

## 전처리 방법에 따른 커피원두 중 polycyclic aromatic hydrocarbons 함량 분석

남혜정 · 서일원 · 신한승\*

동국대학교 식품공학과 및 Lotus 기능성식품소재연구소

### Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content in Coffee Beans with Different Preparation Method

Hejung Nam, Ilwon Seo, and Han-Seung Shin\*

Department of Food Science and Technology and Institute of Lotus Functional Food Ingredient, Dongguk University

**Abstract** This paper proposes an analytical method for determining amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs; benzo[*a*]anthracene, chrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, dibenzo[*a,h*]anthracene, benzo[*g,h,i*]perylene) in coffees beans. Soxhlet extraction and liquid/liquid extraction were tested for the quantification of seven PAHs. Soxhlet extraction was followed by cyclohexane extraction and used a silica cartridge. Liquid/liquid extraction was followed by *n*-hexane extraction and utilized a florisil cartridge. The extracts were analyzed by HPLC-fluorescence detection (FLD) with a Supelcosil LC-PAH column. The PAH recoveries ranged from 78.68 to 96.28% for the liquid/liquid extraction, and from 67.47 to 84.60% for the Soxhlet extraction.

**Key words:** coffee, polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[*a*]pyrene, saponification

## 서 론

Polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)는 탄수화합물이나 석탄, 나무, 기름 등과 같은 유기물질의 불완전 연소나 담배, 산불, 화산 등의 열분해에 의해 생성된다. 이러한 오염된 환경에 영향을 받은 식품 원료와 온도의 영향으로 식품 조리·가공과정 동안 탄수화물, 단백질, 지질 등이 분해되며 PAHs 화합물이 생성된다(1). 이러한 두 방식에 의한 오염은 식품 중의 PAHs 함량에 영향을 미치며 식품 중 낮은 농도의 PAHs도 인간에 발암 가능성의 원인 중 하나로(2) 우리나라에서 보통 식품을 통해 섭취하게 되는 1일 PAHs는 9.27 ng이며, 벤조피렌은 2.02 ng이다. 그러므로 식품에 의해 인간에게 노출된 PAHs의 총 함량을 평가하기 위한 정확하고 빠른 분석 방법을 확립해야 한다.

커피는 독특한 향과 맛을 지니고 있는 기호식품으로 꼭두서니과에 속하는 상록소 교목으로 커피의 품종은 16개로 나뉘어 있지만 상업적으로 재배하고 있는 품종은 아라비카종(*Coffea arabica*)과 로부스타종(*Coffea robusta*) 및 라이베리아종(*Coffea liberia*)의 3대 원종이 있다. 원두는 배합, 로스팅, 분쇄, 추출 과정을 거쳐 소비자들이 섭취하게 된다. 이러한 과정 중 커피 시료의 PAHs는 로스팅과정 동안에 형성된 것이거나 환경으로부터 오염된 원두로 보고되었다(3). 시판되는 원두 커피나 인스턴트 커피에 존재하는 benzo[*a*]pyrene의 농도는 <0.01-1.2 µg/kg 범위에 있으며 고

온 로스팅 된 커피에서는 22.7 µg/kg 이상의 농도가 나타났다(3-8). 몇몇 연구의 결과를 비교해보면 전처리과정에 따라 조금씩 다른 결과가 나타났다. 전처리과정에는 용매 추출(진탕·혼합 또는 Soxhlet 추출), 비누화(KOH-ethanol 용액), 액/액 추출법(cyclohexane 또는 hexane), 정제단계가 포함되어 있다. 본 실험에서 사용된 Soxhlet 추출법과 액/액 추출법의 두가지 방법도 각 단계별로 나누어 진행되었다. Garcia-Falcon등(1)은 7종류의 인스턴트 커피로 PAH의 빠른 검출과 clean up 단계의 최소화를 연구하였고 Houessou등(9-11)은 추출법, 비누화, clean up등의 시료 전처리 방법을 다르게 하여 분석한 결과를 발표하였다. Kayali-Sayadi등(12)은 비누화 과정 없이 내린 커피를 methanol과 섞어 clean up단계를 거친 후 분석하는 방법에 대하여 보고하였다. 커피 시료에서 PAHs 검출의 주요 문제점은 낮은 검출 수준과 잠재적 방해물질들의 변화이다. 로스팅 커피에 포함되어 있는 방해물질(지방질 등)들의 함량이 원두의 종류나 로스팅 조건에 따라 다르며, 전처리 방법에 따라 제거되는 수준도 다르므로 PAHs의 검출에 많은 영향을 줄 것으로 보인다. 이외에도 커피의 배전 정도에 따른 분석(13), 커피의 종류에 따른 이화학적 성분 및 GC에 의한 향기 성분 분석(14), 추출 수율에 관한 분석(15), 커피 보관 시 산패에 따른 향미 변화 분석(16) 등 커피에 대한 논문이 국내외적으로 발표되고 있으며 커피 이외에도 빵, 과일 및 채소류, 유지류 등 식품 중 PAHs에 대한 연구가 진행되었다(17-20). 본 연구는 Soxhlet 추출법과 액/액 추출법의 두 가지 전처리 방법에 따라 PAHs의 회수율을 확인하고 분석 방법을 확립하기 위하여 실행되었다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 기기

본 실험에서 사용된 커피는 robusta 품종으로 자연 건조된 cherry

\*Corresponding author: Han-Seung Shin, Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea  
Tel: 82-2-2260-8590  
Fax: 82-2-2260-8740  
E-mail: spartan@dongguk.edu  
Received January 2, 2009; revised February 17, 2009;  
accepted February 23, 2009

AB(screen 15) 인도산 원두를 선정하였으며 시료는 분쇄기(FM-909TI, Hanil Co., Seoul, Korea)로 분쇄하여 분석에 사용하였다. 시약(acetone, acetonitrile, ethanol, cyclohexane, *n*-hexane, water 등)은 HPLC용(Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA)을 사용하였다. 카트리지는 silica cartridge(Supelco, Bellefonte, PA, USA)와 florisil cartridge(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 수분 제거 목적으로 사용된 anhydrous sodium sulfate는 Merck(Merck, Darmstadt, Germany)사 제품을 사용하였으며 비누화에 사용된 potassium hydroxide(KOH)는 Sigma(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였다. PAHs 검출에 사용된 HPLC는 Dionex P680 series HPLC(Sunnyvale, CA, USA)를 형광검출기(FLD)는 Waters 474 scanning fluorescence detector(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였고, 컬럼은 Supelguard LC-18(Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 장착한 Supelcosil LC-PAH column(Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하여 분석하였다.

### 분석물질

분석대상물질은 benzo[*a*]anthracene, chrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, dibenzo[*a,h*]anthracene, benzo[*g,h,i*]perylene의 7종의 PAHs로 Fig. 1에 나타내었다. 3-methylcholanthrene은 내부표준물질로 Supelco(Supelco, Bellefonte, PA, USA)사 제품을 사용하여 acetonitrile에 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 조제하여 사용하였다.

### 표준검량곡선 작성

HPLC-fluorescence detector의 검량선 작성은 7종의 PAHs 혼합 표준용액을 사용하여 acetonitrile로 정용하여 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  농도로 조제한 후 이를 희석하여 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 혼합표준용액을 조제하였다. 조제한 혼합표준용액은 농도 별로 분석하여 검량선을 작성하였다.

### Soxhlet 추출방법

원통 여과지에 시료 15 g과 acetone 200 mL을 넣고 내부표준물질(30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 1 mL을 첨가하여 65°C 이하 수욕상에서 6시간(30 min per cycle)동안 Soxhlet 추출한 후 35°C 이하 수욕상에서 감압 농축하였다. 농축한 잔여물에 ethanol 25 mL에 KOH 1.5 g를 녹인 용액을 더해 80°C이하 수욕상에서 40분 동안 환류·냉각시켰다. 방냉시킨 후 cyclohexane 100 mL을 더해 5분 정도 환류·냉각하

였다. 방냉시킨 후 분액깔때기로 옮겨 증류수 100 mL를 더해 5분간 진탕·혼합하였다. 혼합액은 하루 동안 방치하여 두 층으로 분리되도록 한 후 에멀전층에 ethanol 25 mL을 더해 물층은 버리고 유기층에 증류수 100 mL를 더해 세척하는 과정을 세 번 반복하였다. 세척과정을 마친 유기층은 무수황산나트륨 10 g으로 탈수·여과하여 35°C이하 수욕상에서 약 1 mL로 감압 농축하였다. Silica cartridge(Supelclean LC-Si, 1 g)는 cyclohexane 5 mL로 활성화 시킨 후 농축액을 가하여 유출시킨 후 cyclohexane을 5 mL씩 네 번에 나누어 용출시켰다. 용출된 액은 35°C이하 수욕상에서 질소가스로 농축하여 잔여물을 acetonitrile에 녹여 전량을 1 mL이 되도록 하고 최종 검체는 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과하여 사용하였다.

### Liquid/liquid 추출방법

Flask에 시료 10 g과 내부표준물질(30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 1 mL을 더하고 1 M KOH·ethanol 100 mL을 넣어 80°C이하 수욕상에서 3시간 동안 추출하였다. 냉각시킨 후 *n*-hexane 50 mL을 넣고 ethanol:*n*-hexane(1:1) 50 mL을 이용하여 분액깔때기(I)로 옮기고 증류수 50 mL을 넣어 진탕·혼합하였다. 물층과 *n*-hexane층으로 분리하여 다른 분액깔때기(II)로 옮긴 후 물층에 *n*-hexane 50 mL로 두 번 더 추출하여 *n*-hexane층을 모두 합친다. *n*-hexane층은 증류수 50 mL로 세 번 세척한 후 무수황산나트륨 약 10 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수·여과한 후 35°C이하 수욕상에서 약 1 mL로 농축하였다. Florisil cartridge는 dichloromethane 10 mL과 *n*-hexane 20 mL으로 활성화 시킨 후 사용하였다. 활성화 된 카트리지에 위에 농축액을 가하여 유출시킨 후 *n*-hexane 10 mL과 *n*-hexane:dichloromethane(3:1) 8 mL로 용출시켜 35°C이하 수욕상에서 질소 농축하여 잔여물을 acetonitrile 1 mL에 녹인 후 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 진행된 실험의 두 가지 전처리 방법은 Fig. 2에 정리하였다.

### HPLC/FLD

PAHs 분석은 HPLC-FLD로 Dionex P680 series HPLC를 사용하였고 Waters 474 scanning fluorescence detector를 통하여 검출하였다. 컬럼은 Supelguard LC-18(Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 장착한 Supelcosil LC-PAH column(25 cm×4.6 mm, I.D. particle size 5  $\mu\text{m}$ )을 사용하였다. 용매 A는 acetonitrile, 용매 B는 water를 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다.

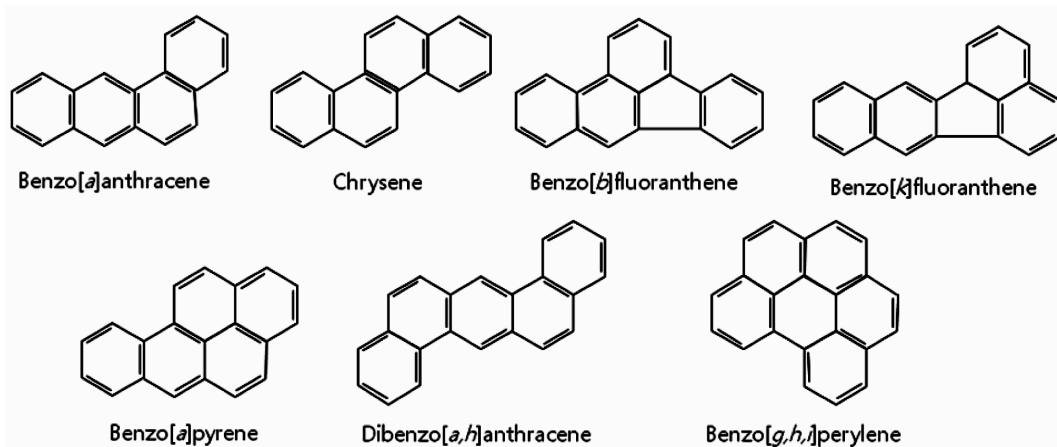


Fig. 1. Structures of 7 PAHs in roasted coffee.

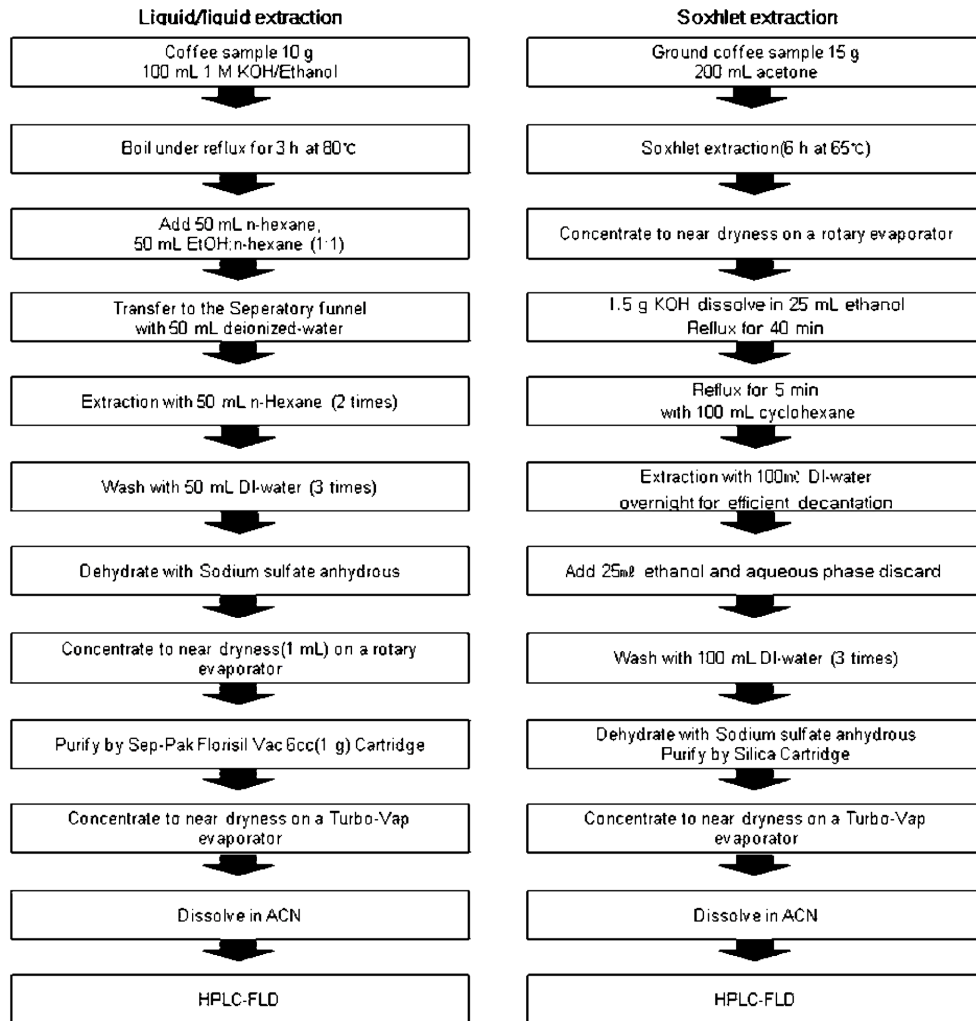


Fig. 2. Flow diagram of PAHs analysis in coffee beans.

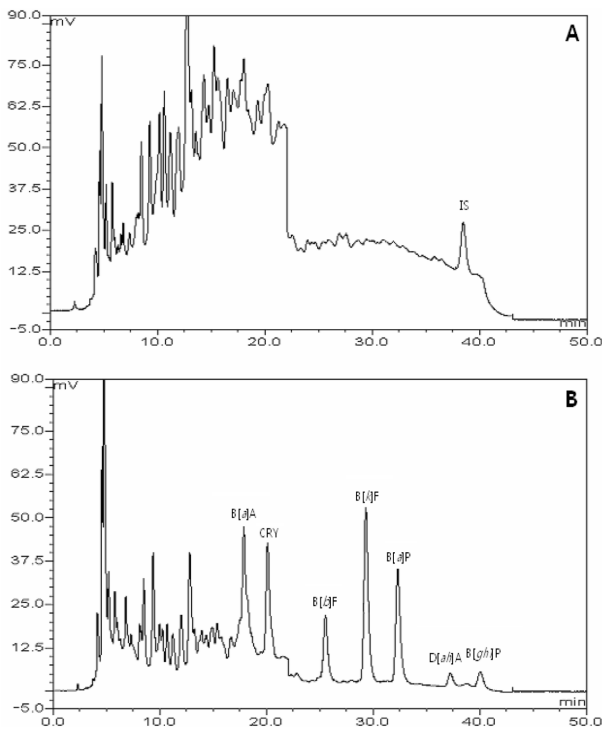
Table 1. Operating condition of HPLC/fluorescence detector

Instrument	Dionex P680 series HPLC		
Column	Supelcosil LC-PAH column (25 cm × 4.6 mm, I.D. particle size 5 μm)		
Flow rate	0.8 mL/min		
Solvent system		Acetonitrile(%)	H <sub>2</sub> O(%)
	0 min	80	20
	31 min	100	0
	41 min	100	0
	43 min	80	20
50 min	80	20	
Injection volume	20 μL		
Instrument	Waters 474 scanning Fluorescence Detector		
Wavelength (Ex/Em)	0-22 min	254 nm/390 nm	
	22-43 min	254 nm/420 nm	
	43-50 min	269 nm/498 nm	

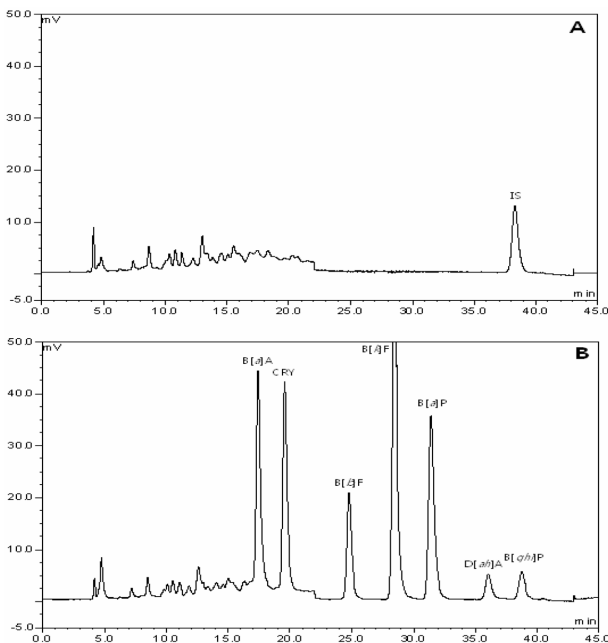
### 결과 및 고찰

본 실험은 PAHs 검출 시 국내에서 주로 사용되는 액/액 추출법과 Soxhlet 추출법을 이용하여 진행하였다. Soxhlet 추출법은

Soxhlet 추출과정 후에 비누화를 시켜 clean up 단계를 거쳐 분석을 하였으며, 액/액 추출법은 먼저 비누화를 시킨 후 n-hexane을 이용하여 추출하고 clean up 단계를 거쳐 분석을 하였다. Clean up 단계에서 사용한 SPE cartridge로 Soxhlet 추출법에서는 silica cartridge를 사용하였고, 액/액 추출법에서는 florisil cartridge를 사용하였다. PAHs를 효과적으로 정제하기 위해 두 전처리 방법에서 각각 극성인 florisil cartridge와 silica cartridge를 사용하였다. florisil cartridge에 비하여 조금 더 비극성인 silica cartridge가 전체적인 용출속도가 느리므로 짧은 시간에 효과적으로 분리, 정제하기에는 florisil cartridge가 더 효과적이다. 이러한 과정의 결과 7종 PAHs 총 회수율은 액/액 추출법과 Soxhlet 추출법 각각 77.08%, 74.25%로 바로 비누화시킨 후 액/액 추출법을 이용하여 전처리 한 방법의 회수율이 다소 높았으며, Soxhlet 추출법과 같은 여러 단계의 전처리 과정을 거치게 되며 생기는 손실과 전처리 과정에 소비되는 시간을 줄일 수 있었다. 원두를 분쇄하여 7종의 PAHs 표준물질과 내부표준물질(3-Methylcholanthrene) 표준용액을 시료에 첨가하고 Soxhlet 추출법과 액/액 추출법의 두 가지 방법으로 전처리하여 얻은 크로마토그램은 각각 Figs. 3, 4와 같다. 원두 시료를 액/액 추출법과 Soxhlet 추출법으로 전처리 한 후 분석하여 얻은 결과는 Table 2에 나타내었다. 실험방법의 회수율 평가를 위해 커피시료에 내부표준물질(IS)과 standard 물질을 직접 spike한 후 Soxhlet 추출법과 액/액 추출법으로 각각 전



**Fig. 3.** HPLC/FLD Chromatogram of PAHs using Soxhlet extraction. A, unspiked sample; B, spiked sample; IS (Internal standard), 3-methylcholanthrene; B[a]A, benzo[a]anthracene; CRV, chrysene; B[b]F, benzo[b]fluoranthene; B[k]F, benzo[k]fluoranthene; B[a]P, benzo[a]pyrene; D[a,h]A, dibenzo[a,h]anthracene; B[g,h,i]P, benzo[g,h,i]perylene.



**Fig. 4.** HPLC/FLD Chromatogram of PAHs using Liquid/liquid extraction. A, unspiked sample; B, spiked sample; IS (Internal standard), 3-methylcholanthrene; B[a]A, benzo[a]anthracene; CRV, chrysene; B[b]F, benzo[b]fluoranthene; B[k]F, benzo[k]fluoranthene; B[a]P, benzo[a]pyrene; D[a,h]A, dibenzo[a,h]anthracene; B[g,h,i]P, benzo[g,h,i]perylene.

**Table 2.** Recovery of 7 PAHs spiked in coffee beans

	Liquid/liquid extraction		Soxhlet extraction	
	Recovery(%)	RSD <sup>a)</sup> (%)	Recovery(%)	RSD <sup>a)</sup> (%)
B[a]A	93.78	3.01	81.90	5.71
Chrys	96.28	0.78	84.60	1.75
B[b]F	86.65	2.50	71.81	7.79
B[k]F	87.81	0.61	70.07	0.91
B[a]P	83.61	1.57	75.51	2.42
DB[a,h]A	89.83	2.16	67.47	0.66
B[g,h,i]P	78.68	4.20	68.37	6.40

<sup>a)</sup> Relative standard deviation

처리하여 내부표준물질(IS)의 회수율과 standard의 회수율을 비교 하였을 때 7종 PAHs 각각의 회수율은 Soxhlet 추출법에 비하여 액/액 추출법으로 전처리 한 것에서 모두 높게 나타났으며, 액/액 추출법으로 전처리 한 7종의 PAHs 회수율은 78.68-96.28%을 보였고, 상대표준편차(RSD)는 0.61-4.20%를 보였다. 전체 7종의 PAHs 중에 Chrys 회수율은 96.28%로 표준물질 중에 가장 높았으며 B[g,h,i]P 회수율은 78.68%로 가장 낮았다. Soxhlet 추출법으로 전처리 한 PAHs의 회수율은 67.47-84.60%로 나타났고 상대 표준편차(RSD)는 0.66-7.79%였다. 액/액 추출법에서와 같이 Chrys 회수율이 84.60%로 가장 높았으며, DB[a,h]A는 67.47%로 가장 낮은 회수율을 보였다. 내부표준물질을 첨가하여 얻은 회수율 결과는 액/액 추출법이 72.97%, Soxhlet 추출법이 78.87%로 많은 차이를 보이진 않았지만 표준물질의 회수율과는 다르게 Soxhlet 추출법의 회수율이 조금 높게 나타났다. 내부표준물질은 DB[a,h]A와 B[g,h,i]P 사이에 나타나므로 두 peak와 겹쳐져 회수율의 변화를 줄 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과로 액/액 추출법을 이용한 방법이 Soxhlet 추출법에 비하여 PAHs를 검출하는데 다소 효율적일 것으로 생각된다.

## 요 약

원두커피의 PAHs 분석을 위한 시료 전처리는 Soxhlet 추출법과 액/액 추출법 두 가지로 하였다. 두 방법의 간단한 모식도는 Fig. 2을 통해 나타내었다. Soxhlet 추출법을 이용하여 추출한 후 비누화시켜 SPE cartridge로 silica cartridge를 사용하여 효과적으로 정제하였으며, 액/액 추출법은 먼저 비누화를 시킨 후 *n*-hexane을 이용하여 추출하고 florisil cartridge로 clean up 시킨 후 각각 HPLC-FLD를 사용하여 분석하였다. 이러한 두 가지 방법으로 진행된 실험의 결과 90% 이상의 회수율을 보인 것은 액/액 추출법의 B[a]A, Chrys이었고, 80% 이상의 회수율을 보인 것은 액/액 추출법의 B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A와 Soxhlet 추출법의 B[a]A, Chrys으로 나타났으며, 그 외에는 약 70% 정도의 회수율을 나타내었다. 7종의 총 PAHs 회수율은 각각 Soxhlet 추출법은 74.25%이고 액/액 추출법 77.08%로 많은 차이를 보이진 않았지만 액/액 추출법이 더 높은 회수율을 나타내었다. 두 방법 모두에서 Chrys의 회수율이 가장 높았으며, 두 가지 방법을 비교하여 실험한 결과 많은 차이를 보이지는 않았지만 Soxhlet 추출법보다 액/액 추출법이 전처리에 소비되는 시간을 줄일 수 있었으며 또한 액/액 추출법에서 표준물질의 회수율도 높게 나타났다.

## 문 헌

1. Garcia-Falcon MS, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J. Minimal

- clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. *Food Chem.* 90: 643-647(2005)
2. Lai JP, Niessner R, Knopp D. Benzo[a]pyrene imprinted polymers: Synthesis, characterization, and SPE application in water and coffee samples. *Anal. Chem. Acta.* 522: 137-144 (2004)
  3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington, DC, USA (1995)
  4. Tamakawa K, Kato T, Oba M. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Vol. 2, pp. 1641-1663, In: *Handbook of Food Analysis*. 1<sup>st</sup> ed. Nollet LML, (ed). Dekker, New York, NY, USA (1996)
  5. Maier HG. Carcinogenic compound content in coffee bean. *Cafe Cacao The.* 35: 133-142 (1991)
  6. Ruschenburg U, Jahr D. Benzo[a]pyrene contents of coffee and some other food products. *Cafe Cacao The.* 30: 7-10 (1986)
  7. Kruijf N, Schouten A, Van der Stegen GHD. Occurrence of benzo[a]pyrene in roasted coffee, instant coffee and coffee brew. *Cafe Cacao The.* 31: 151-154 (1987)
  8. Kruijf N, Schouten T, Van der Stegen GHD. Rapid determination of benzo[a]pyrene in roasted coffee and coffee brew by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agr. Food Chem.* 35: 545-549 (1987)
  9. Houessou JK, Delteil C, Camel V. Investigation of sample treatment steps for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in ground coffee. *J. Agr. Food Chem.* 54: 7413-7421 (2006)
  10. Houessou JK, Benac C, Delteil C, Camel V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew using solid-phase extraction. *J. Agr. Food Chem.* 53: 871-879 (2005)
  11. Houessou JK, Maloug S, Leveque AS, Delteil C, Heyd B, Camel V. Effect of roasting conditions on the polycyclic aromatic hydrocarbon content in ground arabica coffee and coffee brew. *J. Agr. Food Chem.* 55: 9719-9726 (2007)
  12. Kayali-Sayadi MN, Rubio-Barroso S, Cuesta-Jimenez MP, Polo-Diez LM. A new method for the determination of selected PAHs in coffee brew samples by HPLC with fluorimetric detection and solid-phase extraction. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 22: 615-627 (1999)
  13. Clarke RJ, Macrae R. Coffee: technology. Vol. 2: pp. 73-107. In: *Roasting and grinding*. Clarke RJ. (ed). Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London, UK (1989)
  14. Moon JW, Cho JS. Changes in flavor characteristics and shelf-life of roasted coffee in different packaging conditions during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 441-447 (1999)
  15. Gi KH. Analysis of the aroma compounds and compare the result with sensory evaluation score by roasting time. MS. thesis, Hanyang University, Seoul, Korea (1987)
  16. Baik HJ, Ko YS. Headspace gas chromatographic analysis and sensory evaluation of various domestic and foreign-made commercial roasted and ground coffee. MS thesis, Hanyang University, Seoul, Korea (1986)
  17. Rey-Salgueiro L, Garcia-falcon MS, Martinez-Carballo E, Simal-Gandara J. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chem.* 108: 607-615 (2008)
  18. Hu SJ, Oh NS, Kim SY, Lee HM. Determining of polycyclic aromatic hydrocarbons in domestic vegetables and fruits. *Anal. Sci. Tech.* 19: 415-421 (2006)
  19. Hu SJ, Woo GJ, Choi DM. Determination of benzo[a]pyrene in olive oils. *Anal. Sci. Tech.* 20: 170-175 (2007)
  20. Teixeira VH, Casal S, Oliveira MBPP. PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chem.* 104: 106-112 (2007)