

## 고추중의 Capsaicin 定量에 關한 研究

Studies on the quantitative determination of Capsaicin  
in various species of the genus Capsicum

서울大學校 農科大學 農化學科

李 泰 寧 · 朴 性 五

(1962年 12月 15日 受理)

### Summary

Various species of the genus Capsicum contain in their fruits an intensively sharp and pungent substance, Capsaicin, which was first isolated in an almost pure state by Thresh. Containing the pungent principle, Capsicums are used extensively in food as a spice and in medicine as a rubefacient and carminative.

Numerous methods have been proposed for the isolation, the chemical structure and the quantitative determination of Capsaicin. Modifying the several methods described before, the Capsaicin contents in various species of the genus Capsicum were determined as follows.

(1) The isolation of pure Capsaicin was the essential first step for the determination of Capsaicin contents.

Powdered cayenne pepper was extracted with acetone. By the method of ether alkali partition extraction slightly modified at this laboratory and by the recrystallization with light petroleum ether that was repeated ten times, the pure crystalline Capsaicin was obtained. Using this Capsaicin, the standard absorption curve was drawn with Beckman spectrophotometer model DU for the quantitative determination of Capsaicin.

(2) The powdered sample was extracted in a Soxhlet extractor with ether-acetone solvent system (3:1) for 25 hours. Capsaicin in this ether-acetone extracts was efficiently separated in a pure state by paper partition chromatography using 58% methanol solution as developing agent. It was found that 58% methanol was one

of the most valuable solvent to separate Capsaicin from impurities such as sterols, fatty acids, waxes and carotenoid pigments.

(3) The colorimetric method modifying the Schulte-Krüger's method which consists of measuring the red color produced with diazobenzenesulphonic acid was used. Capsaicin in various species of the genus Capsicum was determined quantitatively with use of Beckman spectrophotometer model DU at 480 m $\mu$ .

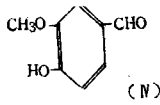
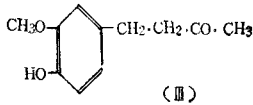
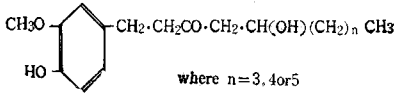
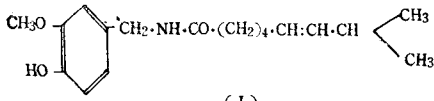
### 緒 論

고추는 調味料로서 重要な 位置를 차지하고 있으며 또한 發赤劑나 驅風劑 등의 醫藥으로도 使用되고 있다. 그런데 고추중의 辛味成分含量은 品種에 따라 다를뿐만 아니라 開花期, 栽培條件等에 따라서도 현저한 差異를 보이고 있다.

고추중의 辛味成分은 Thresh<sup>(1)</sup>氏가 처음으로 거의 純粹한 狀態로 分離하고 Capsaicin 이라는 이름을 붙였고 Micko<sup>(2)</sup>氏는 Capsaicin의 分子式이 C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>3</sub> 이고 分子中에 Vanillin基가 있다고 하였으며 Nelson<sup>(3,4)</sup>氏는 Capsaicin을 加水分解하여 Vanillylamine과 Isodecylenic acid을 얻었고 이들 分解產物로 부터 Capsaicin을 再合成하여 그構造式 (I)이  $\Delta^1,8$ -Methly-nonenyl-vanillylamide라고 發表하였다. Dodge<sup>(5)</sup>氏는 Capsaicin의 構造가 생강의 辣味成分인 Gingerol(II)과 Gingerone(III)의 構造와 類似한것과 또한 이들이 모두 Vanillin(IV)과 類似한 點에 對하여 研究報告 하였다.

最近에 Crombie<sup>(6)</sup>氏들은 고추를 Ethyl ether로 抽出하여 Capsaicin을 純粹하게 分離하고 그의 infra-red spectrum이 968.5cm<sup>-1</sup>에서 medium strong band를 나타냄을 보고 構造式內에 trans-do-

able bond가 있음을 確認한後 Capsaicin이 N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methylnon-6-enamide임을 報告하였으며 小管<sup>(7)</sup>氏들은 여러品種의



日本産 고추로 부터 Capsaicin을 分離하고 Alkali 展開劑를 使用한 paper chromatography에 依하여 Rf는 서로 相異하지만 辛味度, 融點, 呈色反應이 비슷한 二種의 辛味成分의 結晶을 얻었다.

本實驗에서는 辛味成分의 物理化學的 性質이나 그의 構造를 究明하는것 보다 辛味度 即 Capsaicin의 含量을 定量하는데 그 目的이 있으므로 二種의 辛味成分을 單離할 必要가 없고 다만 Capsaicin을 不純物인 Carotenoid色素, Sterol, Fatty acid, Wax 등과 현저하게 分離시키는 方法을 究明할 目的으로 여러 展開溶媒를 使用하여 paper Chromatography를 實施한 結果로서 가장 效果의으로 不純物로 부터 Capsaicin을 分離시킬수 있는 有機溶媒를 發見하여 展開劑로 使用하였다.

고추로 부터 Capsaicin을 分離結晶시키는 方法으로는 Micko<sup>(2)</sup>氏의 方法과 이에 對한 많은 改良法이 있었고 Schultze<sup>(8)</sup>氏의 方法을 改良한 藤田<sup>(9)</sup>氏의 方法은 고추를 Acetone으로 抽出하고 다시 NaOH溶液에 移行시킨後 이것을 鹽酸으로 酸性化시켜서 Capsaicin을 遊離시켰으나 本實驗에서는 이 方法을 改良하여 中和時 Carbon dioxide를 使用하였고 簡單한 操作으로 Capsaicin을 純粹하게 分離結晶시켰다.

Capsaicin의 定量法으로는 味覺比較에 依한 Waisicky-Klein<sup>(10)</sup>氏의 Organoleptic method가 있고 Vanadium oxytrichloride와의 呈色反應을 利用한 Forder<sup>(11)</sup>氏의 Vanadyl method와 Phosphotungstic-Phosphomolybdic acid와의 呈色反應을 利用한 Folin-Denis<sup>(12)</sup>氏의 Molybdenum blue method가 있으며 또한 Diazobenzenesulphonic acid에 依하여

呈色되는 赤色을 定量에 利用하는 Schulte-Krueger<sup>(8)</sup>氏의 Azo-dye method 등이 있다.

本實驗에서는 고추를 有機溶媒로 抽出하고 새로운 展開溶媒를 使用하는 paper partition chromatography에 依하여 Capsaicin을 純粹하게 分離한後 Diazobenzenesulphonic acid를 使用한 比色法으로 몇가지 品種의 고추중의 Capsaicin含量을 定量하여 다음과 같이 報告하는 바이다.

## 實 驗

### I Capsaicin의 分離結晶

風乾고추粉末 약 800g을 4l容 flask에 넣고 室温에서 Acetone으로 고추의 赤色이 없어질때까지 抽出하고 이 抽出液을 濾取하여 약 40°C 前後의 溫度를 維持하면서 water bath上에서 rotating evaporator로 減압하에서 Acetone을 溜去한 다음 이때 얻어진 黑赤色 油狀粘稠을 Petroleum ether (B.P. 40°C~60°C) 500ml와 함께 separating funnel에 넣고 同容의 85% Methanol로 三回 抽出한후 Methanol 抽出部를 rotating evaporator로 濃縮하였다. 이 濃縮物을 Ethyl ether 300ml에 溶解시키고 同容의 5% NaOH溶液으로 Capsaicin을 三回 抽出한 다음 分取된 5% NaOH 溶液 溶解部를 Carbon dioxide gas로 飽和시켰다. 이때 遊離된 黑赤色 油狀物質을 Ether 200ml로 二回 抽出하여 물로 씻은 다음 無水芒硝로 脫水하고 Ether를 溜去한 다음 얻어진 黑赤色 油狀 粘稠液을 Petroleum ether: Ethyl ether (9:1)의 混合溶媒 100ml에 溶解시키고 冷藏庫속에 하루밤 放置하여둔 結果 黑赤色 油狀粘稠液과 함께 針狀結晶이 析出 되었다. 여기서 上澄液을 傾斜시킨다음 그의 殘渣를 少量의 Ether로 溶解시킨후 Petroleum ether (40°~60°C) 90ml를 加하여 얻어진 混濁液을 다시 冷藏하여 針狀結晶을 얻었다. 이와같이 Petroleum ether와 Ethyl ether의 混合溶媒로 10回 再結晶 시켜서 B.P. 64~65°C인 白色의 비늘같은 가벽운 結晶 1.4g을 얻었다.

### II Capsaicin의 定量標準曲線과 그의 Recovery test

#### 1. 定量標準曲線

##### a. 標準溶液

85% Methanol 1ml當 乾燥된 純粹한 Capsaicin 結晶 200μg을 溶解시킨후 이것을 다시 適當히 희

석하여 使用하였다.

#### b. 發色試藥

- (1) 0.4N-Sodium hydroxide 溶液
- (2) 0.25N-Hydrochloric acid 溶液
- (3) 0.33% -Potassium iodide 溶液
- (4) 0.4% -Diazobenzenesulphonic acid 溶液 (每回新調) 製法: Sulphanilic acid 2g을 8% -NaOH 溶液 (W/V) 15ml와 20% -NaNO<sub>2</sub> 溶液 (W/V) 4ml에 溶解시킨후 ice-bath內에서 氷冷한 HCl (S.G. 1.18) 4ml를 徐徐히 攪拌하면서 注入하면 Diazobenzenesulphonic acid의 微黃色 침전이 생긴다. 이것을 sintered glass filter로 濾過한후 氷冷한 물, 氷冷한 Methanol 氷冷한 Ethyl ether 各各 100ml, 25ml, 25ml로 洗滌하였다. 이렇게 하여 얻은 Diazobenzene-sulphonic acid 中에서 0.2g을 0.25N-HCl 溶液에 溶解시켜 50ml로 만든후 冷藏庫에 보관 사용하였다.

#### c. 發色 及 Absorbance 測定

標準溶液 2.5ml를 screw cap test tube (1.5×1 2.5cm)에 注加하고 ice bath內에서 0.4N-HCl 溶液 0.4ml를 加한후 10分間 放置하고 여기에 0.4% -Diazobenzenesulphonic acid 溶液 0.4ml를 加하여 잘 혼든다음 室溫에서 15分間 放置하고 그후 0.33% -KI 溶液과 0.25N-HCl 溶液을 各各 0.4ml씩 加하여 잘 혼든다음 60°~70°C water bath內에서 15分間 熱처리하고 冷却시켜서 0.4N-NaOH 溶液 0.4ml를 加하면 赤色으로 各各 濃度에 따라 差異를 나타내어 着色된다. 이 着色液(70μg/ml)을 1cm-cell에 取하여 Beckman spectrophotometer model DK-2를 使用하여 吸光曲線을 自動作圖하여 maximum absorbance를 決定한 다음 Beckman spectrophotometer model DU를 使用하여 着色된 標準溶液의 各濃度에 對한 Absorbance를 最大吸收 部位(480mμ)에서 測定하여 다음 結果에서와 같은 Capsaicin의 定量標準曲線을 얻었다.

### 2. Paper partition chromatography

- (1) 試料  
위에서 使用한 Capsaicin 標準溶液과 黑赤色油狀 粘稠液
- (2) 濾紙  
Whatman No.1 filter paper 1.75×29cm
- (3) 展開溶媒  
58% Methanol 溶液(S.G. 0.898)
- (4) 展開  
密閉된 Cylinder內에서 前記溶媒로 室溫에서 一

次元 上昇法으로 展開시켰다.

#### (5) 發色

0.4N-NaOH 溶液을 먼저 spray하여 濾紙를 Alkali 性으로 한다음 0.4% -Diazobenzenesulphonic acid 를 spray하던 赤色 spot가 front line에 接하여 나타난다.

### 3. Recovery test

黑赤色 粘稠性 Acetone 抽出物 一定量씩을 濾紙 (Whatman No.1)에 band form으로 spot한 다음 여기에 各各 濃度가 다른 Capsaicin 標準溶液을 spot하여 展開後 抽出 發色시켜서 Beckman spectrophotometer model DU로 그의 Absorbance를 測定하고 計算에 의한 Capsaicin 量과 회수된 量과의 百分率을 求하였다.

### III 고추中의 Capsaicin 定量

試料 10g 程度를 秤量하고 이것을 Soxhlet 抽出 裝置를 使用하며 Ether:Acetone (3:1)의 混合溶媒로 約 25時間 抽出한後 絞압하여서 濃縮하여 約 2ml로 만든後 Acetone을 加하여 精確하게 5ml로 만들었다. 그후 試料의 Capsaicin 含量에 따라 0.01 ml micropipette로 各各 1~4回 spot하여 前記 paper partition chromatography에서와 同一한 方法으로 展開시켰다.

이렇게 하여 얻은 chromatogram을 front line에서부터 約 6~8cm 程度 가위로 잘라낸후 이것을 잘게 (0.5×0.5cm 程度) 잘라서 screw cap test tube에 넣고 85% Methanol 2.5ml를 加한후 30°~35°C water bath에서 때때로 흔들여 주면서 30 分間 Capsaicin을 溶出하고 Absorbance 測定時와 同一한 方法으로 發色시킨후 濾過하여 着色液의 Absorbance를 Beckman spectrophotometer model DU로 測定하고 Capsaicin의 定量標準曲線에 依하여 그의 μg數를 計算하여냈다.

### 結果 및 考察

#### 1. 分離結晶

Schnlte-krüger<sup>(13)</sup>氏와 Suzuki<sup>(14)</sup>氏等은 Capsaicin을 Charcoal column에 吸着시켜서 不純物을 除去하는 方法을 報告하였으나 이 方法은 不純物인 色素, Wax, Fat等이 많은 試料에서는 分離가 완전히 되지않는 결점이 있다. Micko<sup>2</sup>氏의 方法을 改良한 藤田<sup>9)</sup>氏의 方法은 Capsaicin이 Methanol, Ethanol, Acetone, Chloroform, Ether, hot light Petroleum ether等에 잘 溶解되고 물에는 溶解되지 않으나 Alkali에 依하여 水溶性鹽을 形成하므로 이性質을 利用하여 有機溶媒와 Alkila 水溶液間의

partition extraction에 의하여 Capsaicin을分離하는 방법을報告하였다.

本實驗에서는 有機溶媒로 抽出한 Capsaicin을 Sodium hydroxide溶液에 移行시킨후 이것을 Hydrochloric acid로 中和하여 Capsaicin을 遊離시키는 藤田<sup>9)</sup>氏의 方法을 改良하여 中和時 Carbon dioxide로 飽和시키고 이것을 Ether로 回收한후 Petroleum ether로 再結晶시켜서 고추 800g에서 純粹한 Capsaicin結晶 1.4g을 얻었다.

## 2. Paper chromatography에 의한 고추中の Capsaicin分離

純粹한 Capsaicin溶液이나 고추 Acetone抽出物의 paper partition chromatography에 使用되는 展開溶媒로는 alkali 溶液 또는 여러混合 有機溶媒가 있으며 最近 小管氏等은 展開溶媒로서 0.1M-NaOH:0.05M:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1:1)의 混合水溶液을 使用하여 R<sub>f</sub>가 서로 다른 (0.68±0.01 及 0.55±0.01) 2個의 spot를 얻었고 以外에 다른 混合 有機溶媒로서도 各各 R<sub>f</sub>가 다른 2個의 spot를 分離한 報文이 있으나 이들 2個의 辛味成分은 同一한 辛味度를 갖이고 있으므로 Capsaicin 定量時는 spot를 2個로 分離할 必要가 없고 다만 他不純物인 Carotenoid色素, Sterol, Wax, Fatty acid等과 R<sub>f</sub>差가 크게 Capsaicin을 分離시켜야 한다. 이와같은 結果를 얻기 爲하여 여러가지 溶媒를 實驗하여 보았고 또한 filter paper도 여러가지로 coating하여



front line  
capsaicin

original line  
pigments

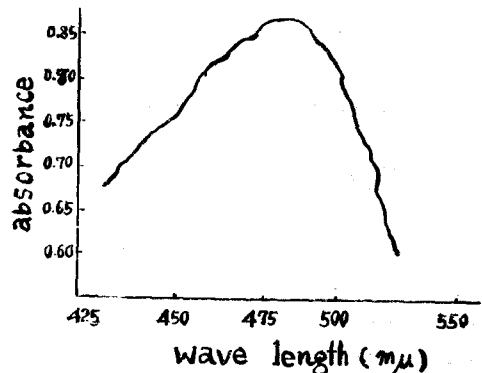
實驗한結果 58% Methanol (S.G. 0.898) 溶液과 Whatman No.1 filter paper로서 가장좋은 結果를 얻었다. 卽 不純物은 original line에 남아 있고 Capsaicin은 front line附近에 上端을 이루고 있는 spot로

第1圖 58% Methanol溶液을 展開劑로 하고 Whatman No.1 filter paper (1.75×29cm)를 使用한 고추 Acetone抽出物의 paper chromatogram.

分離되어 있었으며 (第一圖) original line上部에서 Capsaicin以外的 다른 不純物이나 螢光性物質을 檢出할수 없었다. 이러한 점으로 보아 58% Methanol溶液이 고추有機溶媒抽出物로 부터 Capsaicin을 分離하는데 가장 좋은 展開劑中の 하나로 利用될수있다고 본다.

## 3. Capsaicin의 定量

고추로부터 抽出單離된 Capsaicin을 spectrophotometer로 定量하는 方法으로는 직접 Optical density를 測定하는 Direct Spectrophotometric method<sup>15)</sup>와 酸, Alkali溶液間의 Optical density를 比較測定하는 Spectrophotometric difference method<sup>15)</sup>가 있으나 이 方法은 모두 Capsaicin을 分離할때 완전히 除去되지 않은 微量의 不純物에 依하여 많은 방해를 받고 있으므로 呈色反應을 利用한 Schulte-Krüger<sup>13)</sup> 方法을 改良하여 Diazobenzenesulphonic acid에 依하여 發色된 發色液을 熱처리하고 pH를 11~12로한다음 그의 Absorbance를 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.



第2圖 Spectrophotometer model DK-2에 의한 Capsaicin 着色液의 吸光曲線

卽 Diazobenzenesulphonic acid에 依한 Capsaicin 差色液의 吸光曲線을 70μg/ml의 濃度에서 1cm-cell로 Beckman spectrophotometer model DK-2를 使用하여 Absorbance를 測定한 結果 다음 第2圖와 같이 wave length 480mμ에서 最大吸收部位를 나타냄을 알았다.

이 最大吸收部位 (480 mμ)에서 Beckman spectrophotometer model DU를 使用하여 各 濃度의

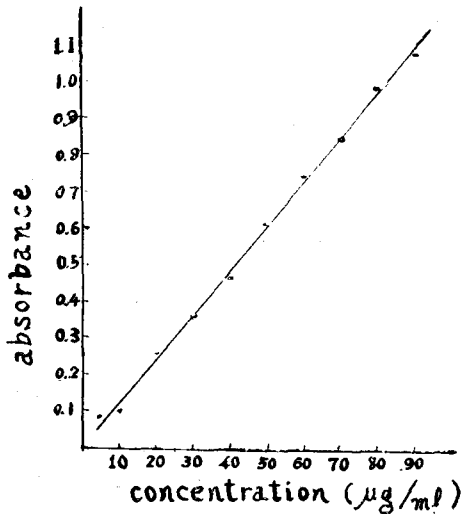
Capsaicin 量과 着色液의 Absorbance와의 關係는 第1表와 같이 Capsaicin 量과 着色液의 Absorbance

와는 正比例하여 Beer-Lambert Law가 適用됨을 알수있었다.

第1表 480 m $\mu$ 에서 Capsaicin 量과 着色液의 Absorbance와의 關係

Capsaicin 量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Absorbance	0,056	0,103	0,243	0,355	0,472	0,603	0,735	0,850	0,980	1.08
計 算 值*	0,046	0,108	0,231	0,355	0,489	0,602	0,726	0,850	0,974	1.10

\* 30 $\mu\text{g/ml}$  와 70 $\mu\text{g/ml}$ 을 基準으로한 直線의 方程式으로 부터 計算할것



第3圖 Diazo benzenesulphonic acid - Capsaicin 着色液의 定量 標準 曲線

이것을 圖示하여 第3圖를 얻었으며 30 $\mu\text{g/ml}$ 와 70 $\mu\text{g/ml}$ 를 基準으로 하는直線의 方程式은 다음과 같다.

$$r = 80,808E + 1,31316 \text{ 또는 } E = 0,012375r - 0.01625$$

여기서 r : Capsaicin의  $\mu\text{g/ml}$   
E : Absorbance

그런데 第1表와 第3圖에 있어서 Capsaicin의 濃度가 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下에서는 Beer-Lambert Law가 適用되지 않고 오히려 計算值보다 測定值가 컸으며 80 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서는 測定誤差가 커서 곤란하였다.

Diazobenzenesulphonic acid-Capsaicin 着色의 安定度는 열처리를 하고 pH를 11~12로 하였을때 室溫에서 發色후 2時間까지는 거의 變化가 없었고 2時間以上 5時間사이에 Spectrophotometer model DU에 의한 Absorbance의 變化가 +0.002~+0.005였다.

本定量法에 의한 Capsaicin의 recovery test結果

는 第2表와 같이 98% 前後의 回收率을 나타내고 있다.

第2表 Capsaicin의 recovery test

고추 Acetone 抽出物의 量 (ml)	純粹 Capsaicin의 添加量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	全合計量의 測定量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	回收率 (%)
0.02	0	32,7685	
0.02	10	41,7853	97,701
0.02	20	51,8181	98,198
0.02	30	61,2231	97,550
0.02	40	71,6161	98,416

各品種의 고추中の Capsaicin 含量은 上記直線의 方程式에서 計算하고 여기에 回收率 98%를 加算하여 다음 第3表와 같은 結果를 얻었다.

第3表 品種別 고추中の Capsaicin 含量 (風乾後 種子除去)

品 種 名	水 分 (%)	風乾高추中の Capsaicin 量 (%)	乾量에 對한 百分率 (%)
泰國產中型 (小)	13.88	0,338	0,3925
泰國產中型 (大)	13.45	0,2336	0,2699
Ronge long oretinaire	14.80	0,3083	0,3619
배 一 망	13.90	0,1713	0,1989
胡 高  추 (小型)	13,05	0,3833	0,4408
은 평 고 추	12,89	0,2346	0,2694
錦 山 高  추	14,52	0,1812	0,212
慶山在來 (2520)	16.70	0,249	0,299
固城在來 (342)	12.39	0,2228	0,2543
書洞在來 (2640)	13.58	0,2738	0,3168
園藝試驗場29號 <sup>(1)</sup>	13.92	0,292	0,3392
園藝試驗場48號 <sup>(2)</sup>	12.19	0,2593	0,2954

- (1) 泰國種 (大型)  
 (2) 園藝試驗場 342號× Hungarian F. wox.

### 要 約

1. 藤田<sup>9</sup>氏의 Ether-alkali partition extraction法을 改良하여 Capsaicin을 純粹하게 分離하여 定量標準曲線을 얻었다.
2. Soxhlet裝置를 使用하여 Ether-Acetone (3:1)混合溶媒로 Capsaicin을 抽出한後 58% Methanol을 展開劑로 하는 paper partition chromatography에 依하여 不純物로 부터 Capsaicin을 純粹하게 分離하였다.
3. Diazobenzenesulphonic acid를 發色劑로 使用하는 Schulte-Krüger 變法에 若干 改良을 加하여 各品種別 高추中의 Capsaicin 含量을 測定하였다.

### 參 考 文 獻

- (1) Thresh: Pharm. J. Trans. (3), 7, 21, 259, 473(1876.77).
- (2) Micko: Z. Nahr. Genussm., 1, 818(1898); 2, 411(1899).
- (3) Nelson, E. K.: J. Ind. Eng. Chem., 2, 419(1910)
- (4) Nelson, E. K.: J. Am. Chem. Soc., 41, 1115(1919).; 42, 597(1920).; 45, 2179

- (1923).
- (5) Dodge, F. D.: Drug Cosmet. Ind., 49, 516(1941).
  - (6) Crombie, L., Dandegaonker, S. H., Simpson, K. B.: J. Chem. Soc., 1025(1955).
  - (7) 小管貞良, 稻垣幸男; 日農化學會誌, 32, 572(1958); 32, 720(1958); 33, 470(1959)
  - (8) Schulte, K. E., Krüger, H. M.: Arch. Pharm. Berlin, 27, 202(1957).
  - (9) 藤田路一, 古谷力, 川名明; 日藥學會誌, 74, 766(1954).
  - (10) Wasicky, R., Klein, F.: Festschr. für A. Tschirch., 357(1926).
  - (11) Forder, K. V.: Z. Untersuch. Lebensm.; 61, 94(1931).
  - (12) Follin and Denis: J. Biol. Chem., 12, 239 (1912).
  - (13) Schulte, K. E., Krüger, H. M.: Z. Anal. Chem., 147, 266(1955).
  - (14) Suzuki, J. I., Tausig, F., Morse, R. E.: Food Tech., 11, 100(1957).
  - (15) The Analyst, 84, 603(1959).
  - (16) 高東成: “고추辛味成分에 關한 研究”(서울大 大學院 化學科 碩士學位論文); (1960)