

기체크로마토그래피에 의한 캡사이신, 디하이드로캡사이신 및 노니바마이드(PAVA)의 정량

김상수¹, 윤중수^{2*}

¹총포화확안전기술협회, ²경동대학교 임상병리과

Determination of Capsaicin, Dihydrocapsaicin and Nonivamide by Gas Chromatography

Sang-Soo Kim¹, Joong-Soo Yoon^{2*}

¹Guns & Explosive Safty Technology Association,

²Department of Medical Laboratory Science, Kyungdong University

요약 호신용 스프레이의 자극성 액체에 포함된 capsaicin, dihydrocapsaicin 및 nonivamide의 함량을 기체 크로마토그래피로 정량하는 방법에 대해 연구하였다. Capsaicin과 거의 동등한 수준의 매운맛을 내는 nonivamide는 천연물 내에도 극히 소량 존재하므로 합성된 nonivamide를 합성 캡사이신(Synthetic capsaicinoid) 또는 PAVA(Pelargonic Acid Vanillyl Amide)라고 부르며 식품 향미 재료나 폭동진압용 무능화 작용제로 이용되어왔다. 호신용품이 난립하는 요즘 각종 불법 호신용 스프레이의 품질관리가 제대로 이행되지 않는 사례가 종종 발견되고 있다. 따라서 기체크로마토그래피로 합성 캡사이신이 포함된 제품이 천연 유래인 것처럼 도용되거나 허용농도를 준수하는 지를 판별할 수 있는 간단한 분석방법을 개발하고자 하였다. 마지막으로 분석방법이 확립되면 시판되는 호신용 스프레이 내에 존재하는 자극성 액체의 성분과 함량 조사에 응용하여 보았다.

Abstract Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin and nonivamide in pungent liquids of self-defense spray were studied. The nonivamide having almost same spicy taste with capsaicin have been containing a few amounts in natural products, it had called as synthetic capsaicin or PAVA, have used to flavorings for foodstuffs and incapacitating agents of riot controls. Nowadays, it has been occasionally found that the quality controls of a self-defense sprays were not properly due to flood of illegal self-defense sprays. Thus, the simple analytical method with gas chromatography is developed, it is identified whether the products which have contained synthetic capsaicin were marked like natural materials as well as the pungent ingredients in it obeyed with permissible concentration to human or not was investigated. Finally, the pungent components and amounts in some kinds of self-defense spray were investigated.

Key Words Capsaicin, Dihydrocapsaicin, Gas Chromatography, Nonivamide, PAVA

1. 서론

capsaicin이 인체의 내장통증 전달 신경세포 섬유질의 활동을 제어하는 생물학적 기능을 가지며[1], 이 성분이 포함된 국부 통증 완화제를 의사의 처방 없이 구매할 수 있다는 장점 때문에 많은 각광을 받고 있다. 최근까지도 향신료, 의

약품, 살균 및 살충제 및 인체에 치명적이지 않은 일시적 무능화 작용제로서의 활용 등 그 용도가 무한하기 때문에 전 세계적으로 capsaicin이 다량 포함된 고추 품종의 개발에 열을 올리고 있다[2]. 보통 매운맛을 갖는 capsaicin 및 capsaicin 유도체들을 통칭해서 capsaicinoid라 하는데 거의 대부분 가지과 고추 속 식물들로부터

*Corresponding Author : Joong-Soo Yoon(Kyungdong Univ.)

Tel: +82-33-738-1371 email: yjs101025@kduniv.ac.kr

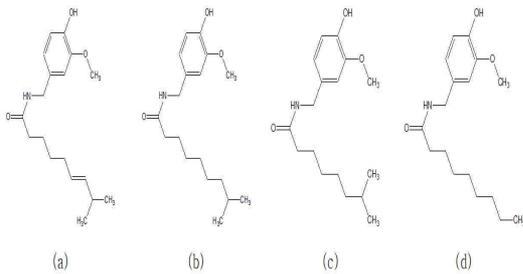
Received Mar 25, 2021

Revised April 29, 2021

Accepted May 14, 2021

터 추출된 것으로 지금까지 총 11가지 종류가 알려져 있지만 매운맛을 내는 주성분은 capsaicin과 dihydrocapsaicin 및 nordihydrocapsaicin의 3종류이며, 이 3가지 성분이 전체 capsaicinoid의 약 90% 이상을 차지한다[3].

Capsaicin유도체들 중에서 처음으로 합성된 nonivamide는 매운맛의 강도가 순수한 capsaicin과 거의 같지만 지금까지는 천연물에 존재하지 않는다고 알려져 있었으나 habanero, anaheim, red-chilli, green-chilli 및 green-bell chilli 고추 등과 같이 일반 고추보다 더 매운 품종에서 극미량 검출됨으로써 자연적으로도 존재한다는 사실이 알려지게 되었다[4]. 그러나 포함된 양이 너무 극소량이어서 다양한 활용에 응용하기에는 곤란한 점이 많았다.



[Fig. 1] The structures of capsaicin(CAP; a), dihydrocapsaicin(DHC; b), nordihydrocapsaicin(NDC; c) and N-vanillyl nonanamide(nonivamide; d)
 [그림 1]. 캡사이신(CAP; a), 디하이드로캡사이신(DHC; b), 노르디하이드로캡사이신(NDC; c) 및 N-바닐릴노난아미드(노니바미드; d)의 구조

그러나 미국에서 처음으로 capsaicin을 이용한 호신 및 치안 용품 제조와 유통판매가 가능해지면서 수요가 급증한 까닭에 고가의 capsaicin을 대체할 수 있는 저가의 매운맛을 내는 물질을 개발하려는 노력이 많아졌다[5].

전술한 바와 같이, 천연 capsaicinoid에는 11가지 종류의 capsaicin 동족체들이 존재하지만 천연물질 내에 nonivamide는 극미량 존재하므로 순수한 상태로 분리하기 어려워 가격이 매우 비싼 문제가 있었으나 인공적으로 합성된 nonivamide인 PAVA는 불순물이 거의 없고,

100% nonivamide 만이 존재하여 고순도 정제를 해야 하는 번거로움이 없을 뿐만 아니라 상대적으로 가격이 저렴하므로 천연 capsaicin 대체물질로 충분히 사용할 수 있다.

현재 유럽과 미국에서는 PAVA를 10 mg/L까지 식품 향미료로 사용하도록 허용하고 있기 때문에 국내에서도 이를 이용한 식품 향미료 사용의 가능성이 있다[6]. 국민건강증진과 국민의 먹거리 수준을 높이기 위해 관련 법규정이 새롭게 제정되거나 강화되고는 있으나 허용량보다 과량으로 식품 첨가물로 이용할 가능성은 항상 존재하며 또 호신용품의 치한 퇴치 효과를 높이기 위해 합성 capsaicin(nonivamide 또는 PAVA)와 유기용매를 인체허용농도 이상 사용할 가능성도 있다. 그러나 몇 가지 발표된 연구결과, capsaicin을 사용한 무능화 작용제가 인체에 유해한 영향을 줄 가능성이 있음을 알리는 연구결과가 다수 발표되었을 뿐만 아니라 이를 이용한 시위 진압용 약품으로 활용되었다는 의혹이 생기고 있음을 생각할 때 신속히 이에 대한 품질관리 대책과 관련한 분석법 검토가 시급한 실정이다. 지금까지 capsaicin 및 그 유도체에 대한 정량은 대부분 액체크로마토그래피 및 액체크로마토그래피-질량분석기를 통해 이루어져 왔으나 보편화된 장비가 아니어서 쉽게 분석적 응용이 이루어지지 못했다[7-8].

따라서 본 연구에서는 천연물로부터 추출한 capsaicin 혼합물(capsaicin과 dihydrocapsaicin 혼합물)과 pelargonic acid vanillylamide(PAVA)라는 이름으로 알려진 nonivamide를 기체크로마토그래피를 이용하여 확인하는 방법에 대해 고찰하고자 한다.

2. 연구방법

2.1 시약

실험과정에서 사용한 물은 1차 증류수를 Barnstead NANO pure ultrapure water system으로 거른 탈염수를 사용하였다.

표준시약 oleoresin capsicum(capsaicin과

dihydrocapsaicin의 함량비는 65 % : 35 %)은 Fluka사의 시약급을 사용하였고, 순도 97%이상의 pelargonic acid vanillylamide(PAVA, nonivamide)는 Sigma사(St. Louis, MO) 시약급을 사용하였다. ethanol은 일본 Junsei사의 특급 시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

제안된 실험방법에 대한 응용 시료인 호신용 스프레이 자극성 액체는 온라인 판매점에서 구매한 호신용 스프레이 3종류에서 채취한 것을 사용하였다.

2.2 기기

기체크로마토그래프-질량분석기는 미국 Perkin-elmer사(모델 Clarus600, USA)이며, 기기 측정조건은 [Table 1]과 같다. 시료의 pH 측정은 Metrohm사의 유리 전극이 장착된 미국 Metrohm사, 모델 826 pH 미터를 사용하였다. 시료는 화학 저울(미국 OHAUS사, 모델 AR2140)을 사용하여 채취하였다.

[Table 1] Instrumental conditions of gas chromatography
 [표 1] 기체크로마토그래피의 기기조건

Gas Chromatography	
Inlet temperature	350°C
Injection volume	1 µL
Split ratio	1/20
Carrier gas/flow rate	He / 1.5 mL/min
Column	Elite-1
Oven temperature program	Initial temp. : 150°C for 1 min
	Ramp time : 10°C/min to 250°C
	Hold time : 9 min
Run time	20 min

2.3 Capsaicin 표준용액의 제조

Capsaicin 표준물을 이용하여 순차적으로 희석시켜 표준용액을 제조하였다. 즉, Capsaicin 표준물 0.0082g을 정확히 달아 에탄올로 희석하

여 최종 용액의 질량을 8,034g로 만들어 Capsaicin 0.102%(m/m) 용액(표준용액 4)을 제조하였다. 다시 Capsaicin 0.102%용액 일정량을 취하고 에탄올로 희석하여 Capsaicin 0.062%용액(표준용액 3)을 제조하였고, 이를 다시 일정량 취하여 에탄올로 다시 희석하여 Capsaicin 0.0408% 용액(표준용액 2)과 0.0104% 용액(표준용액 1)을 제조하여 Capsaicin 검정 곡선 작성에 이용하였다.

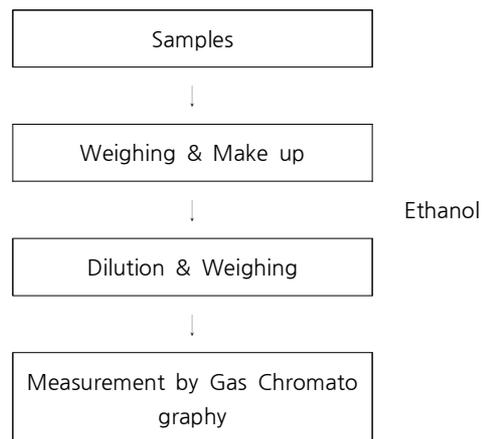
2.4 Pelargonic acid vanillylamide(PAVA, nonivamide) 표준용액의 제조

Capsaicin 표준용액 제조방법과 같게 PAVA 0.0012g을 정확히 달아 에탄올로 희석하여 최종 용액의 질량을 1.4775g으로 만들어 PAVA 0.081%(m/m) 용액을 제조하였고 이를 순차적으로 희석하여 0.060, 0.040 및 0.021% 용액을 제조하여 PAVA 검정 곡선 작성에 이용하였다.

2.5 시료 용액의 제조

3가지 종류의 호신용 스프레이에 내장된 자극성 액체를 0.5g 정도를 정확히 취하고, 에탄올을 첨가하여 희석시켜 일정 질량을 갖는 최종 시료 용액을 제조하였다.

이상의 실험과정을 [Fig. 2]에 간략하게 나타내었다.

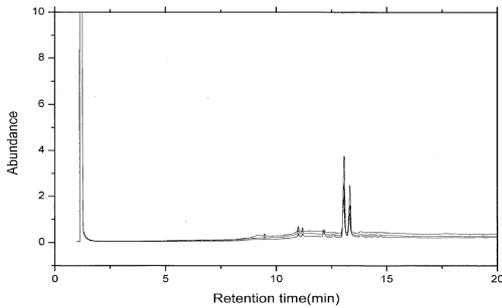


[Fig. 2] Experimental procedure
 [그림 2]. 실험절차

3. 결론

3.1 Capsaicin, Dihydrocapsaicin 및 Nonivamide의 크로마토그램

분석시료에 포함된 capsaicin, dihydrocapsaicin 및 nonivamide를 분석하기 위해서는 반드시 분석하고자 하는 물질의 크로마토그램에서 서로의 피크가 겹치지 않아야 한다. 이를 위해 capsaicin과 dihydrocapsaicin이 혼합된 표준물질로부터 이를 적당한 농도로 에탄올에 희석하여 만들 표준용액을 [Table 1]에 제시된 조건으로 분석하였다[Fig. 3].



[Fig. 3] The chromatograms of capsaicin standard solution

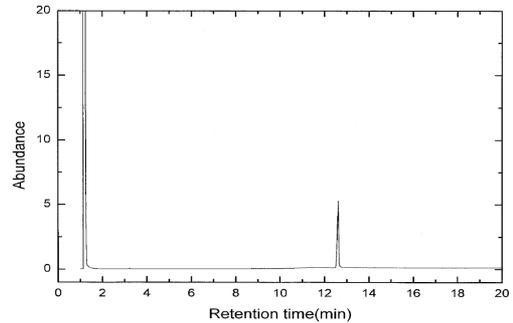
[그림 3]. 캡사이신 표준용액의 크로마토그램

[Figure. 3]에서 보듯이, capsaicin과 dihydrocapsaicin은 각각 머무름 시간이 13.04분과 13.3분에 특징적인 피크를 나타내었다.

이미 이전 연구에서 밝힌 바처럼[9], capsaicin과 dihydrocapsaicin은 매운맛을 내는 물질로서 전체 capsaicinoid에서 ~90% 이상을 차지하며 dihydrocapsaicin이 capsaicin보다 항상 나중에 피크가 출현한다고 알려져 있는 것과 같은 크로마토그램을 얻었다.

물론 본 연구의 목적처럼 천연물에는 미량 존재하고, 합성이 가능한 nonivamide가 어느 정도의 머무름 시간에서 출현할지 모르며, 만일 capsaicin이나 dihydrocapsaicin과 같은 머무름 시간을 갖는다면 nonivamide의 분석이 불가능할 것이다. 따라서 nonivamide를 0.0012g을 정확히 취하여 에탄올로 희석하여 최종 용액 질량을 2.000g으로 만들어 용액의 농도를 0.060%로

제조하여 이 용액 1 μ l를 기체크로마토그래피에 주입하여 이에 대한 크로마토그램을 얻어 보았다[Fig. 4].

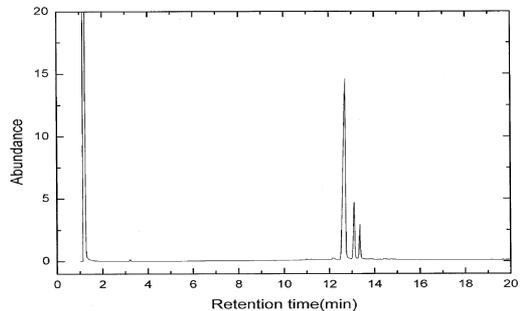


[Fig. 4] The chromatogram of nonivamide standard solution

[그림 4]. 노니바미드 표준용액의 크로마토그램

[Fig. 4]에서 보듯이, nonivamide는 머무름 시간이 12.6분에서 특징적인 피크가 관찰되었고, 합성한 물질답게 그 이외의 머무름 시간에서는 어떠한 peak도 관찰되지 않았다.

또한 [Fig. 4]의 크로마토그램으로는 다행히 capsaicin이나 dihydrocapsaicin의 머무름 시간과 겹치는 일은 발생하지 않는다고 했지만 이를 확인하기 위해 nonivamide 표준용액에 일정량의 Capsaicin용액을 가하여 만든 인공 시료 용액을 만들어 이를 기체크로마토그래피에 주입하여 혼합용액의 크로마토그램을 얻었고, 이로부터 capsaicin 및 dihydrocapsaicin과 nonivamide와 확실히 retention time이 겹치지 않는다는 것을 확인해보았다[Fig. 5].



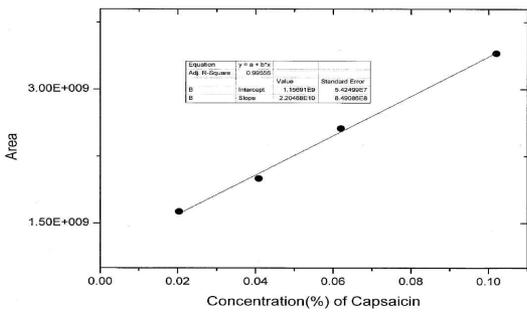
[Fig. 5] The chromatogram of sample solution that was added with nonivamide

[그림 5]. 노니바미드를 첨가한 시료용액의 크로마토그램

[Fig. 5]에서 보듯이, Capsaicin이 포함된 시료에 인공적으로 합성한 PAVA가 포함된 경우 이들의 peak가 서로 겹쳐서 서로의 정량과정에서 방해할 하지 않음을 알 수 있었다.

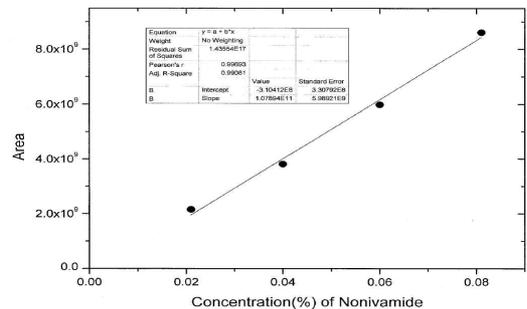
3.2 미지시료 분석을 위한 검정곡선의 작성

미지시료에 포함된 capsaicin, dihydrocapsaicin 및 nonivamide를 분석하기 위해서 실험방법에서 언급된 방법으로 제조한 Capsaicin 표준용액을 기체크로마토그래피에 주입하여 얻은 peak 면적으로부터 검정 곡선을 작성해보았다[Fig. 6].



[Fig. 6] Calibration curve of capsaicin
 [그림 6]. 캡사이신의 검정곡선

얻어진 검정 곡선은 회귀율(r)이 0.99556으로 직선성이 좋았다. 실험방법에서 언급했듯이 0.081% nonivamide 표준용액을 순차적으로 희석시켜 검정 곡선용 표준용액을 만들고, 이를 기체크로마토그래피에 주입하여 얻어진 피크 면적으로 검정 곡선을 작성하였다[Fig. 7].



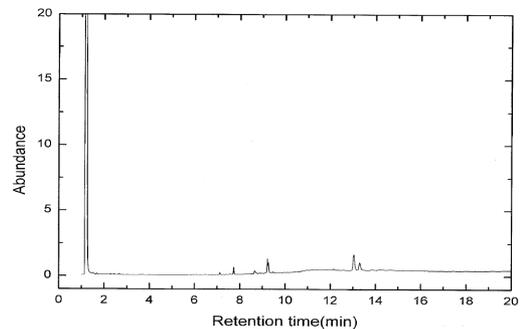
[Fig. 7] Calibration curve of nonivamide
 [그림 7]. 노니바미드의 검정곡선

기체크로마토그래피로부터 얻어진 nonivamide 크로마토그램의 피크 면적으로 작

성된 검정 곡선의 회귀율은 0.99081로 나타나 비교적 직선성도 우수하여 실제 시료에 포함된 nonivamide가 검토한 농도 영역이라면 충분히 검출하여 분석할 수 있을 정도라 판단되었다.

3.3 분석결과

얻어진 최적의 실험조건을 바탕으로 3가지 호신용 스프레이에 내장된 자극성 액체를 적당한 양을 취하여 에탄올에 희석하여 최종 미지시료 용액을 제조하였고, 이 용액 1μl를 취하여 기체크로마토그래피에 주입하여 미지시료에 포함된 자극성 성분의 종류와 함량을 결정하였다 [Table 2]. 분석 결과 3가지 미지시료에서는 모두 capsaicin만 검출되었고, PAVA(nonivamide) 성분은 검출되지 않았다[Fig. 8].



[Fig. 8] The chromatogram of sample solution
 [그림 8]. 시료용액의 크로마토그램

한편, 실험의 정확성을 판단하기 위해 표준물을 첨가하여 회수율을 검토했었다.

[Table 2] Analytical results

[표 2] 분석결과

Samp les	Detect ed Conc. (%)	Average (%)	Reduced amounts (mg)	Add ing amounts (mg)	Reco vered (mg)	Average (mg)	Reco veries (%)	RSD
S1	0.0119	0.0118	0.944	2.00	1.912	1.910	95.5	0.10
	1.911							
	1.908							
S2	0.0223	0.0224	1.800	2.00	1.937	1.940	97.0	0.30
	1.943							
	1.941							
S3	0.0123	0.0125	1.004	2.00	1.930	1.933	96.7	0.30
	1.932							
	1.938							

*RSD : Relative standard deviation

회수율을 검토한 결과 모두 95%이상의 회수율을 얻을 수 있어 비교적 정확한 결과를 얻을 수 있었고, 같은 농도의 시료를 3회 측정하여 얻은 상대 표준편차를 구한 결과 모두 1%이내의 재현성 있는 결과를 얻을 수 있었다. 이로서 기체 크로마토그래피를 이용하여 시료에 극미량 존재하는 capsaicin, dihydrocapsaicin을 정량할 수 있었고, 합성 캡사이신인 nonivamide 역시 정량할 수 있을 것으로 기대된다.

기존의 고가의 장비를 사용하지 않고도 보편화된 기체크로마토그래피를 이용하여 시료 중 미량 존재하는 capsaicin, dihydrocapsaicin 및 합성 캡사이신인 nonivamide를 정량할 수 있는 방법을 검토해 보았다. 검정 곡선의 직선 회귀율은 0.99 이상이어서 실제 분석에 이용할 수 있었고, 검토된 최적 조건을 바탕으로 호신용 스프레이에 충전된 자극성 액체를 분석한 결과 모두 capsaicin이 주원료였으며, 실제 시료를 이용하여 얻어진 회수율은 95%이상이었으며, 이때 상대 표준편차는 모두 1%이하로 미량분석에 충분히 적용할 수 있는 정도였다.

ess, elsevier, pp.131-150, 2015.

- [6] FDA(U.S. Food and Drug Administration). 2006. *EAFUS: A Food Additive Database*. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/earus.html>.
- [7] H-M Ham, M-S Sung, Y-H Kim, Y-M Choi, H-S Jeong and J-S Lee, 'Determination of Capsaicinoids in Selected Commercial Pepper Powders and Pepper-Containing Products Using HPLC and Method Validation', *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.41, No.6, pp.870-874, 2012.
- [8] C. Reilly, D. Crouc, G. Yost and A. Fatah, 'Determination of Capsaicin, Dihydrocapsaicin, and Nonivamide in Self-Defense Weapons by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry', *Journal of Chromatography A*, Vol.912, No.2, pp.259-267, 2001.
- [9] S-S Kim and J-M Choi, 'Determination of allyl isothiocyanate, capsaicin and dihydrocapsaicin in pungent liquid samples', *Analytical Science and Technology*, Vol.26, No.1, pp.73-79, 2013.

References

- [1] J-K Min, K-Y Han, E-C Kim, Y-M Kim, S-W Lee, O-H Kim, K-W Kim, Y-S Gho and Y-G Kwon, 'Capsaicin Inhibits in Vitro and in Vivo Angiogenesis', *Cancer Research*, Vol.64, No.2, pp.644-651, 2004.
- [2] G. Boyhan, C. McGregor, S. Connell, J. Biang and D. Berle, 'A Comparison of 13 Sweet Pepper Varieties under an Organic Farming System', *Hort Technology*, Vol.30, No.1, pp.135-143, 2019.
- [3] H. Constant, G. Cordell and D West, 'Nonivamide, a Constituent of Capsicum oleoresin', *Journal of Natural Products*, Vol.59, No.4, pp.425-426, 1996.
- [4] Wismer T. 'Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents', Second Edition, pp.791-807, 2015.
- [5] R. Gupta, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*, Academic pr