Kor. J. Food Hygiene 5 (4), 213-218 (1990)

고속액체 크로마토그래피에 의한 커피, 홍차, 녹차중의 카페인 정량에 관한 연구

권익부 · 이윤수 · 우상규 · 이충영 · 서준걸
롯데그룹 중앙연구소

A Study on the Determination of Caffeine in Coffee, Black Tea and Green Tea by High Performance Liquid Chromatography

Ik-Boo Kwon, Yoon-Su Lee, Sang-Kyu Woo, Chung-Young Lee and Jun-Girl Suh
Lotte Group R & D Center, 23, 4-Ka, Yangpyong-dong, Youngdeungpo-ku, Seoul, Korea

ABSTRACT-A simple and practical method for the determination of caffeine in coffee, black tea and green tea was studied. The analysis of caffeine was performed by reverse phase high perfomance liquid chromatography using a μ-Bondapak C18 column at isocratic condition with methanol-acetic acid-water (20: 1: 79) on UV detector at 280 nm. The extraction and clean-up of caffeine in sample is based on combing a simple pretreatment with the use of a Sep-Pak Alumina A cartridge. The average recoveries of caffeine from several samples were 95.2 ~ 101.3%, the relative standard deviation for the whole procedure was 0.10 ~ 0.62%, and the detection limit of caffeine in sample solution was about 0.1 μg per m*l*.

Keywords□Caffeine, coffee, black tea, green tea, Sep-Pak cartridge, high performance liquid chromatography

카페인은 중추신경계와 말초신경계를 자극하는 작용을 가지고 있으며 카페인이 함유된 음료를 적당량 섭취할 경우 신경활동이 활발해지고, 피로가 경감되는 효과가 있다. 그러나 과잉량을 섭취하게 되면 신경과민, 흥분, 불면을 유발할 수 있으며 특히 신장질환이나 위궤양 환자에게 나쁜 영향을 준다. 임신중에 있는 여성이 카페인을 섭취할 경우 카페인이 태반을 통해 쉽게 전달되고 혈액으로 부터 모유로 쉽게 이행되므로 임신 주변기에 있는 여성에게는 카페인이 함유된 음료와 식품의 섭취를 경고하고 있다.[1,2] 신생아의 경우에는 섭취된 카페인의 대사가 매우 늦어, 성인이 2-6시간에 카페인이 대사 분해되는 반면 4 일 가량 지나야 분해된다.[3] 따라서 적은 양의 카페인이라도 반복해서 섭취하게 되면 신생아의 혈액중에 축적되게된다. 그러므로 태아나 신생아에게 가능한 나쁜영향을 주지않게 하기위해서는 임신주변기에 있는 여성이 카페인이 함유된 식품이나 음료, 약제의 섭취를 가능한한 제한해야 한다. 그중에서도 커피, 홍차, 녹차는 널리 애용되는 기호음료로서 다량의 카페인이 함유되어 있다. 따라서 이와같은 기호 음료중의 카페인 함량을 신속하고 정확하게 분석하는 방법이 중요하다.

카페인의 정량법은 전위차적정법,[4] 흡광도법,[5,6]

Received for Publication 22 November, 1990
Reprint request; Dr. I.B. Kwon at the above address

Table 1. HPLC conditions for determination of caffeine

Column	μ-Bondapak C18 (3.9 mm × 150 mm)
Mobile phase	Methanol: Acetic acid: Water (20: 1: 79)
Flow rate	1.2 ml/min (1500 psi)
Column Temp.	Ambient
Detector	280 nm, 0.5AUFS
Injection vol.	10μl

가스 크로마토그래피법,[6,7] 이 보고되었다. 그러나 이와같은 방법들은 시료중의 카페인을 분리 추출하는 전처리 방법이 비교적 어렵고 장시간이 소요되며, 다수의 시료를 신속하게 처리하는 데는 부적합한 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 HPLC를 이용하여 시판 차 및 음료중의 카페인을 분석할 경우 최적의 전처리 방법을 검토하고 각종시료중의 카페인함량을 신속하고 정확하게 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

재료－시료는 콜롬비아 및 브라질산 원두커피였으며 커피음료, 홍차 및 드링크류는 시판되고 있는 제품을 그대로 사용하였다. 녹차는 보성, 영암, 장성에서 재배, 건조한 것을 사용하였다.

시약－카페인 표준품을 Sigma제를 사용하였으며 메타놀 및 증류수는 HPLC용 특급시액, 초산은 Aldrich제 특급시액이었다. 혼합된 이동상 용액은 0.45 μm membrane filter로 여과하고 초음파 진동기로 약 30분간 진동시켜 용존가스를 제거하여 사용하였다. 또한 추출물의 정제를 위하여 Waters제 Sep-Pak alumina A, B, N, silica, florisil 및 C18 추출 카트리지를 사용하였다.

기기장치 및 분석조건－본 실험에서 사용한 고속액체크로마토그래피는 Waters제 로서 M-510 Solvent Delivery System, M-U6K Injector, M-490 Programmable Multiwavelength Detector, M-740 Data Module로 구성하였다. 또한 HPLC분석 조건은 Table 1과 같으며 이 조건은 사전 시험을 통하여 적합함을 확인하였다.

시험용액의 조제－실제 음용상태로 기호음료중의 카페인 함량을 분석하기위해 분쇄한 커피 원두 10 g을 약 100℃의 물120 ml에 사이폰식으로 침출 시켰으며, 홍차는 2 g을 약 100℃의 물 120 ml에 2분간 침출시키고, 녹차의 경우는 6 g을 80℃의 물 170 ml에 2분간 침출시켰다.[17] 인스탄트커피는 8 g을 100℃의 물 100 ml에 용해하여 식힌 후 시료용액으로 하였으며 커피음료 및 콜라는 시판품을 그대로 시료용액으로 하였다. 이와같이 조제된 시료 추출용액은 Sep-Pak cartridge에 5 ml씩 통과시키고 HPLC이동상 용매 15 ml로 용출하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC에 주입하였다.

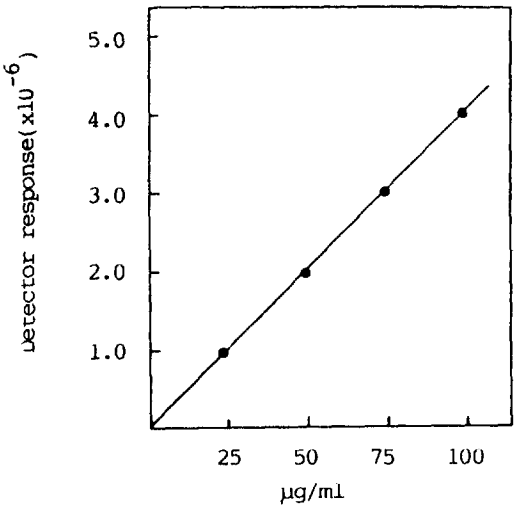

Fig. 1. Calibration curve of caffeine.

결과 및 고찰

검량선 작성 및 검출한계－0.1～100 μg/ml농도로 카페인 표준용액을 제조하고 Table 1의 분석조건에서 일정량씩 HPLC에 주입하여 얻어진 피이크의 검출감도로 부터 검량선을 작성하였다. 그 결과는 Fig. 1과 같이 원점을 통과하는 직선성을 얻었다. 또한 검출한계는 0.1 μg/ml이었다.

카페인의 추출 및 전처리－본 연구에서는 각종 기호음료중의 방해 성분을 제거하고 카페인을 효과적으로 추출하기 위해 Sep-Pak 카트리지를 이용한 추출법을 검토하였다.

커피가 들어있는 캔음료의 경우에는 유지방, 식물성지방, 단백질이 포함되어 있으므로 이들의 영

Table 2. Recoveries of added caffeine in regular coffee by treatment with Sep-Pak cartridges

Cartridge	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	RSD (%)
C18	0	50.18		
	10	59.17	89.93	1.12
Alumina, A	0	51.44		
	10	61.47	100.34	0.15
Alumina, B	0	51.16		
	10	61.71	105.49	0.58
Alumina, N	0	51.21		
	10	61.00	97.88	0.17
Silica	0	54.17		
	10	64.92	107.52	1.04
Florisil	0	6.52		
	10	7.29	7.70	2.79

Average of five trials

향을 없애기 위해 지방과 단백질을 isopropanol에 의해 침전으로 제거한[18] 후 Sep-Pak카트리지로 통과시켰다. Sep-Pak카트리지는 특정 성분은 통과시키고 그외에 것을 흡착하거나 혹은 특정성분만을 카트리지에 머무르게 할 수 있다. 액체-고체 추출법에 사용된 Sep-Pak 카트리지에 따른 카페인의 회수율과 재현성을 보기위해 일정량의 시료에 카페인 표준용액을 일정량씩 가한후 각 시료를 여러가지 Sep-Pak 카트리지로 통과시켜 용출된 시료를 HPLC로 분석한 결과는 Table 2와 같고 용리곡선은 Fig. 2와 같다. 여러가지 카트리지에 통과하여 용리된 커피시료 용액을 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 3이다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 alumina A, B, N의 경우가 효과적으로 방해물질을 제거할 수 있는 것으로 나타났다. 또한 Table 2로 부터 alumina A의 경우가 B, N에 비해 카페인의 추출율이 높고 회수율과 재현성도 양호하였다. Sep-Pak alumina A 카트리지에 의한 카페인의 용리는 15 ml의 methanol-acetic acid-water(20 : 1 : 79)의 용리액으로 완전히 용출되었다.

功刀등[13]은 Estrelut open column으로 추출시료를 정제하여 기호음료 중의 카페인을 정량하였는데, 그들이 사용한 open column정제법에 비해 특별한 준비 조작이 필요없이 간단한 조작만으로 추출물의 정제를 할 수 있어 시료의 전처리 시간이 절약되며

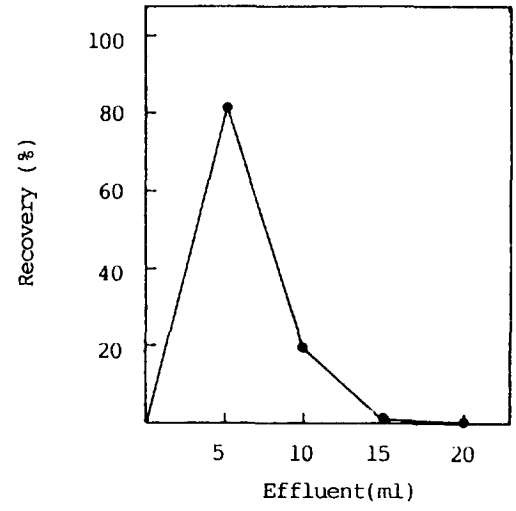

Fig. 2. Elution curve of caffeine from Sep-Pak alumina A cartridge.

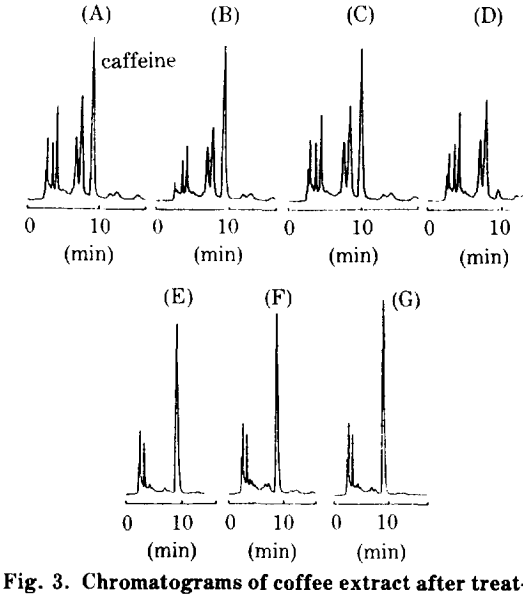

Fig. 3. Chromatograms of coffee extract after treatment with Sep-Pak cartridges.
(A) before treatment, (B) C18, (C) silica, (D) florisil, (E) alumina A, (F) alumina B, (G) alumina N.

다수의 시료를 동시에 처리할 수 있는 잇점이 있다. 또한 HPLC컬럼에 비가역적으로 흡착될 수 있는 불순물을 제거하여 컬럼의 성능을 연장할 수 있다. 이상의 결과로부터 여러가지 기호음료 중의 카페인을 정량 분석할 경우 카트리지를 사용함으로써 시료의 전처리과정을 단축시킬 수 있으며 분석의 결

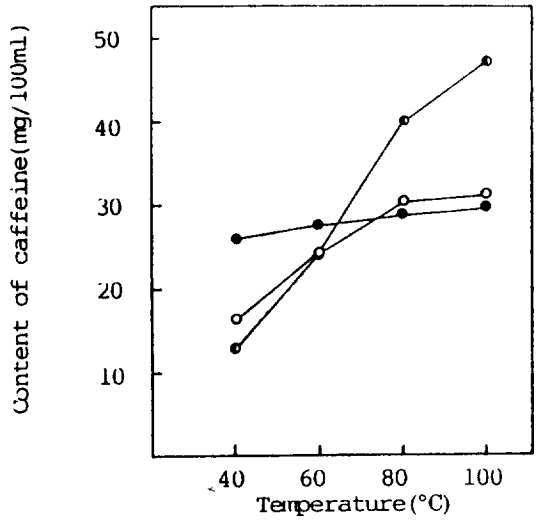

Fig. 4. Effect of extraction temperature on the content of caffeine, extracted for 10 min.
●-●: coffee, ○-○: black tea, ◐-◐: green tea

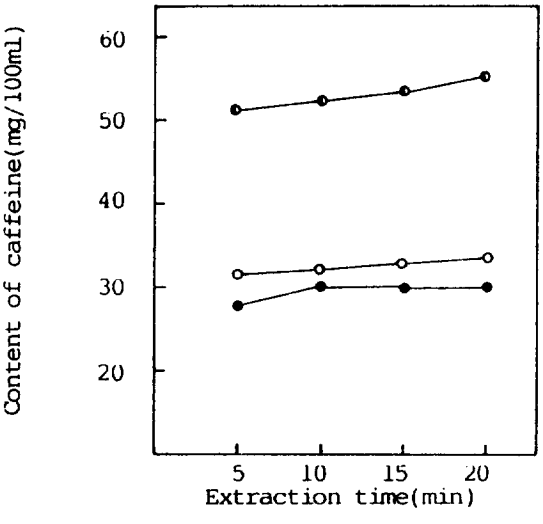

Fig. 5. Effect of extraction time on the content of caffeine, extracted at 100°C.
●-●: coffee, ○-○: black tea, ◐-◐: green tea

Table 3. Content of caffeine in coffee, black tea, green tea and soft drink

Sample	Content (mg/100 ml)
Regular coffee (colombia)	51.78
Regular coffee (Brazil)	86.78
Instant coffee	27.85
Canned coffee A	33.63
Canned coffee B	40.01
Black tea	32.18
Green tea (Bosung)	49.68
Green tea (Voungam)	44.98
Green tea (Jangsung)	37.99
Colar	9.55
Diet colar	12.54

Average of five trials

과도 양호함을 알수 있다.

추출시간 및 추출온도의 영향—시료로 부터 카페인을 추출할 경우 추출시간 및 온도의 영향을 검토하기 위해 Fig. 4및 5의 조건에서 각종 시료의 카페인 함량을 분석하였다. 그 결과 추출온도의 상승에 따라 카페인 함량은 증가된 반면에 추출시간의 영향은 크지 않은 것을 알 수 있다. 이로부터 원두커피, 녹차 또는 홍차를 끓일 경우 카페인의 용출량 및 관능을 고려하여 추출온도를 적절히 조절한 것이 바람직한 것으로 생각된다.

카페인의 정량—Sep-Pak alumina A 를 사용하여 실제로 음용하는 상태의 커피, 인스탄트 커피, 커피음료, 홍차, 녹차, 청량음료 중의 카페인을 정량하였다. 분석결과는 Table 3 에 나타내었다. regular coffe의 경우가 카페인의 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며 홍차 및 녹차의 경우에도 인스탄트 및 캔커피에 비해 상대적으로 많은 양이 함유되어 있음을 알 수 있다.

요 약

커피, 홍차, 녹차중의 카페인 함량을 간단하고 신속하게 정량하는 방법을 검토하였다. 역상계 액체크로마토그래피에 의한 카페인 정량은 메타놀-초산-물(20 : 1 : 79)을 이동상으로 하여 μ-Bondapak C18 컬럼하에서 이루어졌다. 카페인의 검출에는 UV검출기를 사용하여 280 nm 에서 행하였다. Sep-Pak alumina A 카트리지를 이용한 간단한 전처리를 통해 효과적으로 카페인의 추출 및 clean-up를 행하였다. 카페인의 첨가 회수율은 95.2~101.3%이었고 분석의 재현성은 상대표준 편차로서 0.10~0.62%이었으며 검출한계는 0.1 μg/ml이었다.

참고문헌

1. Morris, M.B. and Weinstein, L.: Caffeine and the fetus: Is troble brewing? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **140,** 607 (1981).
2. Resman, B.H., Blumenthal, H.P. and Jusko, W.J.: Breast milk distribution of theobromine from chocolate. *J. Pediatr.*, **91,** 477 (1977).
3. Aldrige, A., Aranda, J.V. and Neims, A.H.: Caffeine metabolism in the developing infant, *Pharamacology,* **20,** 263 (1978).
4. Lau, O.W., Luk, S.F. and Cheung, Y.M.: Simulataneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetanol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode, *Analyst,* **114,** 1047 (1989).
5. Newton, J.M.: Spectrophotometric determination of caffeine in coffee products, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62,** 705 (1979).
6. Strahl, N.R., Lewis, H. and FFargen, R.: Comparison of gas chromatographic and spectrophotometric method of determination for caffeine and teas, *J. Agric. Food Chem.*, **25,** 233 (1977).
7. 石田裕, 關根展子, 關木村茂, 關谷茂二：ガスクロマトグラフによる食品中の ラオブロシソのて定量, 日本食品衛生學雜誌, **27**, 75(1986)
8. Blauch, J.L. and Tarka, S.M.: HPLC determination of caffein and theobromine in coffee, tea and instant hot cocoa mixes, *J. Food Science,* **48,** 745 (1983).
9. Duijn, J.V. and Stegen, G.H.D.: Analysis of caffeine and trigonelline using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **179,** 199 (1979).
10. Kreiser, W,R. and Martin, R.A.: High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63,** 591 (1980).
11. Smyly, D.S.W., Woodward, B.B. and Conrad, E.C.: Determination of sacchairin, sodium benzoate, and caffeine in beverages by reverse phase high pressure liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **59,** 14 (1980).
12. Kreiser, W.R. and Martin, R.A.: High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chcolate products, *J. Assoc. Off. Anmal. Chem.*, **61,** 1424 (1978).
13. 功刀彰, 青木智子, 功刀禎子：高速液体クロマトグラフ-によふコ-ヒ-, 紅茶, 緑茶中のかそイソの分析法, 日本食品衛生學雜誌, **29**, 136(1988)
14. Terada, H. and Sakabe, Y.: High performance liquid chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products, *J. Chromatogr.*, **291,** 453 (1984).
15. Timbie, D.J., Sechrist, L. and Keeney, P.G.: Application of high pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans, *J. Food Science,* **43,** 560 (1978).
16. 桑野和民, 三田村敏男：HPLCによる市販緑茶のカそイソの定量, 日本農藝化學會誌, **60**, 115(1986)
17. 池田中美, 中川致之, 岩 溪：茶業研究報告, **37**, 69 (1972)
18. Kwak, H.S. and Jeon, L.J.: effect of various conditions on the formation of oligosaccharides in milk treated with -galactosidase, *J. Dairy Sci.*, **69,** 2785 (1986).