김스용액 분무에 의한 고추 생과의 신속한 캡사이시노이드 검출법 개발

한정현^{1†} · 홍순철^{1†} · 이우문² · 안을균² · 이준대¹ · 도재왕¹ · 박석진¹ · 윤재복^{1*}

¹(주)고추와 육종 기업부설연구소, ²국립원예특작과학원 원예작물부 채소과

Development of a Rapid Method for Capsaicinoids Detection in Fresh Pepper Fruits by Gibb's Reagents Spraying

Jung-Heon Han^{1†}, Sun Chul Hong^{1†}, Woo-Moon Lee², Yul Kyun Ahn², Jundae Lee¹,
Jae Wahng Do¹, Seok Jin Park¹, and Jae Bok Yoon^{1*}

¹Research & Development Unit, Pepper & Breeding Institute, Business Incubator, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-853, Korea

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

Abstract : The pungency is one of major traits determining the quality of pepper. Analysis of pungency is a cumbersome and time consuming work. To improve the efficiency of pungency analysis, a simple and rapid method was newly developed using 0.1N NaOH and 0.2% 2,6-dichloroquinone chlorimide solutions. This method was designated as a spraying method. Total capsaicinoids could be detected on both a fruit without a part of pericarp and a copying paper blotted with fruit section by spraying with above solutions in 5 minutes. Detection limit of the method was 40 ppm of capsaicinoids. On optical observation, this method could evaluate the presence of capsaicinoids, appropriate amount, and distribution of capsaicinoids in pepper fruits. The spraying method seems to be very useful for a practical breeding of high pungent pepper varieties.

Keywords : Capsaicin, *Capsicum*, Gibbs' reagent, Pungency, Assay

서 언

*Capsicum annuum*은 세계적으로 가장 널리 재배되는 고추로 매운맛에 따라 chilli(매운)와 sweet pepper(맵지 않은)로 불린다(Kumar et al. 2011). 고추의 매운맛은 캡사이신(capsaicin), 호모캡사이신(homocapsaicin), 다이하이드로캡사이신(dihydrocapsaicin), 노르다이하이드로캡사이신(nordihydrocapsaicin), 호모다이하이드로캡사이신(homodihydrocapsaicin)과 같은 천연 캡사이신류에 기인하는데(Kozukue et al. 2005), 캡사이신과 다이하이드로캡사이신이 매운맛 성분의 90% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있다(Mueller-Seitz et al. 2008).

매운맛의 정도는 주로 위 두 가지 성분의 함량으로 표시하

며(Garceas-Clavera et al. 2007, Jeong et al. 2012, Stewart et al. 2005, Topuz and Ozdemin, 2007), 분석방법으로는 Scoville Heat Test법(Scoville, 1912), 고성능 액체크로마토그래피분석법(high-performance liquid chromatography, HPLC)(Wahyuni et al. 2011), capillary gas chromatography(Thomas et al. 1998), TLC법[Thin layer chromatography/2,6-dichloroquinone chlorimide (DCQ)] (Pankar and Magar, 1977), Liquid chromatography-mass spectrometry (Reilly et al. 2001) 등이 있다. 이들 가운데 가장 널리 이용되는 HPLC법은 정확한 분석이 가능하지만 시료 전처리 시간(1일 이상)과 분석시간(시료당 약 20분)이 길어 이를 개선한 분석 속도가 5배 이상 빠른 방법(Ha et al. 2010)과 시료전처리 및 분석속도를 대폭 간소화시킨 간이분석법(Jeong et al. 2012)이 최근에 보고되었다.

간이분석법에 이용되는 Gibb's 반응액은 2,6-dichloroquinone chlorimide (DCQ)로 방향족 화합물의 페놀과 반응하여 푸른

*Corresponding author (E-mail: jaebokyoona@hanmail.net
Tel: +82-31-296-5797, Fax: +82-31-296-5794)

[†]These authors contributed equally to this work.

(Received on May 20, 2013. Revised on October 21, 2013.

Accepted on October 28, 2013.)

색을 나타내는 quinoneimine을 생성한다(Svobodovfi et al. 1978). 캡사이신과 다이하이드로캡사이신은 방향족 화합물로 DCQ와 반응할 수 있는데, 발색반응을 최적화하기 위해 HCl과 암모니아수를 촉매제로 이용된다(Jeong et al. 2012, Ryu, 2007).

DCQ를 이용한 간이분석법은 생과의 매운맛 유무와 정도를 푸른색의 발색 유무와 색의 진하기로 평가할 수 있고, 무엇보다 분석시간의 대부분을 차지하는 고춧가루를 제조하지 않아 신속하게 매운맛을 분석할 수 있다. 그러나 현재까지 개발된 방법은 발색 반응을 위해 Gibb's 반응액, 암모니아수, 또는 HCl을 실험실 수준에서 처리하기 때문에 실제 고추육성에서는 현장 적용성이 다소 떨어진다.

따라서 본 연구에서는 Gibb's 반응액을 이용한 분무법을 개발하고 실제 고추 육종 현장에서 캡사이시노이드 분석하기 위한 응용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

고추시료

실험 재료로는 *Capsicum annuum* ECW123R, 청양, 파리, 7종의 수집종, (주)고추와 육종에서 육성한 맵지 않은 오렌지 파프리카 계통과 *C. chinense* habanero, *C. annuum* NongB1 X *C. chinense* Naga Bhut Jolokia 유래 BC₁F₂ 250개를 사용하였다. 고추는 서울대학교 부속실험 농장에서 재배하였고, 개화 후 20-30일 정도의 미숙과와 50일 이후의 숙과를 수확하여 수확 후 바로 또는 1-3일 이내에 실험에 사용하였다.

표준용액과 반응액

순도 > 95.0% 캡사이신(Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A.)과 > 90.0% 다이하이드로캡사이신(Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A.)을 HPLC용 메탄올(Burdick & Jackson, Morristown, New Jersey, USA)에 각각 500 ppm 농도로 녹여 원액을 제조하였다. 원액을 동일용매로 5가지 농도(5, 10, 50, 100, 250 ppm)로 희석한 다음 두 용액을 농도별로 동량 혼합하여 HPLC용 표준용액으로 사용하였다. 발색반응용 표준용액은 HPLC용 표준액과 동일한 방법으로 8가지 농도(10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500 ppm)로 준비하였다.

분무법에 사용한 반응액은 3차 증류수에 녹인 0.1N NaOH(Showa, Tokyo, Japan)와 MeOH에 녹인 0.2% DCQ (> 95.0%, 2,6-dichloroquinone chlorimide, Sigma Aldrich, St.

Louis, U.S.A.)를 스프레이 병[금속 SP G90/24 녹색, (주) 동방 플라스틱, 한국]에 따로 담아 준비하였다.

HPLC

고춧 가루는 과를 65℃에서 2일간 건조시킨 다음 종자와 꼭지를 제거한 나머지를 가정용 믹서기(Miniblender HR 2870, Philips, the Netherlands)로 곱게 갈아 준비하였다. 캡사이시노이드는 메탄올이 10 ml 첨가된 15 ml conical 튜브(SPL, Korea)에 고춧 가루 0.5 g을 넣은 다음 100 rpm으로 흔들면서 상온에서 1시간 동안 추출하였다. 분석용 시료는 추출액을 0.2 µm syringe filter (PTFE, Smartpor, Korea)로 여과하여 준비하였고, 캡사이노이드 함량은 Capcell Pak C18 VG120 S-5 column (Shiseido, Japan)과 996 Photo Diode Array Detector (파장: 280 nm)가 장착된 HPLC (Waters 2695 Alliance, USA)로 분석하였다. 컬럼을 안정화 시키기 위해 메탄올을 10분간 흘리고 메탄올과 0.5% formic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A.)를 7:3으로 섞은 혼합액을 분당 1 mL의 속도로 흘려 보냈다. 캡사이시노이드 함량은 컬럼이 안정화된 후 시료 10 µL를 주입하여 분석하였고, 표준시료를 사용하여 mg/100 g 단위로 환산하였다.

분무법

종이에 캡사이시노이드를 묻혀서 매운맛을 간접적으로 조사하는 경우, 연필칼로 고추 생과를 횡단 혹은 종단으로 빠르게 자른 다음 절단면을 일반 복사용지(Double A, Khan-Na, South Korea)에 찍고 실온에서 완전히 건조하여 시료를 준비하였다. 고추 생과에서 직접 매운맛을 조사하는 경우, 씨와 태좌 부분이 잘 드러날 수 있도록 연필깎이용 칼로 일부 과피를 제거하여 시료를 준비하였다. 발색반응은 시료로부터 30 cm 정도 떨어져서 0.1 N NaOH와 0.2% DCQ를 순서대로 분무하여 유도하였고, 매운맛의 정도는 발색의 진하기 정도로 판별하였다.

결과 및 고찰

캡사이시노이드 검출 감도

HCl과 암모니아수는 캡사이시노이드와 DCQ가 반응할 때 시료의 산도를 조절하거나 발색반응을 촉매한다(Jeong et al., 2012, Pankar and Magar, 1977, Ryu, 2007).

그러나 본 연구에서는 NaOH와 DCQ를 분무처리 하는 것

Fig. 1. Detection limit of a spraying method for capsaicinoids. Dots were prepared by dropping 5 μ l of each sample on a copying paper. The samples are absolute methanol (0ppm) and dilutions (10~500 ppm) of 1:1 mixture of capsaicin and dihydrocapsaicin. For colored reaction solutions of 0.1N NaOH and 0.1% 2,6-dichloroquinone chlorimide were sprayed in sequence over the paper.

만으로도 정제된 캡사이신과 다이하이드로캡사이신의 발색 반응을 유도할 수 있었는데, 이를 분무법이라 명명하였다. 분무법의 캡사이시노이드 검출 감도를 조사하고자, 표준용액과 HPLC용 메탄올을 일반복사용지에 5 μ l씩 점적한 다음, 5분 간 건조하고 0.1N NaOH와 0.2% DCQ액을 순서대로 분무하였다. 음성대조군으로 사용한 메탄올 점적 처리구에서는 발색 반응이 전혀 관찰되지 않았으나, 표준용액에서는 파란색 발색 반응이 관찰되었다. 육안으로 식별 가능한 캡사이시노이드 검출농도는 40 ppm 정도였으며, 농도가 높을수록 진한 파란색으로 발색되었다(Fig. 1). 분무법의 캡사이시노이드 검출감도는 점적량을 10 μ L로 했을 때 50 ppm의 캡사이신 검출이 가능했다고 보고한 이전의 연구 결과(Jeong et al. 2012)에 비해 다소 높게 나타났다. 한편, 간이검출법(Jeong et. al., 2012)과 TLC법(Pankar and Magar, 1977)에서는 발색반응을 촉진시키기 위해 촉매제로 암모니아수를 사용하였으나, 암모니아수는 휘발성이 강하고 다루기가 쉽지 않아 분무법에는 적합하지 않았다.

직접분무법

고추 육성 포장에서 가장 일반적으로 사용하는 매운맛 판단법은 과를 분지른 다음 냄새를 맡거나 맛을 보는 것이다. 특히 검사 대상이 아주 매울 경우 직접 맛을 보고 매운맛 유무를 판단하는 것은 힘든 일이다. 이와 같은 문제를 해결하고자 본 실험에서는 실제 고추포장에서 맛을 보지 않고 매운맛을 간단하게 판별할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 연필칼을 이용하여 고추 과피를 일부 제거한 과 위에 반응액을 분

Fig. 2. Detection of capsaicinoids in fresh pepper fruits by a spraying method. Pericarp was partially eliminated by cutting with a knife. For colored reaction solutions of 0.1N NaOH and 0.1% 2,6-dichloroquinone chlorimide were sprayed in sequence over the fruit. Brown color was developed in a nonpungent pepper of *Capsicum annuum* ECW123R (A), whereas blue colors showing a contrast to the nonpungent pepper were developed in pungent peppers of an unknown accession (B), *C. annuum* Cheongyang (C), and *C. annuum* Quarri (D). Upper and down rows were whole and magnified images of fruits, respectively.

무하였다. 분무 후 1분 이내에 매운맛이 없는 *Capsicum annuum* ECW123R의 숙과에서는 태좌와 종자 표면에 갈색 반응이 관찰되었다(Fig. 2-A). 캡사이시노이드는 고추과의 태좌에서 외부로 분비되는 것으로 알려져 있는데(Suzuki et al. 1980), 국내의 대표적인 매운 고추인 청양의 미숙과에서는 태좌와 종자 표면에서 푸른색으로 발색되었고 시간이 경과함에 따라 진한 파란색으로 발색되었다(Fig. 2-C & D). 직접분무법으로 명명한 이 방법은 캡사이시노이드의 존재 유무를 손쉽게 판별하거나, 고추 씨 표면의 캡사이시노이드 분포를 판독하는데 유용할 것으로 판단되었다(Fig. 2-D). 또한 다양한 고추에 적용해 본 결과 녹색과와 적색과에 상관없이 매운맛 유무를 쉽게 판독할 수 있었으며, 맵지 않은 고추에서는 육안으로 판별하기 힘들 정도의 위양성반응은 관찰되지 않았다(자료 미제출).

간접분무법

직접분무법은 과피 제거 절차가 번거롭고 분무액이 흘러내

Fig. 3. Detection of capsaicinoids on tissue blots of fresh pepper fruits by a spraying method. The fruits were cut longitudinally (A and B) or horizontally (C) with a knife. The sections were printed on copying papers. For colored reaction solutions of 0.1 N NaOH and 0.1% 2,6-dichloroquinone chlorimide were sprayed in sequence over the papers. Pale green and blue colors were developed in a nonpungent paprika inbred line (A) and a pungent *Capsicum chinense* Habanero (B), respectively. For screening a high pungency, a spraying method was applied to a pungent population of 250 BC₁F₂ (*C. annuum* Nong B1 X *C. chinense* Naga Bhut Jolokia). Positive controls (upper row) were prepared by dropping 5 μ l of each dilute of 1:1 mixture of capsaicin and dihydrocapsaicin (C).

려 캡사이시노이드의 상대량을 객관적으로 비교하기가 힘들다. 이를 개선하고자 식물바이러스 진단에 이용되는 조직자국 면역반응법(Han et al. 2006)을 변형한 간접분무법을 개발하였다. 간접분무법은 고추 과실의 절단면을 종이에 찍은 다음 종이에 묻은 캡사이시노이드를 분석하는 방법이다. 조직자국 면역반응법에 사용되는 셀룰로오스막 대신 가격이 저렴한 매질로 여러 가지 종이의 사용 가능성을 조사하였는데, 실험 결과와 비용면에서 복사용지(Double A, Khan-Na)가 가장 적합한 것으로 판단되었다(자료 미제출).

간접분무법의 활용성을 조사하고자 맵지 않은 오렌지 파프리카 계통, 매운 하바네로, 졸로키아 유래 분리세대, 6개의 수집종의 숙과를 연필칼로 횡단하고 절단면을 복사용지에 찍었다. 캡사이시노이드의 양을 비교하기 위해 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm의 표준액을 복사용지에 5 μ l씩 떨어뜨려 양성 대조구를 제작하였다. 간접분무법에서는 직접분무법과 마찬가지로 맵지 않은 오렌지 파프리카 계통에서는 연한 갈색으로(Fig. 3-A), 매운 하바네로 고추에서는 파란색으로 발색되었다(Fig. 3-B). 고신미 육성 재료인 250개 BC₁F₂ (*C. annuum* Nong B1 X *C. chinense* Naga Bhut Jolokia)분리집단에서는 고추과의 크기가 다양하게 분리되었으나, 그림 3-C의 예처럼 분무법에 의한 발색 차이만으로도 캡사이시노이드 함량이 상대적으로 높은 개체를 손쉽게 선별할 수 있었다. 또한 캡사이

Fig. 4. Distribution of total capsaicinoids on tissue blots of fresh pepper fruits by a spraying method. The fruits of six accessions were cut horizontally (A) and longitudinally (B) with a knife (upper row). The sections were printed on copying papers (middle row). For colored reaction solutions of 0.1N NaOH and 0.1% 2,6-dichloroquinone chlorimide were sprayed in sequence over the papers. Total capsaicinoids (ppm) of six unknown accessions by HPLC analysis were 56 (1), 162 (2), 236 (3), 162 (4), 0 (5), and 152 (6), respectively. Total capsaicinoids were mainly distributed on placenta (A), septum (B), and pericarp (B) (bottom row).

시노이드 함량을 HPLC로 분석한 6개의 수집종에서도 캡사이시노이드 함량이 가장 높은 시료(Fig. 4B의 3번)와 없는 시료(Fig. 4B의 5번)를 간접분무법으로 선별할 수 있었다. 그러나 나머지 시료에서는 두 방법의 분석 결과가 일치하지 않았는데, 이는 시료 준비 방법, 과의 크기, 캡사이시노이드의 분포 위치 등과 같은 여러 가지 요인의 차이 때문인 것으로 판단되었다. 이상의 결과에서 간접분무법은 다량의 시료를 대상으로 캡사이시노이드 함량이 아주 높거나 낮은 시료를 1차적으로 선별할 때 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

간접분무법을 이용한 Capsaicinoids 분포 조사

이전의 실험에 사용한 6개의 수집종을 대상으로 간접분무법을 활용하여 캡사이시노이드 분포를 조사하였다. 캡사이시노이드는 주로 태좌 표면(Fig. 4-A)과 격막(Fig. 4-B)에 존재하였다. 이는 고추 과실의 태좌와 격막 표면에 capsaicin 류가 주로 분포한다는 이전의 결과와 일치한다(Suzuki et al. 1980, Taira et al. 2012). 그러나 캡사이시노이드 함량이 가장 높은 3번 시료에서는 과피에서도 캡사이시노이드가 존재하는 것으로 판단되는데(Fig. 4-B), 아직 과피에서 캡사이시노이드가 존재한다는 보고가 없어 보다 면밀한 조사가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

매운맛은 고추품질에 영향을 주는 주요형질 가운데 하나이다. 매운맛 분석은 번거롭고 시간이 많이 소요되는 작업이다. 매운맛 분석 효율을 개선하기 위해 본 연구에서는 0.1 N NaOH와 0.2% 2,6-dichloroquinone chlorimide 용액을 이용한 간 이분석법을 개발하였다. 이 방법을 분무법으로 명명하였는데, 위 분무액을 과피를 제거한 고추 과실에 직접 분무하거나 고추 절단면이 찍힌 종이 위에 분무함으로써 캡사이시노이드를 5분 이내에 분석할 수 있었다. 분무법의 캡사이시노이드 검출 감도는 40 ppm이었고, 분무법으로 캡사이시노이드 유무, 대략적인 양, 과에서의 분포를 육안으로 판독할 수 있었다. 분무법은 고신미 고추 품종을 육성하는 고추 육성 현장에 매우 유용할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ008024022012)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Garceas-Clavera A, Gil-Ortega R, Alvarez-Fernandez A, Arnedo-Andres MS. 2007. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intraspecific cross of *Capsicum annuum* L. Agric. Food Chem. 55: 6951-6957.
- Ha J, Seo HY, Shim YS, Nam HJ, Seog H, Ito M, Nakagawa H. 2010. Rapid method for the determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in gochujang using ultra-high-performance. Liquid Chromatogr. J. AOAC International 93: 1905-1911.
- Han JH, Lee CH, Kim YH, La YJ. 2006. Production of egg yolk immunoglobulin and its application for pepper mild mottle virus in serological tests. Res. Plant Dis. 12: 144-147.
- Jeong HJ, Hwang DY, Ahn JT, Chun JY, Han KU, Lee WM, Kwon JK, Lee YJ, Kang BC. 2012. Development of a simple method for detecting capsaicinoids using Gibb's reagent in pepper. Korean. J. Hort. Sci. Technol. 30: 294-300.
- Kozukue N, Han JS, Kozukue E, Lee SJ, Kim JA, Lee KR, Levin CE, Friedman M. 2005. Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 53: 9172-9181.
- Kumar R, Dwivedi N, Singh RK, Kumar S, Rai VP, Singh M. 2011. A review on molecular characterization of pepper for capsaicin and oleoresin. International J. Plant Breed. Genetics 5: 99-110.
- Mueller-seitz E, Hiepler C, Petz M. 2008. Chili pepper fruits: Content and pattern of capsaicinoids in single fruits of different ages. J. Agric. Food Chem. 56: 12114-12121.
- Pankar DS, Magar NG. 1977. New method for the determination of capsaicin by using multi-band thin-layer chromatography. J. Chromatogr. 144: 149-152.
- Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA. 2001. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. 912: 259-267.
- Ryu WK. 2007. Development of colorimetric determination method of capsaicinoids in peppers and its application. MS Diss., Kangwon National Univ., Kangwon.
- Scoville WL. 1912. J. America Pharmaceutical Association 1: 251-264.
- Stewart CJ, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I, Jahn MM. 2005. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. Plant J. 42: 675-688.
- Suzuki T, Fujiwaka H, Iwai K. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoids, in *Capsicum* fruit 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. Annum cv. Karayatsubusa. Plant Cell Physiol. 21: 839-853.
- Svobodovfi D, Krenek P, Fraenkl M, Gasparic J. 1978. The colour reaction of phenols with the Gibbs reagent. Mikrochimica. Acta. 1: 197-211.
- Taira S, Shimma S, Osaka I, Kaneko D, Ichianagi Y, Ikeda R, Konishi-Kawamura Y, Zhu S, Tsuneyama K, Komatsu K. 2012. Mass spectrometry imaging of the capsaicin localization in the *Capsicum* fruits. International J. Biotechnol. Wellness Industries 1: 61-65.
- 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.

17. Topuz A, Ozdemir F. 2007. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. J. Food Compos. Anal. 20: 596-602.
18. Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG. 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.