

Determination of capsaicinoids in red pepper powder using ultra high performance liquid chromatography

Bae Namgung, Yunyeol Lee and Jaeho Ha[★]

Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, 1201-62, Bundang, Seongnam, Gyeonggi Province, Korea

(Received June 4, 2013; Revised July 29, 2013; Accepted July 29, 2013)

초고속 액체크로마토그래피를 이용한 고춧가루의 capsaicinoids 분석

남궁배 · 이윤열 · 하재호[★]

한국식품연구원 식품분석센터

(2013. 6. 4. 접수, 2013. 7. 29. 수정, 2013. 7. 29. 승인)

Abstract: The efficiency of the two extractions (refluxing extraction and heating-block extraction) was compared to develop the simple analytical method for the determination of capsaicinoids, including capsaicin and dihydrocapsaicin in red pepper powder. For the method development, the parameters, including particle size, extraction time and sample size, were evaluated using ultra high performance liquid chromatography (u-HPLC). It was found that the most effective extraction time of the refluxing extraction was 3 hr. The higher extraction efficiency was obtained with the fine particle of a mild red pepper powder, while the particle size did not affect the extraction efficiency in case of the hot red pepper powder. The higher extraction efficiency was obtained with the small size of sample taken because of the ratio of the large extracting solvent to sample amount. The extraction efficiency of the refluxing method was 3-9% higher than that of the heating-block method, however, the heating-block method could be applied to the determination of capsaicinoids in the red pepper powder for the purpose of quality control of the product.

요 약: 고춧가루의 매운맛을 나타내는 capsaicinoids인 capsaicin과 dihydrocapsaicin을 초고속액체 크로마토그래피로 간편하게 측정하기 위하여 고춧가루의 입도, 추출시간에 따른 추출율을 비교하고 환류추출법과 가열블록법을 비교하였다. 환류추출법의 경우 3 시간 추출하는 것이 효율적이었으며 capsaicinoids 추출율은 덜 매운 고춧가루의 경우 입도가 고울수록 높았으나 매운 청량고추의 경우는 추출율이 입도에 영향을 덜 받았다. 시료량을 달리한 경우 용매의 사용을 동일하게 하면 시료를 적게 사용하는 것이 추출율이 높았다. 환류추출법으로 3시간 추출한 것은 가열블록법으로 1 시간 추출한 것에 비하여 추출효율이 3-9% 높았으나 품질관리의 목적인 경우 신속 간편 방법인 가열블록법으로 고춧가루의 capsaicinoids를 측정하는 것이 가능하였다.

Key words: u-HPLC, red pepper powder, capsaicinoids, refluxing extraction, heating-block method

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)31-780-9127 Fax : +82-(0)31-780-9280

E-mail : jhkfri@gmail.com

1. 서 론

고춧가루는 각종 식품의 부원료 또는 첨가물로써 우리나라 식품에 매우 중요한 부재료이다. 붉은색과 매운맛을 주기 위하여 우리나라 전통식품인 김치, 고추장 등에는 고춧가루가 필수적이다.¹⁻³ 고춧가루의 붉은 색은 고추가 가지고 있는 carotenoid계 색소 중 적색 색소인 capsanthin과 capsorubin 때문이며 고추의 매운 맛을 나타내는 capsaicin이나 dihydrocapsaicin은 무색으로 고춧가루의 붉은 색과는 무관하다. 고춧가루의 매운 맛, 향, 색깔 및 영양성분 등은 고추의 재배 조건과 재배환경에 따라서 다르다.^{4,7} 고춧가루는 수분이 약 10%, 지방질이 2.0%, 단백질이 약 15%, 탄수화물이 60%이며 그 중 식이섬유가 약 35%, 당류가 약 20%를 차지하고 있다. 고춧가루의 중요한 품질요소인 맛과 향기성분과 더불어 고춧가루의 매운맛은 매우 중요한 품질요소이다.⁸⁻¹¹ 고춧가루의 매운맛을 나타내는 성분은 capsaicinoids로 이들은 capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin 등이 있고 이 가운데 capsaicin과 dihydrocapsaicin이 capsaicinoids 중 90% 정도를 차지한다.^{4,12}

Capsaicin과 dihydrocapsaicin을 분석하기 위하여 gas chromatography (GC),¹³⁻¹⁴ high performance liquid chromatography (HPLC)^{15,16}를 사용하는 방법이 있고 극미량의 capsaicinoids를 분석하기 위하여 gas chromatography-mass spectrometer (GCMS)¹⁷ 또는 liquid chromatography-mass spectrometer (LCMS)¹⁸ 등이 사용된다. 고춧가루의 capsaicinoids를 분석하는데는 HPLC를 사용하는 것이 일반적이며 이 때 사용하는 검출기는 ultra-violet detector (UVD) 또는 fluorescence detector (FLD)이다.¹⁹⁻²¹ 고춧가루의 capsaicinoids 함량을 분석하기 위하여 고춧가루로부터 capsaicinoids를 추출하는 방법이 매우 중요한데, 추출용매로는 일반적으로 ethanol, methanol, acetone, petroleum ether 등 유기용매를 사용하여 환류추출법, 초음파추출법, 또는 가열추출법을 사용한다. 최근 Ha 등은 가열블록을 사용하여 고추장으로부터 capsaicinoids를 신속하게 간편하게 추출하여 초고속액체크로마토그래프(ultra high performance liquid chromatograph, u-HPLC)로 분석하였는데 기존 HPLC에 비하여 신속하게 분석할 수 있다고 보고하였다.^{22,23} 고춧가루는 고추장과 달리 시료의 균질화 정도에 따라서 매운맛에 차이가 있고, 용매를 사용하여 추출할 경우 적절한 추출시간에 대한 연구가 보고되지 않았다. 또한 고춧가루에 대하여 적용 가능한

신속분석방법은 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 고춧가루의 매운맛을 수시로 측정할 필요가 있는 고춧가루 생산업체뿐만 아니라 고춧가루를 부원료로 사용하는 고추장, 김치 및 장류생산업체에서 활용 가능한 간편 신속 분석법을 개발하고자 하였다. 고춧가루의 capsaicinoids 중 capsaicin과 dihydrocapsaicin을 환류추출법으로 추출할 때 추출시간에 따른 추출효율을 비교하고 고춧가루의 입도와 시료 채취량을 달리하여 간편분석법인 가열블록법과 추출효율을 비교하여 고춧가루의 capsaicin과 dihydrocapsaicin을 간편하게 분석할 수 있는 최적분석조건을 제시하였다.

2. 실험

2.1. 재료

본 연구에 사용된 고춧가루는 정읍산(털 매운맛), 청양산(아주 매운맛)을 가락시장(서울)에서 고추를 구입하여 방앗간에서 직접 분쇄하였으며, 굵은 고춧가루(시험용 체 2.00 mm 위에 10% 미만 남고, 시험용 체 850 μm 위에 40% 이상 남는 것), 보통 고춧가루(시험용 체 850 μm 위에 40% 미만 남고, 시험용 체 425 μm 위에 60% 이상 남는 것), 고운 고춧가루(시험용 체 850 μm 위에 5% 미만 남고, 시험용 체 425 μm 위에 60% 미만 남는 것)를 500 g씩 잘 밀봉하였으며 시료를 균질하게하여 실험에 사용하였다.

2.2. Capsaicinoids 추출방법

2.2.1. 환류추출법(Refluxing extraction method)

고춧가루 1.0 g 또는 2.0 g을 250 mL bottom flask에 정밀히 달고 추출용매로 methanol 또는 95% ethanol 80 mL을 가하고 비등석을 10-15 개 넣었다. 이를 환류추출냉각기에 연결하고 85 °C 수욕상에서 각각 1~5 시간 동안 환류추출 시켰다. 환류추출이 끝나면 가열을 중지시키고 flask가 충분히 냉각되었을 때 환류추출기에서 분리시켰다. Capsaicinoids가 추출된 상등액을 10 mL의 여과용 주사기에 가만히 부은 다음 0.20 μm membrane filter로 여과하고 초고속액체크로마토그래프(ultra high-performance liquid chromatograph, u-HPLC)로 분석하였다.

2.2.2. 가열블록법(Heating-block method)

22 mL vial에 비등석 10-15 개 정도 깐다. 여기에 고춧가루 0.1 g 또는 0.2 g을 정밀히 달고 추출용매로

methanol 15 mL을 가한다. 가열블록상에서 90 °C, 1 시간 동안 추출한 다음 식힌다. 추출하는 동안 추출 수율을 높이기 위하여 10 분 간격으로 vial을 잘 흔들 어준다. Capsaicinoids가 추출된 용액은 0.20 µm membrane filter로 여과하고 u-HPLC로 분석하였다.

2.3. 시약 및 장치

2.3.1. Capsaicinoids 표준용액

Capsaicinoids 표준용액은 다음과 같이 제조하였다. 각각 10 mg의 capsaicin (>97%, C₁₈H₂₇NO₃, FW 305.42, CAS 404-86-4, CAP)과 dihydrocapsaicin (>90%, C₁₈H₂₉NO₃, FW 307.42, CAS 19408-84-5, DHC)을 95% ethanol (ACS reagent grade) 10 mL로 volumetric flask에 채워서 1 mg/mL의 농도로 만들었다. Acetonitrile (chromatographic grade)와 acetic acid (ACS reagent grade)로 이동상을 만들었으며 실험에 사용한 용매는 특급 시약을 사용하였다.

2.3.2. 고춧가루의 capsaicinoids 분석장치

사용한 u-HPLC 분석기기는 LaChromUltra L-2000 U Series (Hitachi-High Technologies Corp., Tokyo, Japan)을 사용하였으며, column은 LaChromUltra C18 (pore size 2 µm, 2.0 mm i.d. × 50 mm in length, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan), oven 온도는 40 °C로 하였다. 검출기는 fluorescence detector (L-2485U, Hitachi-High Technologies Corp., Tokyo, Japan)를 사용하였고 excitation wavelength은 280 nm, emission wavelength은 325 nm로 하였다. 이동상은 1% acetic acid 수용액:acetonitrile=60:40 (v/v) 이었고 유속은 0.6 mL/min, injection 부피는 2 µL이었다.

2.3.3. 검량곡선의 작성

고춧가루 중의 capsaicinoids 농도를 측정하기 위하여 capsaicinoids 표준용액을 95% ethanol로 희석하여 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 g/mL로 만들어 검량곡선을 작성한 다음 외부표준물질법으로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출방법에 의한 capsaicinoids 추출효율

고추로부터 capsaicinoids oleoresin을 추출하기 위하여 ethanol을 추출용매로 하여 주로 환류추출법이 이용되고 있다.^{15,22} 최근 Ha 등^{22,23}은 고추장, 김치, 스낵 등으로부터 capsaicinoids를 신속하게 분석하는 방법을



Fig. 1. Comparison of effect of solvent on extraction efficiency between methanol (left) and 95% ethanol (right).

보고하였는데, 추출용매로 methanol을 사용하였다. 환류추출법으로 capsaicinoids를 추출할 경우 methanol과 95% ethanol로 추출한 결과 capsaicinoids 함량에는 큰 차이가 나타나지 않았다. 그러나, methanol을 용매로 사용한 경우 capsaicinoids 함량은 고춧가루 입자의 크기와 추출시간에 따른 반복실험에서 분석결과의 변동값이 25.5%로 높았다. 이는 추출용매인 methanol로 추출하는 과정에서 Fig. 1과 같이 flask 내벽에 고춧가루 입자가 등글게 막을 형성하였고, 고춧가루의 입자가 작을수록, 추출시간이 많을수록 flask 내벽에 있는 등근막은 점점 진하고 두껍게 생성되어 capsaicinoids 함량측정값의 변동이 커짐을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구에서는 환류추출법으로 capsaicinoids를 추출할 경우 추출용매로 95% ethanol을 사용하였다.

3.2. 추출시간에 따른 capsaicinoids 함량비교

u-HPLC를 사용하여 capsaicinoids 중 고춧가루의 매운맛의 주 성분인 capsaicin과 dihydrocapsaicin 표준용액을 분석한 크로마토그램을 Fig. 2(a)에 나타내었다. u-HPLC를 사용하여 capsaicinoids를 분석할 경우 약 4 분 이내에 분석이 완료되었고 capsaicin과 dihydrocapsaicin이 완전히 분리되는 것을 알 수 있었다. Fig. 2(b)은 고춧가루로부터 95% ethanol을 사용하여 capsaicinoids를 추출한 다음 u-HPLC로 분석한 크로마토그램으로 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 분리가 완전히 이루어졌으며 capsaicin 피크 앞에 분리되어 나오는 성분은 nordihydrocapsaicin으로 추정되었다.^{16,18}

고추는 capsaicinoids의 함량에 따라서 매우 매운 것과 덜매운 것 등 다양한 품종이 있다. 덜 매운 품종과 매운품종 중의 capsaicinoids 함량의 차이가 매우 크기 때문에 환류추출법으로 capsaicinoids를 추출할 경우 시료에 대한 추출용매의 사용비율과 추출시간에 따라

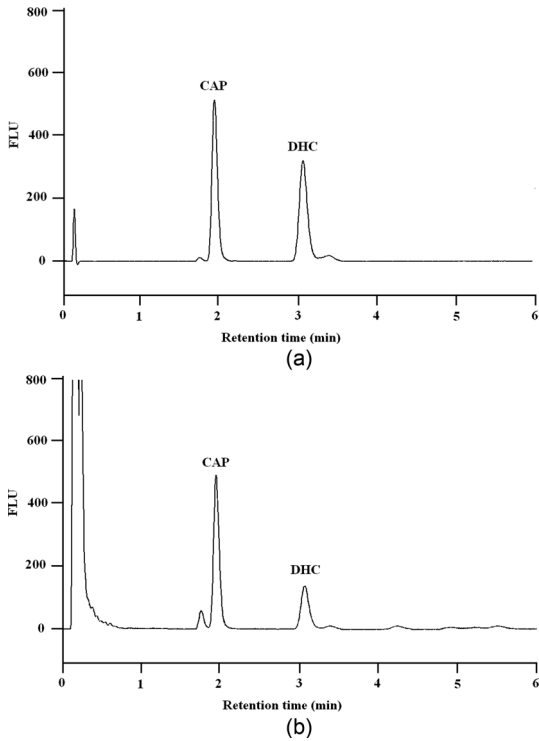


Fig. 2. Typical chromatogram of capsaicinoids in red pepper powder obtained using u-HPLC. (a) Standard solution of capsaicinoids, (b) red-pepper powder.

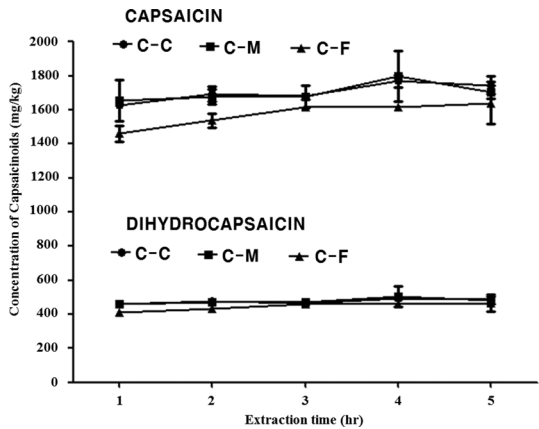


Fig. 3. Changes of capsaicinoid concentrations as a function of extraction time. The amount of red-pepper powder taken was 2 g. Key: C-C, Cheongyang-course; C-M, Cheongyang-medium; C-F, Cheongyang-fine.

capsaicinoids의 추출량이 차이가 있을 것으로 생각된다. Fig. 3은 매운맛을 지닌 청양고추 2 g을 취하여 95% ethanol 80 mL을 가한 다음 환류추출법으로 1

시간에서 5 시간까지 capsaicin과 dihydrocapsaicin을 추출한 결과이다. 추출시간 1 시간부터 3 시간에 이르기 까지 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량은 점차 증가하였고 추출시간 3 시간 이후는 추출율에 큰 변화가 없는 것을 알 수 있었다. 청양 고추가루의 양을 1 g으로하고 95% ethanol을 추출용매로 하여 동일한 방법으로 추출시간을 1 시간에서 5 시간까지 capsaicin과 dihydrocapsaicin을 추출한 경우도 유사한 결과를 보였으며, 덜 매운 고추가루인 정읍산을 사용하여 동일한 방법으로 실험을 실시한 결과도 유사하였다. 따라서 고추가루를 환류추출법으로 추출할 경우 3 시간 정도 추출하는 것이 가장 적절함을 알 수 있었다. 환류추출법에 있어 추출시간에 따른 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 추출율의 변화는 고운 고추가루, 보통 고추가루 및 굵은 고추가루 모두 비슷한 결과를 보여 입도에 의한 차이는 크지 않는 것을 알 수 있었다.

3.3. 고춧가루 입도 및 시료량에 따른 capsaicinoids 함량비교

Table 1은 환류추출에서 추출시간을 3 시간으로 고정하고, 입도(고운, 보통, 굵은)를 달리한 고춧가루의 분석시료량을 1.0 g과 2.0 g을 취하여 분석한 결과이다. 정읍산 (덜매운맛) 굵은 고춧가루는 capsaicin 함량은 75.4 mg/kg과 73.8 mg/kg이었고 dihydrocapsaicin은 35.2 mg/kg과 31.7 mg/kg으로 고추가루양을 1.0 g 취한 경우가 2.0 g취한 경우 보다 약 4-5% 높았다. 이는 추출용매의 양을 80 mL로 동일하게 하고 시료량을 1.0 g에서 2.0 g으로 2 배 많게 한 경우 단위 시료량에 대한 사용용매의 양이 2 배로 증가하게 되어 추출 효율이 증가한 때문인 것으로 사료되었다.

입도에 의한 차이를 보면 입도가 고운 것은 굵은 것에 비하여 capsaicin은 약 8%, dihydrocapsaicin은 약 10%의 함량이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 매운맛을 지닌 청양고추가루의 경우는 입도에 의한 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량 차이가 거의 없었다. 고추가루의 경우 고추를 분쇄할 때 capsaicinoid함량이 많은 태좌부분이 많이 포함될수록 capsaicinoids의 함량이 증가하는데 본 실험에서는 청양고추가루의 경우 분쇄가 골고루 잘 이루어져 입도에 의한 차이가 없었다.

Ha 등^{22,23}은 우리나라 전통식품의 한가지인 고추장의 매운맛의 주성분인 capsaicinoids의 함량을 가열블록을 사용하여 신속하고 간편하게 측정하는 방법을 개발하여 보고하였다. 이 방법은 고추장의 capsaicinoids

Table 1. Comparison of capsaicinoid concentrations depending on the particle size and sample amount of red pepper powder by the refluxing method

Samples	Particle size	Capsaicin		Dihydrocapsaicin	
		1 g	2 g	1 g	2 g
Jeongup	Coarse	75.4±4.7	73.8±5.7	35.2±0.1	31.7±2.2
	Medium	79.2±3.3	77.2±6.0	36.8±1.0	33.6±3.6
	Fine	81.8±2.6	79.4±0.9	38.7±1.4	34.8±1.0
	Average	78.8±1.4	76.8±2.8	36.9±1.8	33.4±1.6
Cheongyang	Coarse	1682.1±21.7	1605.0±15.6	467.2±11.9	431.3±0.6
	Medium	1675.2±66.4	1615.3±30.0	472.6±5.5	426.6±9.2
	Fine	1617.0±12.9	1618.9±5.2	468.0±9.1	428.7±2.1
	Average	1658.1±35.8	1613.1±7.2	469.3±2.9	428.9±2.4

Values represent the mean of triplicate analysis±standard deviation.

Table 2. Comparison of capsaicinoid concentrations depending on the particle size and sample amount of red pepper powder by the heating-block method

Samples	Particle size	Capsaicin		Dihydrocapsaicin	
		0.1 g	0.2 g	0.1 g	0.2 g
Jeongup	Coarse	72.6±2.3	71.4±3.0	32.3±2.3	29.1±2.9
	Medium	78.2±4.9	76.8±6.8	36.5±2.2	35.7±1.3
	Fine	81.0±4.5	75.8±1.4	38.6±2.3	33.7±1.2
	Average	77.3±4.3	74.7±2.9	35.8±3.2	32.8±3.4
Cheongyang	Coarse	1590.4±96.5	1544.0±76.6	436.5±39.2	426.9±16.0
	Medium	1575.0±46.4	1576.5±63.3	434.3±25.8	427.6±24.6
	Fine	1590.5±68.3	1536.4±48.4	446.6±29.8	429.2±12.7
	Average	1585.3±8.9	1552.3±21.3	439.1±6.6	427.9±1.2

Values represent the mean of triplicate analysis±standard deviation.

함량을 측정하는데 있어 기존의 방법에 비하여 분석 시간을 1/4로 단축시키는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 고춧가루의 매운맛을 나타내는 capsaicinoids의 함량을 가열블록을 사용하여 신속 간편하게 분석할 수 있는지를 알아보기 위하여 기존 분석법인 환류추출법과 가열블록법을 비교하였다.

Table 2는 동일한 시료로 가열블록법을 이용한 신속 간편분석법으로 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함량을 측정한 결과이다. 정읍산과 청양산 고춧가루 시료 0.1 g과 0.2 g을 취하고 추출용매로써 methanol을 15 mL 가한 다음 1 시간 동안 추출하였다. 입도에 따른 고춧가루 중의 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 추출수율을 비교하기 위하여 고춧가루의 양을 0.1 g과 0.2 g을 취하여 분석한 결과 굵은 고춧가루의 capsaicin 함량은 72.6 mg/kg과 71.4 mg/kg이었고 dihydrocapsaicin의 경우 32.3 mg/kg과 29.1 mg/kg으로 고춧가루량을 0.1 g 취한 경우가 0.2 g 취한 경우 보다 약 3.5-9% 정도 높

게 나타났다. 이는 Table 1에 나타난 기존 추출법인 환류추출법과 마찬가지로 추출용매량을 15 mL로 고정하고 시료양을 0.1 g에서 0.2 g으로 2 배 많게 할 경우 단위 시료양에 대한 사용용매의 양이 2 배로 증가하게 되어 추출효율이 다소 증가한 때문인 것으로 사료되었다.

입도에 따른 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 추출율을 비교한 결과 Table 1에서 나타난 환류추출법과 동일한 경향을 보여 입도가 고울수록 capsaicinoids의 함량이 증가하였다. 그러나 매운맛을 지닌 청양고추의 경우는 입도에 의한 차이가 거의 없었다. Capsaicinoids 추출에 있어 환류추출법과 가열블록법의 차이를 비교한 결과 capsaicinoid 함량이 적은 정읍산고춧가루의 경우 환류추출법이 가열블록에 비하여 약 1-2% 정도 높은 수율을 보였고 capsaicinoid 함량이 높은 청양고춧가루의 경우 환류추출법의 추출효율이 약 5-7% 정도 높았다. 따라서 고춧가루의 capsaicinoid 분석을 위

하여 기존의 추출법인 환류추출법을 사용하는 것이 간편분석법인 가열블록법에 비하여 높은 추출효율을 보였으나 추출시간 및 사용용매의 양 등을 고려하여 불 때 고춧가루의 매운맛을 신속히 측정하는 방법으로 가열블록법을 사용하는 것이 가능할 것으로 사료되었다.

4. 결 론

고춧가루의 매운맛 성분인 capsaicinoids 함량을 간단하게 측정할 수 있는 방법을 연구할 목적으로 환류추출법과 가열블록법을 비교하였다. Capsaicinoids 추출율은 덜 매운 고춧가루의 경우 입도가 고울수록 높았으나 매운 청량고추의 경우는 추출율이 입도에 영향을 덜 받았다. 환류추출법으로 3 시간 추출한 것은 가열블록법으로 1 시간 추출한 것에 비하여 추출효율이 3-9% 높았으나 품질관리의 목적인 경우 신속간편 방법인 가열블록법으로 고춧가루의 capsaicinoids를 측정하는 것이 가능하였다.

참고문헌

1. E. J. Jeong, B. H. Bang and K. P. Kim, *Korean J. Food & Nutr*, **18**(1), 88-93 (2005).
2. Y. Lim, Y. Kyung, H. S. Jeong, H. Y. Kim, I. G. Hwang, S. M. Yoo and J. Lee, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **41**(9), 1315-1319 (2012).
3. J. Y. Chai, M. S. Kim, I. K. Han, S. Y. Lee and I. H. Yeo, *Anal. Sci. Technol.*, **7**(4), 541-545 (1994).
4. J. O. Yu, W. S. Choi and U. S. Lee, *Food Engineering Progress*, **13**(1), 38-43 (2009).
5. K. H. Ku, E. J. Choi and J. B. Park, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **37**(8), 1084-1089 (2008).
6. H. H. Shin and S. R. Lee, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**(3), 296-300 (1991).
7. K. M. Chung and J. M. Hwang, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **34**(5), 919-923 (2002).
8. S. H. Oh, I. G. Hwang, H. Y. Kim, C. R. Hwang, S. M. Park, Y. Hwang, S. M. Yoo, H. R. Kim, H. Y. Kim, J. Lee and H. S. Jeong, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **40**(5), 725-730 (2011).
9. J. M. Jung and S. T. Kang, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **32**(1), 42-49 (2000).
10. H. Ham, M. Sung, Y. Kim, Y. Choi, H. S. Jeong and J. Lee, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **41**(6), 870-874 (2012).
11. J. Y. Mang, Y. G. Lee, S. J. Lee, J. A. Jung, S. H. Na, C. W. Kim and H. J. Sim, *Soonchunhyang J. Nat.Sci.* **16**(2), 127-133 (2010).
12. S. H. Choi, *J Eat Asin Soc Dietary Life*, **16**(5), 585-591 (2006).
13. W. Hawer, J. Ha, J. Hwang and Y. Nam, *Food Chem.*, **49**, 99-103 (1994).
14. J. H. HA, K. J. Han, K. J. Kim and S. W. Jeong, *J. AOAC Int.*, **91**(2), 387-391 (2008).
15. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 18th ed. Method 995. 03. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA (2005).
16. G. F. Barbero, A. Liazid, M. Palma and C. G. Barroso, *Food Chem.*, **107**, 1276-1282 (2008).
17. A. P. Alvarez, E. R. Maya and L. A. A. Suarez, *J. Chromatogr., A*, **1216**, 2843-2847 (2009).
18. N. Kozukue, J. S. Han, E. Kozukue, S. J. Lee, J. A. Kim, K. R. Lee, C. E. Levin and M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 9172-9181 (2005).
19. J. Juangsamoot, C. C. Ruangviriyachai, S. Techawongstien and S. Chanthai, *Int. Food Res. J.*, **19**(3), 1217-1226 (2012).
20. S. Chanthai, J. Juangsamoot, C. Ruangviriyachai and S. Techawongstien, *E-J. Chem.*, **9**(3), 1550-1561 (2012).
21. V. K. Attuquayefio and K. A. Buckle, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 777-779 (1987).
22. J. H. Ha, H. Y. Seo, Y. S. Shim, D. W. Seo, H. Seog, M. Ito and H. Nakagawa, *Food Sci. Biotechnol.*, **19**(4), 1005-1009 (2010).
23. J. H. Ha, H. Y. Seo, Y. S. Shim, H. J. Nam and H. Seog, *J. AOAC Int.*, **93**(6), 1905-1911 (2010).