002	3.70	102.91

Table 3. 각종 시료 중의 Capsaicin 분석 결과.

지역	품종 건조법	청 양		다 복		홍 일		적 토 마	
		태 양	기 계	태 양	기 계	태 양	기 계	태 양	기 계
	안 동	0.166	0.091	0.043	0.021	0.038	0.030	0.031	0.022
	영 양	0.093	0.068	0.036	0.014	0.026	0.015	0.025	0.011
	제 천	0.158	0.106	0.032	0.026	0.042	0.026	0.043	0.024

※ 기계 건조 : 60°C dry oven

Table 4. 각종 시료 중의 Dihydrocapsaicin 분석 결과.

지역	품종 건조법	청 양		다 복		홍 일		적 토 마	
		태 양	기 계	태 양	기 계	태 양	기 계	태 양	기 계
	안 동	0.071	0.045	0.035	0.028	0.031	0.029	0.033	0.025
	영 양	0.057	0.039	0.022	0.019	0.027	0.018	0.024	0.014
	제 천	0.065	0.059	0.029	0.027	0.030	0.027	0.039	0.028

※ 기계 건조 : 60°C dry oven

과는 피이크의 면적을 기준으로 하여 계산하였다.

시료분석—시료용액을 주입하여 얻어진 크로마토그램은 Fig. 6과 같으며 시료분석의 결과는 각종 고추의 품종에 대하여 지역별 또는 건조방법 등에 따라 비교 검토하였다.

선택 품종으로는 청양, 다복, 적토마, 홍일 등이었으며 재배지역은 안동, 영양, 제천, 순창 등지였다. 기계건조의 경우는 Kim 등의 연구결과^{2,3)}를 참고하여 60°C의 송풍식 건조장치 내에서 건조시켰다. 각각의 경우 분석결과는 Table 3과 4에 요약하였다. 그 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 품종, 재배지역 또는 건조방법에 따라 capsaicin 및 dihydrocapsaicin의 함량에 큰 차이가 나타났다. 특히 건조방법에 따라서 그 차이가 현저한 것으로 나타났는데 capsaicin의 절대함량이 높은 청양의 경우에는 태양건조에 의한 경우가 기계건조의 경우보다 60~80% 정도 높은 함량을 보였으며 기타의 시료에서는 23~30%의 차이를 나타내었다. 또한 dihydrocapsaicin의 경우에는 청양의 경우 40~60%, 기타의 시료에서는 7~15%의 차이를 보여 capsaicin의 함량이 높은 경우 그 차이는 더욱 현저하며, capsaicin의 경우가 dihydrocapsaicin에 비하여 더욱 큰 영향을 받는 것을 알 수

있다. 이는 Leete 등의 보고²¹⁾를 참고할 때 일광에 의하여 capsaicin의 전구물질인 phenylalanine에 작용하는 PAL(phenylalanine ammonialyase)의 활성이 증가함에 기인되는 것으로 추정된다.

한편 재배지역에 따른 차이도 현저한 것을 볼 수 있는데 이는 재배지역의 토질 또는 일조량 등의 기후조건의 차이에서 기인되는 것으로 생각되며 지속적인 연구 검토가 필요할 것으로 본다.

결 론

역상 크로마토그래프계의 μ -Bondapak C₁₈ column을 이용하여 20분 이내에 고추의 주요 신미성분인 capsaicin 및 dihydrocapsaicin을 정량적으로 분석할 수 있었다.

시료의 추출은 70% ethanol, 60°C, 1시간이면 충분하였으며 분석결과의 해석은 피이크의 면적을 기준으로 하였을 경우가 높이를 기준으로 하였을 경우에 비하여 재현성 및 회수율 측면에서 우수한 것으로 나타났다.

시료 분석결과 capsaicin의 함량은 품종, 재배지역, 건조방법에 따라 많은 차이를 보였다. 특히

건조방법에 따른 차이가 더욱 현저한 것으로 나타났는데 태양건조의 경우가 기계건조에 비하여

capsaicin의 경우는 최고 80%, dihydrocapsaicin의 경우는 최고 60% 정도 높게 나타났다.

국문요약

고속 액체크로마토그래피를 이용하여 고추 중의 주요 신미성분인 capsaicin 및 dihydrocapsaicin을 분석하기 위한 최적 조건을 검토하고 고추의 품종, 재배지역 및 건조방법에 따른 함량의 차이를 비교 검토하였다.

시료 중의 capsaicin 및 dihydrocapsaicin을 70% ethanol, 60°C에서 1시간 동안 처리함으로써 효과적으로 추출할 수 있으며 재현성 및 회수율시험 결과 분석데이터의 해석은 피이크의 면적을 기준으로 하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

고추의 품종, 재배지역 및 건조방법에 따라 함량의 차이가 큰 것으로 나타났으며 특히 건조방법에 의한 차이가 더욱 현저하여 태양건조의 경우가 기계건조의 경우에 비하여 capsaicin의 경우는 최고 80%, dihydrocapsaicin의 경우는 최고 60% 정도 높게 나타났다.

참고문헌

- 이태녕, 박성오: 고추 중의 Capsaicin 정량에 관한 연구, 한국농화학회지, 4, 23(1963).
- 박춘란: 고추의 건조방법에 따른 성분변화에 관한 연구, 한국영양학회지, 8, 27(1975).
- 김공환, 전재근: 고추의 열풍건조가 품질에 미치는 영향, 한국식품과학회지, 7, 69(1975).
- 박춘란, 김순동: 녹숙고추의 추숙에 미치는 빛의 영향, 한국영양학회지, 8, 27(1975).
- 이성우: Gas Liquid Chromatography에 의한 고추의 조성에 관한 연구, 한국식품과학회지, 11, 279(1979).
- Crombie, L., Dandegaonker, S.H. and Simpson, K.H.: Amides of Vegetable Origin. Part VI. Synthesis of Capsaicin, *J. Chem. Soc.*, 1025 (1955).
- Chiang, G.H.: HPLC Analysis of Capsaicins and Simultaneous Determination Capsaicins an Piperine by HPLC-ECD and UV, *J. Food Sci.*, 51, 499 (1986).
- Kawada, T., Watanabe, T., Katsura, K., Takami, H. and Iwai, K.: Formation and Metabolism of Pungent principle of Capsicum Fruits, *J. Chromatogr.*, 329, 99 (1985).
- Suzuki, J.I., Tausing, F. and Morse, R.E.: A New Method for the Determination of Pungency in Red Pepper, *Food Technol.*, 11, 100 (1957).
- Bajaj, K.L.: Colorimetric Determination of Capsaicin in capsicum Fruits, *J.A.O.A.C.*, 63, 1314 (1980).
- Dicecco, J.J.: Spectrophotometric Difference Method for Determination of Copasaicin, *ibid*, 62, 998 (1979).
- Rymal, K.S., Cosper, R.D. and Smith, D.A.: Injection-Extraction Procedure for Rapid Determination of Relative Pungency in Fresh Jalapeno Peppers, *ibid*, 67, 658 (1984).
- Govindarajan, V.S. and Ananthakrishna, S.M.: Paper Chromatographic Determination of Capsaicin, *Flavor Ind.*, 5, 176 (1974).
- Suzuki, T., Kawada, T. and Iwai, K.: Effective Separation of Capsaicin and its Analogues by Reversed-Phase High Performance Thin-Layer Chromatography, *J. Chromatogr.*, 198, 217 (1980).
- Pankar, D.S. and Magar, N.G.: New Method for the Determination of Capsaicin by Using Multi-Band Thin-Layer Chromatography, *ibid*, 144, 149 (1977).
- Todd, P.H., Bensinger, M.G. and Biftu, T.: Determination of Pungency Due to Capsicum by Gas-Liquid Chromatography. *J. Food Sci.*, 42, 660 (1977).
- Masada, Y., hashimoto, K., Inoue, T. and Suzuki, M.: Analysis of the Pungent Principles of Capsicum Annuum by Combined Gas

- Chromatography-Mass Spectrometry, *ibid*, **36**, 858 (1971).
18. Lee, K.R., Suzuki, T., Kobashi, M., Hasegawa, K. and Iwai, K.: Quantitative Micro analysis of Capsaicin, Dihydrocapsaicin and Nordihydrocapsaicin Using Mass-Fragmentography, *J. Chromatogr.*, **123**, 119 (1976).
 19. Saria, A., Lembeck, F. and Skofitsch, G.: Determination of Capsaicin in Tissue and Separation of Capsaicin Analogues by High-Performance Liquid Chromatography, *ibid*, **208**, 41 (1981).
 20. Hoffman, P.G., Lego, M.C. and Galetto, W.G.: Separation and Quantitation of Red Pepper Major Heat Principles by Reverse Phase High-Pressure Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1326 (1983).
 21. Leete, E. and Loudon, M.C.L.: Biosynthesis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6837 (1967).