

HPLC를 이용한 차와 커피에 함유된 카페인 함량 조사와 카페인이 흰 쥐의 행동에 미치는 영향 연구

안정화^{1,†} · 마히트비밋^{1,†} · 이병요¹ · 박우규² · 권광일^{1*}

¹충남대학교 약학대학, ²한국화학연구원 약리활성연구센터

(2012년 4월 3일 접수 · 2012년 6월 15일 수정 · 2012년 6월 18일 승인)

Evaluation of the Caffeine Contents in Tea and Coffee by HPLC and Effect of Caffeine on Behavior in Rats

Jung-hwa An^{1,†}, Bimit Mahat^{1,†}, Byung-yo Lee¹, Woo-kyu Park², and Kwang-il Kwon^{1,*}

¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea

²Pharmacology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, Korea

(Received April 3, 2012 · Revised June 15, 2012 · Accepted June 18, 2012)

Different studies have been conducted regarding caffeine as psychostimulant drugs and its effects as well as determination in various materials. Since, coffee and tea are most drinkable beverage in the world and their major constituent is caffeine. So, analysis of the effect of equal amount of caffeine in coffee and tea with respect to SD rats was studied. The present methodology was purposed to determine and validate caffeine amount in different brands of coffee and tea, and canvass locomotor and behavioral patterns of SD rats after administrating coffee and tea orally consisting of same amount of caffeine (10, 30 mg/kg). Determination of caffeine in different brands of coffee and tea and validation of caffeine were evaluated using HPLC. Depending upon different brands of tea and coffee, caffeine amount was altered. Meanwhile, amount of caffeine in tea was directly proportional to the temperature of liquid. Coffee and tea (Instant Maxim original coffee[®] and earl grey black tea[®]) consisting 10, 30 mg/kg of caffeine were studied in SD rats for locomotor activity and behavioral patterns using Tru Scan 99. The locomotor activities of SD rats were increased after administration of coffee and tea consisting caffeine compared to water. The coffee consisted of higher amount of caffeine exhibited steep movement of SD rats. Similarly, rearing and scratching of SD rats as frequency and duration were increased in coffee and tea consisting caffeine compared with water. The study revealed that coffee and tea had effects in locomotor activity and behavioral patterns of SD rats.

□ Key words - caffeine, coffee, tea, HPLC, locomotor activity

커피는 가장 많이 거래되는 작물 음료 중 하나이고, 차는 물 다음으로 많이 소비되는 음료이다.^{1,2)} 카페인은 커피와 차에 함유된 주 성분 중 하나로,³⁾ 세계적으로 가장 널리 소비되는 흥분제이며 커피와 차 뿐만 아니라 소다음료, 초콜릿, 의약품 등에 광범위하게 함유되어 있다.⁴⁾

사람들이 카페인을 섭취하는 이유는 다양하며, 흔히 카페인은 사람들의 에너지 상태에 영향을 끼친다고 생각된다.⁵⁾ 카페인은 고전적 흥분제인 코카인, 암페타민처럼 운동활성, 각성, 강화효과와 같은 행동적 효과를 나타내고,⁶⁾ 피로를 감

소시키는 효과가 있는 반면에 수면 방해를 가져온다. 심혈관계에 대한 영향으로는 수축기 혈압의 증가를 가져오지만, 이는 일시적인 효과이며 장기간 섭취에 따른 영향은 없는 것으로 보인다. 위장관계에 대한 영향으로는 위산 분비를 증가시키는 것에 직접적인 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 또한 일반적으로 카페인을 섭취하는 사람이 카페인을 섭취하지 않게 되면 두통, 우울증, 불안, 피로와 같은 금단증상을 나타낸다.⁷⁾

일반 성인의 경우에는 카페인의 반감기가 2~5시간 정도이나, 임신한 여성에게서는 반감기가 10.5시간까지 증가된다. 반감기가 증가됨에 따라 체내 카페인의 양이 증가하게 되고, 이로 인해 적은 양의 카페인을 섭취한다 할지라도 많은 양의 카페인을 섭취할 때 나타나는 부작용이 쉽게 나타날 수 있다.⁸⁾ 또한 임신 중 지나친 카페인의 섭취는 저체중아 출산

Correspondence to : 권광일

대전광역시 충남대학교 약학대학

Tel: +82-42-821-5937, Fax: +82-42-823-6781

E-mail: kwon@cnu.ac.kr

[†]두 저자는 동등하게 본 논문에 공헌하였음.

또는 자궁 내 성장지체의 위험을 증가시킬 수 있으므로, 임산부의 여성은 카페인의 섭취에 주의를 기울일 필요가 있다.⁹⁾ 또한 모유 수유를 하는 여성이 섭취한 카페인은 모유로 이행하게 되므로, 카페인을 섭취하는 여성에게 장기간 동안 모유 수유를 받은 유아들은 카페인의 대사능력이 떨어져 많은 양의 카페인이 축적될 가능성이 있다.¹⁰⁾

최근에는 커피전문점의 증가와 생활패턴 변화에 따라 카페인 함유 기호식품의 소비가 증가하고 있어 카페인 섭취와 관련해 관심이 증가하고 있다.¹¹⁾ 우리가 즐겨 찾는 카페인 함유 기호식품에는 카페인 함량에 대한 정보가 제공되지 않고 있으므로, 본 연구에서는 HPLC 분석을 통한 커피와 차의 카페인 함량조사를 하고자 한다. 이와 더불어 차의 침출 시간과 침출온도에 따라 변화되는 카페인의 함량을 측정하여 합리적인 음용방법의 정보를 제공하고자 한다.

또한 차 잎 중에는 커피에 함유되어 있지 않은 카테킨(catechin)과 테아닌(theanine) 성분이 함유되어 있어 이를 통해 카페인의 흡수가 저해되고 생리적 작용이 억제될 것으로 기대되며,¹²⁾ 이에 따른 카페인의 행동에 대한 효과에 관한 연구가 필요하다.¹³⁾ 이에 실제 시판중인 커피와 차를 이용하여 동일한 양의 카페인을 함유한 커피와 차를 흰 쥐에게 경구 투여 후 운동량 측정과 특정행동 관찰을 통해 카페인의 행동에 대한 효과를 관찰하고, 카페인의 농도가 증가됨에 따라 그 효과가 달라지는지를 살펴보고, 차와 커피 사이에 효과의 차이가 있는지를 비교해 보고자 한다.

시험방법

카페인 함량 분석

재료 및 시약

카페인 함량 분석에 사용된 재료는 티백홍차 3품목, 티백녹차 1품목, 티백국화차 1품목, 캔홍차 1품목, 캔녹차 1품목, 캔우롱차 1품목, 가루홍차 1품목, 커피믹스 6품목, 인스턴트커피 1품목으로 총 9종 16품목이었다. 시약으로는 카페인 표준품은 순도 99%의 Sigma-Aldrich 사(USA) 제품을 사용하였고, 내부표준물질로 사용한 아세트아미노펜 표준품은 순도 $\geq 99\%$ 의 Sigma-Aldrich 사(USA) 제품을 사용하였다. Methanol은 Merck사(Germany)의 HPLC 등급을 사용하였고, phosphoric acid는 85%의 Samchun Pure Chemical 사(Korea) 제품을 사용하였으며, water는 증류수를 사용하였다.

카페인 표준용액의 조제 및 검량선 시료 조제

카페인 표준품을 증류수에 용해시켜 5 mg/ml 용액을 만들고, 동일 용매로 계열 희석하여 50, 250, 500, 1000, 2500, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 표준용액을 제조하였다. 탈카페인 커피 160 μl 에 250, 500, 1000, 2500, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 의 카페인 표준용액을 40 μl 씩을 각각 정확히 가하여 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 표준커피시료를 만들었다. 마찬가지로 카페인이 함유되

지 않은 국화차 160 μl 에 50, 250, 500, 1000, 2500 $\mu\text{g/ml}$ 의 카페인 표준용액을 40 μl 씩을 각각 정확히 가하여 10, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 표준차시료를 만들었다. 커피의 카페인 검량선 작성을 위해 제조한 표준커피시료 200 μl 에 증류수를 가하여 50배 희석하였다. 이 용액 1 ml에 아세트아미노펜(50 $\mu\text{g/ml}$, 내부표준물질) 1 ml를 정확히 가한 후 교반하였다. 마찬가지로 차의 카페인 검량선 작성을 위해 제조한 표준차시료 200 μl 에 증류수를 가하여 20배 희석하였다. 이 용액 1 ml에 아세트아미노펜 1 ml를 정확히 가해 교반하였다. 최종적으로 0.45 μm 필터(Uniflo RC, 13 mm syringe filters, Whatman, UK)로 여과한 후 50 μl 를 취하여 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 카페인의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였다.

시료의 전처리 과정

카페인 시료샘플의 양은 실제 음용하는 상태로의 카페인 함량을 분석하기 위하여 티백차는 1티백, 가루홍차는 18.0 g, 1회용 봉지로 포장된 커피믹스는 1봉지, 인스턴트커피는 2.0 g으로 하였으며, 캔 음료는 그대로 사용하였다. 각 시료에 대하여 티백 차는 80°C의 물 100 ml에 5분간 침출하고, 가루홍차는 80°C의 물 100 ml에 용해하였다. 커피믹스와 인스턴트커피는 80°C의 물 100 ml에 용해하였다. 각 시료를 200 μl 취하여 검량선 작성 방법과 동일한 방법으로 전처리한 후 HPLC에 주입하였다.

카페인의 HPLC 분석조건

전처리된 시료는 다음의 HPLC 조건에서 정량하였다. 장치로는 Shimadzu 10 AVP사(Japan)의 HPLC를, 검출기로는 UV detector(275 nm)를, column은 C18u Bondapak(4.6 mm i.d. \times 150 mm; 10 μm)을 사용하여 처리한 샘플을 분석하였다. Column의 온도는 항상 30°C로 유지하였고, 데이터 처리장치로는 Shimadzu사의 CLASS-VP를 사용하였다. 이동상으로는 0.1% phosphoric acid : methanol(65:35 v/v) 혼합용액을 사용하였고, 유속 1 ml/min에서 정량하였다.

밸리데이션 항목

밸리데이션 항목으로 직선성, 일내(intra-day) 정확성 및 정밀성, 일간(inter-day) 정확성 및 정밀성, 회수율의 4가지 항목으로 나누어 평가하였다. 최저정량한계는 분석물질의 반응이 공시료의 반응과 비교할 때 최소 5배 이상이 되도록 설정하였다. 표준커피시료의 경우 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 5농도, 표준차시료의 경우 10, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 5농도에 대하여 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내 정확도와 정밀도(CV %)를 구하였고, 3일간 실험을 반복 수행하여 일간 정확도와 정밀도(CV %)를 구하였다. 또한 표준커피시료의 경우 50, 200, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 3농도, 표준차시료의 경우 10, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 3농도를 이용하여 회수율을

측정하였다.¹⁴⁻¹⁶⁾

침출조건의 변화

차를 끓여먹는 물의 온도와 시간에 따라 용출되는 카페인의 양을 비교하고자 차를 대상으로 침출온도와 침출시간을 100°C/10 min, 100°C/5 min, 80°C/5 min, 60°C/5 min으로 변화시켜 용출된 카페인을 분석하였다. 이 때 차의 종류는 중국녹차, 억수설록차, 만수설록차 세 가지로 하였으며 샘플의 양은 1 g, 물의 양은 200 ml로 하였다.

카페인이 행동에 미치는 영향

실험동물

실험동물은 SD male rat 7주령으로 ORIENTBIO 사(Korea)에서 구매하였고, 일주일 정도 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 총 35마리로 각 cage 당 5마리씩 넣어 두었으며, 물과 사료를 자유롭게 섭취하게 하였다. 실험 전 날 저녁부터 절식시켰으며, 실험 시 체중은 191~227 g이었다.

투여 시료 제조

실험동물에게 경구 투여된 표준커피시료는 동서식품(Korea)의 ‘맥심 오리지날’ 인스턴트 커피를 사용하였고, 표준차시료는 Twinings 사(UK)의 ‘earl grey black tea’를 사용하였다. 10 mg/kg과 30 mg/kg의 카페인을 함유한 표준커피시료와 표준차시료를 만들기 위해 250 g 동물에게 0.8 ml가 투여되도록 설계하였으며, 그 결과 각각 카페인의 농도가 2.5 mg/0.8 ml, 7.5 mg/0.8 ml가 함유되도록 하였고, 이를 HPLC로 확인하였다. 위와 같은 농도의 시료를 만들기 위해 사용된 최종적인 방법은 다음과 같다. 10 mg/kg과 30 mg/kg의 카페인을 함유한 표준커피시료를 만들기 위해 각각 2 g, 6 g의 커피를 100°C의 물 50 ml에 용해시켰다. 10 mg/kg의

카페인을 함유한 표준차시료를 만들기 위해, 100°C의 물에 11개의 티백을 10분간 추출시킨 후 티백을 최대한 짜내고 55±2°C에서 3분간 끓였다. 30 mg/kg의 카페인을 함유한 표준차시료를 만들기 위해, 100°C의 물에 11개의 티백을 10분간 추출시킨 후 티백을 최대한 짜내고 55±2°C에서 8분간 끓였다. 시료의 투여량은 동물의 무게에 따라 조절되었다.

실험절차

카페인이 실험동물의 운동에 미치는 영향을 측정하기 위해 사용된 동물은 물(대조그룹), 차 10 mg/kg, 30 mg/kg, 커피 10 mg/kg, 30 mg/kg의 5그룹으로 나누었고, 한 그룹 당 동물의 수는 7마리로 하였다. 동물은 실험 전 챔버에서 30분 동안 적응시간을 거친 후, 시험물질을 경구투여 받았다. 경구투여 직후, 챔버에 다시 넣고 5분 후부터 90분 동안 운동량을 측정하였다. 실험동물의 운동량을 측정하기 위해 사용된 장치는 Tru Scan 99로 Coulbourn Instruments 사(USA)의 제품이었다. 이 장치는 적외선 센서링이 설치되어 있고, 0.76 cm의 공간분해능으로 빛을 깨트리는 수를 감지하여 전기기록기에 기록된다. 동물이 움직인 거리는 TruScan software(Coulbourn Instruments)에 의해 계산되었다.¹⁷⁾

동시에 특정행동 측정을 위해, 90분을 20분 간격으로 나누어 각 20분 간격의 처음 10분과 마지막 10분을 더해 총 50분 동안 관찰하였다. 특정행동에서는 ‘뚝바로 서기(rearing)’와 ‘긁기(scratching)’를 관찰하였으며, ‘뚝바로 서기’는 뒷발을 바닥에 댄 채로 앞발을 들어올려 몸이 수직상태로 되는 것으로 하였으며, ‘긁기’는 앞발 또는 뒷발을 이용하여 신체 부위를 만지는 것으로 하였다.¹³⁾ 관찰하는 동안 빈도와 지속시간을 측정하여 기록하였다.

통계분석

운동량과 특정행동 실험결과에 대한 통계분석은 Microsoft

Table 1. Intraday and interday precision, accuracy, and recovery for caffeine in coffee and tea (mean±SD, n=3)

Added caffeine (µg/ml)	Intraday (n=3)			Interday (n=3)			Recovery (%)	
	Measured (µg/ml)	CV (%)	Accuracy (%)	Measured (µg/ml)	CV (%)	Accuracy (%)		
Coffee	50	54.7±0.6	14.7	109.4±1.1	47.6±0.5	11.4	95.3±0.9	93.4±11.7
	100	111.7±3.3	5.3	111.7±3.3	113.2±9.2	12.2	112.4±9.2	Nt*
	200	187.3±18.4	13.5	93.7±9.2	185.8±3.9	2.8	92.9±1.9	98.2±11.3
	500	490.3±16.9	3.8	98.1±3.3	500.4±10.4	2.3	100.1±2.1	Nt*
	1000	1005.9±16.1	1.7	100.6±1.6	933.9±17.9	1.9	99.4±1.8	101.9±5.1
Tea	10	11.2±0.6	8.6	113.3±5.9	10.7±0.8	9.5	107.3±7.7	115.2±6.3
	50	50.1±3.4	9.2	100.6±6.7	46.8±4.2	13.1	105.9±10.4	Nt*
	100	90.6±5.2	6.9	90.8±5.3	100.6±14.0	14.9	100.6±13.1	97.6±6.8
	200	180.1±12.7	7.7	90.5±12.7	181.1±19.9	11.5	90.5±9.9	Nt*
	500	509.1±7.6	1.5	101.7±1.5	507.1±0.6	0.2	101.5±0.2	101.9±1.9

*Nt; Not tested.

Office Excel 2007을 사용하여 독립표본 t검정으로 분석하였다.

결 과

카페인 함량 분석

밸리테이션

커피와 차에 함유된 카페인의 HPLC 분석법에 사용된 검량선의 농도 범위는 표준커피시료가 50-2500 µg/ml, 표준차시료가 10-500 µg/ml이었다. 검량선의 농도는 피크 면적비(카페인의 피크 면적/내부표준물질의 피크 면적)로 계산하였고 최소제곱법을 이용하여 회귀직선식을 구하였다. 실험을 통해 얻어진 표준커피시료와 표준차시료의 검량선은 각각 $y=0.0012x-0.0544$, $y=0.0031x-0.0413$ 이었으며, r^2 은 각각 0.9987, 0.9944로 직선성을 확인할 수 있었다. 최저정량한계는 표준커피시료의 경우 50 µg/ml, 표준차시료의 경우 10 µg/ml로 설정하였다.

일내 정확성과 정밀성은 검량선 작성 농도 범위에서 5농도에 대해 각각 하루 동안에 3세트를 작성하여 구하였고, 일간 정확성과 정밀성은 검량선 작성 농도 범위에서 5농도에 대해 각각 3일 동안 1세트씩 작성하여 구하였다. 표준커피시료에 함유된 카페인의 일내, 일간 밸리테이션에서 정확도의 평균 범위는 각각 93.7~111.7%, 92.9~112.4%이었고, 정밀도는 각각 1.7~14.7%, 1.9~12.2%이었다. 표준차시료에 함유된 카페인의 일내, 일간 밸리테이션에서 정확도의 평균 범위는 각각 90.5~113.3%, 90.5~107.3%이었고, 정밀도는 각각 1.5~9.2%, 0.2~14.9%이었다(Table 1).

마지막으로 표준커피시료와 표준차시료에 함유된 카페인의 회수율은 각각 3농도에 대해 실험하였으며, 그 결과 93.4~101.9%, 97.6~115.2%로 양호한 결과를 나타내었다(Table 1).

커피와 차의 카페인 함량

크로마토그램에서 아세트아미노펜(내부표준물질)과 카페인

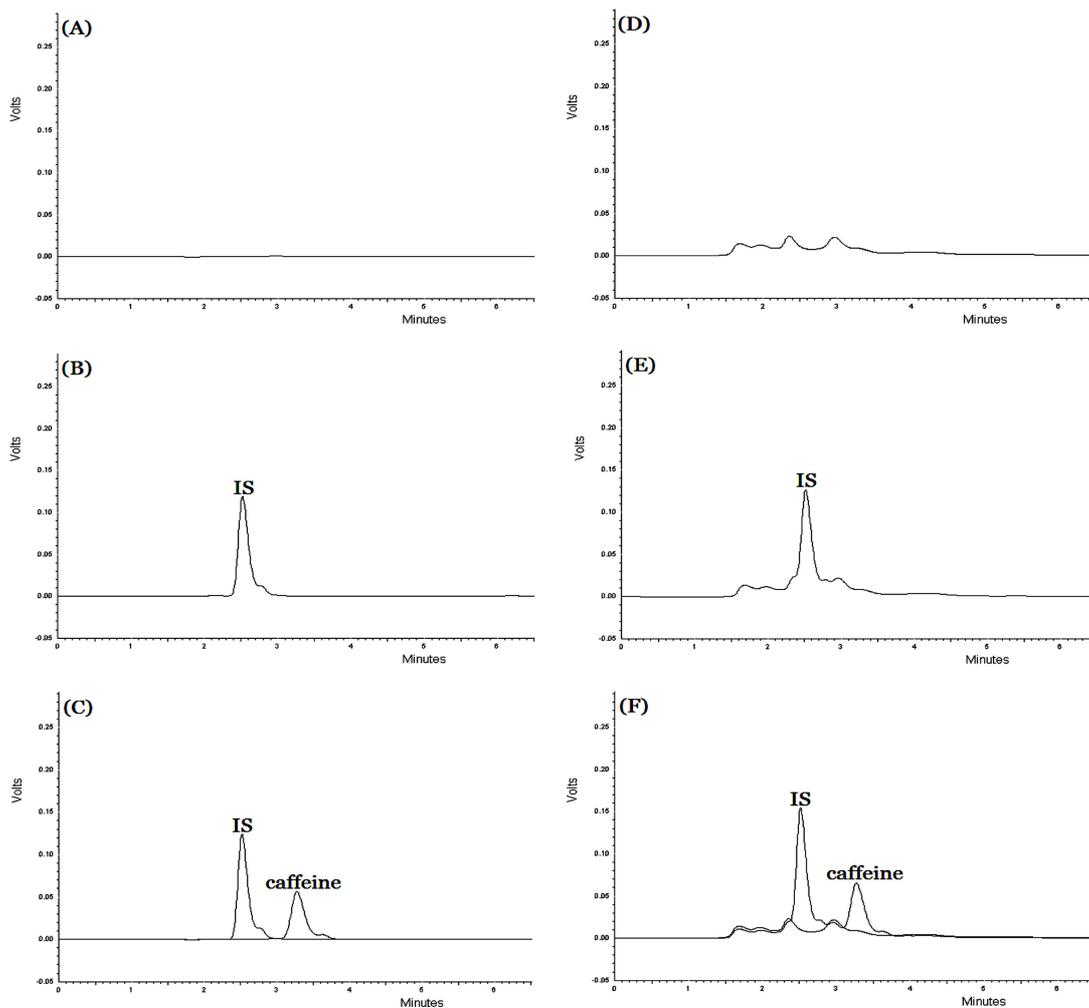


Fig. 1. Chromatograms of tea and coffee at different conditions.

(A) Double blank of standard tea, (B) Zero blank of standard tea, (C) Double blank of standard tea and Earl grey black tea, (D) Double blank of standard coffee, (E) Zero blank of standard coffee, (F) Double blank of standard coffee and Maxim coffee

의 머무름시간은 각각 2.475분, 3.2분이었으며, 실제 샘플의 크로마토그램은 Fig. 1에 제시하였다. 커피와 차에 함유된 카페인의 함량을 측정된 결과는 실제 음용하는 음료의 양에 포함된 카페인의 함량으로 나타내기 위하여 캔음료의 경우 한 캔, 나머지는 100 ml 당 포함된 카페인의 함량(mg)으로 나타냈으며 그 결과는 Table 2와 같다. 차에서의 카페인 함량은 티백 차는 1.5~34.0 mg, 캔차는 16.4~18.3 mg, 가루홍차는 2.8 mg이었으며, 국화차는 카페인을 함유하고 있지 않았다. 커피의 경우 커피믹스는 17.7~56.6 mg, 인스턴트 커피는 50.2 mg 정도의 카페인을 함유하고 있었으며, 탈카페인커피는 카페인을 함유하고 있지 않았다.

Table 2. Amount of caffeine present in different brands of coffee and tea (mean±SD, n=3)

Product	Package	Volume (ml) [†]	Caffeine (mg)
Lemon black tea	Tea bag	100	1.5±0.3
Earl grey black tea	Tea bag	100	34.0±0.7
Lipton Yellow label	Tea bag	100	31.5±0.4
Green tea	Tea bag	100	11.7±0.1
Chrysanthemum tea	Tea bag	100	0.00
Ceylon tea	Can	240	18.2±0.4
Dongsuh green tea	Can	180	16.4±2.1
Dongsuh oolong tea	Can	180	18.3±0.6
Lipton Ice tea	Bulk tea, 18 g	100	2.8±1.3
French Coffee	Mixed bag	100	40.2±2.1
Maxim Coffee	Mixed bag	100	33.4±3.1
Cappuccino Mocha Coffee	Mixed bag	100	56.6±2.2
Hazelnut Coffee	Mixed bag	100	37.5±2.3
Mocha latte Coffee	Mixed bag	100	17.7±2.4
Decaffeinated coffee	Mixed bag	100	0.00
Premium Coffee	Instant, 2 g	100	50.2±2.1

[†]The amount of caffeine in can product was determined by usual amount of beverages in the can, and other product was determined in 100 ml of water.

침출조건의 변화에 따른 카페인 함량 변화

침출온도와 침출시간의 변화에 따른 차에 함유된 카페인의 양은 Table 3과 같다. 침출온도와 침출시간이 60°C/5 min에서 100°C/10 min으로 변화함에 따라 카페인의 함량이 중국 녹차의 경우 약 14.4 mg, 억수설록차의 경우 약 17.0 mg, 만수설록차의 경우 약 16.8 mg 증가하였다. 침출시간을 5분으로 고정 후 침출온도를 60°C에서 80°C, 100°C로 증가시킨 결과, 카페인의 함량이 평균 12.33 mg, 2.53 mg씩 증가되었다. 침출온도 100°C에서 침출시간을 5분에서 10분으로 증가시킨 결과 카페인의 함량이 평균 1.2 mg 증가되었다. 침출온도와 침출시간이 증가됨에 따라 차에 함유된 카페인의 양이 증가하였다.

카페인이 행동에 미치는 영향

운동량

커피와 차 투여에 따른 동물의 운동량 결과는 Table 4와 같다. 통계 분석 시 최대값과 최소값을 제외하고 5마리의 결과값을 이용하였다. 물(대조그룹), 차 10 mg/kg, 30 mg/kg, 커피 10 mg/kg, 30 mg/kg의 5그룹 중 커피 30 mg/kg 그룹이 8507.08±8.82 cm로 가장 높았으며, 차 30 mg/kg 그룹이 5297.42±37.12 cm로 두 번째였다. 차 10 mg/kg 그룹과 커피 10 mg/kg 그룹이 각각 3681.58±21.86 cm, 3449.56±40.77 cm이었으며, 물 그룹이 1119.48±29.92 cm로 가장 낮았다(Table 4). 이 결과를 Fig. 2에 그래프로 나타내었다. 독립표본 t검증을 이용하여 각 그룹을 비교한 결과를 Table 4에 제시하였다. 먼저 대조그룹인 물 그룹과 카페인을 투여한 다른 그룹들 각각을 비교하였을 때, 카페인을 투여한 네 그룹 모두 물 그룹보다 유의하게 이동거리가 증가된 것을 볼 수 있었다. 다음으로 커피와 차에서 농도의 변화에 따른 차이를 살펴보면, 커피 30 mg/kg 그룹이 커피 10 mg/kg 그룹보다 이동거리가 유의하게 증가된 것을 볼 수 있었지만($p < 0.001$), 차에서는 두 농도 사이에 통계적인 차이가 없었다($p > 0.127$). 마지막으로 커피와 차를 비교하였을 때, 10 mg/kg 농도에서는 두 그룹 사이에 통계적인 차이가 없었지만($p > 0.757$), 30 mg/kg 농도에서는 커피 그룹이 차 그룹보다 이동거리가 유의하게 증가된 결과를 나타냈다($p < 0.01$).

Table 3. Amount of caffeine present in different brands of tea at different temperature and time interval (mean±SD, n=3)

Conditions	100°C/10 min	100°C/5 min	80°C/5 min	60°C/5 min
Sample	Chinese green tea			
Caffeine (mg/200 ml)	28.5±1.2	26.5±0.6	25.9±0.8	14.1±1.1
Sample	Oksu tea			
Caffeine (mg/200 ml)	36.0±1.2	35.2±1.1	31.8±1.5	19.0±1.3
Sample	Mansu tea			
Caffeine (mg/200 ml)	37.3±0.1	36.5±0.7	32.9±1.1	20.5±2.1

Table 4. A) Effects of water, tea (10 and 30 mg/kg) and coffee (10 and 30 mg/kg) on locomotor activity of SD rats for continuous 90 minutes (n=5). B) Results of t-test between 1) control group (water) and caffeine administered groups; 2) low concentration (10 mg/kg) of caffeine group and high concentration (30 mg/kg) of caffeine group in same beverages; 3) tea and coffee at same concentration of caffeine. **, $p < 0.01$, *, $p < 0.001$**

	1	2	3	4	5
Group	Water	Tea 10 mg/kg	Coffee 10 mg/kg	Tea 30 mg/kg	Coffee 30 mg/kg
Mean (cm)	1119.48	3681.58	3449.56	5297.42	8507.08
RSD (%)	29.92	21.86	40.77	37.12	8.82

	Group	p-value	
1)	Water	Tea30 mg/kg	0.002**
	Water	Coffee30 mg/kg	$p < 0.001$ ***
	Water	Tea10 mg/kg	$p < 0.001$ ***
	Water	Coffee10 mg/kg	0.007**
2)	Tea10 mg/kg	Tea30 mg/kg	0.127
	Coffee10 mg/kg	Coffee30 mg/kg	$p < 0.001$ ***
3)	Tea30 mg/kg	Coffee30 mg/kg	0.009**
	Tea10 mg/kg	Coffee10 mg/kg	0.757

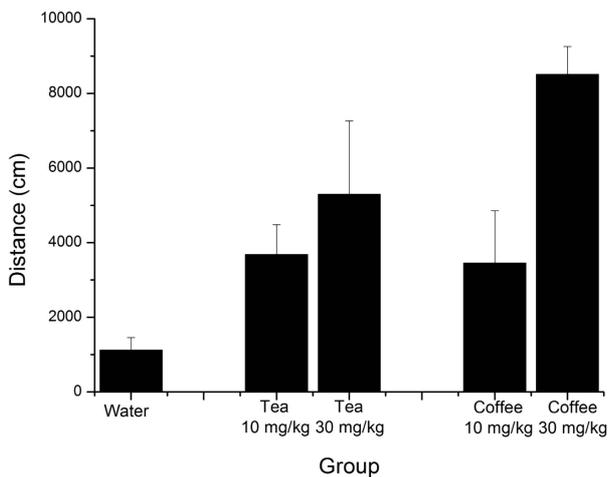


Fig. 2. Effects of water, tea (10 and 30 mg/kg) and coffee (10 and 30 mg/kg) on locomotor activity of SD rats for continuous 90 minutes. The data shown are mean±SD (n=5).

특정 행동

커피와 차 투여 후 관찰한 ‘뚝바로 서기(rearing)’와 ‘긁기(scratching)’에 대해 각각 빈도와 지속시간을 계산하였으며 그

결과를 각각 Fig. 3와 Fig. 4에 나타내었다. ‘뚝바로 서기’에서는 물 그룹과 비교해 다른 그룹 모두에서 빈도와 지속시간이 증가한 것을 볼 수 있다. 물 그룹과 비교해 유의하게 빈도와 지속시간이 증가된 그룹은 커피 10 mg/kg 그룹을 제외한 차 10 mg/kg, 차 30 mg/kg, 커피 30 mg/kg 그룹이었다. ‘긁기’에서는 물 그룹과 비교해 다른 그룹 모두에서 빈도가 증가되었고, 지속시간의 경우에는 차 10 mg/kg 그룹을 제외한 나머지 그룹에서 증가되었다. ‘긁기’에서는 커피 10 mg/kg 그룹에서만 물 그룹과 비교해서 빈도가 유의하게 증가된 것을 볼 수 있었다.

고 찰

HPLC를 이용하여 분석한 결과, 표준커피시료와 표준차시료에서 r^2 은 각각 0.99 이상으로 직선성을 확인할 수 있었다. 차와 커피 모두 일내, 일간 정확도 및 정밀도가 $\pm 15\%$ 안에 포함되었고, 회수율도 120% 안에 포함되었다. 이로부터 차와 커피에 함유된 카페인에 대한 본 분석법은 충분한 직선성과 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있다.

차와 커피에 함유된 카페인의 함량은 종류에 따라 다양하였다. 티백의 경우 일반적으로 홍차가 녹차보다 카페인 함량이 높았고, 캔으로 판매되는 차보다는 티백 형태로 판매되는 차의 카페인 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 그러나 이러한 결과는 티백의 침출온도나 침출시간에 따라 달라질 수 있는 결과라 생각된다. 또한 전체적으로 살펴보면, 일반적으로 커피가 차보다 많은 양의 카페인을 함유하고 있었다. 그러나 이러한 결과는 이번 실험에 사용된 차와 커피의 종류가 한정되어 있기 때문에 단정짓기는 어렵다. 과도한 카페인의 섭취는 건강에 해를 줄 수 있으므로 소비자들이 합리적인 선택을 할 수 있도록 카페인이 함유된 제품에 카페인 함량에 대한 정보가 제공되어야 할 필요가 있다고 생각된다.

침출온도와 침출시간에 따른 차와 커피에서 카페인 함량의 차이를 살펴본 결과, 커피에서는 침출온도와 침출시간이 카페인의 함량에 영향을 주지 않았으나, 차에서는 침출온도와 침출시간이 증가할수록 카페인의 함량도 증가하는 것을 볼 수 있었다. Kim HY¹²⁾과 Yoon MH¹⁸⁾의 연구에서도 어느 정도까지는 침출온도와 침출시간이 증가함에 따라 차에 함유된 카페인의 함량이 증가하는 결과를 볼 수 있다. 일반적으로 개인에 따라 카페인에 대한 민감도가 다르므로 침출온도와 침출시간을 고려하여 차를 마시는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

Tru Scan 99를 사용하여 운동량을 측정된 결과, 카페인이 함유된 차와 커피를 투여 받은 그룹이 물을 투여 받은 대조 그룹과 비교해 운동량이 유의하게 증가되었고, 커피 30 mg/kg이 흰 쥐의 운동량에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 보였다. Antoniou K¹³⁾의 연구에서도 카페인을 용해한 생리식염수를 흰 쥐에게 복강 투여한 결과, 10 mg/kg, 20 mg/kg 농도

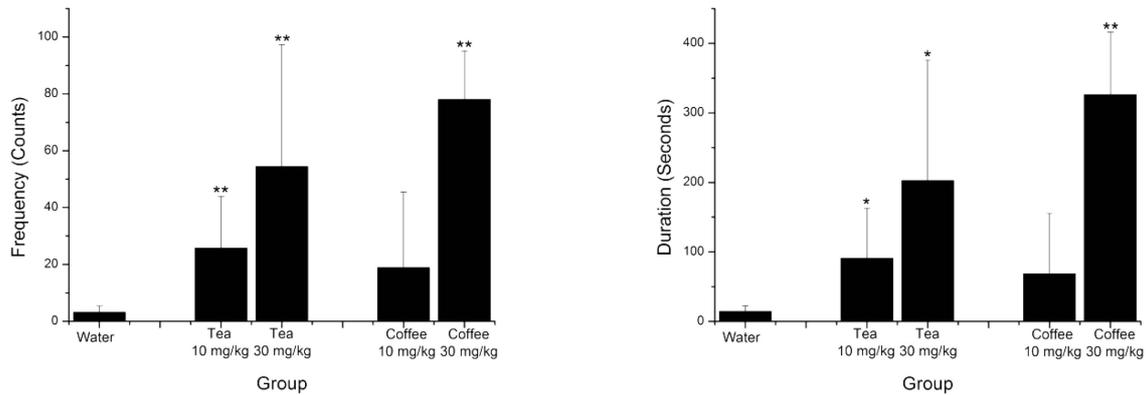


Fig. 3. Effects of water, tea (10 and 30 mg/kg) and coffee (10 and 30 mg/kg) on the frequency and duration of rearing in SD rats. The cumulative frequency scores (counts) and duration (seconds) of five 10 min recording sessions separated by 10 minute intervals. The data shown are mean±SD (n=7). *, p<0.05, **,p < 0.01.

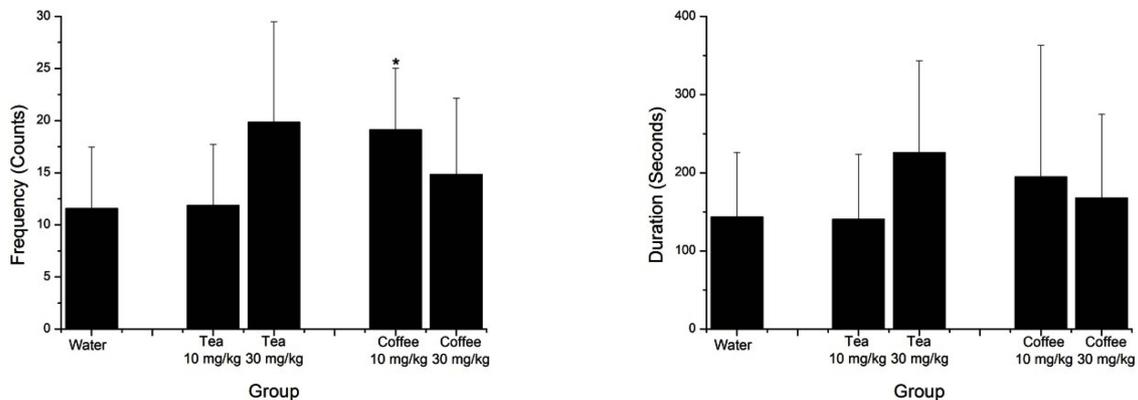


Fig. 4. Effects of water, tea (10 and 30 mg/kg) and coffee (10 and 30 mg/kg) on the frequency and duration of scratching in SD rats. The cumulative frequency scores (counts) and duration (seconds) of five 10 min recording sessions separated by 10 minute intervals. The data shown are mean±SD (n=7). *, p < 0.05

의 카페인을 투여 받은 그룹에서 대조그룹인 식염수를 투여한 그룹과 비교해 운동량이 유의하게 증가되었다. 두 번째로 차와 커피에서 카페인의 농도 변화에 따른 운동량의 변화를 살펴보면, 커피에서는 카페인의 농도가 10 mg/kg에서 30 mg/kg으로 증가함에 따라 이동거리가 유의하게 증가되었다 ($p < 0.001$). 그러나 차에서는 카페인의 농도가 증가함에 따라 이동거리가 증가하였지만 유의한 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.1$). Antoniou K의 연구에서도 카페인의 농도가 증가함에 따라 운동량이 증가하였지만, 카페인의 농도가 40 mg/kg 일 때는 운동량이 다시 감소하는 결과를 나타냈다. 마지막으로 같은 양의 카페인을 함유한 차와 커피가 투여된 그룹을 비교해보면, 10 mg/kg의 카페인을 함유한 차와 커피가 투여된 그룹 사이에서는 운동량에 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.7$). 그러나 30 mg/kg의 카페인이 함유된 차와 커피를 투여 받은 그룹에서는 커피 그룹이 차 그룹보다 운동량이 유의하게 증가되었다($p < 0.01$). Rogers PJ¹⁹)의 연구결과를 보면

카페인만 투여한 실험군과 비교해 카페인과 테아닌을 함께 투여한 실험군에서 혈압에 대한 저해 효과를 볼 수 있었다. Kakuda T²⁰)의 연구에서는 흰 쥐에게 카페인을 정맥 투여한 후와 뒤이어 테아닌을 정맥 투여한 후 각각 뇌파측정을 한 결과, 테아닌이 카페인에 의한 자극 상태를 저해하는 결과를 나타냈다. 테아닌의 약리 기전은 정확히 알려져 있지 않지만, 동물실험 결과 glutamate 수용체 차단에 의한 glutamate 재흡수의 저해, gamma-aminobutyric acid(GABA) 농도의 증가 등 다양한 신경화학계에 대한 복합적인 약리 효과에 의한 것으로 생각된다.²¹) 이러한 테아닌의 진정작용은 Lu K²¹)와 Juneja LR²²)의 실험에서 테아닌 섭취 후의 효과를 통해 볼 수 있다. 이와 같은 연구결과와 더불어 이번 실험에서도 차에 함유된 테아닌에 의해 카페인의 작용이 억제되어 차와 커피가 운동량에 미치는 영향에 유의한 차이가 나타났을 것으로 생각된다.

SD rat의 특정 행동(뚝바로 서기, 굽기)을 관찰한 결과, ‘뚝

바로 서기'에서는 대조그룹인 물과 비교하여 카페인이 투여된 네 그룹 중 차 10 mg/kg, 차 30 mg/kg, 커피 30 mg/kg 그룹에서 빈도와 지속시간이 유의하게 증가된 것을 볼 수 있었으며, 이러한 결과는 Antoniou K의 연구와 유사하다. 그러나 '굽기'에서는 커피 10 mg/kg 그룹에서만 물 그룹과 비교하여 빈도가 유의하게 증가된 것을 볼 수 있었다. 이번 연구에서는 두 가지 특정 행동만 관찰했다는 점에 한계를 가지지만, Antoniou K의 결과와 함께 고려했을 때 카페인이 특정 행동에 영향을 미침을 알 수 있다.

본 연구에서는 카페인과 테아닌을 투여하는 대신 차와 커피를 직접 투여하여 운동량에 대한 카페인의 영향을 관찰하고, 차와 커피를 비교하여 카페인에 대한 테아닌의 저해작용을 관찰함으로써 그 동안의 실험들과는 다른 의미를 가진다고 할 수 있다. 그러나 한 종류의 차와 커피를 가지고 실험하였기 때문에 차와 커피가 운동량에 미치는 영향에 대해 결론짓기에는 부족하며, 다른 종류의 차와 커피를 이용한 실험이 필요로 된다. 이번 연구는 카페인이 함유된 차와 커피가 흰 쥐의 운동량에 미치는 영향과 그 차이를 볼 수 있었으며, 전임상 자료로서 추후 카페인이 함유된 차와 커피가 한국 사람에게 미치는 영향을 연구하는 임상연구에 활용 가능할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 사용된 HPLC 분석법은 다양한 차와 커피에 함유된 카페인의 함량을 결정하는데 효율적이었으며, 차에 함유된 카페인의 함량은 침출온도와 침출시간이 증가함에 따라 증가하였다. 카페인은 흰 쥐의 운동량 증가에 영향을 미쳤고, 커피에서는 카페인의 농도가 증가함에 따라 운동량이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 높은 농도의 카페인을 함유한 차와 커피가 투여된 그룹에서는 커피 그룹이 차 그룹과 비교하여 운동량의 증가에 더 큰 영향을 미치는 것을 볼 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국화학연구원의 지원 하에 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Huck CW, Guggenbichler W, Bonn GK. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2005; 538: 195-203.
- Nakagawa M. Constituents in tea leaf and their contribution

- to the taste of green tea liquor. *Jpn Agric Res Q* 1970; 5(3): 43-7.
- Bunker ML, McWilliams M. Caffeine content of common beverages. *J Am Diet Assoc* 1979; 74(1): 28-32.
- Chou T. Wake up and smell the coffee. Caffeine, coffee, and the medical consequences. *West J Med* 1992; 157(5): 544-53.
- Lorist MM, Tops M. Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain Cogn* 2003; 53(1): 82-94.
- Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem* 2008; 105(4): 1067-79.
- Richardson NJ, Rogers PJ, Elliman NA, *et al.*, Mood and performance effects of caffeine in relation to acute and chronic caffeine deprivation. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52(2): 313-20.
- Knutti R, Rothweiler H, Schlatter C. Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of caffeine. *Eur J Clin Pharmacol* 1981; 21(2): 121-6.
- Fenster L, Eskenazi B, Windham GC, *et al.*, Caffeine consumption during pregnancy and fetal growth. *Am J Public Health* 1991; 81(4): 458-61.
- Tyrala EE, Dodson WE. Caffeine secretion into breast milk. *Arch Dis Child* 1979; 54(10): 787-9.
- Yoon JO, Kwon KI. Amount of caffeine in caffeine containing products, and the pattern of caffeine consumption. *Kor J Clin Pharm* 1993; 3(1): 21-30.
- Kim HY, Lee YJ, Hong KH, *et al.*, Development of analysis method of caffeine and content survey in commercial foods by HPLC. *Korean J Food Sci Technol* 1999; 31(6): 1471-6.
- Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, *et al.*, d-amphetamine, cocaine and caffeine: A comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23(2): 189-96.
- Yong CS, Lee KH, Choi JS, *et al.*, Bioequivalence of Cilostan tablet (Korea United Pharmaceutical Co.) to Pletaal tablet (cilostazol 100 mg). *J Kor Soc Health-syst Pharm* 2003; 20(2): 239-46.
- Sung MK, Park HM, Kim NH, *et al.*, Validation of a HPLC method for determination of pentoxifylline in human serum and its application to single-dose pharmacokinetics. *Kor J Clin Pharm* 2005; 15(1): 46-9.
- US Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM. Guidance for industry: Bioanalytical method validation. 2001
- McOmish CE, Burrows E, Howard M, *et al.*, Phospholipase

- C-β1 knockout mice exhibit endophenotypes modeling schizophrenia which are rescued by environmental enrichment and clozapine administration. *Mol Psychiatry* 2008; 13(7): 661-72.
18. Yoon MH, Lee MJ, Hwang SI, *et al.*, A evaluation of the caffeine contents in commercial foods. *J Fd Hyg Safety* 2001; 16(4): 295-9.
 19. Rogers PJ, Smith JE, Heatherley SV, *et al.*, Time for tea: mood, blood pressure and cognitive performance effects of caffeine and theanine administered alone and together. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 195(4): 569-77.
 20. Kakuda T, Nozawa A, Unno T, *et al.*, Inhibiting effects of theanine on caffeine stimulation evaluated by EEG in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64(2): 287-93.
 21. Lu K, Gray MA, Oliver C, *et al.*, The acute effects of L-theanine in comparison with alprazolam on anticipatory anxiety in humans. *Hum Psychopharmacol* 2004; 19(7): 457-65.
 22. Juneja LR, Chu DC, Okubo T, *et al.*, L-theanine-a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans. *Trends Food Sci Technol* 1999; 10(6-7): 199-204.