

한국지역사회생활과학회지 24(1) : 5~12, 2013
Korean J Community Living Sci 24(1) : 5~12, 2013
<http://dx.doi.org/10.7856/kjcls.2013.24.1.5>

원두커피내 카페인 및 클로로겐산 함량 평가를 위한 동시분석법

신정화 · 안윤경[†]

한국기초과학지원연구원

Simultaneous Determination for the Contents of Caffeine and Chlorogenic Acid in Coffee Beans

Shin, Jeoung Hwa · Ahn, Yun Gyong[†]

Korea Basic Science Institute, Seoul, Korea

ABSTRACT

Caffeine is an alkaloid of the methylxanthine family known as a central nervous system stimulant, temporarily warding off drowsiness and restoring alertness in humans. There is a recommended upper limits of caffeine for health because a high dose can cause negative effects. Chlorogenic acid is a natural polyphenol compound known to have an antioxidant activity. In this study, the contents of caffeine and chlorogenic acid in coffee beans from different origins(Costa Rica, Indonesia, Vietnam) were determined by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS). The experiment offers more selectivity and sensitivity for those compounds compared with conventional methods such as UV/VIS spectrophotometry. The average concentrations of caffeine and chlorogenic acid in coffee beans originated in Costa Rica were 15.05 mg/g and 5.33 mg/g respectively. In the case of coffee beans originated in Indonesia, the average concentrations were 13.10 mg/g for caffeine and 3.75 mg/g for chlorogenic acid. Vietnamese coffee showed that the average concentrations were 17.79 mg/g for caffeine and 1.12 mg/g for chlorogenic acid. This study can contribute to a better understanding of the contents of caffeine and chlorogenic acid in various coffee beans in order to evaluate dietary intake.

Key words: caffeine, chlorogenic acid, LC-MS/MS, coffee beans

I. 서론

기호음료로서 커피는 세계인구의 1/3이상이 즐겨 마시고 있으며 초기에는 약리효과 때문에 널

리 알려지게 되었으며(Brown et al. 1999), 우리나라에서는 한국전쟁 이후 커피소비가 급속히 증가하였다. 2009년 관세청에서 발표한 커피 수입 동향을 살펴보면 2008년 기준 약 11만톤, 3억 3

접수일: 2012년 8월 31일 심사일: 2013년 1월 24일 게재확정일: 2013년 2월 14일

[†]Corresponding Author: Ahn, Yun Gyong Tel: 82-2-920-0786

e-mail: ygahn@kbsi.re.kr

This is an Open-Access article 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.

천불 상당의 커피가 우리나라에 수입되었으며 수입물량은 매년 증가 추세에 있다. 수입물량의 90% 이상은 생두(green bean)가 대부분으로 국내 유통은 로스팅·가공 후 인스턴트 커피시장, 커피전문점에 공급되며 일부는 해외 수출되는 형태가 전형적인 것으로 나타났으며 원산지별로 보면 생두는 베트남에서 가장 많이 수입되는 것으로 조사되었다(O 2009). 건강학적 측면에서 커피는 인간에게 어떠한 영향을 주는지 의학적인 관점에서 많은 연구가 되어 왔다. 커피가 주는 긍정적인 영향으로는 알츠하이머와 치매(Lindsay et al. 2002; Maia & de Mendonça 2002), 파킨슨 병 예방(Ross et al. 2000)에 효과적이라는 보고가 있으며 담석(Michael et al. 1999; 2002), 인지기능(Marllyn et al. 2002), 당뇨(Huxley et al. 2009), 간보호(Klatsky et al. 2006), 암예방(Song et al. 2008), 항산화효과(Chu et al. 2009), 혈압강화 효과(Matsuura et al. 2012)등이 있는 것으로 발표되기도 하였다. 커피가 건강에 미치는 부정적인 영향으로는 심리적 효과로 불안, 초조, 과다 섭취시 숙면을 취하기 어려운 현상에 대한 보고가 있으며(Ton et al. 2010) 위장병, 체내 콜레스테롤 수치를 증가시키는 효과가 있는 것으로 발표되기도 하였다(Ricketts et al. 2007). 또한 철 결핍성 빈혈증을 유발하기 때문에 산모나 영유아에게는 이롭지 않은 것으로 발표되었으며(Muñoz et al. 1988), 임신과 관련해서는 다양한 연구가 되고 있다(Wisborg et al. 2003). 그밖에 관상 동맥 질병(Zampelas et al. 2004), 타 이레놀과 같은 약물과 동시 복용시 간 손상에 영향이 있는 것으로 알려져 있기도 하다(Andersen et al. 2006; Lopez et al. 2006). 커피 원료인 생두는 폴리페놀의 일종인 클로로겐산(chlorogenic acid)과 카페인 (caffeine)을 포함한 다양한 생리활성 물질이 함유되어 있다(Farah et al. 2008). 따라서 이들의 함유량을 파악하는 것은 소비자들이 건강하게 커피를 섭취할 수 있는 정보를 줄 수 있는 자료가 된다. 커피내 대표적인 성분으로는 카페인과 클로로겐산이 있으며 이들 물질은 추출온도, 시간, 물의 부피에 따라 함량이 달라진다(Phan et al. 2012). 이들에 대한 분석방법으로는 고 성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid

Chromatography, HPLC)에 의한 분리 및 자외선, 가시광선 흡광(UV/VIS absorbance)검출방법이 주로 사용되고 있으나 동시분석에는 어려움이 있다(Zhang et al. 2005).

분리 및 검출방법으로 액체크로마토그래피/질량분석기(Liquid Chromatography/Mass Spectrometer, LC-MS)를 사용할 경우 시료 중 존재하는 다른 물질의 간섭을 받지 않고 선택적으로 원하는 물질을 정성확인하고 정량할 수 있어서 최근에는 LC-MS 방법의 활용이 많아지고 있다. 따라서 항암효과가 있는 것으로 알려지면서 관심이 커지고 있는 클로로겐산과 적정 섭취 함량으로 주목되고 있는 커피내 카페인 성분의 동시 분석법을 개발하고 커피 생산지별 클로로겐산과 카페인 함량을 조사하였다. 국가적으로도 식품 중 성분함량에 관심이 증대되고 있는만큼 이들 성분에 대한 지속적인 모니터링 관리에 기여할 수 있을 것이다.

II. 연구방법

1. 커피 시료 및 실험방법

커피시료는 생산지별로 인도네시아산 12종, 베트남산 4종, 코스타리카산 4종 총 20종의 시료를 대상으로 하였다. 실험에 사용된 시료는 가정에서 직접 추출해서 섭취할 수 있도록 판매되는 커피원두로 추출에 바로 사용될 수 있도록 분쇄된 것이었다. 시료내 정성확인 및 정량을 위한 클로로겐산과 카페인 표준물질은 Sigma-Aldrich사(Steinheim, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 커피시료의 추출은 분쇄시료 2 g을 취해 0.25 μm 의 여지(Whatman No 2)에 넣고 50 mL의 뜨거운 증류수를 이용, 필터하였고 이 여과액을 분석에 사용하였다. 정량을 위한 표준물질의 조제는 클로로겐산과 카페인 10 mg을 Milli-Q purification 시스템(Millipore, Eschborn, Germany)의 3차 증류수 10 mL에 녹이고 5 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 5개 이상의 농도를 분석하여 직선성을 확인하였다.

2. 기기분석방법

기기분석은 Shiseido사의 nanospace SI-2 액체

크로마토그래프와 Thermo Finnigan사의 LCQ Deca XP 질량분석기를 이용하였다. 클로로겐산과 카페인의 분리용 컬럼은 phenomex사의 Luna C₁₈ (150 x 2.1 mm, 내경 2.7 μm)컬럼이 사용되었으며 컬럼의 이동상은 85% 증류수/15% 아세토나이트릴 혼합액 (0.1% 포름산 포함)을 일정용매조성법(Isocratic method)으로 22분간 훌려주었다(Table 1). 시료의 주입은 2 μL였으며, 질량분석기는 이온포집 (Ion trap) 형태의 분석관이 사용되었으며, 전자분무 이온화 (electrospray ionization, ESI)방식에 의한 양이온, 음이온 모드에서 두 화합물이 측정되었다. Capillary voltage 와 Capillary temperature는 각각 15 V 와 275 °C 이고 Spray voltage는 4.5 kV로 설정하였다.

3. 정성 및 정량분석

액체크로마토그래프상에서 카페인과 클로로겐산의 완전한 분리가 어렵기 때문에 분자이온 확인에 의한 정성확인 및 정량조건을 제시하였다. UV에서 사용한 파장은 275 nm이었다. ESI 이온화 방식에서는 각 성분별로 positive 이온모드에서 [M+H]⁺ 이온세기와 negative 이온 모드에서 [M-H]⁻ 이온세기를 비교하여 이온모드를 결정하였다. 이와 더불어 특별한 전처리 없이도 시료 중 존재하는 다른 물질의 간섭을 피하고 선택성과 검출감도를 높이기 위해 MS/MS 분석을 위한 SRM(Selected Reaction Monitoring)모드를 사용하

였다. 이때 각 성분별로 감응도가 큰 충돌에너지 (collision energy)를 선정하여 사용하였다. 또한 정성 및 정량의 모든 과정은 Xcalibur version 2.0.7 소프트웨어가 사용되었으며 피크 면적과 검량선은 Qual Browser version 2.0.7에서 수행되었다. 시료의 농도는 아래의 식에 의해 계산되었으며 검출량은 검량선으로부터 계산되었으며, 이때 측정용 시료액의 양은 추출에 사용되어진 증류수 50 mL이었고 시료의 양은 분쇄한 커피시료 2 g 으로 계산되었다.

$$\text{시료의 농도} (\mu\text{g/g}) =$$

$$\frac{\text{검출량} (\mu\text{g}) \times \frac{\text{측정용 시료액의 양} (\text{mL})}{\text{주입량} (\mu\text{L})}}{\times \frac{1}{\text{시료의 양} (\text{g})}}$$

III. 결과 및 고찰

1. 시료 성분의 분리 검출 방법

카페인 및 클로로겐산은 커피에서 가장 관심의 대상이 되고 있는 물질로써 일반적으로 가장 많이 사용되는 역상크로마토그래피 C₁₈ 컬럼을 이용하여 빠른 동시분석을 목적으로 하였다. Fig. 1 은 커피 추출물을 0.1% 포름산을 포함한 85% 증류수와 15% 아세토나이트릴 혼합액(v,v)을 이동상으로 C₁₈ 컬럼에 훌려 주었을 때 UV 검출기

Table 1. Condition of LC/ESI-MS

Liquid chromatograph		Mass spectrometer	
NANOSPACE SI-2 (Shiseido)		LCQ DECA XP (Thermo Finnigan)	
Column	phenomex Luna C18 2.7 μm , 150 X 2.1 mm	Ionization source	Electrospray ionization(ESI) Positive (caffeine)
Mobile phase	Isocratic method, 22 min 85% H ₂ O (0.1% formic acid)	Polarity	Negative (chorogenic acid)
Flow rate	50 μL/min	Analyzer type	Ion trap
Injection volume	2 μL	Spray voltage	4 kV
UV wavelength	275 nm	Capillary voltage	15 V
		Capillary temperature	275 °C
		Sheath gas pressure	30 Arb
		Aux gas pressure	10 Arb
		CID condition	40 eV

275 nm 파장에서 측정된 두 가지 물질의 크로마토그램을 나타내고 있었다. 컬럼상에서 카페인과 클로로겐산이 완전하게 분리가 되지 못하고 이동상의 조건이나 흐름속도에 매우 민감하여 조작에 어려움이 있음을 알 수 있었다. 반면 질량분석기를 이용하는 경우 선택된 분자이온을 분리할 수

있으며 분리된 이온은 충돌가스에 의해 조각 이온화(fragment ion)하여 이들 이온을 동시에 스캔 할 수 있기 때문에 컬럼에서 비슷한 머무름 시간을 가진 물질이라도 분리해 낼 수 있으며 분석의 선택성과 검출감도를 높일 수 있었다. 최근 이러한 LC-MS/MS 방법은 시료의 추출 후 특별한 정

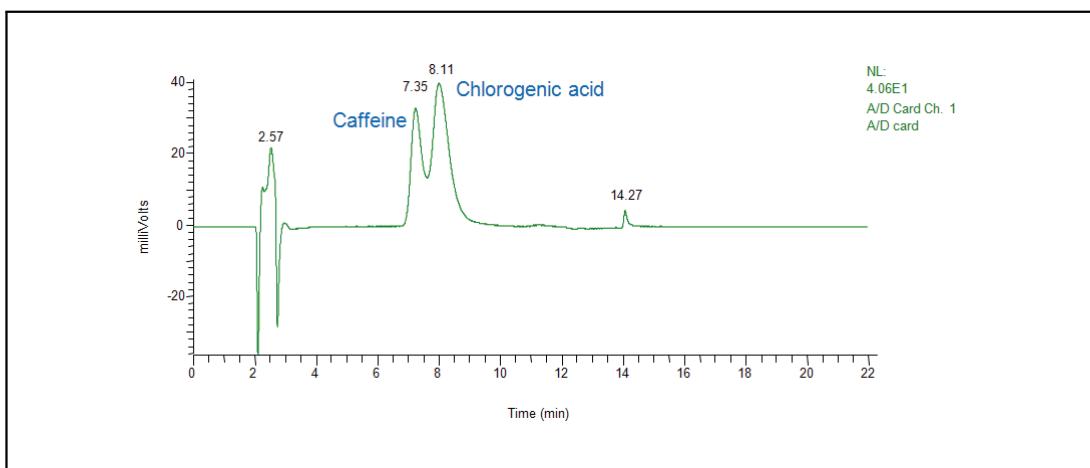


Fig. 1. UV chromatogram of caffeine and chlorogenic acid extracted from coffee beans

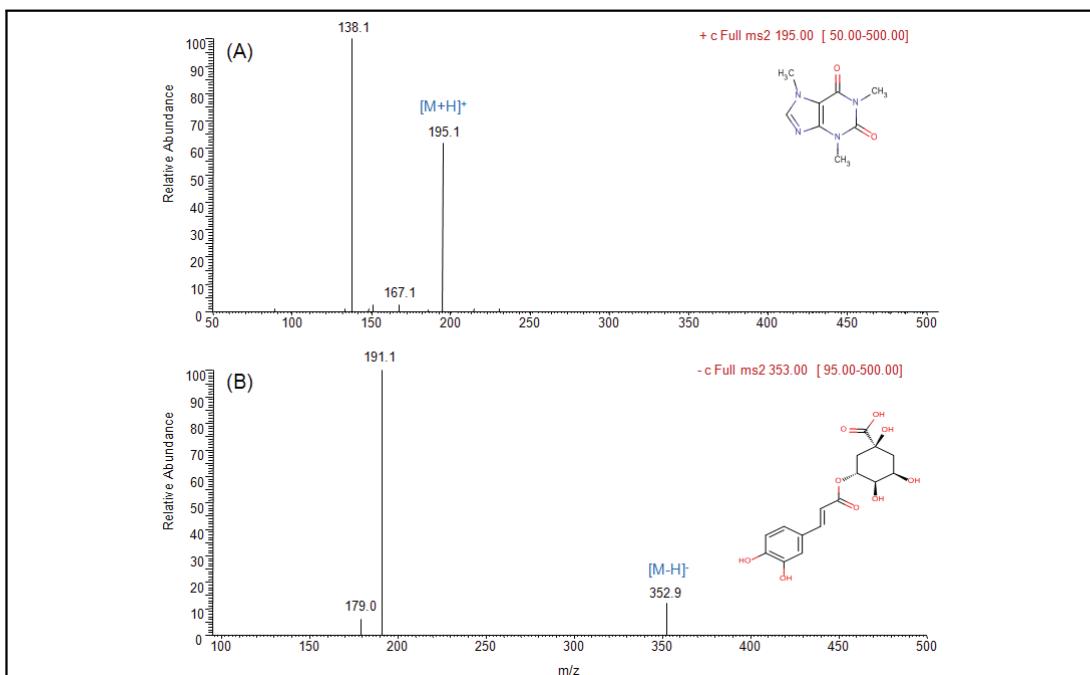


Fig. 2. MS/MS spectra of caffeine (A) and chlorogenic acid (B)

제과정 없이도 원하는 물질을 분리, 분석할 수 있는 방법으로 많이 활용되고 있다. Fig. 2는 카페인(A)과 클로로겐산(B)을 MS/MS 분석으로 스캔하여 얻어진 질량 스펙트럼으로 카페인의 경우는 positive 모드에서 분자이온 m/z 195를 확인할 수 있었고 MS/MS에 의한 조각이온 m/z 138을 정량 이온으로 선정하였다. 클로로겐산의 경우는 negative

모드에서 Fig. 2 (B)에서와 같이 분자이온 m/z 352를 확인할 수 있었으며 MS/MS 분석에서 이온세기가 강한 m/z 191을 정량이온으로 선정하였다. 질량분석기는 positive, negative 모드를 동시에 스캔하기 때문에 두가지 물질을 각각의 모드에서 한번에 분리한 결과를 얻을 수 있다. Fig. 3은 커피 추출물에서 이 두 가지 물질이 바탕선 분리

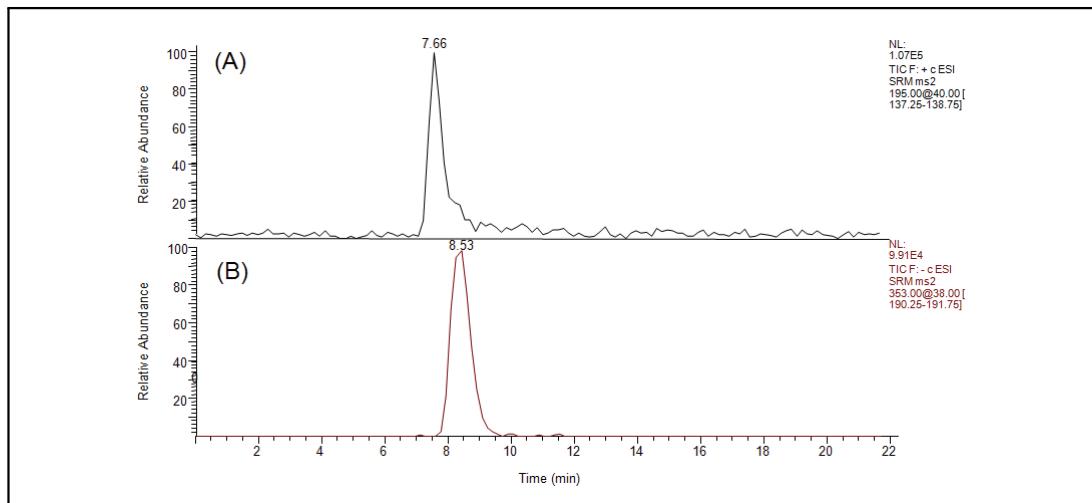


Fig. 3. ESI-SRM chromatogram of caffeine (A) and chlorogenic acid (B) extracted with coffee bean

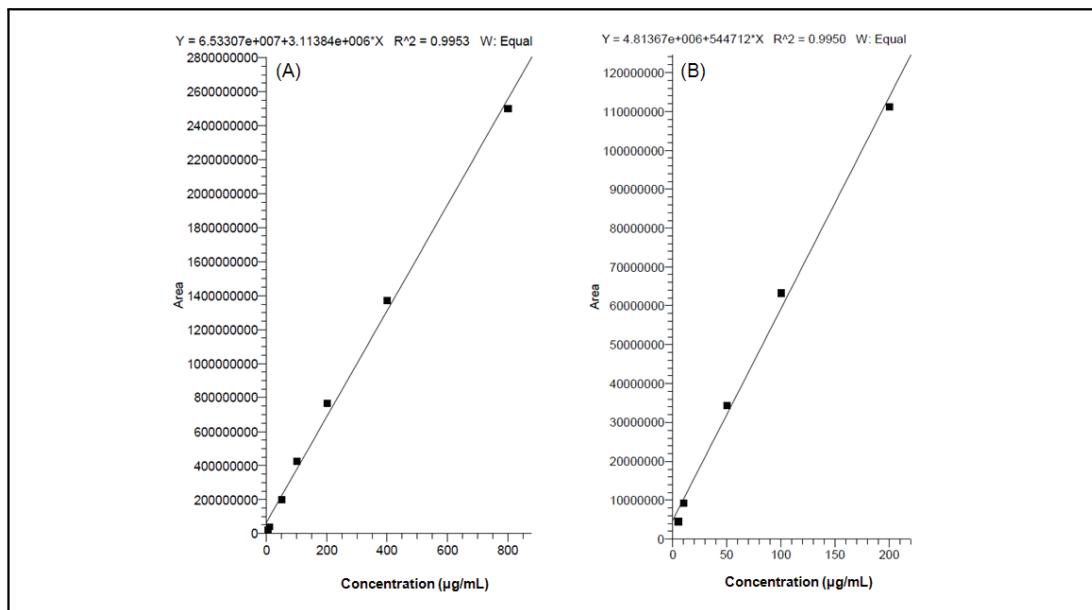


Fig. 4. Calibration curves of caffeine (A) and chlorogenic acid (B)

(baseline separation)가 가능함을 보여주는 전자 분무 이온화선택반응분석법(selected reaction monitoring, SRM)에 의해 수행된 크로마토그램으로 UV 검출기를 사용하였을 때와 비교하여 분리효율과 감도 면에서 큰 차이를 보임을 알 수 있었다.

2. 시료 중 성분의 정량

카페인과 클로로겐산의 정량을 위하여 5점 이상의 표준물질을 제조하여 검량선을 작성하였다. 카페인의 경우는 5 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 클로로겐산의 경우는 5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이의 농도범위에서 얻어진 크로마토그램에서의 면적비를 농도별로 그래프화 하여 상관계수를 얻은 결과 두 성분 모두 R^2 값이 0.99 이상의 직선성을 나타내는 것을 알 수 있었으며 시료 중 고농도의 경우 이 범위내에서 면적비를 가질 수 있도록 희석하여 사용하였다(Fig. 4). 카페인 일일 권장량으로 볼 때 국가별로는 취약계층에 따라 그 양을 다르게 제시하고 있으며, 성인의 경우 일일권장량은 300 ~ 500 mg, 임산부의 경우 150 ~ 200 mg, 어린이의 경우는 50 mg 이하로 보는 경우가 일반적이다(Heckman et al. 2010). 우리나라에서도 2009년 한국소비자원의 시험검사국 식품미생물팀에서 카페인을 중심으로 어린이 기호식품의 상품시험 조사를 실시하는 등 카페인 관리에 대한 관심이 높아지고 있다. 클로로겐산은 폴리페놀 화합물의 일종으로 대장암과 피부 노화 억제 효능이 있는 것으로 알려져 있으며 최근에는 빌암 단백질의 활성화를 줄여 대장암 세포의 증식과 전이 과정을 억제한다는 사실이 입증되기도 하였다(Kang et al. 2011). 이러한 클로로겐산의 경우 고온으로

Table 2. The concentrations of caffeine and chlorogenic acid in coffee bean samples produced in various countries

Origins	Caffeine(mg/g)	Chlorogenic acid(mg/g)
Costa Rica (4) ¹⁾	15.05 ± 1.47 ²⁾	5.33 ± 0.65
Indonesia (12)	13.10 ± 1.18	3.75 ± 0.41
Vietnam (4)	17.79 ± 1.40	1.12 ± 0.07

¹⁾ Sample number, ²⁾ Average ± Standard Deviation

로스팅(볶는 과정)하는 중 분해되어 감소하는데, 따라서 로스팅 과정을 거치는 원두 커피에서 보다는 그린 커피빈(green coffee bean)의 효능에 착안한 식품들이 출시되고 있다. 일일권장량 설정에 관한 필요성이 제기되는 카페인과 항암물질로 섭취양에 대한 관심이 집중되고 있는 클로로겐산의 동시분석 방법을 통하여 생산지별 원두커피내 두 성분을 정량하였다.

Table 2는 각 생산지별 카페인 및 클로로겐산의 측정결과를 나타낸 것으로써 평균값과 표준편차를 제시하였다. 베트남산의 경우 카페인 농도가 17.79 mg/g으로 가장 높았으며 인도네시아산의 경우 13.10 mg/g으로 가장 낮았으나, 세가지 산지별 농도는 크게 차이가 없었다. 클로로겐산의 경우는 베트남산이 1.12 mg/g로 가장 낮았고 코스타리카산이 5.33 mg/g로 가장 높게 검출되었다. 이러한 측정 결과는 미국 시장 브랜드별 카페인과 클로로겐산을 UV-VIS 흡광도 검출기로 측정한 결과값과 유사한 것으로 나타났다(Fujioka & Shibamoto 2008). Fujioka & Shibamoto(2008)의 결과에 따르면 7개의 끓인 커피에서의 카페인 농도는 10.9 ~ 16.5 mg/g, 클로로겐산의 농도는 5.26 ~ 17.1 mg/g으로 보고된 바 있으며 이를 결과는 본 연구 방법에서 측정된 결과값과 유사한 값을 보였다. 분리에 있어서 빠르고 선택성 있는 질량 분석기를 활용한 검출방법은 분자이온의 확인을 통하여 보다 효과적으로 방해물질을 배제, 정량 할 수 있어서 활용면에서 있어서 실용적인 방법으로 제시될 수 있다. 그러나 이러한 성분의 함량은 추출온도, 추출시간, 추출에 사용되어지는 물의 양에 따라 다르고(Phan et al. 2012), 측정에 사용되어지는 분석기기에 따라 다소간 차이를 보일 수 있기 때문에(Wanyika et al. 2010) 시료처리와 사용된 기기에 대한 제시가 필요하다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 생산지별 원두커피내 카페인과 클로로겐산의 함유량을 모니터링하기 위해 수행되었다. 시료의 특별한 전처리 없이 추출 후 두 물질을 동시에 분석할 수 있는 LC-MS/MS 방법을

적용하였다. LC 상에서는 카페인과 클로로겐산을 완전하게 분리할 수 없었지만 전자 분무 이온화-선택반응분석법(selected reaction monitoring, SRM)에 의해 두 성분의 바탕선 분리가 가능하였고 이러한 방법으로 커피 시료내에 두 성분을 정량하였다. 커피 주요 생산지별 20개의 시료를 선정하여 분석한 결과 코스타리카산의 경우 카페인은 15.05 mg/g 평균값을 나타내었다. 클로로겐산의 경우는 5.33 mg/g이었다. 인도네시아산의 경우 카페인의 평균값은 13.10 mg/g이었고 클로로겐산의 경우는 3.75 mg/g이었다. 베트남산의 경우 카페인은 17.79 mg/g, 클로로겐산은 1.12 mg/g의 평균값을 나타내는 것으로 조사되었다. 식품 중 두 성분의 관심이 높아지고 있는 만큼 향후 관련 연구 및 관리를 위하여 보다 많은 시료수의 분석을 통한 통계적인 접근이 필요하다고 사료된다.

참고문헌

- Andersen LF, Jacobs DR, Carlsen MH, Blomhoff R(2006) Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa women's health study. *Am J Clin Nutr* 83(5), 1039-1046
- Brown CA, Bolton-Smith C, Woodward M, Tunstall-Pedoe H(1993) Coffee and tea consumption and the prevalence of coronary heart disease in men and women: results from the Scottish heart health study. *J Epidemiol Community Health* 47(3), 171-175
- Chu YF, Brown PH, Barbara J, Chen Y, Black RM, Williams CE, Lin Y-C, Hsu CW, Cheng IH(2009) Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *J Agric Food Chem* 57(20), 9801-9808
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S(2008) Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr* 138(12), 2309-2315
- Fujioka K, Shibamoto T(2008) Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem* 106(1), 217-221
- Heckman MA, Weil J, Mejia EG(2010) Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci* 75(3), 77-87
- Huxley R, Lee CM, Barzi F, Timmermeister L, Czernichow S, Perkovic V, Grobbee DE, Batty D, Woodward M(2009) Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Arch Intern Med* 169(22), 2053-2063
- Johnson-Kozlowski M, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E, Morton D, Marilyn J-K, Donna K-S, Elizabeth B-C, Deborah M(2002) Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am J Epidemiol* 156(9), 842-850
- Kang NJ, Lee KW, Kim BH, Bode AM, Lee H-J, Heo Y-S, Boardman L, Limburg P, Lee HJ, Dong(2011) Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinog* 32(6), 921-928
- Klatsky AL, Morton C, Udaltssova N, Friedman GD(2006) Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. *Arch Intern Med* 166(11), 1190-1195
- Lopez GE, Dam RM, Willett WC(2006) Coffee consumption and coronary heart disease in men and women: A prospective cohort study. *Circ* 113(17), 2045-2053
- Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I(2002) Risk factors for alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian study of health and aging. *Am J Epidemiol* 156(5), 445-453
- Maia L, de Mendonça A(2002) Does caffeine intake protect from alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 9(4), 377-382
- Marlynn J-K, Donna K-S, Elizabeth B-C, Deborah M(2002) Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am J Epidemiol* 156(9), 842-850
- Matsuura H, Mure K, Nishio N, Kitano N, Nagai N, Takeshita T(2012) Relationship between coffee consumption and prevalence of metabolic syndrome among Japanese civil servants. *J Epidemiol* 22(2), 160-166
- Michael FL, Meir JS, Walter CW, Donna S, Graham AC, Edward LG(2002) Coffee intake is associated with lower risk of symptomatic gallstone disease in women. *Gastroenterol* 123(6), 1823-1830
- Michael FL, Walter CW, Eric BR, Meir JS, Donna S, Graham AC, Edward LG(1999) A prospective study of coffee consumption and the risk of symptomatic gallstone disease in men. *J Am Med Assoc* 281, 2106-2112
- Muñoz LM, Lönnéröd B, Keen CL, Dewey KG(1988) Coffee consumption as a factor in iron deficiency anemia among pregnant women and their infants in Costa Rica. *Am J Clin Nutr* 48(3), 645-651
- O HJ(2009) Import trade trends of coffee for five

- years recently. Korea Customs Service Report, pp1-5
- Phan TTD, Kuban V, Kráčmar S(2012) Determination of caffeine contents of coffee brands in the vietnamese market. *J Microbiology Biotechnol Food Sci* 1, 995-1002
- Ricketts ML, Boekschoten MV, Kreeft AJ, Hooiveld GJ, Moen CJ, Müller M, Frants RR, Kasanmoentalib S, Post SM, Princen HM, Porter JG, Katan MB, Hofker MH, Moore DD(2007) The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors. *Mol Endocrinol* 21(7), 1603-1616
- Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Morens DM, Grandinetti A, Tung KH, Tanner CM, Masaki KH, Blanchette PL, Curb JD, Popper JS, White LR(2000) Association of coffee and caffeine intake with the risk of parkinson disease. *J Am Med Assoc* 283(20), 2674-2679
- Song YJ, Kristal AR, Wicklund KG, Cushing-Haugen KL, Rossing MA(2008) Coffee, tea, colas, and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 17(3), 712-716
- Ton TG, Watson NF, Longstreth WT(2010) Associations between narcolepsy and consumption of alcohol and caffeinated beverages among genetically susceptible individuals: A population-based case-control study. *J Clin Sleep Med* 6(4), 406
- Wanyika HN, Gatebe EG, Gitu LM, Ngumba EK, Maritim CW(2010) Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *Afr J Food Sci* 4(6), 353-358
- Wisborg K, Kesmodel U, Bech BH, Hedegaard M, Henriksen TB(2003) Maternal consumption of coffee during pregnancy and stillbirth and infant death in first year of life: Prospective study. *BMJ* 326(7386), 420-424
- Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysanthou C, Stefanadis C(2004) Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 80(4), 862-867
- Zhang QL, Lian HZ, Wang WH, Chen HY(2005) Separation of caffeine and theophylline in poly (dimethylsiloxane) micro channel electrophoresis with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 1098, 172-176