

## HPLC를 이용한 일부 시판 고춧가루 및 고추 가공품의 Capsaicinoids 함량 분석 및 분석법의 검증

- 연구노트 -

함현미 · 성미선 · 김영화 · 최용민 · 정현상 · 이준수<sup>†</sup>

충북대학교 식품공학과

### Determination of Capsaicinoids in Selected Commercial Pepper Powders and Pepper-Containing Products Using HPLC and Method Validation

Hyeonmi Ham, Misun Sung, Younghwa Kim, Youngmin Choi, Heon-Sang Jeong, and Junsoo Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

#### Abstract

The objective of this study was to determine the content of capsaicinoids in different commercial pepper powders and pepper-containing products in the Korean market. The two major capsaicinoids in the samples, capsaicin and dihydrocapsaicin, were analyzed using reversed-phase HPLC. The levels of capsaicin and dihydrocapsaicin in pepper powders and pepper-containing products ranged from 0.21 to 78.24 and 0.20 to 38.82 mg/100 g sample, respectively. Pepper powders contained generally higher amounts of capsaicin and dihydrocapsaicin than pepper-containing products. In addition, the analytical method validation parameters including accuracy, precision, and specificity were provided to ensure the validity of the extraction procedure for capsaicinoid analysis. Overall recovery from pepper powder and pepper paste was close to 100% (n=3). The results of validation parameters indicated that the present method was reliable and reproducible for the HPLC analyses of capsaicin and dihydrocapsaicin in commercial pepper products.

**Key words:** pepper, pepper product, capsaicinoids, HPLC, method validation

#### 서 론

고추(*Capsicum annuum* L.)는 가지과에 속하는 식물로 매운맛에 대한 선호도가 높은 우리 식생활에서 많이 사용되고 있으며 한국의 음식문화를 대표하는 김치, 고추장, 양념 등의 주원료 또는 부원료로 이용되고 있다. 고추는 주로 음식의 매운맛을 내는 향신료로 사용되어져 왔지만 최근 웰빙(well-being)이 하나의 중요한 문화적 패턴으로 떠오르면서 고추의 생리활성 성분과 활성에 대해 다양하게 연구되고 있다.

고추는 매운맛을 가진 특성 때문에 많이 소비되고 있으며 매운맛의 주성분은 capsaicinoids라는 물질로 알려져 있다. 고추의 매운맛은 음식의 풍미를 향상시키고 식욕을 촉진시킨다고 보고되어 있다(1). Capsaicinoids는 capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin, homodihydrocapsaicin 등의 동족체로 구성되어 있다(2). 고추의 품종에 따라서 다르지만 일반적으로 capsaicin과 dihydrocapsaicin이 고추에 함유된 capsaicinoids의 약 90% 이상을 차지한다고 보고되어 있다(3). Capsaicinoids는 vanillylamine을 공통 구조로 하며 여기에 결합된 분지측 지방산의

탄소수 및 이중결합의 유무에 의해 구조를 달리한다. 또한 capsaicinoids는 항산화, 항암, 항균, 항우울 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(4-7). Capsaicinoids를 분석하는 방법으로는 high-performance liquid chromatography(HPLC), gas chromatography(GC), thin-layer chromatography, spectrophotometric method, enzyme immunoassay 등이 보고되었다(8-13). 최근 역상 HPLC는 신뢰도가 높고 빠르게 분석할 수 있기 때문에 capsaicinoids를 분석하는데 가장 많이 이용되고 있다. 또한 Jeon과 Lee(14)는 solid phase extraction, acetonitrile extraction, methanol extraction 방법을 이용하여 고춧가루로부터 capsaicinoids 함량을 비교한 결과 methanol extraction 방법이 가장 좋다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 methanol extraction 방법을 이용하여 capsaicinoids 함량을 분석하고자 하였다.

한국에서는 많은 종류의 고추 가공품을 사용하고 있다. 특히 한국인은 고춧가루 외에도 고추장, 초고추장, 쌈장 등 많은 고추 가공품을 사용하고 있다. 하지만 시중에 판매되는 고추 가공품의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량을 분석한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 HPLC를

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr  
Phone: 82-43-261-2566, Fax: 82-43-271-4412

이용하여 다양한 고춧가루 및 고추 가공품의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량을 분석하였으며 정밀도(precision) 및 정확도(accuracy) 등을 이용하여 분석법을 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용된 시판 고춧가루, 고추장, 쌈장, 초고추장, 소스류는 대형마트(충북 청주)에서 구입하여 분석용 시료로 사용하였다. Capsaicinoids 측정에 이용된 표준물질은 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 혼합물로 Fluka사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였고, acetonitrile, methanol, water 등은 J.T.Baker(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 HPLC 등급을 사용하였다.

### Capsaicinoids 분석

Capsaicin 및 dihydrocapsaicin 함량은 Jeon과 Lee(14)의 방법을 이용하여 분석하였다. 고춧가루 1 g, 고추장 2 g을 methanol 50 mL과 혼합하여 Ultra Turrax® homogenizer (T25; Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Germany)로 2분간 교반하여 추출하였다. 균질화 후 100 mL mass flask에 깔대기를 넣고 Whatman filter paper(Whatman No. 2, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)를 이용하여 여과 후 methanol로 정용하였다. 이 추출물을 0.45 µm nylon membrane filter로 여과한 뒤 HPLC(Jasco, Tokyo, Japan)을 이용하여 capsaicinoids를 정량 분석하였다. 분석 칼럼은 Luna 5 µm C18(2) 100 A column(5 µm, 4.6×250 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)을 사용하였으며, 형광검출기(Exλ=280 nm, Emλ=320 nm)를 이용하여 검출하였다. 이동상은 acetonitrile : water : glacial acetic acid(60:39:1, v/v/v), 유속은 1.0 mL/min 이며 시료의 일회 주입량은 20 µL이었다.

### 분석방법의 검증

Capsaicinoids 표준용액을 시료에 spike하고, 시료 전처리 과정에 따라 추출한 후 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적의 비를 이용하여 회수율(recovery)을 구하였다. 분석법의 반복성(repeatability)을 평가하기 위하여 시료 전처리부터 분석까지 하루 3 반복 실험을 실시하였으며, 재현성(reproducibility)은 3일간 동일 실험을 반복 수행하였다. Peak의 순도를 검증하기 위해 방출파장을 320 nm로 고정된 후 흡수파장이 270, 280, 290 nm인 상태에서의 peak 면적을 측정하여 샘플의 peak 면적의 비율을 같은 파장에서 표준물질의 peak 비율과 비교하였다(15).

### 통계처리

실험결과는 SAS package(Statistical Analysis System, version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 평균의 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 Tukey's multiple range test에 의해 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### Capsaicin 및 dihydrocapsaicin 함량

고추의 매운맛은 지용성 물질인 capsaicin과 dihydrocapsaicin에 기인한다고 잘 알려져 있다(16). 본 연구에서는 HPLC를 이용하여 다양한 고춧가루 및 고추 가공품의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량을 분석하였다. 표준물질과 고춧가루 시료의 chromatogram은 Fig. 1에 나타내었고, 시료의 capsaicinoids 함량은 Table 1에 나타내었다. 본 연구에서 분석한 고추 가공품의 capsaicin 함량은 0.21~78.24 mg/100 g이었으며 dihydrocapsaicin 함량은 0.20~38.82 mg/100 g으로 나타났다. 고추장, 초고추장, 쌈장, 소스류에 비해 고춧가루의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량이 높게 나타났고, 아주 매운맛으로 표기되어 있는 고춧가루 시료(pepper powder 1)의 capsaicin과 dihydrocapsaicin 함량이 각각 78.24 mg/100 g과 38.82 mg/100 g으로 가장 높은 것

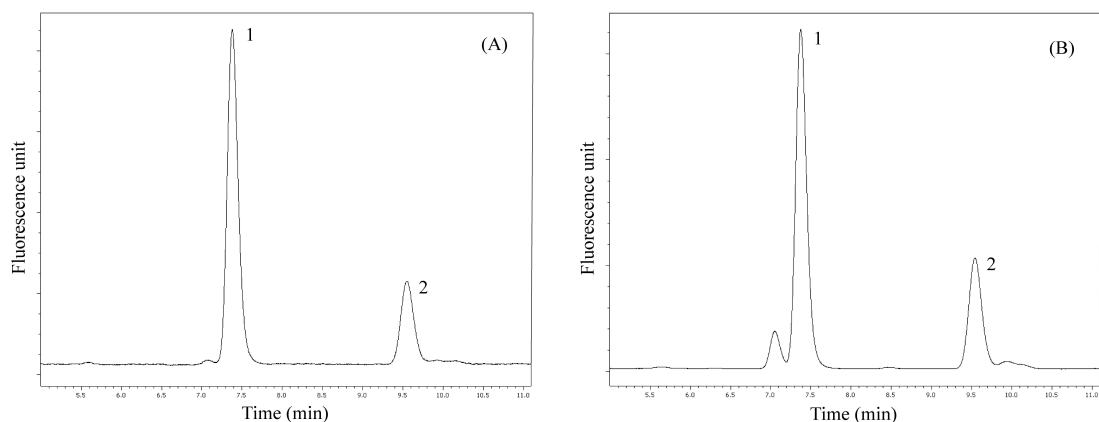


Fig. 1. Reversed-phase HPLC chromatograms of capsaicinoids using fluorescence detection. Standard (A) and pepper powder extract (B) where 1 is capsaicin and 2 is dihydrocapsaicin (Exλ=280 nm, Emλ=320 nm).

Table 1. Concentration of capsaicinoids in commercial pepper powder and pepper products

Sample type	Sample number	Capsaicinoids <sup>1)</sup>		Total <sup>2)</sup>	SHU <sup>3)</sup>
		Capsaicin	Dihydrocapsaicin		
Pepper powder	1	78.24	38.82	117.06 <sup>a</sup>	18846.66
	2	12.38	8.49	20.87 <sup>c</sup>	3359.27
	3	1.80	1.18	2.99 <sup>e</sup>	480.59
	4	18.70	13.58	32.28 <sup>b</sup>	5197.08
	5	9.17	5.44	14.61 <sup>d</sup>	2352.21
	6	15.47	7.66	23.12 <sup>c</sup>	3722.32
Gochujang	1	2.38	1.53	3.92 <sup>e</sup>	630.32
	2	2.44	1.70	4.14 <sup>de</sup>	665.74
	3	2.93	1.69	4.62 <sup>cde</sup>	743.82
	4	3.25	1.98	5.24 <sup>abc</sup>	842.84
	5	3.52	2.30	5.82 <sup>ab</sup>	937.02
	6	3.55	2.28	5.83 <sup>ab</sup>	937.83
	7	3.65	2.24	5.90 <sup>a</sup>	949.10
	8	2.97	1.98	4.95 <sup>bcd</sup>	796.95
Gochujang with vinegar	1	1.62	1.14	2.77 <sup>c</sup>	445.17
	2	2.30	1.38	3.69 <sup>b</sup>	593.29
	3	0.68	0.54	1.23 <sup>d</sup>	198.03
	4	2.71	1.58	4.29 <sup>a</sup>	690.69
Gochujang with soybean paste	1	1.00	0.70	1.71 <sup>b</sup>	274.51
	2	0.21	0.20	0.42 <sup>c</sup>	67.62
	3	2.49	1.52	4.01 <sup>a</sup>	644.81
Sauce	1 (Chili)	1.44	0.90	2.34 <sup>b</sup>	376.74
	2 (Chili)	0.49	0.37	0.86 <sup>c</sup>	138.46
	3 (Topokki)	2.20	1.36	3.56 <sup>a</sup>	573.16

<sup>1)</sup>All samples were assayed in duplicate and the concentration of capsaicinoids was expressed as mg/100 g sample.

<sup>2)</sup>Sum of capsaicin and dihydrocapsaicin. Values in same sample type with different superscripts are significantly different at 5% significant level by Tukey's multiple range test.

<sup>3)</sup>Scoville Heat Unit, (capsaicin×16.1 + dihydrocapsaicin×16.1)×10.

로 분석되었다. Park 등(17)은 시판 고춧가루를 95% ethanol과 혼합하여 약 16시간 실온에서 진탕하고 원심분리 하여 상층액을 HPLC로 분석한 결과 capsaicin 함량이 3.0~33.0 mg/100 g 수준이라고 보고하였다. Son 등(18)은 국내산 고춧가루를 soxhlet 추출장치에서 4시간 동안 acetone을 사용하여 추출하고 감압건조 시킨 다음 80% methanol 50 mL로 건고물을 녹이고 hexane 50 mL과 격렬하게 흔들어 정지한 후 methanol 층을 취하여 GC로 분석하였다. 그 결과 capsaicin 함량이 11.8~25.1 mg/100 g이라고 보고하였다. 또한 Jeon과 Lee(14)는 고춧가루를 methanol과 혼합하고 2분 동안 homogenizer로 균질화하여 HPLC로 분석한 결과 capsaicin과 dihydrocapsaicin 함량이 각각 0.8~279.8 mg/100 g과 0.3~72.0 mg/100 g으로 보고하였다. 본 연구에서는 Jeon과 Lee의 연구에서 언급된 methanol 추출법을 이용하여 capsaicin과 dihydrocapsaicin 함량을 분석하였다. 또한 위에 언급된 Park 등(17)과 Son 등(18)의 방법들은 분석방법의 검증을 시행하지 않았지만 본 연구에서는 분석방법을 검증하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 새로운 capsaicinoids 분석 방법은 다른 방법에 비해 빠르고 간편하며 정확하게 capsaicinoids 함량을 분석할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 분석 방법의 검증

Capsaicinoids의 분석방법을 검증하고자 정밀도(preci-

sion), 정확도(accuracy) 및 특수성(specificity)을 분석하였다. 특수성은 시료에 따라 추출물이 달라질 수 있기 때문에 수분함량이 적은 고춧가루와 수분함량이 많은 고추장을 각각 선정하여 분석하였다. 고춧가루와 고추장의 정밀도는 Table 2에 나타내었다. 정밀도를 알아보기 위하여 반복성(repeatability)과 재현성(reproducibility)을 분석하였다. 반복성을 평가하기 위하여 하루 3 반복 실험을 실시하였으며, 재현성은 3일간 동일 실험을 반복 수행하였다. 반복성과 재현성의 CV%(coefficients of variation)는 모두 5% 이하로 우수하였다. 또한 capsaicinoids 표준용액을 시료에 spike하고, 시료 전처리 과정에 따라 추출한 후 HPLC에 주입하여 얻은 peak 면적의 비를 이용하여 회수율(recovery)을 구하였다(Table 2). 고춧가루의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 회수율은 각각 102.62와 103.43%, 고추장의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 회수율은 각각 97.02와 99.50%로 나타났다.

Peak의 순도는 Haroon 등(15)의 방법을 응용하였다. Peak의 순도를 검증하기 위해 방출파장을 320 nm로 고정된 후 흡수파장이 270, 280, 290 nm인 상태에서의 peak 면적을 측정하여 샘플의 peak 면적의 비율을 같은 파장에서 표준물질의 peak 비율과 비교하였다(Table 3). 고춧가루와 고추장의 peak 비율이 capsaicin 표준물질의 peak 비율과 매우 비슷하였으며, dihydrocapsaicin 표준물질의 peak 비율과 비교하였

Table 2. Precision and accuracy for pepper powder and pepper paste

	Parameters <sup>1)</sup>	Precision		Accuracy <sup>2)</sup>	
		Repeatability <sup>3)</sup>	Reproducibility <sup>4)</sup>	Recovery (%)	
Pepper powder	Capsaicin	Mean	13.04	12.98	102.62
		SD	0.58	0.18	3.20
		CV (%)	4.43	1.38	3.12
	Dihydrocapsaicin	Mean	8.91	9.14	103.43
		SD	0.45	0.28	3.31
		CV (%)	5.01	3.12	3.20
Pepper paste	Capsaicin	Mean	3.83	3.74	97.02
		SD	0.02	0.14	0.85
		CV (%)	0.56	3.70	0.88
	Dihydrocapsaicin	Mean	2.18	2.19	99.50
		SD	0.05	0.09	4.04
		CV (%)	2.22	4.18	4.06

<sup>1)</sup>Mean, n=3 (mg/100 g); SD, standard deviation; CV (%), coefficient of variation.

<sup>2)</sup>A measure of the closeness of the analytical result to the value evaluated by analyzing a spike sample.

<sup>3)</sup>Refers to the results of independent determinations carried out on a sample by analyzing 3 replicates of the sample on the same day.

<sup>4)</sup>Refers to the results of independent determinations carried out on a sample by analyzing 3 replicates of the sample at different periods of time.

Table 3. Evaluation of peak purity by fluorescence ratio using pepper powder and pepper paste

Ratio <sup>1)</sup>	Capsaicin			Dihydrocapsaicin		
	Standard	Pepper powder	Pepper paste	Standard	Pepper powder	Pepper paste
280/290 nm	2.33	2.28	2.26	2.31	2.27	2.34
270/290 nm	1.63	1.57	1.58	1.63	1.56	1.71
280/270 nm	1.43	1.46	1.43	1.41	1.46	1.37

<sup>1)</sup>Fluorescence ratios shown were calculated by dividing the values for the 2 peak heights for each analyte (capsaicin and dihydrocapsaicin) obtained from separate chromatographic runs at 2 different excitation wavelengths, with the emission wavelength constant at 320 nm.

을 때에도 매우 유사한 결과를 얻었다.

문 헌

## 요 약

본 연구에서는 다양한 고추 가공품의 capsaicinoids 함량을 분석하고 분석 방법을 검증하고자 하였다. 본 연구에서는 역상 HPLC를 이용하여 고춧가루 및 고추 가공품의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량을 분석하였다. 연구 결과 고춧가루 및 고추 가공품의 capsaicin 함량은 0.21~78.24 mg/100 g이었으며 dihydrocapsaicin 함량은 0.20~38.82 mg/100 g으로 나타났다. 고추장, 초고추장, 짬장, 소스류에 비해 고춧가루의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량이 높게 나타났다. Capsaicinoids의 분석방법을 검증하고자 정밀도, 정확도, 특수성을 분석하였다. 그 결과 회수율은 90% 이상이었으며 재현성과 반복성의 CV%는 5% 이하로 우수하게 나타났다. 전반적으로 분석 방법의 검증 parameter들은 우수하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 연구비 지원(과제번호 PJ007805 및 PJ007524)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

- Perucka I, Oleszek W. 2000. Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chem* 71: 287-291.
- Constant HL, Cordell GA, West DP, Johnson JH. 1995. Separation and quantification of capsaicinoids using complexation chromatography. *J Nat Prod* 58: 1925-1928.
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H. 1979. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agric Biol Chem* 43: 2493-2498.
- Henderson DE, Slickman AM. 1999. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: A comparative study against BHT and melatonin. *J Agric Food Chem* 47: 2563-2570.
- Surh YJ. 2002. More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *J Natl Cancer Inst* 94: 1263-1265.
- Khan IA, Mirza ZM, Kumar A, Verma V, Qazi GN. 2006. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 810-812.
- Lee SA, Hong SS, Han XH, Hwang JS, Oh GJ, Lee KS, Lee MK, Hwang BY, Ro JS. 2005. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxi-

- dase and antidepressant-like activity. *Chem Pharm Bull* 53: 832-835.
8. Saria A, Lembeck F, Skofitsch G. 1981. Determination of capsaicin in tissues and separation of capsaicin analogues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 208: 41-46.
  9. Parrish M. 1996. Liquid chromatographic method for determining capsaicinoids in capsicums and their extractives: Collaborative study. *J AOAC Int* 79: 738-745.
  10. Thomas BV, Schreiber AA, Weisskopf CP. 1998. Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography. *J Agric Food Chem* 46: 2655-2663.
  11. Lee KR, Suzuki T, Kobashi M, Hasegawa K, Iwai K. 1976. Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin using mass fragmentography. *J Chromatogr A* 123: 119-128.
  12. BaJaj KL, Kaur G. 1979. Colorimetric determination of capsaicin in capsicum fruits with the Folin-Ciocalteu reagent. *Microchim Acta* 71: 81-86.
  13. Perkins B, Bushway R, Guthrie K, Fan T, Stewart B, Prince A, Williams M. 2002. Determination of capsaicinoids in salsa by liquid chromatography and enzyme immunoassay. *J AOAC Int* 85: 82-85.
  14. Jeon G, Lee J. 2009. Comparison of extraction procedures for the determination of capsaicinoids in peppers. *Food Sci Biotechnol* 18: 1515-1518.
  15. Haroon Y, Bacon DS, Sadowski JA. 1986. Liquid chromatographic determination of vitamin K1 in plasma with fluorometric detection. *Clin Chem* 32: 1925-1929.
  16. Shin HH, Lee SR. 1991. Quality attributes of Korean red pepper according to cultivars and growing areas. *Korean J Food Sci Technol* 23: 296-300.
  17. Park JS, Kim MH, Yu R. 1999. Approximate amounts of capsaicin intakes determined from capsaicin contents in powdered soups of Korean instant noodles and hot peppers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 501-504.
  18. Son SM, Lee JH, Oh MS. 1995. A comparative study of nutrients and taste components in Korean and imported red peppers. *Korean J Nutr* 28: 53-60.

(2012년 2월 13일 접수; 2012년 5월 14일 채택)