

## Флуоресценція люцигеніну і флуоресцеїну в присутності кофеїну і таніну

*Роботу виконано на кафедрі аналітичної хімії  
КНУ ім. Тараса Шевченка*

Досліджено вплив кофеїну і таніну на інтенсивність флуоресценції люцигеніну і флуоресцеїну в гомогенній фазі. Установлено, що інтенсивність флуоресценції люмінофорів зменшується зі збільшенням концентрації кофеїну й таніну. Кофеїн краще гасить люмінесценцію люмінофору аніонного типу – флуоресцеїну, що може бути покладено в основу розроблення методики люмінесцентного визначення кофеїну. Діапазон лінійності градуувального графіка становить 4–20 мг/л кофеїну, межа виявлення – 4 мг/л.

**Ключові слова:** флуоресцеїн, люцигенін, кофеїн, танін, люмінесценція.

**Кеда Т. Е. Флуоресценция люцигенина и флуоресцеина в присутствии кофеина и танина.** Исследовано влияние кофеина и танина на интенсивность флуоресценции люцигенина и флуоресцеина в гомогенной фазе. Установлено, что интенсивность флуоресценции люминофоров уменьшается с увеличением концентрации кофеина и танина. Кофеин лучше гасит люминесценцию люминофора анионного типа – флуоресцеина, что может быть положено в основу разработки методики люминесцентного определения кофеина. Диапазон линейности градуировочного графика составляет 4–20 мг/л кофеина, предел обнаружения – 4 мг/л.

**Ключевые слова:** флуоресцеин, люцигенин, кофеин, танин, люминесценция.

**Keda T. Ye. Lucigenin and Fluorescein Fluorescence in the Presence of Caffeine and Tannin.** The influence of caffeine and tannin on the intensity of lucigenin and fluorescein fluorescence in homogeneous phase was studied. Intensity of fluorophores fluorescence was found to decrease with the growth of caffeine and tannin concentration. Caffeine shows efficient quenching of the anionic fluorophore – fluorescein. This can be used for the fluorimetric determination of caffeine. The calibration graph was linear in the range 4 to 20 mg/l of caffeine with a detection limit of 4 mg/l.

**Key words:** fluorescein, lucigenin, caffeine, tannin, fluorescence.

**Постановка наукової проблеми та її значення.** Зростання споживання кофеїновмісних продуктів зумовлене фізіологічними особливостями кофеїну як стимулятора центральної нервової системи людини. Однак надмірні кількості кофеїну в організмі спричиняють ефект звикання, призводять до виснаження нервових клітин, безпліддя і появи онкозахворювань [6; 11]. Важливо врегулювати споживання і контролювати якість кофеїновмісних напоїв. Чинні стандартні рідинно-хроматографічні, спектрофотометричні й титриметричні методики визначення кофеїну є або дорогими і трудомісткими, або ж характеризуються незадовільною точністю та чутливістю, зокрема під час визначення кофеїну в декофеїнізованій продукції [2; 3; 4; 8; 9; 10]. Як наслідок, розроблення надійних, простих і експресних аналітичних методик для визначення кофеїну та контролю за якістю кофеїновмісних продуктів і сьогодні є актуальним завданням.

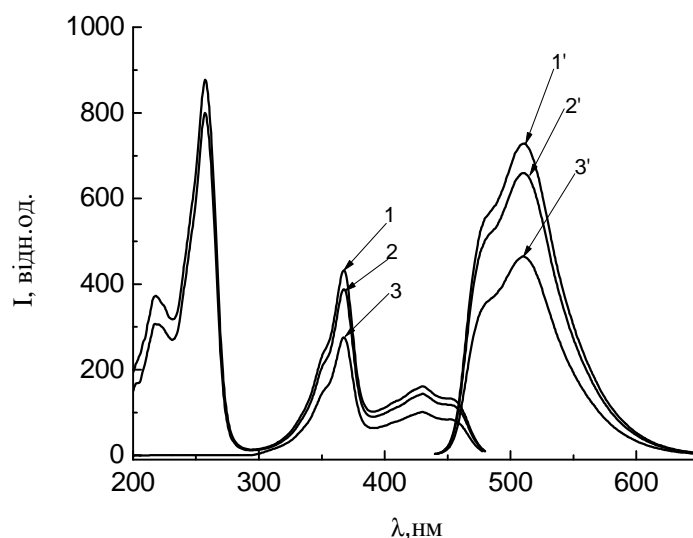
Перспективним у цьому плані може бути застосування високочутливого люмінесцентного методу, що є не лише потужним засобом для виявлення та визначення аналітів у різноманітних середовищах, а й унікальним інструментом для дослідження хімічних і біохімічних процесів. Вивчення спектральних властивостей люмінофорів має велике значення для розроблення нових методик аналізу різноманітних об'єктів. Люцигенін і флуоресцеїн – відомі флуоресцентні та хемілюмінесцентні реагенти катіонного й аніонного типу [1; 7]. У літературі відсутні відомості щодо застосування цих реагентів для визначення кофеїну флуоресцентним методом. Одним із основних компонентів, які заважають під час визначення кофеїну в рослинній сировині, є танін, що утворює кофеїну таннат, тому, розробляючи методику визначення кофеїну, доцільно вивчати вплив таніну.

**Мета роботи** – дослідити вплив кофеїну і таніну на інтенсивність флуоресценції люцигеніну та флуоресцеїну.

**Матеріали і методи.** У роботі використовували флуоресцеїн і люцигенін «ч. д. а.» виробництва «РеаХим», кофеїн кваліфікації «фарм.» («Merck»), танін «ч. д. а.» («Merck»), аскорбінову кислоту

«ч. д. а.». Вихідні розчини готували розчиненням точних наважок препаратів у бідистильованій воді. Боратний із рН 9,18 та фосфатний з рН 4,02 буферні розчини готували з фіксаналів. Спектри збудження і люмінесценції розчинів реєстрували на спектрофлуориметрі Perkin Elmer LS 55;  $l=1,00$  см.

**Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження.** *Вплив кофеїну й таніну на люмінесценцію люцигеніну.* Вплив кофеїну на люмінесценцію люцигеніну в розчині вивчали залежно від кислотності середовища та концентрації кофеїну. Встановлено, що кофеїн гасить люмінесценцію люцигеніну. Краще цей ефект спостерігається при рН розчину 9,18 (рис. 1). Однак значне зменшення інтенсивності сигналу в спектрах люмінесценції ( $\lambda_{\max} = 510$  нм) відбувається лише за молярного співвідношення люцигеніну та кофеїну в суміші 1 : 1000. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що за таких умов обидві сполуки знаходяться в катіонній формі [5; 12].

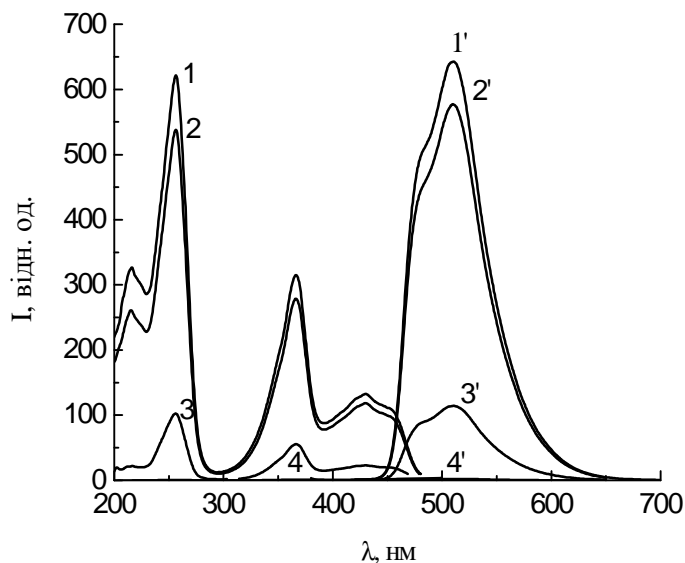


**Рис. 1.** Спектри збудження (1–3) і люмінесценції (1'–3') 5 мкмоль/л розчину люцигеніну за відсутності (1) і в присутності кофеїну (2, 3). рН = 9,18,  $C_{\text{кофеїну}}$  моль/л:  $5 \cdot 10^{-6}$  (2);  $5 \cdot 10^{-3}$  (3),  $\lambda_{\text{збудж}} = 370$  нм,  $\lambda_{\text{емісії}} = 510$  нм

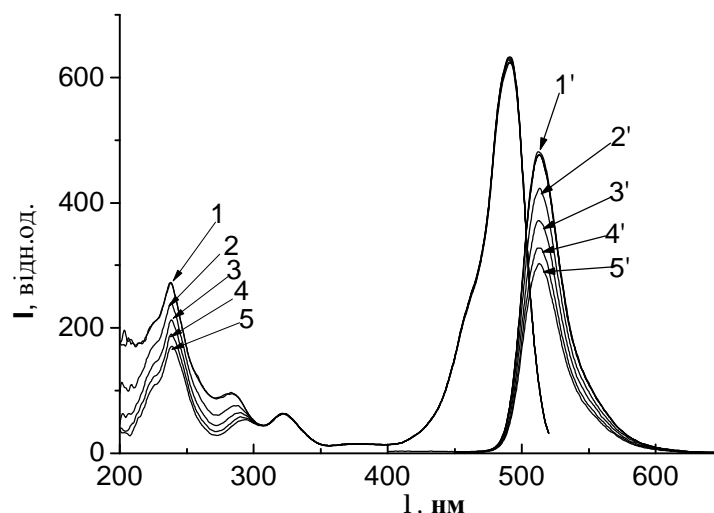
Для таніну, на відміну від кофеїну, ефект гасіння флуоресценції люцигеніну виражений більшою мірою. Так, при рН 9,18 ступінь гасіння флуоресценції становив  $> 80\%$  уже за молярного співвідношення люцигеніну й таніну 1:1, а за концентрації таніну в 10 разів вищій, ніж люцигеніну, спостерігалось повне гасіння свічення (рис. 2). Це, ймовірно, зумовлено іонною взаємодією катіонного люмінофору й аніонної форми таніну за цих умов.

*Вплив кофеїну і таніну на люмінесценцію флуоресцеїну.* За умов найбільшої інтенсивності свічення флуоресцеїну при рН розчину 9,18 введення кофеїну спричиняє зменшення інтенсивності сигналу в спектрах збудження ( $\lambda_{\max} = 238$  нм) і люмінесценції ( $\lambda_{\max} = 530$  нм) пропорційно зростанню його концентрації в розчині (рис. 3). Цей ефект можна використати для визначення кофеїну флуоресцентним методом.

Градувальний графік залежності інтенсивності люмінесценції флуоресцеїну від концентрації кофеїну має вигляд:  $I_{530} = (393 \pm 13) + (-18 \pm 2)C_{\text{кофеїну}}$ ,  $10^{-5}$  моль/л. Діапазон лінійності градувального графіка становить 4–20 мг/л кофеїну, межа виявлення – 4 мг/л.



**Рис. 2.** Спектри збудження (1-4) і люмінесценції (1'-4') 5 мкмоль/л розчину люцигеніну за відсутності (1) і в присутності таніну (2, 3).  $pH = 9,18$ ,  $C_{\text{танін}}$  моль/л:  $5 \cdot 10^{-7}$  (2);  $5 \cdot 10^{-6}$  (3),  $5 \cdot 10^{-5}$  (4),  $\lambda_{\text{збудж}} = 370$  нм,  $\lambda_{\text{емісії}} = 570$  нм

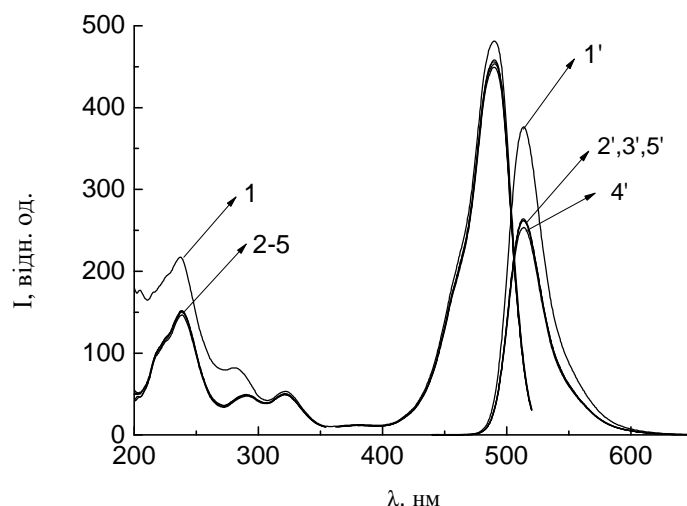


**Рис. 3.** Спектри збудження (1-5) і люмінесценції (1'-5') розчину 0,5 мкмоль/л флуоресцеїну в присутності кофеїну.  $C_{\text{кофеїну}} \cdot 10^{-5}$  моль/л: 0 (1), 2,5 (2), 4,9 (3), 7,2 (4), 9,5 (5);  $pH = 9,18$ ;  $\lambda_{\text{зб}} = 238$  нм,  $\lambda_{\text{емісії}} = 530$  нм

Уведення таніну також призводить до гасіння флуоресценції флуоресцеїну, проте меншою мірою, ніж у випадку з люцигеніном. Різниця інтенсивності люмінесценції ( $\Delta I = I_0 - I$ ) за відсутності та в присутності таніну (флуоресцеїн : танін = 1 : 4) становить 100 відносних одиниць, а з люцигеніном – понад 600 відносних одиниць. Це вказує на інший тип взаємодії гасника з люмінофором.

Для усунення впливу таніну, який заважає під час визначення кофеїну, використали здатність таніну окиснюватися під час кип'ятіння. Показано, що після 20-хвилинної термічної обробки (піщана баня) і охолодження до кімнатної температури, розчини таніну не змінюють інтенсивності люмінесценції флуоресцеїну. Натомість вплив кофеїну навіть після такої обробки не змінюється.

Ураховуючи те, що в багатьох біологічних об'єктах, які містять кофеїн, присутня також аскорбінова кислота, було вивчено її вплив на люмінесценцію флуоресцеїну. Установлено, що наявність у розчині еквімолярних кількостей аскорбінової кислоти змінює інтенсивність аналітичного сигналу не більше, ніж на 5 % (рис. 4).



**Рис. 4.** Спектри збудження (1–5) і люмінесценції (1'–5') розчину флуоресцеїну за відсутності (1) та в присутності кофеїну (2, 2') і суміші кофеїну і аскорбінової кислоти (3–5, 3'–5').  $C_{\text{flu}}=0,1$  мкмоль/л,  $C_{\text{коф}}=5 \cdot 10^{-5}$  моль/л (2–5, 2'–5'),  $C_{\text{аск}} \mu\text{кмоль/л}$ : 1 (3), 10 (4), 50 (5).  $\lambda_{\text{зб}} = 238$  нм,  $\lambda_{\text{емісії}} = 530$  нм

Отримані дані підтверджують перспективність розроблення методики люмінесцентного визначення кофеїну з використанням флуоресцеїну.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Установлено, що кофеїн і танін зменшують інтенсивність флуоресценції люцигеніну і флуоресцеїну в гомогенній фазі. У випадку люмінофору катіонної природи – люцигеніну більш ефективним гасником є танін, що за оптимальних умов люмінесценції (рН 9,18) знаходиться в аніонній формі.

Кофеїн краще гасить люмінесценцію аніонного люмінофору – флуоресцеїну. Градувальний графік для визначення кофеїну за гасінням люмінесценції флуоресцеїну лінійний у межах 4–20 мг/л, межа виявлення становить 4 мг/л. Вплив таніну, який заважає під час визначення кофеїну, можна усунути кип'ятінням розчинів упродовж 20 хв. Наявність у розчині еквімолярних кількостей аскорбінової кислоти не впливає на визначення кофеїну з флуоресцеїном.

#### Список використаної літератури

1. Меленьева Г. А. Фармацевтическая химия / Г. А. Меленьева, Л. А. Антонова. – М. : Медицина, 1985. – 480 с.
2. Швайкова М. Д. Токсикологическая химия / М. Д. Швайкова. – Изд. 3. – М. : Медицина, 1975. – 376 с.
3. Кофе. Определение массовой доли кофеина. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ISO 10095: 1992): ГОСТ Р 52613–2006. – [Введ. 15–12–2006]. – Киев : Стандартиформ, 2004. – 7 с.
4. Кофе натуральный растворимый. Технические условия : ГОСТ 29148 – 97. – [Введ. 1999–01–01]. – Киев : Стандартиформ, 1999. – 6 с.
5. Напитки безалкогольные. Методы определения аспаркама, сахарина, кофеина и бензоата натрия. ГОСТ 30059-93. – [Введ. 1996–01–01]. – Киев : Госстандарт Рос. Федерации, 1998. – 6 с.
6. Напитки алкогольные и безалкогольные. Определение кофеина, аскорбиновой кислоты и ее солей, консервантов и подсластителей методом капиллярного электрофореза. ГОСТ 53193-2008. – [Введ. 2008–12–18]. – Киев : Стандартиформ, 2010. – 12 с.
7. Кофепродукты. Методика выполнения измерения массовой доли кофеина. ГОСТ Р 51182-98. – [Введ. 1998–07–03]. – Киев : Госстандарт России, 2003. – 8 с.
8. Чай. Методы определения содержания танина и кофеина. ГОСТ 19885-74. – [Введ. 1975–07–01]. – Киев : Стандартиформ, 1985. – 4 с.
9. Бишоп Э. Индикаторы : в 2 т. Т. 2 / Э. Бишоп ; пер. с англ. И. В. Матвеевой. – М. : Мир, 1976. – 496 с.
10. Мчедлов-Петросян Н. О. Константы ионизации флуоресцеина в растворах / Н. О. Мчедлов-Петросян // Журн. аналит. химии. – 1979. – Т. 34, № 6. – С. 1055–1059.
11. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии : пер. с англ. / Дж. Лакович. – М. : Мир, 1986. – 496 с.
12. Edward H. Kerns. Drug-like properties: concepts, structure, design and methods for ADME to toxicity / H. Edward, Li Di Kerns. – Academic Press, 2008.

Стаття надійшла до редколегії  
12.04.2012 р.