

## Spectrofluorometric determination of caffeine using acridine orange- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex

Jong Hee Park and Hee-Seon Choi\*

Department of Chemistry, The University of Suwon, San 2-2, Wau-ri, Bongdam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-743, Korea

(Received July 17, 2013; Revised October 15, 2013; Accepted October 15, 2013)

## Acridine orange- $\beta$ -cyclodextrin 내포 착물을 이용한 카페인 분광형광법 정량

박종휘 · 최희선\*

수원대학교 자연과학대학 화학과

(2013. 7. 17. 접수, 2013. 10. 15. 수정, 2013. 10. 15. 승인)

**Abstract:** A method on the determination of caffeine in beverage with acridine orange- $\beta$ -cyclodextrin (CD) inclusion complex was developed. The conditions such as pH of the sample solution and concentration of acridine orange and  $\beta$ -CD were optimized to 12.0( $\pm$ 0.5),  $1.9 \times 10^{-6}$  M and  $1.25 \times 10^{-3}$  M, respectively. Under these optimum conditions, the calibration curve of caffeine was obtained over concentration range of  $5 \times 10^{-5}$  ~  $1.1 \times 10^{-3}$  M. The detection limit was  $1.0 \times 10^{-5}$  M. The relative errors(%) in beverage samples were less than 5.0%.

**Key words:** caffeine determination, acridine orange,  $\beta$ -cyclodextrin, spectrofluorometry

### 1. 서 론

커피, 콜라, 차, 드링크제 및 에너지 음료 등과 같은 여러 종류의 식품과 음료에 들어있는 카페인인 사람에게 있어서 중추신경계에 자극을 주거나 과다하게 배뇨를 하게 하거나, 위산을 분비하게 하는 것과 같은 생리적인 현상을 일으킨다.<sup>1</sup> 하지만 카페인을 과량으로 섭취하게 되면 몸이 떨리고, 메스껍고, 신경이 예민해지고, 발작을 일으키기도 한다.<sup>2</sup> 따라서 적당한 카페인의 섭취량을 알기 위해 식품이나 음료 중에 들어

있는 카페인의 함량에 대해 많은 관심을 갖게 되고, 이에 따라 카페인의 함량을 알아내는 방법이 다양하게 개발되었다. 이 중에는 전압전류법,<sup>3</sup> FT-IR,<sup>4</sup> 이온 크로마토그래피,<sup>5</sup> HPLC,<sup>6</sup> GC<sup>7</sup> 등이 있다.

$\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) (Fig. 1(a))의 구멍 내부는 외부에 비해 비극성<sup>8</sup>으로서 비교적 비극성인 형태를 갖는 acridine orange (AO) (Fig. 1(b))가 구멍에 들어가 내포되어 착물을 만들면서 AO의 형광 세기가 증가한다. 여기에 분석물인 카페인 (Fig. 1(c))이 첨가되면  $\beta$ -CD에 내포되어 있는 AO와 카페인이 치환되면서 형

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-220-2152 Fax : +82-(0)31-220-2520

E-mail : choihs@suwon.ac.kr

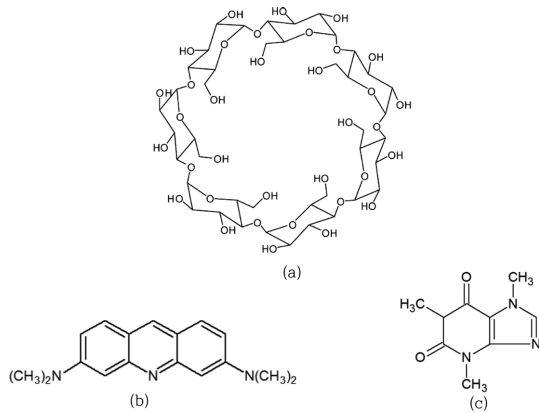


Fig. 1. Molecular structures of (a)  $\beta$ -cyclodextrin, (b) acridine orange, and (c) caffeine.

광의 세기가 감소된다. 즉 카페인의 농도가 증가함에 따라 형광의 세기가 비례적으로 감소하는데 이 현상을 이용하여 카페인을 정량하는 방법에 대해 연구하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시약과 용액

Acridine orange (Acros Organic, U.S.A)는  $1.0 \times 10^{-3}$  M 저장용액을,  $\beta$ -cyclodextrin (Wako, Japan)은  $1.0 \times 10^{-2}$  M 저장용액을 각각 만들어 필요할 때마다 적절한 농도로 만들어 사용하였다. 시료용액 및 표준용액의 pH는 1.0 M의 NaOH를 이용하여 조절하였다. 실험에 사용된 모든 시약들은 분석급 시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 실험에서 사용한 물은 초순수 장치 (Ultra 370 series, 영린기기, 대한민국)를 사용하여 만든 탈이온수였다.

### 2.2. 기기 및 실험조건

분광형광계는 일본 HITACHI 사의 F-2000을 사용하였으며, 들뜸 스펙트럼과 형광스펙트럼의 슬릿 나비는 모두 10 nm로 하여 측정하였다. 모든 형광 세기는 실온에서 acridine orange의 들뜸 파장인 297 nm에서 들뜨게 하고 형광 파장인 535 nm에서 1.0 cm 석영 용기를 사용하여 측정하였다. 이 때 시료 용액에 질소 기체를 불어넣어 용존 산소의 유무에 따른 형광 세기의 변화를 관찰한 결과 차이가 발생하지 않았기 때문에 시료용액과 표준용액에 질소 기체를 불어넣지 않고 형광 세기를 측정하였다.

### 2.3. 카페인 정량을 위한 검정곡선과 표준물 첨가법

7 개의 20 mL 부피 플라스크에 각각 카페인 농도를  $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.1 \times 10^{-3}$  M 되도록 취하였고 각각에 AO 농도가  $1.9 \times 10^{-6}$  M,  $\beta$ -CD 농도가  $1.25 \times 10^{-3}$  M 되게 하고, 용액의 pH를 12.0( $\pm 0.5$ ) 정도가 되도록 1.0 M NaOH 용액 0.35 mL를 가한 후 증류수로 표선까지 묽혀 형광 세기를 측정하였다. 실제 시료 분석에 이용하는 검정곡선은 카페인 없을 때의 AO- $\beta$ -CD 내포 착물의 형광 세기(F1)와 카페인을 첨가한 후의 AO- $\beta$ -CD 내포 착물의 형광 세기(F2)의 차이( $\Delta F = F1 - F2$ )를 카페인의 몰농도(M)에 대해 도시하여 얻었다. 바탕용액은 카페인과 AO를 제외하고 나머지 시약들은 똑같은 양을 가하여 만들었으며 이의 형광 세기를 측정하여 바탕보정에 사용하였다.

표준물 첨가법을 하기 위하여 5개의 20 mL 부피 플라스크에 음료 시료를 10 mL 취하고, 여기 각각에 AO 농도가  $1.9 \times 10^{-6}$  M,  $\beta$ -CD 농도가  $1.25 \times 10^{-3}$  M 이 되도록 넣어주었고, 그리고 pH 12.0( $\pm 0.5$ ) 정도가 되도록 1.0 M NaOH 용액 적절한 양을 가하였다. 그 다음  $10^{-3}$  M 카페인 표준용액을 0, 0.1, 0.2, 0.3, 및 0.4 mL 가한 후 증류수로 표선까지 묽히고 형광 세기를 측정하여 카페인을 정량하였다.

### 2.4. 음료 시료 만들기

실제 시료인 음료 시료내의 카페인을 정량하기 위해 5개의 20 mL 부피 플라스크 각각에 음료 시료를 10 mL씩 취하고, 각각 모두에 acridine orange 농도가  $1.9 \times 10^{-6}$  M,  $\beta$ -CD 농도가  $1.25 \times 10^{-3}$  M 되도록 하고, pH 12.0( $\pm 0.5$ ) 정도가 되도록 1.0 M NaOH 용액을 가한 후 증류수로 표선까지 묽힌 후 형광 세기를 측정하였다.

AO- $\beta$ -CD 내포 착물은 햇빛이 있는 곳에서는 불안정하여 시간이 지남에 따라 형광의 세기가 달라지므로 형광 세기를 측정하기 전까지 항상 은박지를 싸서 어두운 곳에 보관하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Acridine orange의 형광 스펙트럼

Fig. 2에서는 AO(a), AO- $\beta$ -CD 내포 착물(b), 그리고 AO- $\beta$ -CD 내포 착물에 카페인을 첨가하였을 때(c)의 형광 스펙트럼을 보여주고 있다. 같은 농도의 AO에 대해서  $\beta$ -CD가  $1.25 \times 10^{-3}$  M 농도로 존재하면 AO와  $\beta$ -CD 간의 내포 착물이 형성되기 때문에 형광

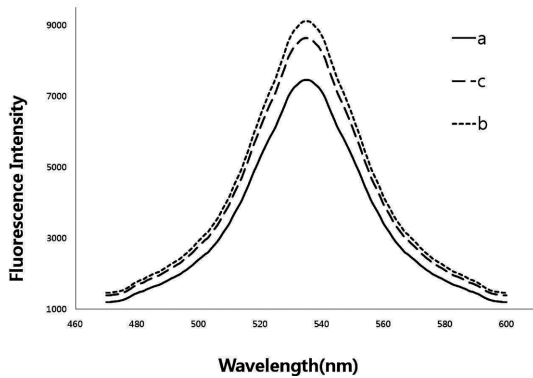


Fig. 2. Fluorescence emission spectra of (a) acridine orange ( $1.9 \times 10^{-6}$  M), (b) acridine orange-β-cyclodextrin inclusion complex, and (c) acridine orange-β-cyclodextrin inclusion complex in caffeine solution.

의 세기가 증가한다. 이는 AO가 β-CD와 내포 착물을 만들면서 AO 분자내의 회전 및 진동운동이 자유롭지 못해 내부전환이 잘 일어나지 않아 비복사 전이가 없어서 형광 세기가 증가한 것으로 보인다. 그리고 AO-β-CD 내포 착물에 카페인을 첨가하면 형광의 세기가 감소하는 것을 볼 수 있는데 이는 AO-β-CD 내포 착물에서 AO가 카페인으로 치환되기 때문일 것이다.

### 3.2. 최적 조건

β-CD의 안쪽인 구멍은 바깥쪽보다 비극성 즉 소수성이어서 AO가 비교적 비극성에 가까운 구조를 가질수록 AO-β-CD 내포 착물을 더 잘 만들 수 있게 된다. AO의 구조(Fig. 1(b))를 보면 산성일 때는 두 아민기에 H<sup>+</sup>가 붙어 더 큰 양전하를 띠지만 염기성일 때는 이런 현상이 일어나지 않아 양전하를 띠지 않으므로 내포 착물을 더 잘 만들 것으로 예상된다. 따라서 AO-β-CD 내포 착물을 잘 형성하여 형광 세기를 가장 크게 증가시키고 카페인에 의해 치환이 가장 잘 되는 pH를 조사하였더니 pH 12.0(±0.5)였다. 용액의 pH를 12.0(±0.5)로 맞추는 데는 1.0 M NaOH 0.35 mL 정도를 가하여 조절하였다. 이때 용액의 pH 조절의 편리성과 안정성을 위해 사용하는 완충용액은 높은 농도의 전해질을 포함하고 있으므로 이로 인해 AO의 형광 세기가 불안정하였기 때문에 사용하지 않았다.

AO와 β-CD를 잘 결합시켜 형광의 세기를 극대화시켜야 다양한 농도의 카페인을 검출할 수 있으므로 최대의 형광 세기를 얻을 수 있는 AO와 β-CD의 농도를 결정해 보았다.

pH 12.0(±0.5)에서 β-CD의 농도가  $1.25 \times 10^{-3}$  M

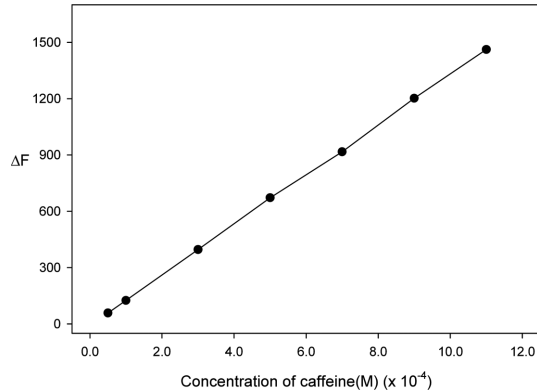


Fig. 3. Calibration curve of caffeine at  $1.9 \times 10^{-6}$  M acridine orange,  $1.25 \times 10^{-3}$  M β-CD and pH=12.0(±0.5).

이고, AO의 농도는  $1.9 \times 10^{-6}$  M 일 때 형광의 세기가 가장 컸고 이 이상의 농도가 되면 기기의 형광 세기 측정 범위를 넘어섰기 때문에 사용할 수 없었다.

앞에서 설명한 바와 같이 β-CD의 농도가 높을수록 AO와 내포 착물을 많이 만들게 되므로 AO보다는 과량을 넣어주어야 하는데 AO의 농도가  $1.9 \times 10^{-6}$  M 일 때 β-CD는  $1.25 \times 10^{-3}$  M에서 가장 형광 세기가 컸고 그 이상의 농도가 되어도 형광의 세기 변화는 거의 없었다.

### 3.3. 실제 시료에의 응용

2.3에서 설명한 방법으로 카페인의 검정곡선을 얻었으며(Fig. 3) 그 성능계수를 Table 1에 실었다. 비교적 감도(기울기)가 좋고, 직선성(R<sup>2</sup>)도 매우 좋음을 알 수 있다.

실제 음료 속에 들어있는 카페인의 함량을 측정하기 위해 시판되고 있는 하나의 B 드링크제(D사)와 하나의 M 에너지 음료(L사)를 사용하였다. 이에 대한 결과를 Table 2에 나타내었다. 비교적 작은 오차 범위에서 정량할 수 있음을 알 수 있다.

시료의 매트릭스로 인한 방해가 있을 가능성이 있어서 표준물 첨가법으로 실험하여 얻은 카페인의 함

Table 1. Calibration curve limit of detection and quantitation of caffeine

Linear range	$5.0 \times 10^{-5}$ – $1.1 \times 10^{-3}$ M
Regression equation	$y = 1.34 \times 10^6 x - 6.9$
Correlation coefficient (R <sup>2</sup> )	0.9987
Detection limit	$1.0 \times 10^{-5}$ M (1.94 μg/mL)
Quantitation limit	$3.3 \times 10^{-5}$ M (6.40 μg/mL)

Table 2. Determination of caffeine in beverage samples

Samples (volume)	Certified value <sup>a</sup>	External standard method		Standard addition method	
		Found value <sup>b</sup>	% Relative error	Found value <sup>b</sup>	% Relative error
B (100 mL)	30 mg	28.8(±0.9) mg	-4%	29.0(±0.8) mg	-3.3%
M (250 mL)	36.75 mg	35.12(±0.78) mg	-4.4%	35.24(±0.82) mg	-4.1%

<sup>a</sup>The values shown in beverage cans

<sup>b</sup>The mean values were obtained from five replicates of samples.

량을 알아보았다. 이 결과와 검정곡선법으로 얻은 카페인 함량이 95% 신뢰수준에서 F시험<sup>9</sup>을 한 결과 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 실제 시료인 두 음료에 들어있는 매트릭스에 의한 방해는 없다고 할 수 있다.

본 연구의 응용성을 확장하고자 두 종류의 콜라의 카페인 함량도 측정하려고 하였으나 두 종류의 콜라 모두 카페인의 들뜨기 과장이 콜라 매트릭스에 의한 흡수 과장과 겹쳐서 정량할 수 없었다.

#### 4. 결 론

Acridine orange-β-cyclodextrin 내포 착물을 이용하여 두 종류의 음료 시료 중에 들어있는 카페인을 분광형광법으로 비교적 간단하게 정량할 수 있었다. 측정 농도 범위는  $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.1 \times 10^{-3}$  M이고, 검출한계는  $1.0 \times 10^{-5}$  M (1.94 μg/mL)이고, 측정값의 % 상대오차는 5% 미만이었다.

#### 참고문헌

1. M. A. Rostagno, N. Manchn, M. D'Arrigo, E. Guillamn,

A. Villares and A. Garca-Lafuente, *Anal. Chim. Acta*, **685**, 204-211 (2011).

2. U. L. P. Okonny, S. X. Wang, R. J. Stubbs and N. A. Guzman, *Electrophoresis*, **26**, 2652-2663 (2005).

3. L. vorc, P. Tomk, J. Svtkov, M. Rievaj and D. Bustin, *Food Chem.*, **135**, 1198-1204 (2012).

4. N. M. Najafi, A. S. Haid and R. K. Afshin, *Microchem. J.*, **75**, 151-158 (2003).

5. Q. Chen, S. Mou, X. Hou and Z. Ni, *Anal. Chim. Acta*, **371**, 287-296 (1998).

6. M. S. El-Shahaw I, A. Hamza, S. O. Bahaffi, A. A. Al-Sibaai and T. N. Abduljabbar, *Food Chem.*, **134**, 2268-2275 (2012).

7. A. A. Rahim, B. Saad, H. Osman, N. Hashim and S. Yahya, *Food Chem.*, **126**, 1412-1416 (2011).

8. X. Zhu, J. Sun and J. Wu, *Talanta*, **72**, 237-242 (2007).

9. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler and S. R. Crouch, "Fundamentals of Analytical Chemistry", 8th ed., 158, Thomson Brooks/Cole, U.S.A. 2004.