

## Gibb's Reagent를 이용한 캡사이시노이드 간이 분석 방법

정희진<sup>1</sup> · 황도연<sup>1</sup> · 안정탁<sup>1</sup> · 천진영<sup>1</sup> · 한고은<sup>1</sup> · 이우문<sup>2</sup> · 권진경<sup>1</sup> · 이용직<sup>3</sup> · 강병철<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 농업생명과학대학 식물생산과학부, <sup>2</sup>국립원예특작과학원 원예작물부 채소과, <sup>3</sup>(주)하나종묘

### Development of a Simple Method for Detecting Capsaicinoids Using Gibb's Reagent in Pepper

Hee-Jin Jeong<sup>1</sup>, Doyeon Hwang<sup>1</sup>, Jeong Tak Ahn<sup>1</sup>, Jin Young Chun<sup>1</sup>, Koeun Han<sup>1</sup>,  
Woo-Moon Lee<sup>2</sup>, Jin-Kyung Kwon<sup>1</sup>, Yong-Jik Lee<sup>3</sup>, and Byoung-Cheorl Kang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Science, Vegetable Breeding Research Center, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

<sup>2</sup>Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Suwon 440-706, Korea

<sup>3</sup>Hana Seed Co., Ltd., Anseong 456-841, Korea

**Abstract.** Capsaicinoids are responsible for the pungency of *Capsicum* species. Among the several reported methods for quantifying capsaicinoids in pepper, liquid chromatography methods such as TLC and HPLC have been the most widely used due to their precision and reliability. However, they are quite expensive and time consuming to be applied to the field breeding. In this paper, we demonstrated that Gibb's reagent, 2,6-dichloroquinone chlorimide, mediated measurement of capsaicinoids is a simple and reliable method for determining the presence/absence of capsaicinoids, and estimating the amount of capsaicinoids in pepper fruits. The capsaicinoids could be also detected via colorimetric reactions of the Gibb's reagent. This simple method has been verified to be as accurate as the HPLC analysis. We have also modified this method for a high through-put analysis. This method will be useful for measuring capsaicinoids in pungency breeding programs in pepper.

**Additional key words:** breeding, capsaicin, high through-put analysis, pungency

## 서 언

고추는 전 세계 시장 규모가 약 1억 5천만 달러에 달하며 재배 면적과 시장 규모가 지속적으로 확대되고 있다(FAO STAT, 2009). 고추는 전 세계적으로 가장 많이 소비되는 채소 중 하나이며, 풋고추, 건고추, 단고추, 피망 등 다양한 형태와 특징으로 섭취가 가능하고, 우리나라와 같이 매운 음식을 선호하는 나라에서는 다양한 요리에 양념이나 식품 첨가제로 활용된다. 우리나라에서 고추는 쌀 다음으로 중요한 채소 작물로서 국민 1인당 연간 1.7kg를 소비하는 것으로 알려져 있다. 또한 고추는 비타민 A와 C가 풍부하고 카로테

노이드의 함량이 높은 건강식품으로 알려져 있다(Howard and Wildman, 2007; Topuz and Ozdemir, 2007).

고추의 성분 중 가장 잘 알려진 물질은 매운 맛 성분인 캡사이신(capsaicin)이다(Nelson and Dawson, 1923). 캡사이신은 캡사이시노이드(capsaicinoids)의 유도체 중 하나로 다이하드로캡사이신과 함께 전체 매운 맛의 90% 이상을 차지한다(Davis et al., 2007; Mueller-Seitz et al., 2008). 이러한 캡사이신은 고추 속(屬)에서만 특이적으로 만들어지는 물질로서, 통각신경을 자극하는 것으로 알려져 있는데 특히 인체 내의 수용체 활성화 채널의 하나인 통증수용체(Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1,

\*Corresponding author: bk54@snu.ac.kr

※ Received 9 January 2012; Revised 9 March 2012; Accepted 14 March 2012. 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(식물분자육종사업단 과제번호: PI0081872012)의 지원과 농림수산식품부 융복합연구센터지원사업 채소육종연구센터 (과제번호: 0636-20110005)의 지원에 의해 수행되었음.

TRPV1) 단백질을 활성화시켜 발열감을 느끼게 한다(Caterina et al., 1997; Iida et al., 2003) 체 내에 흡수된 캡사이신은 뇌를 자극하여 부신의 아드레날린을 분비시키고 발한 및 강심 작용을 유도하며, 체 내에서 항암(Surh, 2002), 항비만(Reinbach et al., 2009) 및 항진통(Wong and Gavva, 2009)에 효능이 높은 것으로 알려져 있다. 더불어, 고추의 캡사이신은 의약품, 화장품 산업, 호신용, 살충제 등으로도 쓰이고 있다(Cheema and Pant, 2011).

최근 들어서는, 소비자의 기호에 따라 고추장, 김치 등을 비롯한 다양한 식품의 매운 맛의 정도를 조절하기 위한 품종의 개발이 절실히 요구되고 있다. 그러나 고추의 매운 맛은 재배 환경, 숙기, 과실의 착과 위치 등에 따라 매우 변이가 심하기 때문에 육종이 가장 어려운 형질이다(Mueller et al., 2008). 고추 과실의 매운 맛의 유무는 단일 우성유전자인 *Pun1* 유전자에 의하여 결정되며, 신미계통과 무신미 계통의 염기서열의 차이를 바탕으로 한 분자표지가 개발되어 육묘기에 매운 맛의 유무를 신속히 판단할 수 있다(Stewart et al., 2005). 하지만, 매운 맛의 정도는 여러 개의 유전자가 복합적으로 작용하는 양적 형질로 유전되는 것으로 알려져 있으며(Ben-Chaim et al., 2006), 매운 맛의 정도를 판단할 수 있는 분자표지의 개발은 미미한 상태이다(Ben-Chaim et al., 2006). 따라서 매운 맛의 함량을 측정하기 위해서 스코빌 지수(Scoville unit), high performance liquid chromatography(HPLC) 방법(Garceas-Clavera et al., 2007; Wahyuni et al., 2011), TLC/HPTLC(Cheema and Pant, 2011)와 capillary gas chromatography(Thomas et al., 1998) 등을 이용하고 있다. 스코빌 지수의 경우 주관적인 판단이 개입되는 문제점이 있으며, HPLC는 정확한 결과를 분석할 수 있는 장점이 있는 반면, 전처리 과정이 길고 비용이 많이 드는 단점이 있다. 특히 품종 육성과정 중에는 짧은 시간 내에 많은 수의 개체를 분석하여 선발해야 하기 때문에 신미품종 육종에 활용할 수 있는 신속하고 간편한 매운 맛 측정방법의 개발이 절실히 필요하다.

Gibb's reagent라고 알려져 있는 2,6-dichloroquinone chlorimide는, 페놀 구조를 가지고 있는 화합물을 분석하는데 활용된다(Pankar and Magar, 1977; Svobodovfi, et al., 1978). Gibb's reagent는 페놀 화합물과의 반응을 통해 2,6-dichloro-indophenol를 생성하여 파란색으로 변색이 되기 때문에 페놀성 화합물의 정성적 분석과 정량적 분석에 활용할 수 있어 Gibb's reagent를 이용한 다양한 방향족 화합물을 분석하는 방법이 보고되었다(Otey and John, 2003). 고추에서도 Gibb's reagent와 TLC 방법을 이용하여 캡사이신을 분석하는 방법이 보고되었다(Pankar and Magar et al.,

1977). 하지만, 이러한 방법은 전처리와 분석에 많은 시간과 노력이 들어, 육종 현장에서 간편히 활용하기에는 부적합하다.

본 연구에서는 Gibb's reagent를 이용하여 육종현장에서 활용할 수 있는 신속 간편한 캡사이신 측정 방법을 개발하고자 하였다. 본 연구를 통해 개발된 간이 분석 방법은 캡사이신의 정성적인 측정에 효율적으로 이용이 가능하다. 본 논문에서는 이 분석법을 이용하여 다양한 고추 유전자원을 이용하여 캡사이신의 함량을 측정하고 이를 HPLC 방법과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

표준 시료인 캡사이신(순도 > 97.0%, HPLC)은 Sigma Aldrich(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. 캡사이신은 HPLC용 순수 메탄올(Burdick&Jackson, Morristown, New Jersey, USA)에 녹여서 사용하였다. 동일 제품의 메탄올을 이용하여 캡사이신 용액을 희석하여 각각 0, 50, 100, 200, 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000, 10,000, 50,000, 100,000ppm의 캡사이신 표준용액을 만들었다. 2,6-dichloroquinone chlorimide (Gibb's reagent, 순도 > 95.0%, TLC)는 Sigma Aldrich(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였고, 50g<sup>-1</sup> 농도로 메탄올에 희석하여 실험에 사용하였다. 암모니아 용액(28% 포함물)은 Showa(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 고추 유전자원

본 연구에 사용한 고추는 서울대학교 원예육종학 연구실에서 보유하고 있는 고추 유전자원 17점을 활용하였다(Table 1). 고추 매운 맛의 정성/정량적인 분석을 위해 아주 매운맛으로 알려진 '하바네로'와 농촌진흥청에서 매운 맛 고추로 육성된 'SR211'을 이용하였으며, 전혀 맵지 않은 단고추인 고추 3 계통과 맵지 않은 고추로 육성된 'SR213'을 이용하였다. 각 유전자원 별로 10립의 종자를 2% sodium chlorate와 10% trisodium phosphate에 소독시킨 이후 페트리 접시로 옮겨 발아시켰다. 이후 50공 플러그에 옮겨 심고 생장상에서 8본엽기까지 성장시킨 이후, 서울대학교 부속 실험 농장에서 정식하여 생장시켰다. 고추 과실 샘플은 개화 후 20-30일 정도의 미숙과와 50일 이후의 숙과를 각각 샘플링하여 실험을 진행하였다.

### HPLC 분석

동결 건조된 1g의 건태좌를 잘 빻아 7.5mL의 ethylacetate

와 acetone이 6:4의 비율로 섞인 용액에 넣고 37°C에서 24시간 동안 200rpm의 속도로 용매에 녹여 캡사이신을 추출하였다. 각 샘플은 15분 동안 2,700rpm으로 원심 분리한 이후, 4.5mL의 상층액을 취하여 SpeedVac System AES1010 (GMI, Minnesota, USA)을 이용하여 용액을 날렸다. 남은 펠렛은 다시 1mL의 순수 메탄올에 잘 녹여 0.45µm syringe filter(PTFE, Millipore, MA, USA)로 걸러 HPLC로 측정하였다. HPLC 분석은 Varian 212/410/325 HPLC(USA) 제품을 사용하였으며, column과 detector는 Phenomenex Luna C18(250 × 4.60mm, 5 micron)과 UV/VIS detector(파장: 280nm)을 사용하였다. 처음 10분간의 mobile phase의 조성은 solvent A는 acetonile으로, Solvent B는 DW와 0.1% formic acid로 구성하여 A와 B를 7:3으로 섞어서 흘려 주고, 30분까지는 A:B의 조성은 100:0으로 하여 흘려 보냈으며 5분 정도 이 용액의 상태를 유지하였다. 다시 용액의 조성을 7:3으로 섞어서 50분까지 흘려 보냈으며, mobile phase는 분당 0.7mL의 속도로 흘려 보냈다. HPLC 분석에 사용한 시료의 부피는 20µL였으며, 표준품 캡사이신 농도 1, 2, 5, 10, 20, 50ppm을 만들어 정량 보정하였다.

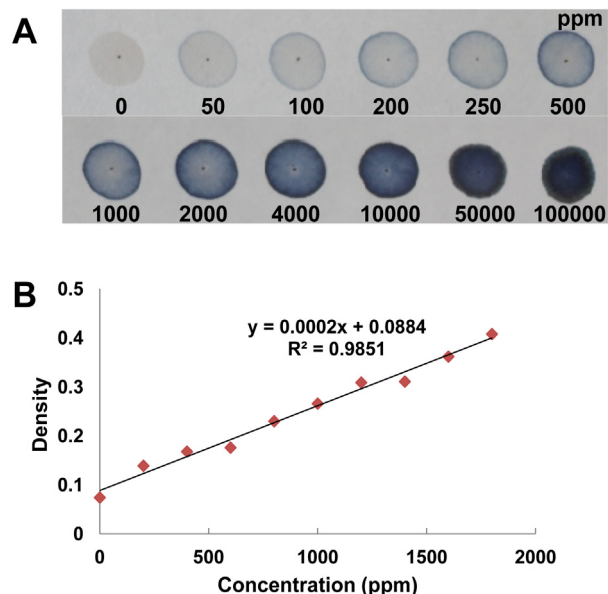
### Gibb's reagent를 이용한 캡사이신 측정

고추 샘플로부터 1g 정도의 건태좌를 분쇄하여 1mL의 메탄올에 넣고 원심 분리하여 상층액만을 분리하였다. 10µL 태좌 용액을 거름 종이에 떨어뜨린 이후 잘 말린 뒤, 그 위에 10µL Gibb's reagent를 떨어뜨리고 말린다. 이후에 암모니아 증기를 30초 정도 쐬어준 이후, 발색 변화를 관찰하고 표준 캡사이신의 변화와 비교하여 캡사이신을 함량을 분석하였다. 실험의 객관성을 유지하기 위해 세 명의 패널에게 각각의 색의 변화와 표준 캡사이신을 비교하여 blind test를 실시하여 캡사이신의 농도를 판단하게 하였다. 또한, 발색 정도를 정확하게 측정하기 위하여 Spectrophotometer Nano Drop(NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)을 이용하여 637nm 파장에서 빛의 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Gibb's reagent를 이용한 캡사이시노이드 발색 반응 검정

캡사이신의 농도에 따른 Gibb's reagent 발색 반응의 변화에 대해서 우선 실험하였다. 표준 캡사이신 시료를 0, 50, 100, 200, 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000, 10,000, 50,000, 100,000ppm의 농도로 희석하여 각각에 Gibb's reagent를 처리하고 발색 반응을 관찰한 결과, 캡사이신 농도의 변화에 따라 발색 반응이 비례적으로 증가하는 것을 확인할 수



**Fig. 1.** Gibb's reagent reactions with different concentrations of standard capsaicin. (A) The color reactions with Gibb's reagent became stronger as the concentration of capsaicin was increased. (B) Correlation between the color changes and the concentrations of capsaicin. The color reactions were quantified using a spectrophotometer. The coefficient ( $R^2$ ) value demonstrated that the changes of color were co-related with the concentrations of capsaicin.

있었다(Fig. 1A). 50ppm의 농도에서도 발색 반응을 육안으로 확인할 수 있어, 비교적 낮은 농도의 캡사이신도 검출이 가능한 것으로 판단되었다. Gibb's reagent의 발색 반응과 캡사이신의 농도와의 비례적 관계를 정량적으로 측정하기 위하여 spectrophotometer를 이용하여 캡사이신의 농도에 따른 흡광도를 측정해 보았다. 그 결과 캡사이신의 농도에 따른 Gibb's reagent의 흡광도 변화가 매우 높은 상관관계가 있음을 확인하였다( $R^2 = 0.9851$ , Fig. 1B). 기존의 선행 연구에서 Gibb's reagent의 발색반응을 HPTLC를 통하여 관찰한 결과에서도 캡사이신의 농도에 따라 일관성 있는 흡광도를 보였다(Cheema and Pant, 2011; Pankar and Magar., 1977). 따라서 Gibb's reagent가 캡사이시노이드 계열의 화합물의 농도에 비례하여 발색 반응을 일으키며 이를 통한 캡사이신의 함량을 비례적으로 측정하는 것이 가능할 것으로 판단하였다.

### Gibb's reagent 발색 반응을 이용한 고추 태좌의 캡사이시노이드 정성적 검정

Gibb's reagent를 이용하여 표준 캡사이신 시료의 농도를 측정하는 방법을 고추 태좌의 캡사이신 농도 측정에 적용하였다. 실험에 사용한 고추는 서울대학교 원예작물유전육종학 연구실에서 보유하고 있는 유전자원 중에 각기 다른 매운맛

의 정도를 가지고 있을 것으로 판단되는 17점을 임의 선발하여 실험을 진행하였다. 대조군으로 신미 계통인 ‘하바네로’와 ‘SR211’을 이용하였으며, 무신미 계통으로는 ‘SR213’을 포함하였다(Table 1). 17개의 유전자원을 재배하여 각각 미숙과와 숙과 상태로 구분하여 과실을 수확하고 태좌 샘플을 확보하였다. 재료 및 방법에 제시한 방법에 따라 캡사이신 추출하고, Gibb’s reagent를 이용하여 앞서 방법대로 표준 캡사이신의 함량을 측정하였다. 실험의 오차를 줄이기 위해 3반복의 실험을 수행하였다. 17개의 유전자원에서 추출한 태좌 추출물은 각각 캡사이신의 함량에 따라 Gibb’s reagent를 통한 발색 반응이 다양하게 나타났다. 특히 고신미 계통인 ‘SR211’과 ‘하바네로’의 경우에는 예상대로 발색 반응이 매우 강하게 나타났으며, 무신미 계통인 ‘SR213’의 경우에는 발색반응이 나타나지 않았다(Fig. 2). SNU001, SNU002, 07-485, AC09-221, R09-124, R09-136, R09-129, 07-407, 07-154, 07-036, 07-161의 경우에는 Gibb’s reagent의 처리에 따라 발색이 나타나, 신미를 가지는 계통으로 판단하였다. 이 중에서도 SNU002, AC09-221의 숙과, R09-124의 미숙과, R09-129의 숙과, 07-036 미숙과 등이 발색반응이 강하게 일어난 것으로 보아 캡사이신이 함량이 높을 것으로 판단되었으며, 이외의 계통들은 중간 신미를 가질 것으로 판단되었다(500-3,000ppm). 대조군으로 사용한

SR213과 더불어 07-027, 07-200, 07-139의 경우에 Gibb’s reagent를 처리하여도 색이 변화하지 않아 무신미의 특성을 가지는 계통으로 판단할 수 있었다. 이상의 결과를 통해, Gibb’s reagent를 활용하여 고추 태좌에서 캡사이신의 유무를 정성적으로 판단할 수 있음을 확인하였다. 무신미의 유전자원의 경우에는 암모니아 증기에 더 오래 노출시켜 처리하였을 경우에도 발색 반응이 나타나지 않는 것으로 보아 태좌 내에 캡사이신이 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 검증하기 위해 각각의 유전자원에서 DNA를 추출하여 매운맛 분자표지를 이용하여 각 식물체의 유전형을 검정하였다. 그 결과 분자표지의 유전형과 Gibb’s reagent를 통한 발색반응의 결과가 서로 일치하는 것으로 보아, Gibb’s reagent를 이용해 정성적인 캡사이신의 분석이 가능한 것으로 보인다(결과 미포함).

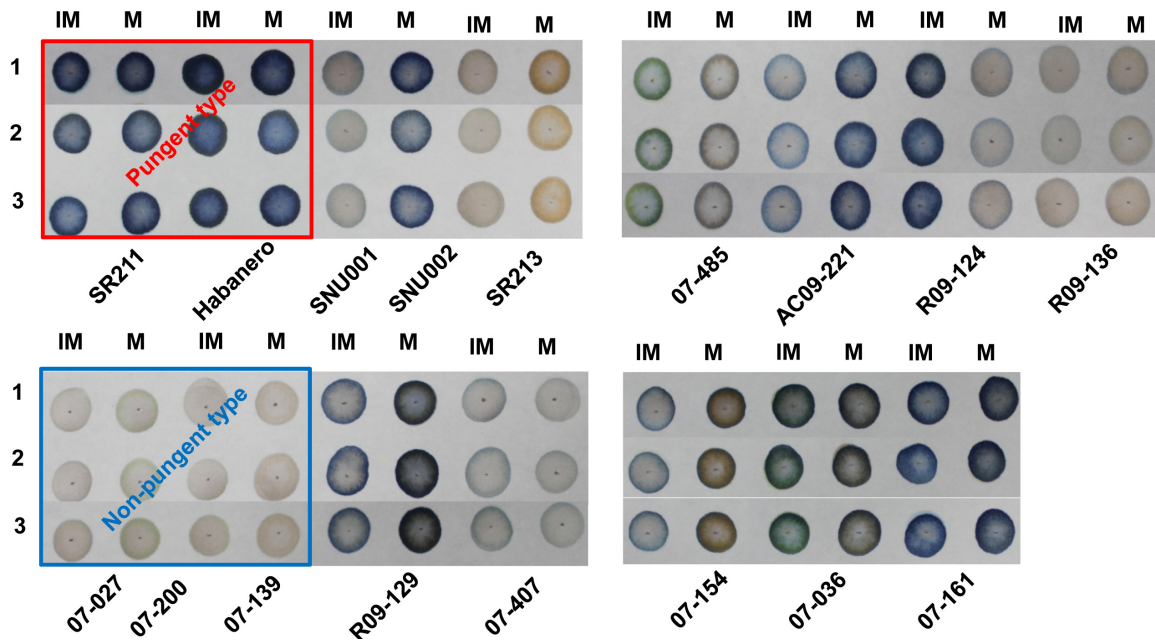
#### Gibb’s reagent 발색 반응을 이용한 캡사이신 농도 측정

표준 캡사이시노이드의 농도에 따른 Gibb’s reagent 발색 반응을 이용하여 고추 태좌의 캡사이신의 함량을 정성적으로 측정하고 HPLC를 이용하여 태좌에서 캡사이신의 함량을 측정한 결과와 비교하였다. 각기 다른 세 명의 패널을 선정하여 캡사이신 표준 시료의 Gibb’s reagent 반응결과와 유전자원의 반응결과를 비교하여 캡사이신의 함량을 추정하

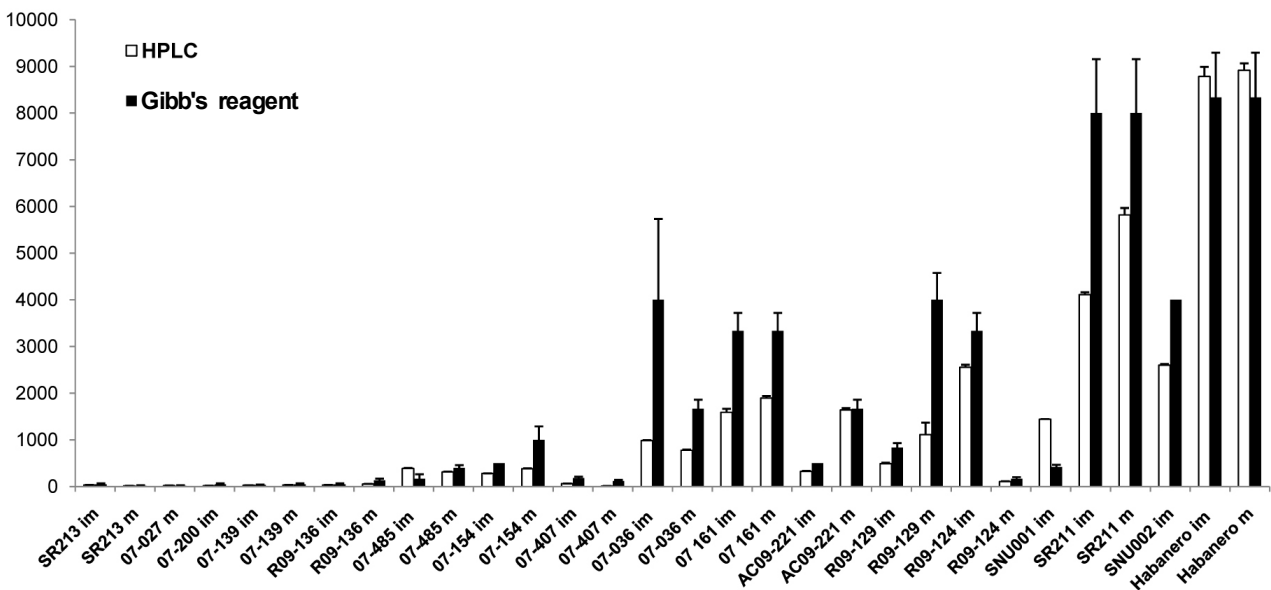
**Table 1.** *Capsicum* germplasm accessions used in this study.

Name and accession	Species	Molecular marker test	Total capsaicinoids (mg·g <sup>-1</sup> DW) <sup>a</sup>	Level of capsaicinoids contents	Fruit shape
SR213	<i>C. annuum</i>	NP	0	Non-pungent	Medium and conical
07-027	<i>C. annuum</i>	NP	0	Non-pungent	Flat and round
07-200	<i>C. annuum</i>	NP	0	Non-pungent	Bell
07-139	<i>C. annuum</i>	NP	0	Non-pungent	Bell
R09-136	<i>C. annuum</i>	P	0.88	Low	Long, Slim and curved shape
07-485	<i>C. chacoense</i>	P	1.02	Low	Cherry
07-154	<i>C. annuum</i>	P	1.02	Low	Cherry
07-407	<i>C. frutescens</i>	P	2.12	Low	Short and slim
07-036	<i>C. annuum</i>	P	2.71	Low	Cherry
07-161	<i>C. annuum</i>	P	9.83	Mild	Cherry
AC09-221	<i>C. annuum</i>	P	10.21	Mild	Cherry
R09-129	<i>C. annuum</i>	P	11.17	Mild	Long, conical and tapered
R09-124	<i>C. annuum</i>	P	22.37	Mild	Short and slim
SNU001	<i>C. chinense</i>	P	25.04	Mild	Habanero
SR211	<i>C. annuum</i>	P	30.53	High	Medium and conical
SNU002	<i>C. frutescens</i>	P	52.08	High	Globus
Habanero	<i>C. chinense</i>	P	72.64	High	Habanero

<sup>a</sup>Capsaicinoids content analyzed by HPLC.



**Fig. 2.** The detection of capsaicinoids using Gibb's reagent for the placenta extracts of pepper germplasm. The thick blue color indicates that high contents of capsaicinoids are present in the high pungent accessions (Red box). The intermediate color changes occurred in the mild pungent pepper. No color change was detected in non-pungent accessions (Blue box). IM: immature, M: mature, Number on the left: Replicated, Numbers at the bottom: Accession number.



**Fig. 3.** The comparison between HPLC and the Gibb's reagent methods. Blue bars are the capsaicinoids amounts measured by HPLC and red bars are the ones determined by the Gibb's reagent. Unit: ppm

계 하였다. 무신미의 계통은 두 가지 방법 모두에서 캡사이신이 검출되지 않음을 확인하였다. 저신미와 중간신미 계통의 캡사이신 함량은 Gibb's reagent를 이용한 분석방법에서 다소 높게 나타났으나 캡사이신의 함량 추정치와 HPLC 결과가 거의 일치하였다. 그러나, 고추 태좌 샘플에 따라 Gibb's reagent 이용한 함량 추정치가 다소 변이를 보였다. 미숙과 샘플 중에서 태좌 추출액의 색이 진한 녹색이거나

(07-485 IM, 07-036 IM), 숙과 샘플이 진한 붉은색의 경우 (07-154 M)에는 육안 측정에 다소 오차가 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 고신미 계통의 경우 각 패널에 따라 캡사이신 함량 추정치의 변이가 더욱 높게 나타났다. 매우 높은 농도의 캡사이신은 발색 반응이 매우 강하기 때문에 농도에 따른 차이를 육안으로 쉽게 판별하기 어려운 것으로 판단된다. 하지만 전체적으로는 Gibb's reagent의 발색 반응을 이용한

캡사이신의 함량 추정치 결과가 HPLC를 통해 분석한 결과와 상당히 일치함을 확인할 수 있었다(Figs. 2 and 3). Gibb's reagent 발색 반응의 차이는 많은 종류의 페놀 화합물이나 이와 유사한 종류의 아민 화합물 등도 Gibb's reagent와 반응하기 때문에 생길 수도 있다(Otey and John, 2003). 예를 들어, 고추 과실에는 다양한 페놀성 화합물인 quercetrin, luteonin, apigenin이 존재하므로 그 함량에 따라 발색 반응이 다르게 나타날 수 있다(Wahyuni et al., 2011). 하지만, 본 연구에서는 태좌에서만 캡사이신을 추출하였고 다른 페놀화합물에 비해 캡사이신이 월등히 많이 존재하기 때문에 이들 페놀성 화합물이 큰 영향을 주지는 않았을 것으로 판단된다(Wahyuni et al., 2011).

### 육종 현장에 적용 가능한 초간편 간이 분석법 개발

품종 육성과정 중에는 짧은 기간 내에 많은 수의 개체를 분석하여 선발해야 하기 때문에 육종현장에서 활용할 수 있는 신속하고 간편한 측정방법의 개발이 필요하다. 특히 기존의 방법을 이용해 캡사이신을 분석하기 위해서는 태좌를 건조하고 파쇄하는데 많은 시간이 소요된다. 이러한 전처리 과정 없이 캡사이신의 함량을 측정할 수 있는 방법을 개발한다면 좀 더 신속하게 매운 맛을 분석할 수 있을 것이다. 이에 육종포장에서 바로 적용이 가능한 Gibb's reagent 분석 방법을 개발하였다. 먼저, 앞서 분석에 사용했던 고추 유전자원의 과실을 수확하여 과실을 절단하고 절단면을 거름종이에 찍어 태좌의 캡사이노이드가 거름종이에 묻도록 하였다. 이후 이전 실험과 동일한 방법으로 Gibb's reagent 발색 반응이 나타나는 지를 확인하였다. 그 결과, 과실 절단면 중 태좌 부분에서 발색 반응이 나타났으며, 이를 통해 캡사이신의 유무를 매우 신속하게 판단할 수 있었다(Fig. 4). 아울러

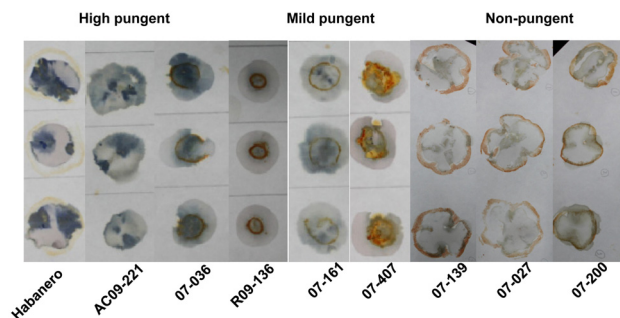
**Table 2.** Comparison between HPLC and Gibb's reagent methods.

	HPLC analysis	Gibb's reagent
Sample preparation	3 days	5 min
Preprocessing time	1 hour/1 sample	5 min
Cost	High	Very low
Accuracy	Very accurate	Qualitative

러 고신미, 중간신미, 무신미 정도를 구별할 수 있을 정도의 정성적 분석은 가능하였다. 따라서, 초간편 Gibb's reagent 발색반응 방법으로 무신미, 중간신미, 고신미 개체를 구별하고, 추후 선발된 개체의 정확한 함량 측정은 HPLC 등의 방법을 통해 재확인한다면 매우 효과적으로 선발이 가능할 것이다. 무신미의 교배 조합, 고신미, 중간신미, 저신미 등의 교배 조합에서 육종 목표에 따라 Gibb's reagent를 통한 개체 선발이 용이해짐에 따라, 이를 이용하여 육종 포장에서는 간이적인 방법으로 매운맛에 대해서 정성적 분석과 대략적인 정량적 분석을 토대로 선발을 할 수 있어, 기존의 HPLC 방법에 비해 시간과 비용이 절약되며 정확성에서도 큰 차이를 보이지 않아 고추 육종에서 활용이 가능할 것으로 판단된다(Table 2).

## 초 록

캡사이신은 고추의 매운맛을 결정하는 화합물이며 HPLC 등과 같은 액상 크로마토그래피를 통한 정량법이 가장 많이 이용되고 있다. HPLC 방법은 정확하게 캡사이신 함량을 측정할 수 있으나 전처리 시간이 길고 고가의 장비를 필요로 하는 단점이 있다. Gibb's reagent로 불리는 2,6-dichloroquinone chlorimide는 캡사이신의 벤젠 구조와 반응하여 발색을 하며 이 반응을 이용해 상대적인 캡사이신의 양을 측정할 수 있다. 본 연구는 Gibb's reagent를 통한 발색반응은 캡사이신의 양에 비례하여 증가하며, 고추 태좌를 이용하였을 때에도 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 방법을 대량 신속 캡사이신의 함량 측정을 위하여 고추의 과실을 절단하여 발색반응을 시키거나 Gibb's reagent를 미리 도포 시켜놓은 조건에서도 동일하게 신뢰할만한 결과를 확인하였다. 육종 목표에 따라 Gibb's reagent를 통한 개체 선별을 쉽게 하여 실제 육종 포장에서 간이적인 방법으로 매운 맛에 대해서 정성적 분석과 대략적인 정량적 분석이 가능하게 되었다. 이러한 방법은 기존의 액상 크로마토그래피 등의



**Fig. 4.** Developing a simple method using Gibb's reagent for high through-put analysis for field breeding. The qualitative and quantitative analysis using placenta tissues after horizontally cutting pepper fruits. The color reactions occurred on the surrounds of fruit placenta. Qualitative analysis could be performed using cut placenta tissues and approximately quantitative analysis could be also possible.

방법에 비해 시간과 비용이 절약되며 정확성에서도 큰 차이를 보이지 않아 고추 육종 포장에서의 활용을 기대할 수 있다.

**추가 주요어 :** 포장 육종, 캡사이신, 대량 신속 검정법, 매운 맛

## 인용문헌

- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B.C. Kang, I. Paran, and M.M. Jahn. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 113:1481-90.
- Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, and D. Julius, 1997. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Cheema, S.K. and M.R. Pant. 2011. Estimation of capsaicin in seven cultivated varieties of *Capsicum annum* L. *RJPBCS.* 2:701-706.
- Davis, C.B., C.E. Markey, M.A. Busch, and K.W. Busch. 2007. Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *J. Agric. Food Chem.* 55:5925-5933.
- Garceas-Clavera, A., R. Gil-Ortega, A. Alvarez-Fernandez, and M.S. Arnedo-Andres, 2007. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intra-specific cross of *Capsicum annum* L. *Agric. Food Chem.* 55:6951-6957.
- Howard, L.R. and R.E.C. Wildman. 2007. Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annum*), p. 165-191. In: R.E.C. Wildman (ed.). *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- Iida, T., T. Moriyama, K. Kobata, A. Morita, N. Murayama, S. Hashizume, T. Fushiki, S. Yazawa, T. Watanabe, and M. Tominaga. 2003. TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology.* 44:958-967.
- Mueller-seitz, E., C. Hiepler, and M. Petz, 2008. Chili pepper fruits: Content and pattern of capsaicinoids in single fruits of different ages. *J. Agric. Food Chem.* 56:12114-12121.
- Nelson, E.K. and L.E. Dawson. 1923. The constitution of capsaicin-the pungent principal of *Capsicum* III. *J. Am. Chem. Soc.* 45:2179.
- Otey C.R., and M.J. John. 2003. High-throughput screen for aromatic hydroxylation, p. 141-148. In: F.H. Arnold and G. Georgiou (eds.). *Directed enzyme evolution: Screening and selection methods.* Humana Press, Totowa, NJ.
- Pankar, D.S. and N.G. Magar. 1977. New method for the determination of capsaicin by using multi-band thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 144:149-152.
- Reinbach, H.C., A. Smeets, T. Martinussen, P. Moller, and M.S. Westerterp-Plantenga. 2009. Effects of capsaicin, green tea and CH-19 sweet pepper on appetite and energy intake in humans in negative and positive energy balance. *Clin. Nutr.* 28:260-265.
- Stewart, C.J., B.C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S.L. Moore, E.Y. Yoo, B.D. Kim, I. Paran, and M.M. Jahn. 2005. The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J.* 42:675-688.
- Surh, Y.J. 2002. More than a spice: Capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:1263-1265.
- Svobodovfi, D., P. Krenek, M. Fraenkl, and J. Gasparic. 1978. The colour reaction of phenols with the Gibbs reagent. The properties of the coloured product and the optimum reaction conditions. *Mikrochimica. Acta.* 1:197-211.
- Thomas, B.V., A.A. Schreiber, and C.P. Weisskopf. 1998. Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 46:2655-2663.
- Topuz, A. and F. Ozdemir. 2007. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annum* L.) grown in Turkey. *J. Food Compos. Anal.* 20:596-602.
- Wahyuni, Y, A.R. Ballester, E. Sudarmonowati, R.J. Bino, and A.G. Bovy. 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry.* 72:1358-70.
- Wong, G.Y. and N.R. Gavva. 2009. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: recent advances and setbacks. *Brain Res. Rev.* 60:267-277.