

HPLC 를 이용한 고추엑스 제제 중 Capsaicin 과 Dihydrocapsaicin 의 분리정량

엄동옥 · 윤규섭*

전주우석대학 약학과

*보령제약

(Received July 6, 1989)

Differential determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin from Capsicum extract preparation by HPLC.

Dong Ok Eom and Kyu Sup Yoon*

Department of pharmacy, Jeonju Woo Suk University, Samryeup, Jeonbuk, Korea and

*Boryung Pharm. Co., Ltd.

Abstract—A new application of high performance liquid chromatography for the determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in cataplasma preparation was investigated.

Optimum conditions for a good separation and detection were determined; 0.93 volt, acetonitrile: H₃PO₄ sol (pH 2.8), sample size; 7 μ l. Recovery rates of capsaicin and dihydrocapsaicin from mixed artificial preparations were 99.9% and 98.4% respectively.

Also reproducibility tests showed that the coefficient of variation was 1.59% for capsaicin and 1.14% for dihydrocapsaicin.

There was no interference with cataplasma preparation containing thymol, dl-camphor and the commonly encountered excipients or additives such as gelatine, glycerine.

This method was rapid, accurate and it gave higher sensitivity than other method.

Keywords □ Capsaicin, dihydrocapsaicin, cataplasma preparation.

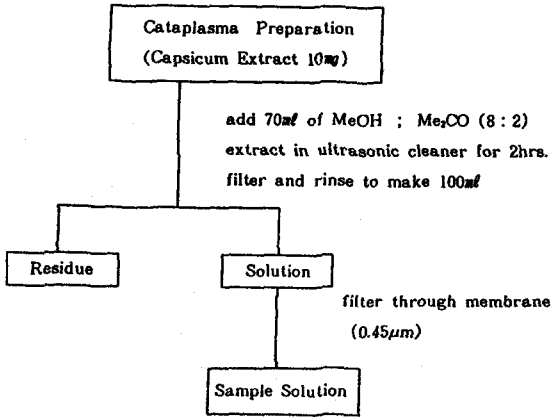
고추엑스는 국소자극의 목적으로 카타플라스마제, 연고제, 외용액제에 배합되며, 모근 자극이나 지양 효과를 기대하는 hair tonic 등에도 쓰인다. 이들 제제에 배합되어 있는 고추엑스의 정량은 capsaicinoid를 정량하고 있으나, capsaicinoid는 capsaicin (CS), dihydrocapsaicin (DHC)과 미량의 homocapsaicin, homodihydrocapsaicin, nor-dihydrocapsaicin 등이 보고되어 있다.

고추엑스는 이들 각 성분을 GLC,^{1,2)} HPLC,³⁻⁵⁾ GC-MS^{6,7)} 등으로 분리정량하고 있으나, 제제는 고추엑스가 저농도로 배합되어 있어 이들 성분의 정량에 어려움이 있으므로 capsaicinoid를 정량하여야 하는 단점이 있다.

저자들은 이동상으로 acetonitrile 과 H₃PO₄ 완충액의 혼합액 (pH 2.8)을 쓰고, 검출기로 ECD를 이용했을 때 미량농도의 고추엑스에서 CS와 DHC을 양호하게 분리할 수 있었으며, 제제도 capsaicinoid를 정량하는 것보다 시간을 단축하고, 재현성있게 정량할 수 있었으므로 보고한다.

실험방법

시약 및 시료—capsaicin (No.M-2028, Sigma), dihydrocapsaicin (No.M-102Z, Sigma), natural capsaicin (No.21750, Fluka), capsaicin extract (Hisamitsu)의 각 25 mg씩을 정확히 달아 MeOH



Schem 1—Method of preparing sample solution.

Table 1 —Conditions of high performance liquid chromatography.

Column	: μ Bondapak Phenyl (10 μ m, 3.9 mm \times 30 cm)
Column temp.	: about 30°C
Mobile phase	: acetonitrile: H ₃ PO ₄ solution (pH 2.8) = 36 : 64
Detector	: +0.93 volt Electrochemical detector
Injection volume	: 7 μ l
Flow rate	: 2.0 ml/min.
Span rage	: 20 nA
Chart speed	: 0.5 cm/min.

: Me₂CO(8 : 2) 혼액에 녹여 각각을 5.0 $\times 10^{-3}$ mg \cdot ml⁻¹의 용액으로 만들었고, acetonitrile(E. Merk)은 LC grade를, 물은 증류수를 Water-I (Gelman Co.)로 정제한 것을, 기타의 시약들은 시판 시약 특급을 사용하였다.

기기—HPLC는 Waters사의 Glassy carbon working electrode에 Ag/AgCl reference electrode가 부착된 460 Amperometric electrochemical detector와 730, 740 data module의 Recorder를, Ultrasonic cleaner는 Bransonic사의 model 220을 사용하였다.

정량조작—고추엑스 10 mg에 해당하는 카타플라스마제를 삼각 flask에 넣고 Scheme 1로 조작하

여 시료용액을 만든 다음 Table I에서와 같은 조건에서 시료용액과 CS, DHC(natural) 표준용액(표준조작) 각 7 μ l씩을 주입하여 얻어지는 chromatogram의 높이에 대한 비로부터 각각의 양을 환산한다.

결과 및 고찰

검출기의 선정—J. Jurenitsch⁴⁾ 등은 자외, 가시 흡광광도계를 검출기로 이용하여 고추엑스에서 CS와 DHC를 정량했고, S. Ohnishi⁸⁾ 등은 형광광도계를 검출기로 이용하여 화장품에서 CS를 정량하였다. 이들 검출기를 이 실험에 이용하여 고추엑스에서 분리양상을 검토하였으나, 농도가 희박하여 분리가 만족스럽지 못하였다. 그러나 G.H. Chiang⁵⁾이 electrochemical(EC) monitoring을 이용하여 미량의 CS를 정량한 보고가 있어 이 실험에 이용한 결과 Fig.1에서와 같이 0.93 V 부근에서 일정한 peak response의 한계전류가 되었으므로 0.93 V를 가전압으로 하여 미량의 CS와 DHC의 양호한 chromatogram을 얻을 수 있었다.

이동상의 선택—n-Hexane 등 수종의 용매를 단

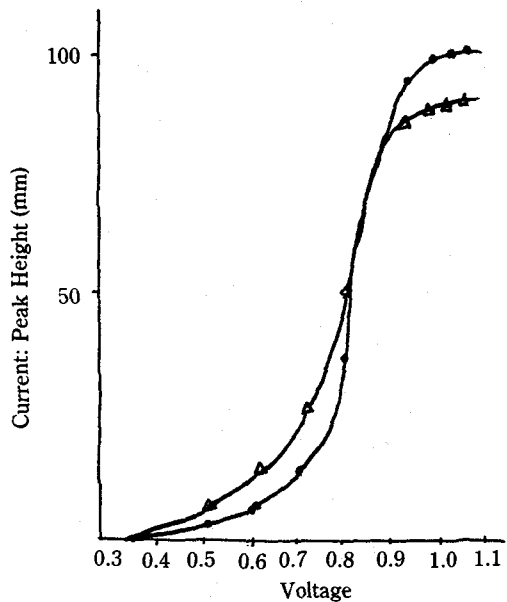


Fig. 1—Current-Voltage (C-V) curve of capsaicin and dihydrocapsaicin. ● Capsaicin, Δ Dihydrocapsaicin

Table II—Effect of mobile phase on the retention time of thymol, capsaicin and dihydrocapsaicin.

Mobile phase	Retention time (min.)		
	Thymol	Capsaicin	Dihydrocapsaicin
45 : 55 (4.0)	6.31	6.87	8.04
40 : 60 (3.0)	6.15	7.14	8.71
36 : 64 (2.8)	11.70	15.11	19.46

Mobile phase; Acetonitrile : H₃PO₄ (pH 2.8)

Table III—Effect of column temperature on the retention time and resolution of capsaicin and dihydrocapsaicin.

Column temp (°C)	Retention time (min.)		Resolution
	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	
25	15.80	20.35	3.82
30	14.66	18.92	3.86
35	14.38	18.47	3.88
40	13.58	17.40	4.09

독 또는 혼합액으로 하여 분리 정도를 관찰하였으나, 검출량과 기타의 약효성분으로 첨가된 thymol (TM)과의 분리가 만족스럽지 못하였다. 그러나 이중 가장 양호한 용매가 acetonitrile과 H₃PO₄용액의 혼합액이었으며, 이 용매간의 혼합비는 Table II에서와 같이 H₃PO₄용액의 증가 및 pH의 감소로 유지시간은 길어지나, 양호하게 분리되는 chromatogram을 얻을 수 있었다.

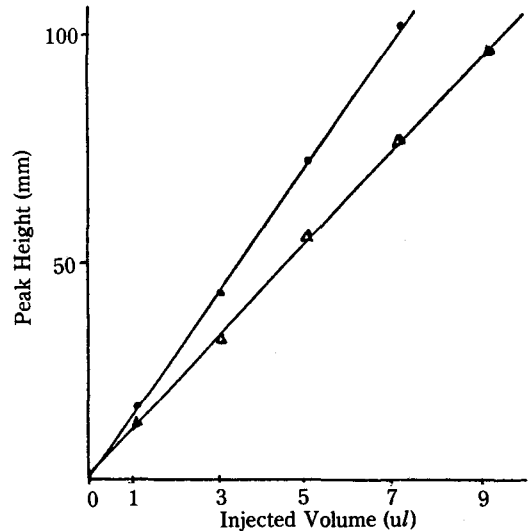
특히 acetonitrile과 H₃PO₄용액(pH 2.8)의 비율이 36 : 64에서 기타의 약효 성분인 TM과 CS, DHC간의 분리가 양호하였으므로 이 실험에서 이 동상으로 택하였다.

칼럼 온도의 영향—column 온도가 TM, CS, DHC의 분리에 대한 영향을 검토하기 위하여 1.5 ml/min의 유속에서 온도를 25~40°C로 변경하면서 HPLC를 행하였다. 그 결과 Table III에서와 같이 분리도는 조금 증가되었으나, 유지시간이 약간 단축되었다. column의 온도가 분리나 유지시간에 큰 영향은 없었으나, column의 수명과 일정온도를 유지하기 위하여 30°C로 하였다.

유속의 영향—column 실의 온도를 30°C로 하고

Table IV—Effect of flow rate on the retention time and resolution of capsaicin and dihydrocapsaicin.

Flow rate (ml/min.)	Retention time (min.)		Resolution
	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	
1.5	15.11	19.48	3.4
1.7	13.44	17.20	3.2
2.0	11.05	14.20	3.4

**Fig. 2**—Calibration curve for capsaicin and dihydrocapsaicin.

$$\text{Capsaicin: } y = 13.65X + 1.75, r = 0.9991$$

$$\text{Dihydrocapsaicin: } y = 10.40X + 1, r = 0.9996$$

●Capsaicin, △Dihydrocapsaicin

유속을 1.5 ml/min에서 2.0 ml/min까지 변화시켰을 때 Table IV에서와 같이 유속이 감소됨에 따라 CS, DHC간의 분리는 별로 차이가 없었으며, 유지시간은 길어졌으므로 이 실험에서 2.0 ml/min을 택하였다.

검량선— $5 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 의 CS와 DHC 표준 용액으로 이상과 같은 최적조건에서 정량 조작의 표준조작에 따라 HPLC를 행하였다. 각 표준용액 1-9 μl 의 주입시 CS는 $Y = 13.65X + 1.75$ ($r = 0.9991$)이고, DHC는 $Y = 10.40X + 1.00$ ($r = 0.9996$)로 Fig.2에서와 같이 거의 원점을 지나는 양호한 직선성을 나타내었다.

공존물질에 의한 영향—시판 카타플라스마제에서 CS와 DHC의 분리정량시 기타의 약효 성분과 첨

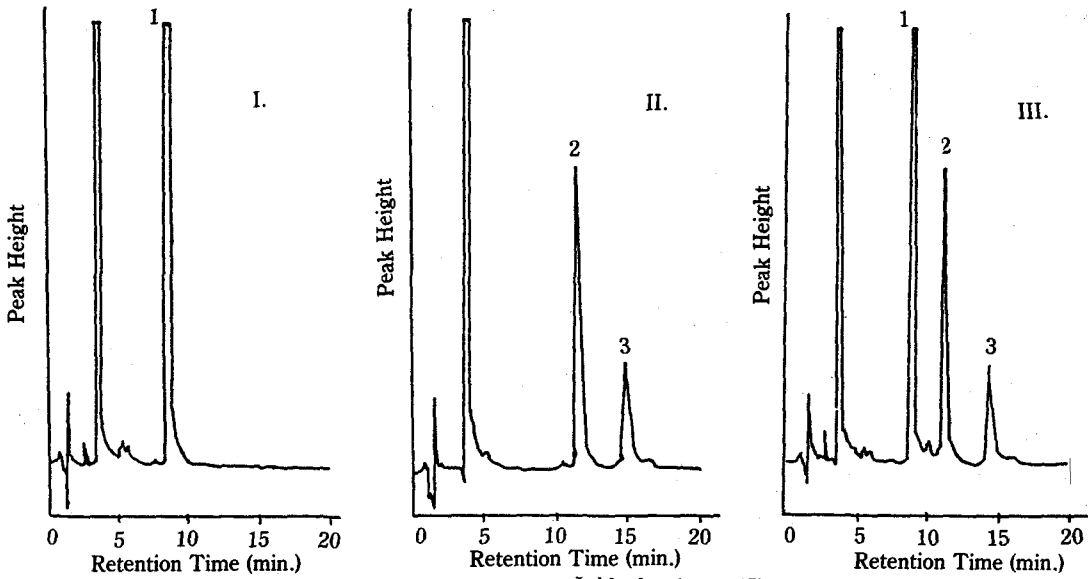


Fig. 3 - Liquid chromatogram showing the separation of I. blank mixture, II. natural capsaicin, III. standard mixture
 Key-1: Thymol, 2: Capsaicin, 3: Dihydrocapsaicin

Table V - Standard formulation for analysis.

Component	Declared.g	(%)
Capsicum Extract	0.28	(0.155)
Methyl Salicylate	1.80	(1.00)
dl-Camphor	0.90	(0.50)
Thymol	0.18	(0.10)
Gelatine	9.90	(5.50)
Conc. Glycerine	45.00	(25.00)
D-sorbitol Solution (70%)	18.00	(10.00)
Sodium-C.M.C.	5.40	(3.00)
Polyethylene Glycol Monostearate	0.90	(0.50)
Perfume	q.s.	
Purified Water sufficient to make	180.0g	

Table VI - Recovery of capsaicin and dihydrocapsaicin in standard formulations.

No. of formulations	Recovery (%)	
	Capsaicin	Dihydrocapsaicin
1	98.4	97.2
2	101.7	00.0
3	101.1	99.0
4	98.1	98.0
5	100.0	97.7
Average	99.86	98.38
C.V. (%)	1.59	1.14

가제가 주는 영향을 검토하기 위하여 Table V와 같은 첨가제의 양과 종류로 표준처방을 조제하여 chromatogram을 얻은 결과 Fig.3에서와 같이 전혀 영향을 받지 않았다.

회수율 및 재현성-Table V의 표준처방에 따라 조제된 시료용액으로 CS와 DHC의 회수율 및 재현성을 검토한 결과 Table VI에서와 같이 상대표준 편차가 CS 1.59%, DHC 1.14%로 시판 제품에 대

하여 이 실험방법을 적용할 때 회수율과 재현성이 우수하였다.

결 론

이 정량방법은 카타플라스마제 등에 함유되어 있는 고추엑스 중 CS와 DHC를 복잡한 전처리 조작 없이 MeOH : Me₂CO 혼액으로 Ultrasonic cleaner를 이용 추출하여 HPLC로 정량할 수 있는 방법이다.

흔히 제제 중에 함유되는 첨가제 등의 영향을 받지 않고 감도도 예민하여 2.3×10^{-6} M의 농도에서 정량이 가능하였으며, 그 범위는 2.3×10^{-6} - 2.1×10^{-5} M이었다. CS와 DHC의 변동 계수가 각각 1.59%와 1.14%로 재현성이 매우 양호하였으며, capsaicinoid만을 정량하는 기존의 방법에 비해 조작이 간편할 뿐만 아니라, 신속 정확하게 분리정량할 수 있는 장점이 있었으므로 제제의 품질관리는 물론 고추엑스의 기준 설정에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) K. Sagara, S. Kakizawa, K. Kasuya, T. Misaki and H. Yashizawa: Simultaneous Determination of Capsaicin, Dihydrocapsaicin and Nordihydrocapsaicin in Capsicum Fruit by Gas Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2796 (1980)
- 2) A. Müller-Stock, R.K. Toshi and J. Büchi: II. Study of the components of capsaicin. Quantitative gas chromatographic determination of individual homologs and analogs of capsaicin in mixtures from a natural source and of vanillyl pelargonic amide as adulteration. *J. Chromatogr.*, **63**, 281 (1971)
- 3) O. Sticher, F. Sordati and R.K. Joshi: High performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures and fructus capsici. *J. Chromatogr.*, **166**, 221 (1978)
- 4) J. Jurenitsch and I. Kampelmuhler: Rapid determination of nonylic acid vanillylamide and other capsaicinoids in capsicum fruits and extracts by means of Ag⁺ complexation high performance liquid chromatogr. *J. Chromatogr.*, **193**, 101 (1980)
- 5) G.H. Chiang: HPLC Analysis of Capsaicins and Simultaneous Determination of Capsaicins and Piperine by HPLC-ECD and UV. *Journal of Food Science*, **51**, 499 (1986)
- 6) K.R. Lee T. Suzuki, M. Kobayashi, K. Hasegawa and K. Iwai: Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin using mass fragmentography. *J. Chromatogr.*, **23**, 119 (1976)
- 7) K. Iwai, J. Suzuki, H. Fujiwake and S. Oka: Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **172**, 303 (1979)
- 8) S. Ohnishi, T. Yoneya and S. Hara: Liquid-Solid chromatography resolution system for capsaicine analogues in cosmetic preparation. *YAKUGAKU ZASSHI*, **103**, 236 (1983)