

УДК 54

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА ПО ТУШЕНИЮ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АСПИРИНА

### **В. А. Лысова**

кандидат технических наук, доцент

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

### **Н. А. Клебанова**

кандидат химических наук, доцент

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

### **А. В. Клебанов**

кандидат химических наук, доцент

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

### **А. А. Дробенкова**

выпускница факультета математики и естествознания

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

*В статье представлены экспериментальные данные по исследованию флуоресценции водных растворов чистого аспирина и аспирина в присутствии кофеина. Методом спектрофлуориметрии исследован процесс тушения флуоресценции аспирина в присутствии кофеина и установлен диапазон концентраций кофеина, в котором флуоресценция аспирина наиболее чувствительна к присутствию кофеина. В данном диапазоне получена градуировочная зависимость относительной флуоресценции аспирина от концентрации кофеина, которую можно использовать для определения кофеина в различных реальных объектах.*

**Ключевые слова:** аспирин, кофеин, спонтанная флуоресценция, спектрофлуориметрия, тушение флуоресценции, относительная интенсивность флуоресценции.

### **Введение**

Флуоресценция – это свечение, индуцированное светом. В повседневной жизни мы практически не встречаем или не замечаем это явление. Интенсивность флуоресценции слишком мала по сравнению с вызывающим ее светом. Тем не менее на сегодняшний день существуют приборы и методы, позволяющие не только выявлять, но и измерять различные параметры флуоресценции. Причем благодаря этим измерениям, можно получать уникальную информацию о молекулярной организации и функционировании биологических систем [1, 2]. За последние тридцать лет использование различных спектрофлуориметрических методов, основанных на регистрации флуоресценции, в биологических и медицинских исследованиях стремительно возросло. Обусловлено это появлением как новых технических возможностей – в первую очередь компьютеров и лазеров, – так и широкого спектра доступных флуоресцирующих молекул и молекулярных комплексов [2]. Флуоресцентная методология обеспечила решение многих принципиальных задач биологии и медицины. Благодаря высокой чувствительности и сравнительной безопасности она вытеснила многие традиционные методы, связанные с применением радиоактивных веществ.

Эффект тушения флуоресценции в последние годы привлекает внимание исследо-

вателей [3-7] в области биологических, биомедицинских и биохимических исследований как основа для создания простых и экспрессных методов анализа как органических биологически-активных молекул, так и некоторых комплексообразователей [4, 6]. Известно, что интенсивность флуоресценции зависит и от внутри-, и межмолекулярного взаимодействия, которое приводит к снижению излучения флуорофоров [3]. Изученные тушители флуоресценции можно разделить на четыре группы:

- тяжелые анионы и катионы (например, иодид и бромид ионы, катионы цезия и меди);

- парамагнитные ионы и молекулы, которые имеют неспаренные электроны (например, молекулярный кислород, некоторые оксосоединения азота, катион марганца (+2) и др.);

- полярные растворители (наибольшим тушащим действием обладает вода);

- акцепторы электронной энергии возбуждения.

В аналитическом обзоре [3] приведено достаточно большое количество примеров количественного определения аналитов-тушителей с использованием люминесцентных (флуоресцентных) зондов: от ионов алюминия до молекул ДНК, что подтверждает актуальность и перспективность исследования эффекта тушения различных флуорофоров как ионами металлов, так и биологически активными веществами с целью разработки методик определения веществ-тушителей. Одним из веществ-тушителей по отношению к некоторым органическим флуорофорам является кофеин [8, 9].

Кофеин относится к алкалоидом пуринового ряда. Он присутствует в листьях чая, семенах кофе, орехах кола, плодах гуараны, бобах какао, луковицах морского лука и энергетических напитках. Растениями кофеин синтезируется для стимулирования опылителей и предотвращения поедания насекомыми. В лаборатории его можно синтезировать из теобромина. Кофеин оказывает выраженное физиологическое действие на организм человека [10]: снижает вялость и утомленность, активизирует и оптимизирует механизмы возбуждения в коре головного мозга, вызывая положительные условные автоматизмы и увеличивая двигательную активность. Улучшает работу сердца и дыхания; возбуждает центральную нервную систему и сердечно-сосудистую систему; может использоваться как противоядие от отравлений барбитуратами и морфием. Кофеин увеличивает рефлекторную возбудимость спинного мозга, снижает воздействие снотворных и наркотических веществ и улучшает работу центров дыхания и движения. Вместе с тем в больших дозах кофеин оказывает негативное действие на нервную систему человека. Особенности нервной системы каждого человека должны быть учтены при определении дозировки кофеина. Он входит в состав таких лекарственных препаратов, как эмпирин, кофетамин В, кафергот и виграин [11].

В связи с тем что кофеин проявляет слабую флуоресценцию большинство известных спектрофлуориметрических методов анализа основаны на эффекте тушения флуоресценции веществ с выраженным излучением, например, 3,5-диаминобензойной кислоты [8] или аспирина [9]. Тем не менее за последнее десятилетие разработано и используется оборудование, способное зафиксировать даже такую сверхслабую флуоресценцию, которая характерна для кофеина [3, 12, 13].

Целью настоящей работы являлось исследование флуоресценции аспирина в присутствии кофеина в растворе методом спектрофлуориметрии.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования были кофеин, ацетилсалициловая кислота (аспирин), экстракты кофе, чая и энергетический напиток.

Кофеин химически чистый (ХЧ) – мелкодисперсный порошок белого цвета, молярная масса 194,19 г/моль, плотность 1,23 г/см<sup>3</sup>, температура плавления 234 °С, температура сублимации 180 °С.

Аспирин таблетки производства the Bartell drugs company с содержанием основного вещества (ацетилсалициловой кислоты) – 325 мг / шт.

Для получения экстракта кофе использовали нерастворимый кофе-порошок марки Barista. Для получения экстракта чая использовался листовый черный чай Tess.

Основным методом исследования флуоресценции является спекрофлуориметрический анализ, который проводился на приборе спекрофлуориметр FP-8200 (производство Япония).

Приготовление стандартных растворов осуществляли следующим образом:

- приготовление раствора аспирина с концентрацией 0,04 мг/мл (стандартный раствор 1): исходя из содержания ацетилсалициловой кислоты в одной таблетке (325 мг), взвешена одна таблетка и взято 123/1000 от ее массы ( $0,36 \text{ г} * 0,123 = 0,044 \text{ г}$ ). Полученную навеску аспирина с содержанием ацетилсалициловой кислоты 0,04 г растворили в мерной колбе на 1 литр и довели до метки дистиллированной водой;

- приготовление раствора аспирина с концентрацией 0,004 мг/мл (стандартный раствор 2): точно отмеренный объем стандартного раствора 1 – 25 мл перенесли в мерную колбу на 250 мл и довели до метки дистиллированной водой;

- приготовление раствора кофеина концентрацией 0,1 мг/мл (стандартный раствор 3): навеску кофеина массой 25 мг перенесли в мерную колбу на 250 мл и довели до метки дистиллированной водой.

Для исследования зависимости интенсивности флуоресценции аспирина от концентрации из стандартного раствора 2 методом разбавления были приготовлены растворы с концентрациями 0,0005 мг/мл, 0,001 мг/мл, 0,002 мг/мл, 0,003 мг/мл и 0,004 мг/мл.

Для исследования эффекта тушения флуоресценции аспирина в присутствии кофеина была приготовлена серия растворов с фиксированным содержанием аспирина (0,004 мг/мл) и непрерывно возрастающим содержанием кофеина. Растворы готовили непосредственно в кювете для спекрофлуориметрии. Объем кюветы составлял 3 мл. Рассчитанные объемы добавляемых растворов приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Вносимые объемы стандартных растворов аспирина и кофеина для приготовления рабочих растворов (в расчете на 3 мл)

№	V аспирина (мл) (стандартный раствор 1)	V воды (мл)	V раствора кофеина (мл) (стандартный раствор 3)	C кофеина (мг/мл)
1	0,3	0	2,7	0,09
2	0,3	0,3	2,4	0,08
3	0,3	0,6	2,1	0,07
4	0,3	0,9	1,8	0,06
5	0,3	1,2	1,5	0,05
6	0,3	1,5	1,2	0,04
7	0,3	1,8	0,9	0,03
8	0,3	2,1	0,6	0,02
9	0,3	2,4	0,3	0,01
10	0,3	2,7	0	0

Приготовление экстрактов кофе и чая следующим образом:

Навеску молотого кофе массой 8 г помещали в стакан, заливали 100 мл кипящей дистиллированной воды и кипятили в течение 5 минут. Полученную суспензию охлаждали до +18...+20 °С, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливали дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы взбалтывали и отстаивали 2,3 ми-

нуты, затем фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат использовали для анализа [14].

Навеску листового чая массой 16 г помещали в стакан, заливали 100 мл кипящей дистиллированной водой и кипятили 5 минут. Полученную суспензию охлаждали до +18...+20 °С, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливали дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы взбалтывали и отстаивали 2,3 минуты, затем фильтровали. Полученный фильтрат использовали для анализа [14].

Энергетический напиток изменениям не подвергали.

### Результаты и обсуждение

Для определения длины волны с максимальной флуоресценцией аспирина были получены 3-D спектры стандартного раствора аспирина (стандартный раствор 1) в интервале длин волн возбуждения – испускания  $\lambda = 210\text{--}500$  нм. Полученные данные представлены на рисунке 1.

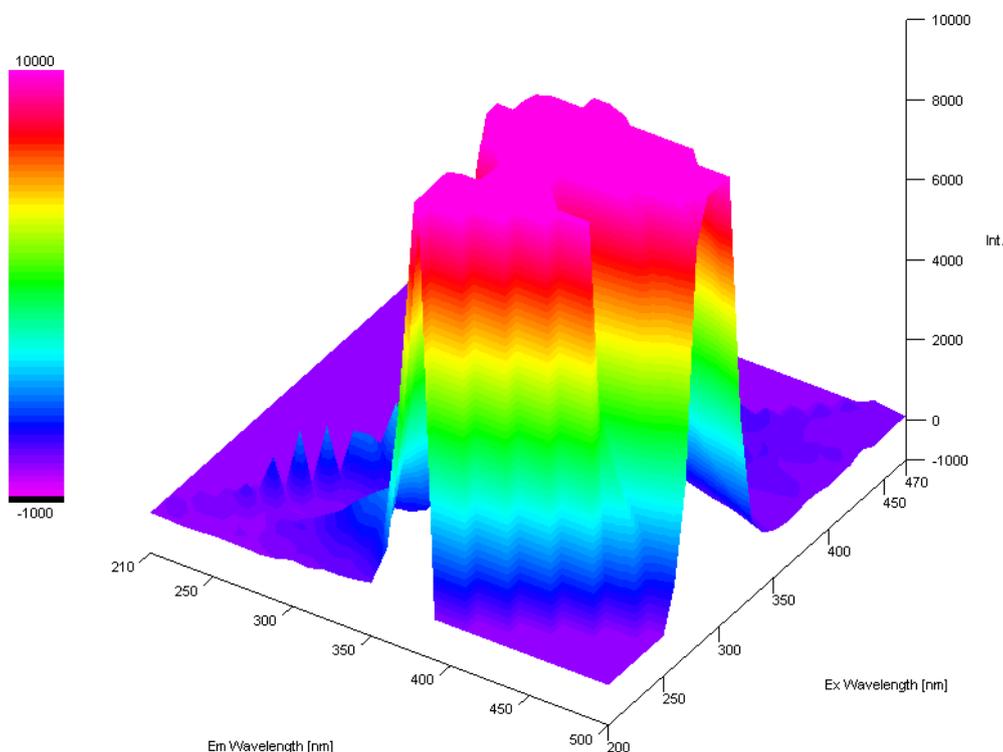


Рисунок 1 – 3-D спектр стандартного раствора 1 аспирина.  
Чувствительность прибора High

Как видно из приведенных данных, пик флуоресценции аспирина наблюдается при длине волны возбуждения  $\lambda = 380$  нм, длина волны испускания  $\lambda = 390$  нм. Однако относительная интенсивность флуоресценции стандартного раствора аспирина 1 при заданных условиях анализа получилась очень высокая ( $>10000$  у. е.) и проводить дальнейшие измерения с такой концентрацией аспирина нецелесообразно, поэтому был приготовлен стандартный раствор 2 с концентрацией аспирина 0,004 мг/мл (т. е. с коэффициентом разбавления 1 : 10). Полученный спектр флуоресценции стандартного раствора 2 аспирина приведен на рисунке 2.

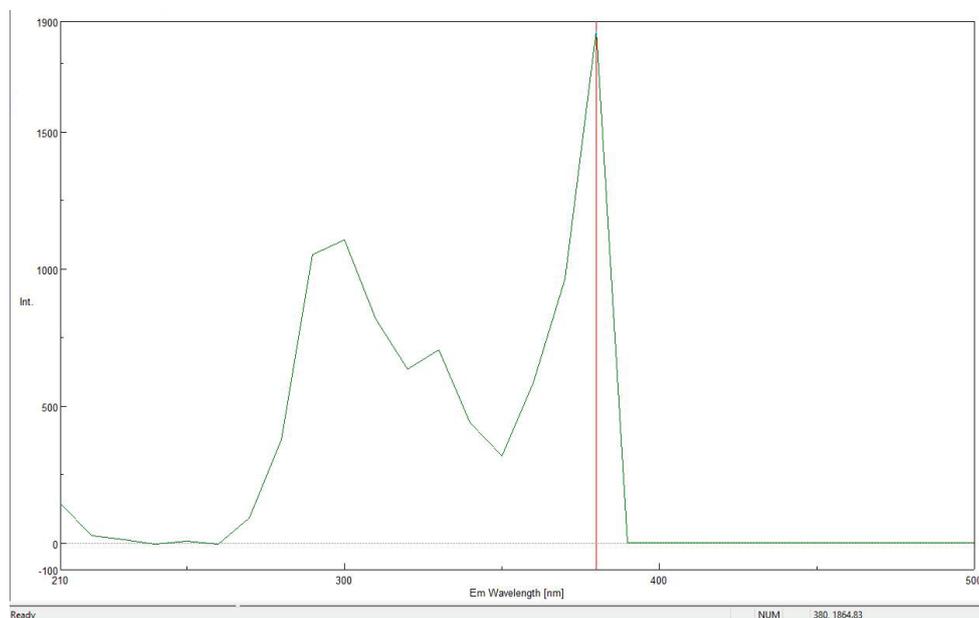


Рисунок 2 – Относительная интенсивность флуоресценции стандартного раствора 2 аспирина (концентрацией 0,004 мг/мл)

Из представленных данных видно, что пик флуоресценции стандартного раствора 2 аспирина наблюдается при длине волны 390 нм, интенсивность равна 1864,83 (усл.ед.инт.) при чувствительности прибора High. Дальнейшие исследования проводились при этих длинах волн и такой же чувствительности прибора.

Для определения зависимости относительной интенсивности флуоресценции аспирина от его концентрации были получены спектры флуоресценции для растворов с концентрациями от 0,0005 мг/мл до 0,004 мг/мл. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Интенсивность флуоресценции растворов аспирина в зависимости от концентрации

C (мг/мл)	I (усл.ед.инт.)
0,0005	326,883
0,0010	652,701
0,0020	822,358
0,0030	1064,87
0,0040	1864,83

На основании приведенных в таблице 2 данных был построен график зависимости относительной интенсивности флуоресценции аспирина от его концентрации и добавлена линия тренда (Рисунок 3).

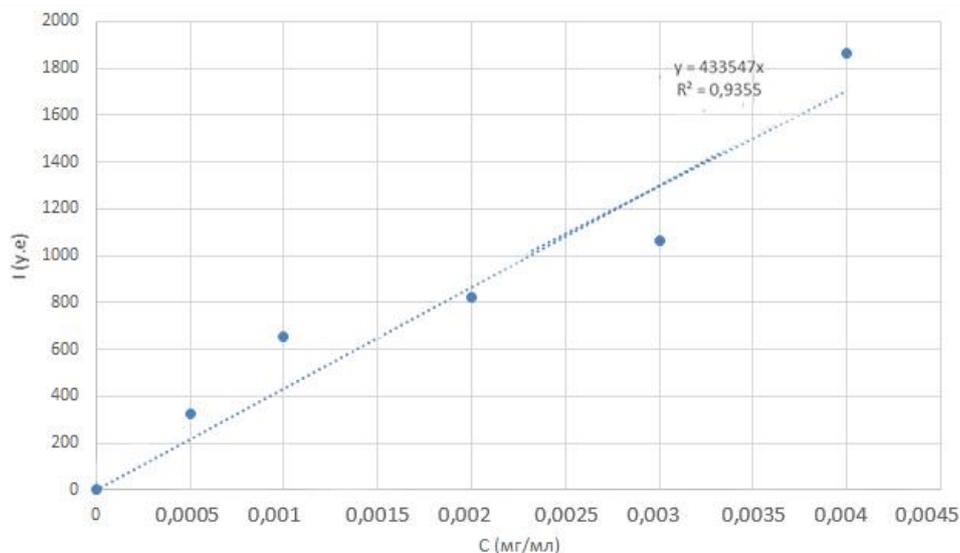


Рисунок 3 – Градуировочный график зависимости относительной интенсивности флуоресценции аспирина от его концентрации

Из приведенных данных видно, что в выбранном диапазоне концентраций аспирина 0,0005 – 0,0040 мг/мл зависимость относительной интенсивности флуоресценции аспирина от концентрации носит линейный характер с линейным коэффициентом аппроксимации  $R^2=0,9355$ .

Для исследования относительной интенсивности флуоресценции аспирина в присутствии кофеина различной концентрации были проанализированы рабочие растворы в соответствии с таблицей 1. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Интенсивность относительной флуоресценции аспирина в зависимости от концентрации исследуемого раствора кофеина

С кофеина (мг/мл)	I (усл. ед. инт.)
0,09	55,84
0,08	60,14
0,07	72,94
0,06	98,19
0,05	120,18
0,04	201,03
0,03	437,68
0,02	613,13
0,01	1000

На основании полученных данных был построен градуировочный график (Рисунок 4).

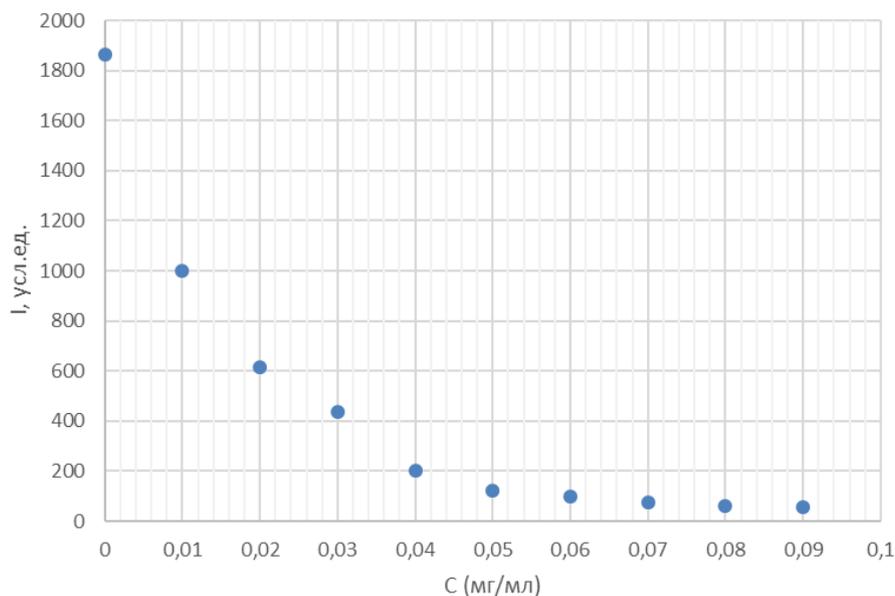


Рисунок 4 – Градуировочный график интенсивности флуоресценции аспирина в зависимости от концентрации кофеина

Как видно из приведенных данных, интенсивность флуоресценции аспирина существенно падает в присутствии кофеина концентрации 0,01 до 0,05 мг/мл. В диапазоне концентраций кофеина 0,06 – 0,09 мг/мл интенсивность флуоресценции аспирина изменяется незначительно. В связи с чем для последующих определений был выбран диапазон концентрации кофеина 0,01 – 0,05 мг/мл (Рисунок 5).

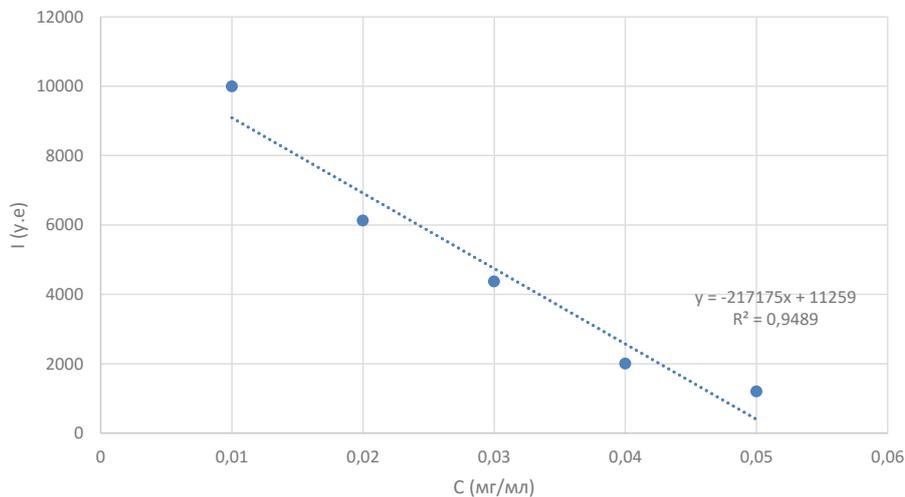


Рисунок 5 – Градуировочный график зависимости относительной интенсивности флуоресценции аспирина с диапазоном концентрации кофеина 0,01 – 0,05 мг/мл

Из приведенных данных видно, что в выбранном диапазоне концентраций аспирина 0,01 – 0,005 мг/мл зависимость относительной интенсивности флуоресценции аспирина от концентрации кофеина носит линейный характер при коэффициенте аппроксимации  $R^2 = 0,9489$ .

Для применения полученной методики определения кофеина по тушению флуоресценции аспирина были получены экстракты кофе и чая в соответствии с методикой «Определение массовой доли кофеина» [14]. Полученный экстракт кофе был проанализирован на спектрофлуориметре, для этого в кювету 3 мл было добавлено 0,3 мл стандартного раствора аспирина 1 и экстракт кофе, объемом 2,7 мл. Экспериментальные результаты 3-D спектр экстракта кофе приведены на рисунке 6.

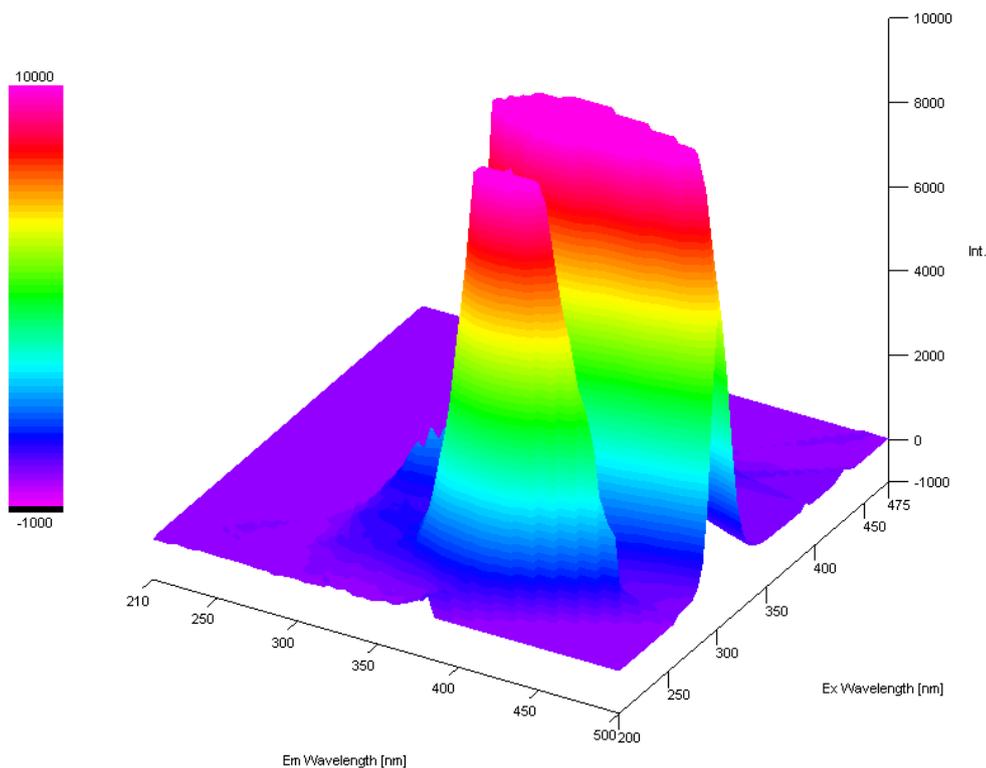


Рисунок 6 – 3-D спектр аспирина в присутствии экстракта нерастворимого кофе.  
Чувствительность прибора High

Из приведенных данных видно, что при длине волны  $\lambda = 380$  нм относительная интенсивность флуоресценции аспирина в присутствии экстракта нерастворимого кофе равна 401,04 у.е.

Полученный в соответствии с методикой [14] экстракт чая был также исследован на спектрофлуориметре. Для чего в кювету 3 мл было добавлено 0,3 мл стандартного раствора аспирина 1 и экстракт чая, объемом 2,7 мл. Экспериментальные результаты 3-D спектр экстракта чая приведены на рисунке 7.

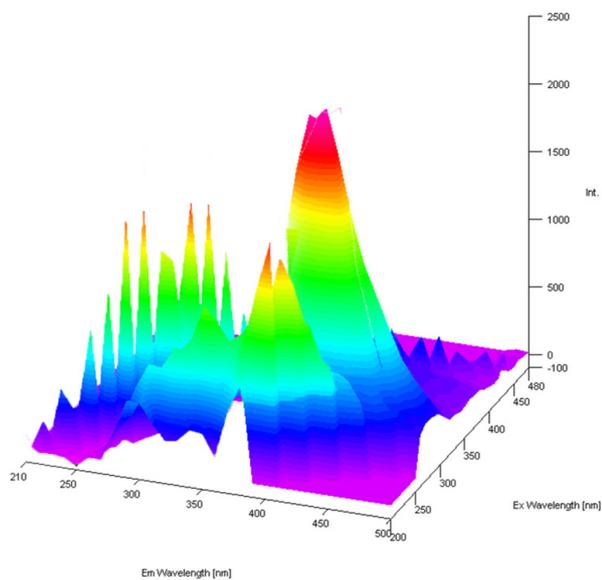


Рисунок 7 – 3-D спектр аспирина в присутствии экстракта чая. Чувствительность прибора High

Из приведенных данных видно, что при длине волны  $\lambda = 380$  нм относительная интенсивность флуоресценции аспирина в присутствии экстракта листового чая равна 872,879 у. е.

Энергетический напиток динамит специальной пробоподготовке не подвергался и был проанализирован на спектрофлуориметре. В кювету 3 мл было добавлено 0,3 мл стандартного раствора аспирина 1 и энергетический напиток, объемом 2,7 мл. Экспериментальные результаты 3-D спектр энергетического напитка приведены на рисунке 8.

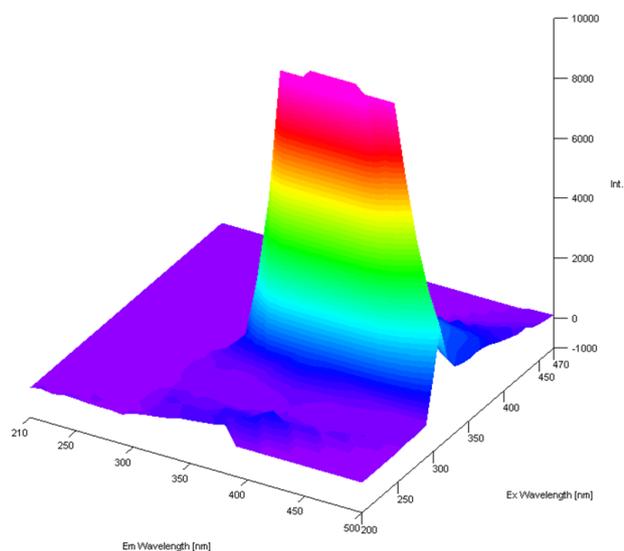


Рисунок 8 – 3-D спектр аспирина в присутствии энергетического напитка. Чувствительность прибора High

Из приведенных данных видно, что при длине волны  $\lambda = 380$  нм относительная интенсивность флуоресценции аспирина в присутствии энергетического напитка равна 618,648 у. е.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изученные напитки (экстракт нерастворимого кофе, экстракт листового чая и энергетический напиток), внесенные в одинаковом количестве, гасят интенсивность флуоресценции аспирина в разной степени (результаты приведены в таблице 4).

Таблица 4 – Относительная интенсивность флуоресценции аспирина в присутствии реальных напитков

Напиток	Интенсивность
Кофе нерастворимый	401,040
Чай черный листовый	872,879
Энергетический напиток	618,648

Используя уравнение тренда  $y = -217175 \cdot x + 11259$ , полученного из градуировочного графика (рисунок 5), где  $y$  – интенсивность, а  $x$  – концентрация, была рассчитана концентрация кофеина в исследуемых растворах:

- чай черный листовый (экстракт):  $x = 0,0478$  (мг/мл);
- кофе нерастворимый (экстракт):  $x = 0,0500$  (мг/мл);
- энергетический напиток:  $x = 0,0489$  (мг/мл).

Из полученных данных видно, что наибольшая концентрация кофеина обнаружена в экстракте нерастворимого кофе (0,0500 мг/мл), несколько меньшая концентрация кофеина (0,0489 мг/мл) обнаружена в энергетическом напитке, и наименьшая концентрация кофеина обнаружена в экстракте листового чая (0,0478 мг/мл).

Для определения кофеина в исходном кофе расчет проводили следующим образом: полученную концентрацию кофеина умножали на объем полученного экстракта и делили на массу навески, взятой для анализа:

$$(0,0005 \cdot 100) / 8 \cdot 100 \% = 0,625 \%$$

Для определения кофеина в исходном чае расчет проводили следующим образом: полученную концентрацию кофеина умножали на объем полученного экстракта и делили на массу навески, взятой для анализа:

$$(0,000478 \cdot 100) / 16 \cdot 100 \% = 0,299 \%$$

#### Заключение

Спектрофлуориметрический метод определения кофеина является весьма перспективным благодаря экспрессности, высокой специфичности и чувствительности, а также хорошей воспроизводимости результатов.

По результатам исследования флуоресценции водных растворов аспирина различной концентрации получена линейная зависимость относительной интенсивности флуоресценции аспирина в диапазоне концентраций от 0,0005 до 0,004 мг/мл. При изучении зависимости тушения флуоресценции аспирина в присутствии кофеина получена обратно пропорциональная линейная зависимость относительной интенсивности флуоресценции аспирина в зависимости от концентрации вводимого кофеина в диапазоне концентраций последнего 0,01–0,05 мг/мл.

На основании адаптированной методики определения кофеина были проведены анализы реальных кофеинсодержащих объектов: кофе нерастворимого, чайного напитка и энергетического напитка. Содержание кофеина в нерастворимом кофе составляет – 62,5 ppm, чайном напитке – 29,9 ppm, и энергетическом напитке – 0,0489 мг/мл, что соответствует требованиям, предъявляемым к указанным напиткам.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Введение в спектральный и люминесцентный анализ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.bsmu.by/downloads/kafedri/k\\_fiziki/2013-2/vveden.pdf](https://www.bsmu.by/downloads/kafedri/k_fiziki/2013-2/vveden.pdf) – Дата доступа: 11.04.2024.
2. Общие закономерности хемилюминесценции [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.studfiles.ru/preview/2782203/> – Дата доступа: 11.04.2024.
3. **Weldegebreal, B.** Development of new analytical methods for the determination of caffeine content in aqueous solution of green coffee beans / B. Weldegebreal, M. Redi-Abshiro, B. S. Chandravanshi // Chemistry Central Journal. – 2017. – Vol. 11, № 126. – Access mode: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-017-0356-3>. – Access date: 05.04.2024.
4. **Леоненко, И. И.** Аналитическое применение эффектов тушения люминесценции (Обзор) / И. И. Леоненко [и др.] // Методы и объекты химического анализа. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 108–125.
5. **Yan, P.** Determination of nitrogen oxides with rhodamine B by fluorescence quenching method / P. Yan [at al.] // Int. J. Spectroscopy, 2011. – P. 1–4.
6. **Вульфова, Д. А.** 2-(5-[4- диметиламинофенил]-2-оксазолил)-бензойная кислота как флуоресцентный сенсор влаги в органических растворителях / Д. А. Вульфова [и др.] // Вісник Харків. нац. універ. – 2008. – № 820. – Хімія. Вип. 16, Т. 39. – С. 225–232.
7. **Zhan, X.-Q.** Sensitive fluorimetric determination of formaldehyde by the co-quenching effect of formaldehyde and sulfite on the fluorescence of tetra-substituted amino aluminium phthalocyanine. / X.-Q. Zhan [at al.] // Analyst (Cambridge, U. K.). – 2000. – Vol. 125. – P. 2330–2334.
8. **Chenxu, Du.** Fluorescence Sensing of Caffeine in Tea Beverages with 3,5-diaminobenzoic Acid / Du Chenxu [at al.] // Sensors. – 2020. – Vol. 20(3), № 819. – Access mode: <https://doi.org/10.3390/s20030819>. – Access date: 05.04.2024.
9. **Smith, J.** Analysis of Caffeine in Beverages Using Aspirin as a Fluorescent Chemosensor / J. Smith [at al.] // Chem. Educ. – 2016. – Vol. 93 (10). – P. 1776–1780. – Access mode: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00303>. – Access date: 05.04.2024.
10. **Зайцева О. Е.** Должны потребители кофеин-содержащих напитков знать фармакокинетику кофеина? / О. Е. Зайцева // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-5. – С. 946–952.
11. **Wierzejska, R.** Caffeine-common ingredient in a diet and its influence on human health / R. Wierzejska // Roczn. Panstw. Zakl. Hig. – 2012. – Vol. 63(2). – P. 141–147.
12. **Luchiari N.** Development of miniaturized fluorimetric device for caffeine determination using a smartphone / N. Luchiari [at al.] // RSC Advances. – 2019. – Vol. 60. – Access mode: <https://doi.org/10.1039/C9RA06220C> - Access date: 05.04.2024.
13. **Горячева, И. Ю.** Акридиновые красители в триплетном состоянии как реагенты для избирательного фосфориметрического определения полициклических ароматических углеводородов в мицеллах додецилсульфата натрия / И. Ю. Горячева, Г. В. Мельников, С. Н. Штыков // Журн. аналит. химии, 2000. – № 55(9). – С. 971–975.
14. **Седакова, В. А.** Анализ пищевых продуктов. Часть 1. / сост. В. А. Седакова. – Могилев : МГУ им. А. А. Кулешова, 2011. – 88 с.

Поступила в редакцию 22.07.2024 г.

Контакты: [sedakova@m.msu.by](mailto:sedakova@m.msu.by) (Лысова Валентина Антоновна), [klebanova@m.msu.by](mailto:klebanova@m.msu.by) (Клебанова Наталья Александровна), [klebanov@m.msu.by](mailto:klebanov@m.msu.by) (Клебанов Александр Владимирович), [androbenkova@mail.ru](mailto:androbenkova@mail.ru) (Дробенкова Анастасия Андреевна)

**Lysova V. A., Klebanova N. A., Klebanov A. V., Drobenkova A. A. QUANTITATIVE DETERMINATION OF CAFFEINE BY QUENCHING OF ASPIRIN FLUORESCENCE**

*The article presents experimental data on the study of fluorescence of aqueous solutions of pure aspirin and aspirin in the presence of caffeine. Using spectrofluorometry, the process of quenching aspirin fluorescence in the presence of caffeine has been studied, and the range of caffeine concentrations in which aspirin fluorescence is most sensitive to the presence of caffeine has been established. Within this range, a calibration dependence of the relative fluorescence of aspirin as a function of caffeine concentration has been obtained, which can be used to determine caffeine in various real samples.*

**Keywords:** aspirin, caffeine, spontaneous fluorescence, spectrofluorimetry, fluorescence quenching, relative fluorescence intensity.