

## HPLC-UVD를 이용한 건강기능식품에서 클로로겐산과 카페인 동시분석법 최적화 및 적용성 검증

정희선<sup>1</sup> · 이세윤<sup>1</sup> · 김규현<sup>1\*</sup> · 이미영<sup>1</sup> · 최정호<sup>1</sup> · 안정선<sup>1</sup> · 오재명<sup>2</sup> · 권광일<sup>1</sup> · 이혜영<sup>1</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 영양기능연구과

<sup>2</sup>식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 첨가물포장과

## Optimization and Applicability Verification of Simultaneous Chlorogenic acid and Caffeine Analysis in Health Functional Foods using HPLC-UVD

Hee-Sun Jeong<sup>1</sup>, Se-Yun Lee<sup>1</sup>, Kyu-Heon Kim<sup>1\*</sup>, Mi-Young Lee<sup>1</sup>, Jung-Ho Choi<sup>1</sup>, Jeong-Sun Ahn<sup>1</sup>,  
Jae-Myoung Oh<sup>2</sup>, Kwang-Il Kwon<sup>1</sup>, Hye-Young Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nutrition and Functional Food Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,  
Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

<sup>2</sup>Food Additives and Packages Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,  
Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

(Received November 2, 2023/Revised March 22, 2024/Accepted April 18, 2024)

**ABSTRACT** - In this study, we analyzed chlorogenic acid indicator components in preparation for the additional listing of green coffee bean extract in the Health Functional Food Code and optimized caffeine for simultaneous analysis. We extracted chlorogenic acid and caffeine using 30% methanol, phosphoric acid solution, and acetonitrile-containing phosphoric acid and analyzed them at 330 and 280 nm, respectively, using liquid chromatography. Our analysis validation results yielded a correlation coefficient ( $R^2$ ) revealing a significance level of at least 0.999 within the linear quantitative range. The chlorogenic acid and caffeine detection and quantification limits were 0.5 and 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 1.4, and 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. We confirmed that the precision and accuracy results were suitable using the AOAC validation guidelines. Finally, we developed a simultaneous chlorogenic acid and caffeine analysis approach. In addition, we confirmed that our analysis approach could simultaneously quantify chlorogenic acid and caffeine by examining the applicability of each formulation through prototypes and distribution products. In conclusion, the results of this study demonstrated that the standardized analysis would expectably increase chlorogenic acid-containing health functional food quality control reliability.

**Key words:** Health functional food, Green coffee bean extract, Chlorogenic acid, Caffeine, Optimization

꼭두서니과(*Rubiaceae*) 코페아속(*Coffea*)에 속하는 커피 나무는 그 원두를 음료로 가공하여 이용하는 대표적인 기호 작물의 하나로 전 세계적으로 하루에 약 22억 5천만

잔 정도가 소비되고 있다<sup>1</sup>. 커피는 약 80여 종이 있으며 아프리카 대륙과 마다가스카르섬이 기원으로 알려져 있다<sup>2</sup>. 이 중 아라비카(*C. arabica*)와 로부스타(*C. canephora*)종은 세계적으로 주로 소비되는 종이다<sup>3</sup>. 아라비카와 로부스타 종은 유전적으로 염색체 수가 다르며 이에 기인하여 재배 환경, 수량, 품질 등에서 차이가 있다<sup>4</sup>. 일반적으로 아라비카는 로부스타보다 품질이 우수하다고 여겨지며 가격이 비싸게 형성되어 있고<sup>3</sup>, 전 세계 커피 생산량 중 60%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>4</sup>. 최근 소비자들의 고급 제품에 대한 선호도가 증가하면서 저가형 블렌딩 커피보다 아라비카종을 사용하는 스페셜티 커피에 대한 수요

\*Correspondence to: Kyu-Heon Kim, Nutrition and Functional Food Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea

Tel: +82-43-719-4425, Fax: +82-43-719-4420

E-mail: khkim95@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

가 급증하고 있다<sup>5)</sup>.

커피의 주요한 역할을 하는 물질로 카페인(caffeine, 1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione), 클로로겐산(chlorogenic acid, 3-O-caffeoylquinic acid) 등이 알려져 있다. 카페인은 알칼로이드 물질로 파킨슨병과 제2형 당뇨병의 위험을 감소시키는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 클로로겐산은 폴리페놀 화합물의 일종으로 커피의 떫은맛과 쓴맛을 부여하는 물질로, 항산화 효능을 보이는 물질이며 고온에서 분해되는 특징이 있다<sup>7)</sup>. 커피의 생리활성 물질은 품종과 원산지, 재배 조건(기온, 일사량, 영양성분 등), 수확 후 처리(필프 제거 방법 등), 저장 기간과 조건, 로스팅 조건, 추출 방법 등 다양한 요인에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다<sup>8-11)</sup>. 클로로겐산은 쌍자엽 식물의 잎이나 과실에 다량으로 들어있는 화합물로, 특히 커피콩, 사과, 배, 블루베리와 같은 과실과 토마토, 고구마, 우엉, 감자, 땅콩, 가지 등과 같은 채소에 다량 함유되어 있다<sup>12)</sup>. 폴리페놀 화합물인 클로로겐산은 *in vitro* 시험에서 HSCT6 세포에서 collagen I과 TIMP-1의 발현을 활성화해 산화 스트레스 억제를 통한 간 질환에 대한 보호 효과가 있는 것으로 보고되었고<sup>13)</sup>, 특히 활성산소나 발암성 물질에 의한 DNA 손상으로 세포 돌연변이를 유발하게 되며, 심할 경우 암세포로 변형되게 하는 물질의 하나인 8-hydroxydeoxyguanosine의 생성을 채소나 과일에 함유된 클로로겐산이 억제한다고 보고되었다<sup>14)</sup>. 또한 산화적 손상의 원인으로 발병하는 암이나 심혈관 질환 예방 효과<sup>15)</sup> 및 당뇨병이 유발된 동물모델에서 혈당 저하 효과와 지질 개선 효과<sup>16)</sup> 등 *in vivo* 실험에서도 다양한 연구 결과가 보고되어 건강 촉진 물질로 클로로겐산의 기능성에 대한 연구와 관심이 점차 증가하고 있는 추세이다.

그린커피빈은 로스팅을 하지 않은 커피원두를 말하며, 최근 여러 문헌에 따르면 지방 감소, 항산화 작용, 혈당조절 등 다양한 효과가 있다고 보고되고 있다<sup>17-21)</sup>. 이러한 효과들은 클로로겐산에 의한 것으로 알려져 있으며, 그린커피빈추출물(제2014-31호)이 2014년에 ‘체지방 감소에 도움을 줄 수 있음’으로 기능성 내용을 인정받았고, 클로로겐산이 지표(기능)성분이며, 카페인이 함유되어 있다. 「건강기능식품의 기준 및 규격」에서 기능성 원료는 고시된 원료(누구나 사용할 수 있는 원료) 및 고시되지 아니한 원료(인정받은 영업자만이 사용할 수 있는 원료)로 구분되며, 고시되지 아니한 원료는 인정받은 영업자에 한하여 제조·수입하도록 규정하고, 제한된 영업자만 제조할 수 있다. 인정받은 일로부터 6년이 경과하고, 품목제조신고 50건(생산실적이 있는 경우에 한함) 이상인 경우 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 추가로 등재할 수 있도록 규정하고 있으며, 추가 등재될 가능성이 있는 기능성 원료 그린커피빈추출물을 다양한 건강기능식품 제형·제품에 적용하기 위해 최적화된 시험법 마련이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 그린커피빈추출물의 클로로겐산

및 카페인이 동시 분석될 수 있도록 재검토하고, 시험법 밸리데이션<sup>22)</sup> 및 실험실 간 교차검증 과정을 통해 국내에서 유통 중인 건강기능식품에 대한 적용성을 확인하여 최적화된 클로로겐산과 카페인 동시분석법을 마련함으로써, 분석의 편의성을 높이고, 품질관리의 효율성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## Materials and Methods

### 시약 및 재료

본 연구에서 사용된 클로로겐산 표준품, 카페인 표준품, 인산, 아세트니트릴(HPLC급) 및 메탄올(HPLC급)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 시료는 인터넷 판매 사이트를 이용하여 10건을 구매하여 시험에 사용하였으며, 당질(정, 경질캡슐), 지방질(연질캡슐), 단백질(정, 경질캡슐)을 부원료로 시제품 5건을 제조하여 클로로겐산 및 카페인 함량에 대하여 적용성 검토를 수행하였다.

### 표준용액 조제

클로로겐산과 카페인 표준품을 각각 25 mg씩 정밀하게 취하여 메탄올로 완전히 녹인 후 25 mL 부피플라스크에 정용한 후 30% 메탄올로 적정 농도로 희석하여 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 액을 표준용액으로 사용하였다.

### 시험용액 조제

클로로겐산으로서 약 0.1 mg 이상 함유되도록 시료를 정밀하게 취하여 30% 메탄올을 첨가하여 시료를 녹인다. 25 mL 부피플라스크에 정용한 후 30% 메탄올로 적절히 희석하고 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험용액으로 사용하였다.

### 기기 조건

클로로겐산을 분석하기 위해 photo diode array (PDA, Accela PDA 80, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA)가 장착된 high performance liquid chromatography (HPLC, Nanospace SI-2, OSAKA SODA Co., Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 칼럼은 Capcell Pak UG120 C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 µm, OSAKA SODA Co.) 이었으며, 이동상은 0.5% 인산용액과 0.5% 인산 함유 아세트니트릴을 사용하여 1.0 mL/min 유속으로 클로로겐산 330 nm, 카페인 280 nm로 하여 분석하였다(Table 1).

### 밸리데이션 방법

특이성을 확인하기 위하여 표준품과 시료에서의 분리도 및 머무름시간을 확인하였다. 직선성은 시료에서 성분이 검출되는 농도 범위를 중간값으로 설정하여 총 6개의 농

**Table 1.** Analysis parameters of HPLC for chlorogenic acid in sample

Parameters	Conditions		
Column	Capcell Pak UG120 C <sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm)		
Column oven temp.	40°C		
Injection volume	10 μL		
Mobile phase	A) 0.5% Phosphoric acid solution B) Acetonitrile containing 0.5% phosphoric acid		
Flow rate	1.0 mL/min		
Wavelength	Chlorogenic acid : 330 nm Caffeine : 280 nm		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
	12.5	90	10
	22.5	90	10
Gradient	27	70	30
	28	10	90
	30	10	90
	31	95	5
	40	95	5

도 10, 20, 30, 40, 50, 60 μg/mL를 검토하였으며, 표준용액만을 이용하여 산출하였고, 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3 반복 시험을 수행하였다. 정확도는 클로로겐산과 카페인을 함유하지 않은 공시료에 대하여 각각 다른 농도를 spiking/recovery 방법으로 회수되는 백분율을 통해 매트릭스 영향을 검토하였다. 표준품 첨가법에 따라 공시료에 대하여 일정량의 시료를 채취하고, 표준용액을 각각 첨가하였을 때 클로로겐산 최종 농도의 합이 20, 40, 60 μg/mL, 카페인은 8, 16, 24 μg/mL이 되도록 설정하여 진행하였다. 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였다. 검출한계와 정량한계의 경우 표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y 절편값을 이용하여, 검량선 y 절편값의 표준편차에 3.3배를 곱한 값을 기울기 평균값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 평균값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. 정밀도는 시료량의 변화에 대한 반복 정밀도(반복성, repeatability)를 확인하기 위하여 1개의 표본 시료를 선정한 후 시료 450, 900, 1,350 mg을 각각 취하여 5회 반복 측정하였다. 마지막으로 실험실 간 재현성(reproducibility)을 확인하기 위하여 3개 실험실에서 표본 시료를 5회 반복 측정하였다.

## Results and Discussion

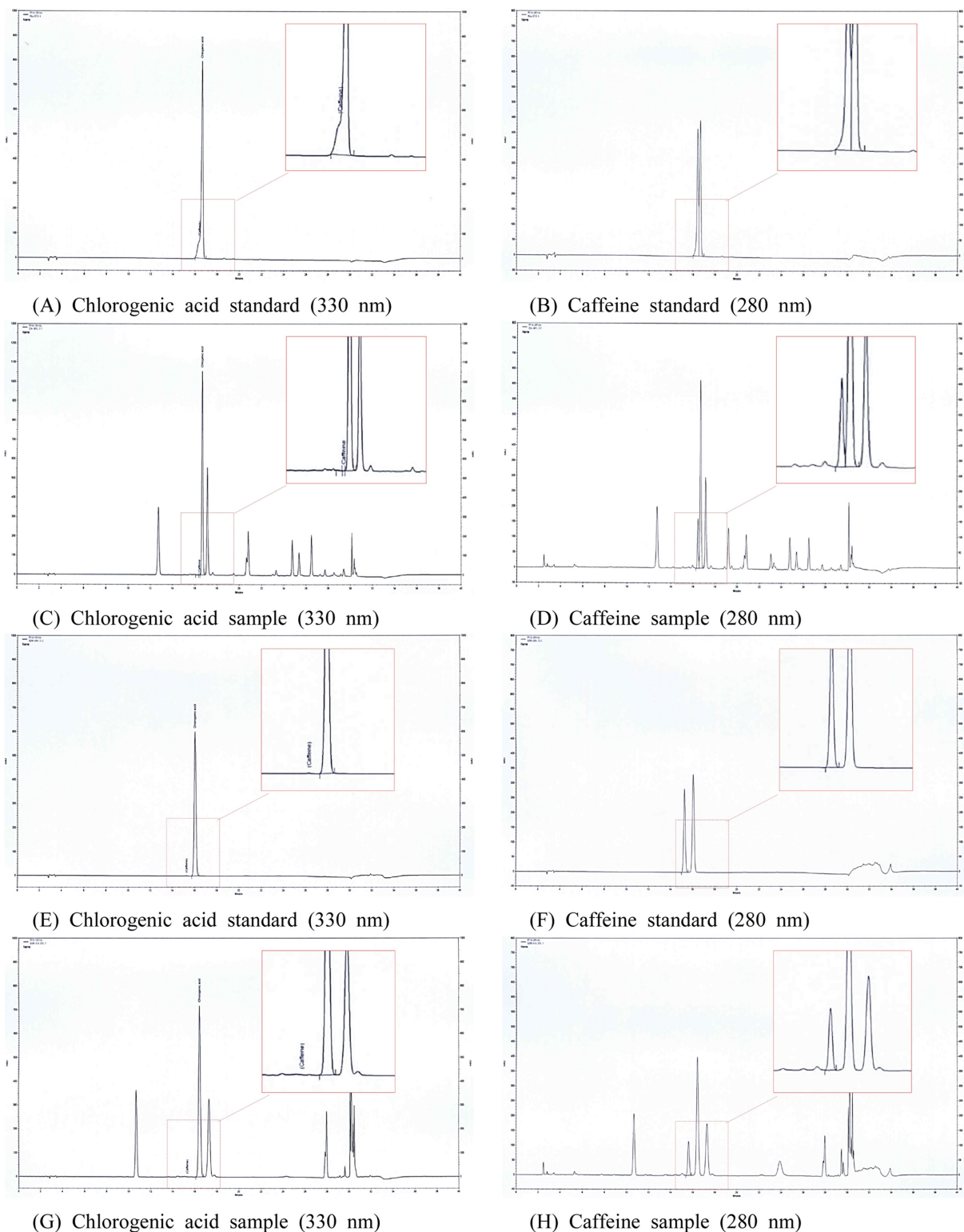
### 국내·외 시험법 검토

기능성 원료로 인정받은 그린커피빈추출물의 클로로겐

산 시험법은 30% 메탄올로 추출 후, 0.5% 인산용액 및 0.5% 인산 함유 아세트니트릴을 이용하여 액체크로마토그래프/자외선흡광도검출기(330 nm)로 분석<sup>23)</sup>하며, AOAC 시험법(Official Method 957.04.)은 증류수로 용해하여 분광광도계(324 nm)로 측정하는 방법<sup>24)</sup>이다. 최근 문헌에 따르면, 액체크로마토그래프를 이용하여 클로로겐산과 카페인을 동시 분석하는 논문들이 다수 보고되고 있다. 특히, Vinson 등<sup>25)</sup>에 따르면 그린커피빈추출물에서 클로로겐산과 카페인을 메탄올 추출하여 액체크로마토그래프/자외선흡광도검출기(325 nm, 275 nm)로 동시 분석하였다. 또한, De Luca 등<sup>26)</sup>에 따르면 그린커피빈을 70% 메탄올 추출하여 액체크로마토그래프/자외선흡광도검출기(280 nm)로 정량 분석하였고, Shan 등<sup>27)</sup>에 따르면 그린커피빈추출물에서 클로로겐산 및 카페인을 1% 개미산 함유 10% 아세트니트릴 용액으로 추출하여 액체크로마토그래프/자외선흡광도검출기(280 nm)로 동시 분석하였다. 시험법 검토 결과, AOAC 시험법은 분광광도계를 이용한 시험법으로 다양한 건강기능식품 제품과 제형에서 적용성이 낮을 것으로 판단되어 개별인정형 원료 시험법을 토대로 최근 문헌을 참고하여 최적의 시험법을 마련하고자 하였다. 클로로겐산 머무름시간 14.8분과 스펙트럼이 표준품과 시료에서 동일하게 검출되었으나(data not shown), 기기분석 조건 중 이동상 유속이 1.4 mL/min으로, 건강기능식품공전 카페인 시험법과 Vinson 등 다수의 연구 결과<sup>25-27)</sup>에서 유속을 1.0 mL/min으로 제시하고 있으며, 클로로겐산과 카페인 동시 분석법을 마련하기 위해서는 시료의 추출 용매, 초음파 추출 시간, 시료 채취량 등의 검토가 필요하였다.

### 전처리 및 기기분석 조건 개선

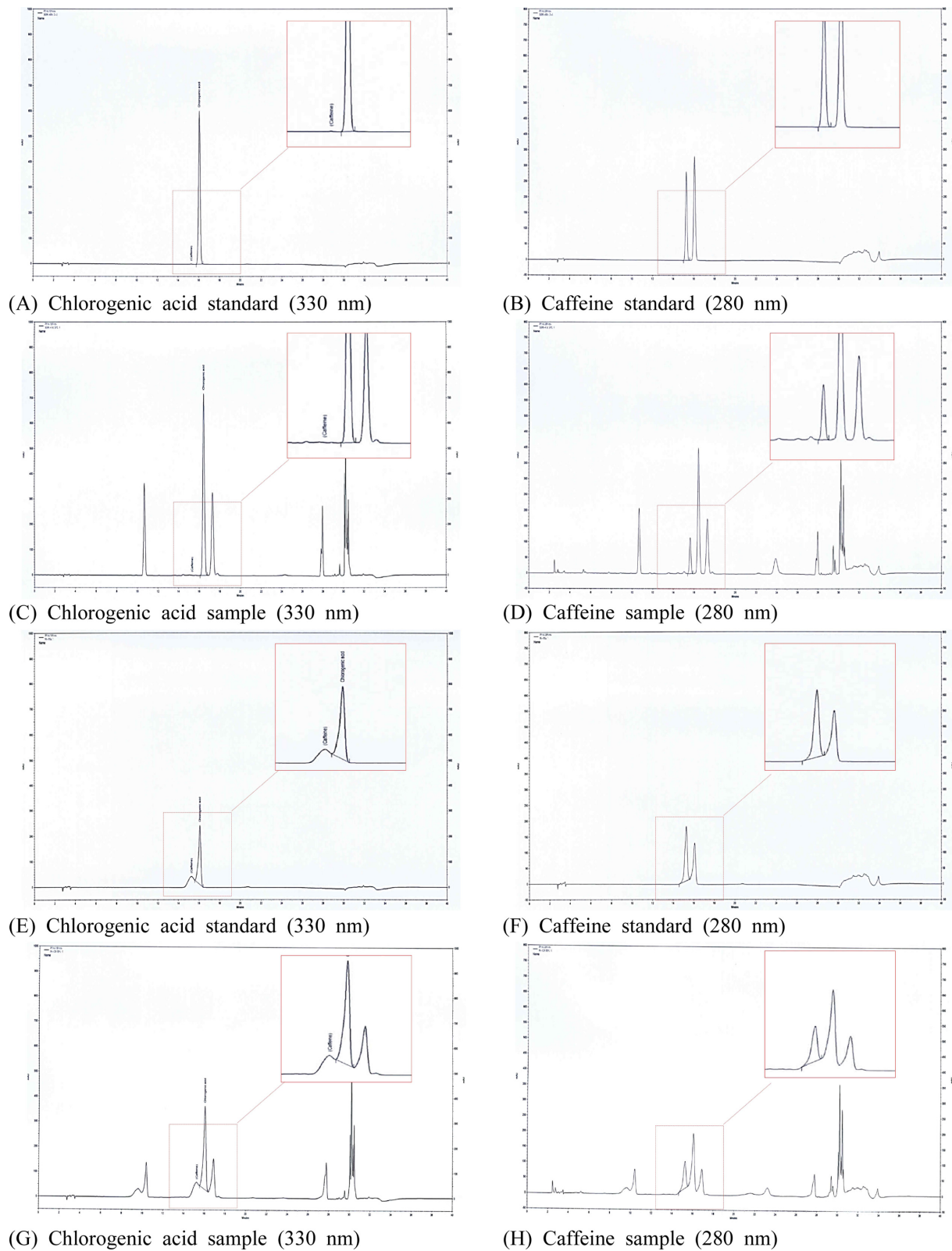
개별인정형 원료 클로로겐산 시험법의 기기분석 조건 중 이동상은 0.5% 인산용액과 0.5% 인산 함유 아세트니트릴로, 기울기 용기 조건은 0분(95%:5%)→7분(95%:5%)→27분(70%:30%)→28분(10%:90%)→30분(10%:90%)→31분(95%:5%)→40분(95%:5%)으로 유속을 1.0 mL/min으로 변경하여 표준품과 클로로겐산이 함유된 시료를 측정된 결과, 클로로겐산과 카페인의 머무름시간이 비슷하여 피크 겹침 현상으로 정량 분석에 어려움을 확인하였다(Fig. 1). De Luca 등<sup>24)</sup>에 따르면 그린커피빈을 70% 메탄올 추출하여 액체크로마토그래프/자외선흡광도검출기(280 nm)로 분석 시 이동상 기울기 용리 조건[0분(0.5% 인산용액 95%:0.5% 인산 함유 아세트니트릴 5%)→12.5분(90%:10%)→22.5분(90%:10%)→27분(70%:30%)→28분(10%:90%)→30분(10%:90%)→31분(95%:5%)→40분(95%:5%)]으로 정량 분석함에 따라 기울기 용리 조건을 변경하여 표준품과 시료의 함량을 측정하였다. 그 결과, 클로로겐산과 카페인 피크가 완전히 분리되어 정량에 어려움이 없어 유속과 이동상 기울기 용리 조건을 재설정하였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Comparison of chromatograms by mobile phase conditions of individually certificated functional ingredient (A-D) and recent literature<sup>24)</sup> (E-H).

추출 용매는 30% 메탄올로 제시하고 있으며, 건강기능식품공전 카페인 시험법의 추출 용매도 메탄올로 제시되어 있어 클로로겐산과 카페인이 메탄올의 농도에 따라 추출 효

율이 차이가 있는지 확인하고자 하였다. 각각의 표준품과 시료를 30% 메탄올 또는 100% 메탄올로 표준용액과 시험용액을 조제하여 분석하였다. 그 결과, 클로로겐산과 카페



**Fig. 2.** Comparison of chromatograms by pre-treatment conditions (extraction solvent) in 30% methanol (A-D) and 100% methanol (E-H).

인의 시료 표시량 대비 함량 비율은 큰 차이가 없어 메탄올 농도가 두 성분의 추출 효율에 영향을 주지 않았다. 다

만, 100% 메탄올은 peak fronting 현상이 확인되어 메탄올 농도에 따라 각 성분의 피크 모양에 영향을 줄 수 있으며

**Table 2.** Comparison of analysis results by pre-treatment conditions (ultrasonic extraction time)<sup>1)</sup>

	Ultrasonic extraction time (min)	Chlorogenic acid contents (mg/g)	Content ratio to labeled amount (%) <sup>2)</sup>	Caffeine contents (mg/g) <sup>3)</sup>
Sample 1 (2.2 mg/g)	0	2.4±0.2	110.1	0.3±1.0
	10	2.4±0.3	110.5	0.3±1.9
	20	2.4±0.5	108.6	0.3±1.6
	30	2.4±0.1	109.3	0.3±1.2
	60	2.4±1.2	107.8	0.3±0.9
Sample 2 (73.6 mg/g)	0	60.7±0.4	82.5	9.5±1.7
	10	59.2±1.3	80.5	9.3±1.2
	20	59.5±1.0	80.9	9.4±1.0
	30	59.9±1.9	81.5	9.5±2.1
	60	59.5±0.5	80.9	9.4±0.6

<sup>1)</sup>Each data was obtained by three times analyses (n=3). Each value was the mean±relative standard deviation.

<sup>2)</sup>Specifications of final product: 80-120% of labeled amount.

<sup>3)</sup>Specifications of caffeine contents: no more than 20 mg/g.

**Table 3.** Comparison of analysis results by pre-treatment conditions (sample amount)<sup>1)</sup>

Sample amount (mg)	Chlorogenic acid (mg)	Chlorogenic acid contents (mg/g)	Content ratio to labeled amount (%) <sup>2)</sup>	Caffeine contents (mg/g) <sup>3)</sup>
Sample 1 (2.2 mg/g)	10	0.9±0.1	40.9	0.2±1.3
	25	1.7±0.1	78.4	0.3±2.2
	50	2.0±0.1	91.0	0.3±0.9
	100	2.2±0.1	99.9	0.3±1.8
	250	2.2±0.1	101.6	0.3±2.1
	500	2.2±0.1	100.8	0.3±3.2
	1,000	2.2±0.1	98.3	0.3±2.0
Sample 2 (73.6 mg/g)	10	61.2±1.1	83.2	9.8±2.4
	25	62.7±1.1	85.2	10.1±2.3
	50	61.5±0.2	83.6	10.1±0.5
	100	61.4±0.6	83.5	10.1±0.9
	250	62.4±0.4	84.9	10.3±0.7
	500	60.8±0.4	82.7	10.0±0.7
	1,000	62.8±0.5	85.3	10.3±0.7

<sup>1)</sup>Each data was obtained by three times analysis (n=3). Each values was the mean±relative standard deviation.

<sup>2)</sup>Specifications of final product: 80-120% of labeled amount.

<sup>3)</sup>Specifications of caffeine contents: no more than 20 mg/g.

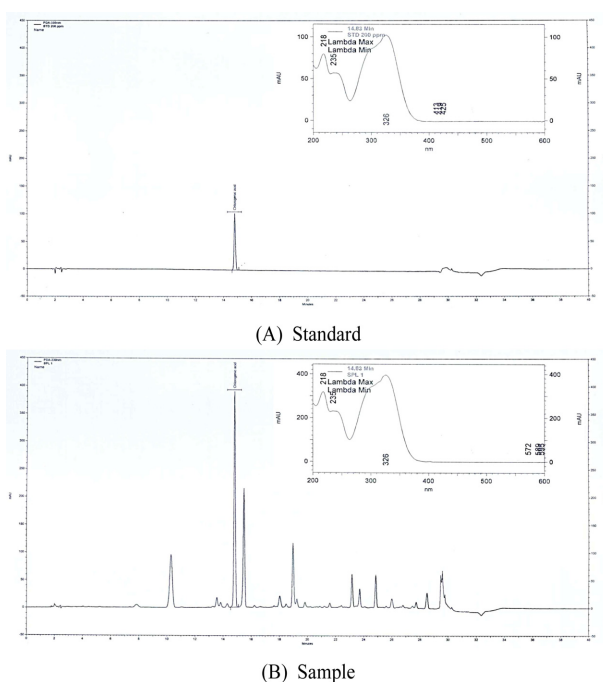
로 추출 용매는 30% 메탄올을 최종 설정하였다(Fig. 2).

시험용액 조제 시 30% 메탄올로 용해 후 측정한다고 제시하고 있으며, 카페인 시험법은 메탄올로 용해 후 적절히 초음파 추출한다고 되어있다. 따라서, 시험용액 조제 과정 중 초음파 추출이 함량에 영향을 미치는지 확인하였다. 시료 1g 당 클로로겐산 함량이 가장 낮은 시료(2.2 mg/g)와 가장 높은 시료(73.6 mg/g)를 선택하고, 초음파 추출 시간을 0, 10, 20, 30, 60분까지 설정하여 클로로겐산 및 카페인 함량을 측정하였다. 그 결과, 초음파 추출 시간에 따

라 클로로겐산과 카페인 함량 변화는 없어 초음파 추출은 시험용액 조제 과정에서 제외하였다(Table 2).

시료 채취량을 30 mg으로 제시하고 있으나, 시중에 판매되고 있는 시료 1g 당 클로로겐산 함량(mg)의 범위가 약 2.2-73.6 mg/g으로 넓게 분포되어 있어 시료량 칭량에 어려움이 있어 클로로겐산으로서 시료량을 재설정하고자 하였다. 구입한 시료 중 클로로겐산 함량이 가장 낮은 시료(2.2 mg/g)와 가장 높은 시료(73.6 mg/g)를 선택하고, 시료량을 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 mg까지 설정하여 클로



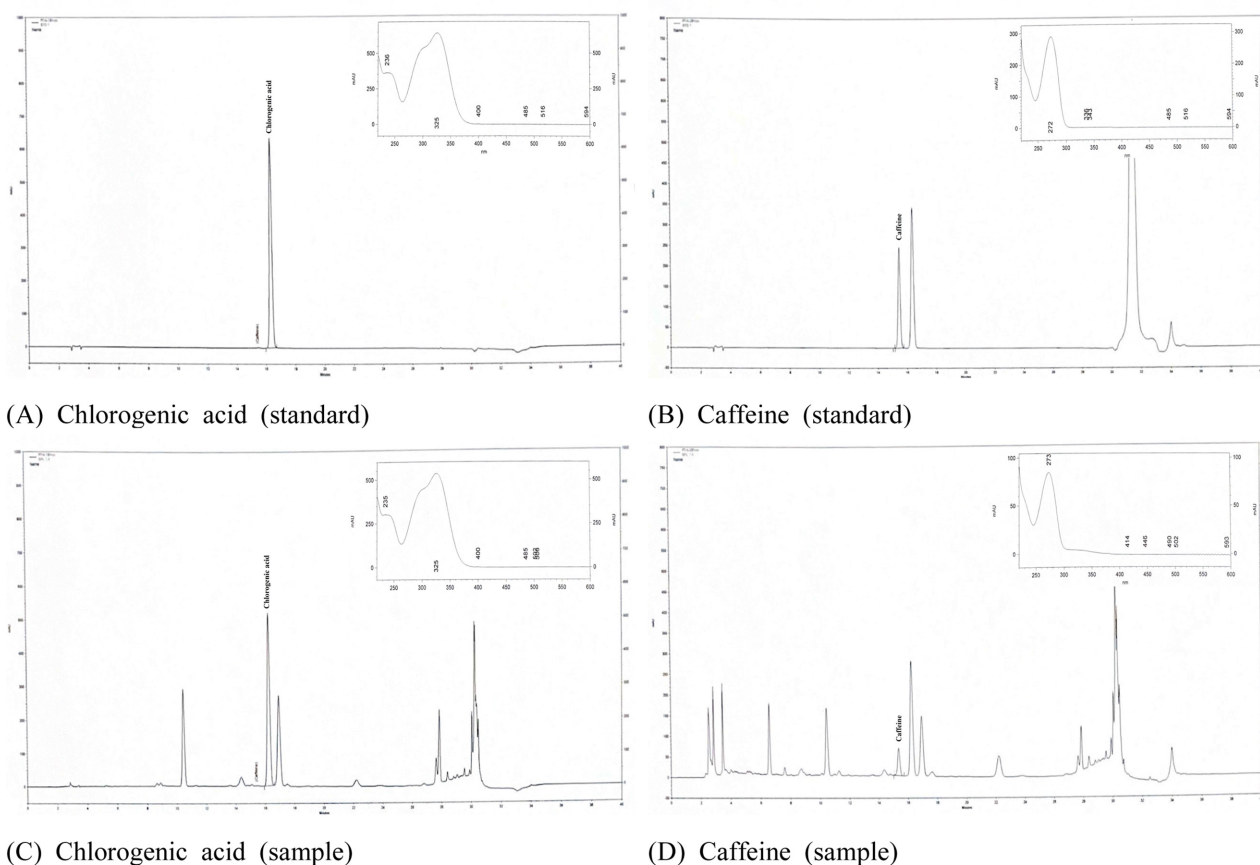


**Fig. 3.** HPLC chromatograms and spectrums of chlorogenic acid in (A) standard and (B) sample.

로겐산을 분석하였다. 그 결과, 클로로겐산 함량이 높은 시료는 시료량에 따라 함량의 차이가 없지만, 클로로겐산 함량이 낮은 시료 중 시료량 50 mg 미만은 표시량 대비 회수율이 80% 미만으로 확인하였다. 클로로겐산 저함량의 시료에서 시료량에 따라 회수율에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되어 저함량의 시료량 50 mg을 클로로겐산의 함량으로 환산하여 약 0.11 mg이므로 시료 채취량을 클로로겐산으로서 약 0.1 mg 이상으로 설정하였다(Table 3).

**표준화 시험법 마련**

개별인정형 원료 시험법을 검토한 결과, 기기분석 조건 중 이동상 유속 1.4 mL/min을 1.0 mL/min으로 개선하였다. 또한, 카페인 동시분석법 마련을 위해 시험법을 검토한 결과, 클로로겐산과 카페인 피크의 겹침 현상이 발생하여 이를 해결하기 위해 이동상 기울기 용리 조건을 0분(0.5% 인산용액 95%:0.5% 인산 함유 아세트니트릴 5%) → 12.5분(90%:10%) → 22.5분(90%:10%) → 27분(70%:30%) → 28분(10%:90%) → 30분(10%:90%) → 31분(95%:5%) → 40분(95%:5%)으로 변경하여 클로로겐산과 카페인 피크가 완전히 분리되는 것을 확인하였다. 그리고 30% 메탄올과 100%



**Fig. 4.** HPLC chromatograms and spectrums of chlorogenic acid in (A) chlorogenic acid (standard), (B) caffeine (standard), (C) chlorogenic acid (sample), and (D) caffeine (sample).

메탄올 추출 용매 비교와 초음파 추출 시간, 시료 채취량 검토 등 최적의 기기분석 및 전처리 조건을 마련함에 따라 클로로겐산과 카페인 동시분석법을 확립하였다.

**시험법 검증**

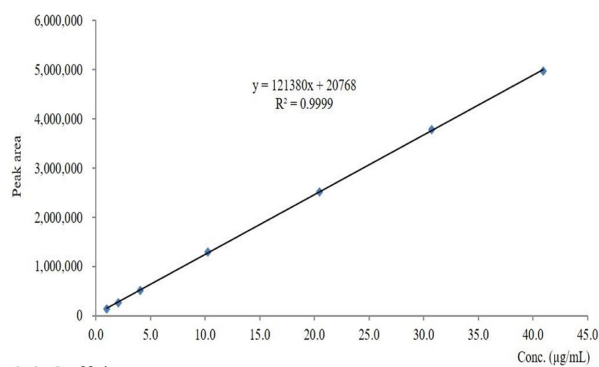
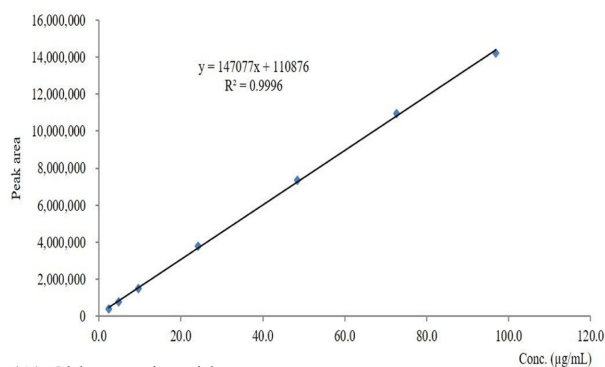
**특이성**

특이성을 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액에서 머무름시간 및 분리도를 분석하였다. Fig. 3과 같이 표준품

과 시료를 분석한 크로마토그램이며 동일한 위치에서 단일 피크가 형성되는지 살펴본 결과, 표준용액과 시료에서 지표(기능)성분인 클로로겐산의 머무름시간 16.3분, 카페인의 머무름시간 15.4분으로 일치하였다. 또한, 분리된 피크의 정점에서 PDA 스펙트럼은 표준품과 시료의 패턴이 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

**직선성**

시료에서 클로로겐산과 카페인이 검출되는 농도 범위



(A) Chlorogenic acid  
 (B) Caffeine  
**Fig. 5.** Calibration curves of chlorogenic acid and caffeine.

**Table 4.** Validation (accuracy, repeatability, and reproducibility) of analysis method for chlorogenic acid and caffeine (n=5)<sup>1)</sup>

Treatments	Chlorogenic acid			Caffeine			
	Spiked concentration (µg/mL)			Spiked concentration (µg/mL)			
	20	40	60	8	16	24	
Accuracy	1	19.8	39.5	59.3	7.8	15.3	22.9
	2	19.8	39.9	59.7	7.8	15.5	23.1
	3	19.6	39.4	59.9	7.7	15.3	23.2
	4	19.7	40.0	59.6	7.7	15.5	23.0
	5	19.8	39.8	59.2	7.8	15.4	22.8
Measured mean (mg/g)		19.7	39.7	59.6	7.7	15.4	23.0
%RSD		0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	0.6
Recovery(%)		98.7	99.3	99.3	96.8	96.2	95.9

Treatments	Chlorogenic acid			Caffeine			
	Sample contents (mg)			Sample contents (mg)			
	450	900	1,350	450	900	1,350	
Repeatability	1	2.3	2.3	2.3	318.7	319.1	319.7
	2	2.3	2.2	2.3	321.6	313.5	319.0
	3	2.3	2.3	2.3	323.8	317.1	320.4
	4	2.3	2.2	2.3	315.4	307.8	326.4
	5	2.3	2.3	2.3	320.1	314.2	319.8
Measured mean (mg/g)		2.3	2.3	2.3	319.9	314.3	321.1
SD		0.1	0.1	0.1	3.1	4.3	3.0



**Table 4.** (Continued) Validation (accuracy, repeatability, and reproducibility) of analysis method for chlorogenic acid and caffeine (n=5)<sup>1)</sup>

%RSD		0.5	0.1	0.1	1.0	0.1	0.1
		Chlorogenic acid			Caffeine		
Treatments		Laboratory			Laboratory		
		A	B	C	A	B	C
Reproducibility	1	2.3	2.3	2.2	319.1	331.0	358.1
	2	2.2	2.3	2.2	313.5	331.6	354.5
	3	2.3	2.3	2.2	317.1	334.3	351.4
	4	2.2	2.3	2.2	307.8	332.3	354.4
	5	2.3	2.3	2.2	314.2	334.3	350.4
Measured mean (mg/g)		2.2			333.3		
SD		0.1			16.9		
%RSD		2.4			5.1		

<sup>1)</sup>Each data was obtained by five times analyses (n=5).

를 중간값으로 설정하여 총 7개의 농도에 대한 직선성을 검토하였다. 실험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3 반복 시험을 수행한 결과, 검량선 상관계수(R<sup>2</sup>) 0.999 이상의 높은 직선성을 보였다(Fig. 5).

#### 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

표준용액을 3회 분석한 검량선을 이용하여 y 절편의 표준편차 3.3배로 곱한 값을 기울기의 평균값으로 나눈 값을 검출한계로, 10배 곱한 값에 기울기의 평균값으로 나눈 값을 정량한계로 설정하였다. 그 결과, 클로로겐산과 카페인의 검출한계는 0.5, 0.2 µg/mL이며, 정량한계 1.4, 0.4 µg/mL로 나타났다.

#### 정확도

클로로겐산과 카페인을 함유하지 않은 공시료에 대하여 각각 다른 농도를 spiking/recovery 방법으로 회수되는 백분율을 통해 매트릭스 영향을 검토하였다. 표준품 첨가법에 따라 공시료에 대하여 일정량의 시료를 채취하고 표준용액을 첨가하였을 때 클로로겐산 최종농도 20, 40, 60 µg/mL, 카페인 최종농도 8, 16, 24 µg/mL이 되도록 하였다. 그 결과, 클로로겐산과 카페인의 회수율은 95.9-99.3%로 나타났으며, 상대표준편차는 0.5-0.6%였다(Table 4).

#### 정밀도

시료량의 변화에 대한 반복 정밀도(반복성, repeatability)를 확인하기 위하여 표본 시료 1개를 선정하여 각각 시료량으로서 450, 900, 1,350 mg을 취하여 5회 반복 측정하였다. 그 결과, 클로로겐산의 함량은 2.3, 2.3, 2.3 mg/g으로 나타났으며, 상대표준편차는 0.5, 0.1, 0.1%였다(Table

4). 또한, 카페인의 함량은 319.9, 314.3, 321.1 mg/kg으로 나타났으며, 상대표준편차는 1.0, 0.1, 0.1%였다(Table 4).

실험실 간 반복 정밀도(재현성, reproducibility)를 확인하기 위하여 1개의 시료를 선정하여 세 실험실에서 각각 5회 반복 측정하였다. 재현성의 상대표준편차를 확인한 결과, 클로로겐산 2.4%, 카페인 5.1%로 나타났다(Table 4).

#### 유통제품 및 시제품 적용성 검토

수거한 건강기능식품에 대하여 마련된 클로로겐산과 카페인 동시분석법을 이용하여 지표성분의 함량에 대해 적용성 검토를 수행하였다. 클로로겐산 함량은 표시량의 80-120% 범위에 해당되어야 하며, 카페인 함량은 20 mg/g 이하로 제시되어 있다. 총 10건의 유통제품에서 표시 함량 대비 80.1-110.6%로 적합하였고, 카페인은 모두 20 mg/g 이하로 검출되어 적합하였다(data not shown). 또한, 마련된 시험법을 이용하여 당질, 지방질, 단백질을 부원료로 시제품을 제조하여 지표성분 함량에 대해 적용성 검토를 수행하였다. 그린커피빈추출물 원료를 이용하여 시제품 제조가 가능한 부원료는 당질, 지방질, 단백질 모두 가능하였으나, 제형은 당질은 정제와 경질캡슐, 지방질은 연질캡슐, 단백질은 정제와 경질캡슐로 제조가 가능하였으며, 5개의 시제품 모두 클로로겐산의 표시 함량은 33.1 mg/g, 카페인 함량은 20 mg/g 이하로 제조하였다. 총 5건의 시제품의 클로로겐산과 카페인 함량을 분석한 결과, 클로로겐산은 표시 함량 대비 87.3-92.7%로, 카페인은 모두 20 mg/g 이하로 적합하였다(data not shown).

#### Acknowledgement

본 연구는 2021년도 식품의약품안전처 연구개발사업의

연구비지원(21161미래식044)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 국문 요약

본 연구는 그린커피빈추출물이 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 추가로 등재될 경우를 대비하여 표준화된 클로로겐산 시험법을 설정하고, 카페인이 동시 분석되도록 최적화하는 연구를 진행하였다. 최적화된 시험법을 마련하기 위해 기기분석 및 전처리 조건을 비교·분석하여 클로로겐산과 카페인을 30% 메탄올 추출하여 인산용액과 인산 함유 아세트니트릴로 액체크로마토그래프를 통해 330 nm, 280 nm에서 분석하도록 시험법을 설정하였다. 시험법 밸리데이션 결과, 직선성 정량범위 내에서 상관계수 ( $R^2$ ) 0.999 이상의 유의수준을 보였고, 클로로겐산과 카페인 검출한계는 0.5와 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , 정량한계는 1.4와 0.4  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 정밀도와 정확도 결과는 AOAC 밸리데이션 가이드라인을 통해 적합함을 확인하였고, 클로로겐산 및 카페인 동시분석법을 최종적으로 마련하였다. 또한, 시제품과 유통제품을 통해 제형별 적용성 검토하여 클로로겐산과 카페인을 동시에 정량 가능한 시험법임을 재확인하였다. 최적화된 시험법은 클로로겐산을 함유한 건강기능식품 품질관리에 대한 신뢰성을 더 높일 것으로 본다.

## Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

## ORCID

Hee-Sun Jeong	<a href="https://orcid.org/0000-0001-7590-6649">https://orcid.org/0000-0001-7590-6649</a>
Se-Yun Lee	<a href="https://orcid.org/0009-0000-9303-889X">https://orcid.org/0009-0000-9303-889X</a>
Kyu-Heon Kim	<a href="https://orcid.org/0009-0002-8687-2442">https://orcid.org/0009-0002-8687-2442</a>
Mi-Young Lee	<a href="https://orcid.org/0009-0005-4222-8366">https://orcid.org/0009-0005-4222-8366</a>
Jung-Ho Choi	<a href="https://orcid.org/0009-0003-6168-926X">https://orcid.org/0009-0003-6168-926X</a>
Jeong-Sun Ahn	<a href="https://orcid.org/0000-0003-0129-0567">https://orcid.org/0000-0003-0129-0567</a>
Jae-Myoung Oh	<a href="https://orcid.org/0000-0001-6341-4989">https://orcid.org/0000-0001-6341-4989</a>
Kwang-Il Kwon	<a href="https://orcid.org/0000-0002-5958-3752">https://orcid.org/0000-0002-5958-3752</a>
Hye-Young Lee	<a href="https://orcid.org/0009-0005-6831-6743">https://orcid.org/0009-0005-6831-6743</a>

## References

- Denoëud, F., Carretero-Paulet, L., Dereeper, A., Droc, G., Guyot, R., Pietrella, M., Zheng, C.F., Alberti, A., Anthony, F., Aprea, G., Aury, J.M., Bento, P., Bernard, M., Bocs, S., Campa, C., Cenci, A., Combes, M.C., Cruzillat, D., Da Silva, C., Daddiego, L., De Bellis, F., Dussert, S., Garsmeur, O., Gayraud, T., Guignon, V., Jahn, K., Jamilloux, V., Joët, T., Labadie, K., Lan, T.Y., Leclercq, J., Lepelley, M., Leroy, T., Li, L.T., Librado, P., Lopez, L., Muñoz, A., Noel, B., Pallavicini, A., Perrotta, G., Poncet, V., Pot, D., Priyono, Rigoreau, M., Rouard, M., Rozas, J., Tranchant-Dubreuil, C., VanBuren, R., Zhang, Q., Andrade, A.C., Argout, X., Bertrand, B., de Kochko, A., Graziosi, G., Henry, R.J., Jayarama, Ming, R., Nagai, C., Rounsley, S., Sankoff, D., Giuliano, G., Albert, V.A., Wincker, P., Lashermes, P., The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, **345**, 1181-1184 (2014).
- Ruas, P.M., Ruas, C.F., Rampim, L., Carvalho, V.P., Ruas, E.A., Sera, T., Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. *Genet. Mol. Biol.*, **26**, 319-327 (2003).
- Alonso-Salces, R.M., Serra, F., Reniero, F., Héberger, K., Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): Chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4224-4235 (2009).
- Kim, C.H., Kim, S.C., Song, E.Y., Shin, M.J., Lim, C.G., Specialty coffee cultivation. Rural Development Administration, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Jeju, Korea, pp. 1-97 (2020).
- Kim, S.A., Chung, S.W., An, H.J., Lim, C.K., Jeon, M.K., Jang, Y.J., Changes in morphology, total polyphenols, caffeine, and chlorogenic acid in bean of arabica coffee (*Coffea arabica*) during roasting. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **51**, 344-351 (2022).
- Grosso, G., Godos, J., Galvano, F., Giovannucci, E.L., Coffee, caffeine and health outcomes: an umbrella review. *Annu. Rev. Nutr.*, **37**, 131-156 (2017).
- Fuller, M., Rao, N.Z., The effect of time, roasting temperature, and grind size on caffeine and chlorogenic acid concentrations in cold brew coffee. *Sci. Rep.*, **7**, 17979 (2017).
- Bitter, N.Q., Fernandez, D.P., Driscoll, A.W., Howa, J.D., Ehleringer, J.R., Distinguishing the region-of-origin of roasted coffee beans with trace element ratios. *Food Chem.*, **320**, 126602 (2020).
- Borém, F.M., Cirillo, M.Â., de Carvalho Alves, A.P., dos Santos, C.M., Liska, G.R., Ramos, M.F., de Lima, R.R., Coffee sensory quality study based on spatial distribution in the Mantiqueira mountain region of Brazil. *J. Sens. Stud.*, **35**, e12552 (2020).
- de Mejia, E.G., Ramirez-Mares, M.V., Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends Endocrinol. Metab.*, **25**, 489-492 (2014).
- Król, K., Gantner, M., Tatarak, A., Hallmann, E., The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *Eur. Food Res. Technol.*, **246**, 33-39 (2020).
- Chung, D.M., Chung, Y.C., Chun, H.K., Spectrophotometric assay for determination of chlorogenic acid using green pigment formation and quantitative analysis of chlorogenic acid in blueberry leaf. *J. Life Sci.*, **21**, 610-612 (2011).
- Shi, H., Shi, A., Dong, L., Lu, X., Wang, Y., Zhao, J., Dai, F.,

- Guo, X., Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress. *Clin. Nutr.*, **35**, 1366-1373 (2016).
14. Kasai, H., Fukada, S., Yamaizumi, Z., Sugie, S., Mori, H., Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 467-471 (2000).
  15. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 933-956 (1996).
  16. Lee, J., Seo, K.I., Kim, M.J., Lee, S.J., Park, E.M., Lee, M.K., Chlorogenic acid enhances glucose metabolism and antioxidant system in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 774-781 (2012).
  17. Chen, Y., Zhao, Y., Wang, Y.J., Nazary-Vannani, A., Clark, C.C.T., Macit, M.S., Khani, V., Zhang, Y., The influence of green coffee bean extract supplementation on blood glucose levels: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother. Res.*, **34**, 2159-2169 (2020).
  18. Farias-Pereira, R., Oshiro, J., Kim, K.H., Park, Y.H., Green coffee bean extract and 5-O-caffeoylquinic acid regulate fat metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J. Funct. Foods*, **48**, 586-593 (2018).
  19. Kim, I.Y., Jung, S.Y., Kim, E.K., Yun, H.Y., Zhang, S.A., Ha, J.H., Jeong, Y.H., Physicochemical characteristics of El salvadoran *Coffea arabica* cv. Bourbon coffee extracts with various roasting conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **52**, 212-219 (2020).
  20. Shimoda, H., Seki, E., Aitani, M., Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complement. Altern. Med.*, **6**, 1-9 (2006).
  21. Zain, M.Z.M., Baba, A.S., Shori, A.B., Effect of polyphenols enriched from green coffee bean on antioxidant activity and sensory evaluation of bread. *J. King Saud Univ. Sci.*, **30**, 278-282 (2018).
  22. George, W.L. Jr., 2016. AOAC, official method 950.57. Arabinose, galactose, and xylose and other sugar in sugars and syrups. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th ed, Rockville, MD, USA, pp. 44.1.28.
  23. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2014. Certificate of functional ingredient: green coffee bean extract (No. 2014-31), Cheongju, Korea.
  24. George, W.L. Jr., 2016. AOAC, official method 957.04. Chlorogenic acid in green coffee. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th ed., Rockville, MD, USA, pp. 44.1.28.
  25. Vinson, J.A., Chen, X., Garver, D.D., Determination of total Chlorogenic acids in commercial green coffee extracts. *J. Med. Food.*, **22**, 314-320 (2019).
  26. De Luca, S., Ciotoli, E., Biancolillo, A., Bucci, R., Magri, A.D., Marini, F., Simultaneous quantification of caffeine and chlorogenic acid in coffee green beans and varietal classification of the samples by HPLC-DAD coupled with chemometrics. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **25**, 28748-28759 (2018).
  27. Shan, Y.Y., Jin, X., Cheng, Y., Yan, W.D., Simultaneous determination of chlorogenic acids in green coffee bean extracts with effective relative response factors. *Int. J. Food Prop.*, **20**, 2028-2040 (2017).