

УДК 54.062:547.857.4:663.93

Н. Ю. Бондаренко, М. Є. Блажеєвський

Національний фармацевтичний університет

ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ У КАВІ МЕТОДОМ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

Розроблена методика та показана можливість кількісного визначення кофеїну у зернах кави «Арабіка» (СП «Галка Лтд», м. Львів, Україна) методом інгібування хемілюмінесценції системи $H_2L - H_2O_2 - Hb$. Лінійна залежність депресії хемілюмінесценції ($\Delta I_{хл}$) від концентрації інгібітора спостерігалась в інтервалі $(0,3-12) \cdot 10^{-5}$ моль/л ($\Delta I_{хл} = 2,83c + 1,06$ ($r = 0,997$)). Нижня межа визначуванних концентрацій (LOQ) – $6,7 \cdot 10^{-7}$ г/мл ($3 \cdot 10^{-6}$ моль/л). Встановлено, що теобромін та теофілін у еквімолярних кількостях не виявляли інгібіторного впливу на хемілюмінесценцію у досліджуваній системі. Вміст кофеїну у зернах кави становив $100,13 \pm 1,96$ %, $RSD = \pm 2,12$ % ($\delta = + 0,14$ %, розраховано за даними референс-методу).

Ключові слова: кількісне визначення; люмінал; гемоглобін; кофеїн; кава; хемілюмінесцентний метод

ВСТУП

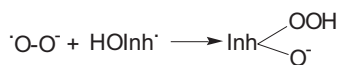
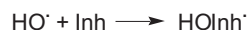
Кофеїн (1,3,7-триметилксантин) (**К**) належить до групи пуринових алкалоїдів, похідних ксантину. Препарати, які містять кофеїн, застосовують в медицині при різних захворюваннях та отруєннях, які супроводжуються пригніченням функцій центральної нервової та серцево-судинної систем, при спазмах судин головного мозку, для підвищення психічної та фізичної працездатності. Крім лікарських препаратів, кофеїн є складовою частиною продуктів харчування (наприклад: чорний, зелений чай, кава, какао, кола та інші), а також енергетичних напоїв для спортсменів.

Для кількісного визначення **К** у теперішній час здебільшого застосовують різноманітні фізико-хімічні методи аналізу, а саме фотолюмінесцентні [7], спектроскопічні методи [5, 9, 11], вольтамперометрію [10] та як домінуючий метод – ВЕРХ [4, 8].

Також останнім часом увагу вчених привертає високочутливий та експресний хемілюмінесцентний метод. Раніше нами вже був вивчений інгібіторний вплив **К** на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у лужному середовищі в присутності гемоглобіну (**Нв**) як каталізатора процесу та опрацьовані методики його кількісного визначення в субстанції та лікарських формах натрію кофеїн-бензоату [1].

У теперішній праці наведені результати досліджень опрацьовання методики кількісного визначення **К** методом хемілюмінесценції з використанням системи H_2L (люмінол) – H_2O_2 – **Нв** у зернах колумбійської кави «Арабіка». Механізм інгібіторного впливу кофеїну на хемілюмінесценцію (**ХЛ**) в цій системі вже

був нами розглянутий раніше [1]. При змішуванні лужних розчинів H_2O_2 та H_2L в присутності каталітичної кількості **Нв** спостерігається **ХЛ**, обумовлена виникненням аніону амінофталевої кислоти в електронно-збудженому стані. Ключовою частинкою у послідовності реакцій, які ведуть до виникнення **ХЛ** через утворення трансанулярного пероксиду люмінолу, при розкладанні якого й утворюється еміттер світіння, є аніон-радикал $\cdot O-O^-$ [2, 3]. В літературі наявні вказівки на інгібування **ХЛ** під час окиснення H_2L акцепторами $\cdot O-O^-$ радикалу. З іншого боку, під час каталітичного розкладання H_2O_2 , як правило, утворюються радикали $HO\cdot$ [2]. Вельми ймовірно, що явище інгібування обумовлене координацією радикалів $HO\cdot$ до подвійного зв'язку $C=N$ імідазольного кільця кофеїну, а відтак рекомбінацією новоутвореного радикалу $HOInh\cdot$ з супероксид-радикалом $O-O^-$ відповідно:



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для досліджень використовували субстанцію кофеїну (1,3,7-триметилксантин, моногідрат), яка відповідає вимогам [6], та зерна колумбійської кави «Арабіка» виробництва СП «Галка Лтд» м. Львів, Україна).

Розчини готували об'ємно-ваговим методом при 293 К. Для приготування розчинів в усіх випадках використовували двічі дистильовану воду.

Приготування вихідного розчину $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л люмінолу (5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазидіон, H_2L , НВФ «Сімбіас», Україна). 0,217 г Гідрозиду 3-амінофталевої кислоти кваліфікації «ЧДА» розчиняли в мірній колбі на 100 мл у 10 мл $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину

© Бондаренко Н.Ю., Блажеєвський М.Є., 2016

натрію гідроксиду і доводили до позначки двічі дистильованою водою. Розчин зберігали у темному місті.

Для підтримки необхідної кислотності середовища використовували $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л розчин натрію гідроксиду, рН розчинів контролювали за допомогою скляного індикаторного електроду ЕСЛ-43-07 в парі з насиченим хлоридосрібним електродом та іонміру лабораторного І-130 (ЗИП, Гомель, Беларусь). Усі розчини готували на двічі дистильованій воді.

Розчин гідрогену пероксиду 5 % (мас.) готували з 50 % препарату о.с.ч. розбавленням його у 100 разів двічі дистильованою водою: 10,00 мл перенесли у мірну колбу на 100 мл і доводили об'єм розчину до позначки при 293 К. Готовий розчин зберігали при зниженій температурі (281-283 К).

Як каталізатор використовували гемоглобін крові людини (Hb) виробництва фірми «Simko Ltd», м. Львів, Україна. Вихідний розчин гемоглобіну 75 мкг/мл готували розчиненням у мірній колбі на 100 мл 7,5 мг гемоглобіну в 75 мл двічі дистильованої води при нагріванні та додаванні 0,5 г натрію дигідрогенфосфату. Об'єм доводили до позначки двічі дистильованою водою при 293 К і перемішували. Робочий розчин гемоглобіну готували розбавленням вихідного двічі дистильованою водою точно у 100 разів. Готовий розчин зберігали при зниженій температурі (281-283 К).

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на «Хемілюмінометрі – ХЛ 01» з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0,5 і швидкодіючим (постійна часу 0,1 с) потенціометром-самописцем. Реакцію, що супроводжується хемілюмінесценцією, проводили у кварцовій кюветі циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів зберігали такий порядок змішування реагентів: до суміші індикатора H_2L в розчині лугу та H_2O_2 (з розчином K або без нього у контрольному досліді) додавали за допомогою піпеткового дозатора П-1 0,50 мл розчину Hb і реєстрували кінетичну криву інтенсивності ХЛ у відносних одиницях (відн. од.) ($I_{x,t}$) – час (с). Дозатор влаштований у зйомний тримач, який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Всі досліді виконували при температурі 293 К. Для характеристики інгібіторної дії K на максимальну інтенсивність світіння розраховували величину $\Delta I_{x,t} = I_0 - I_{x,t}$, де: I_0 – максимальна інтенсивність ХЛ в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ (за відсутності K , контрольний дослід); $I_{x,t}$ – максимальна інтенсивність ХЛ у тій же системі з додаванням інгібітора: $H_2L - H_2O_2 - K - Hb$ (робочий дослід).

Визначення залишкової вологи у зернах кави «Арабіка» (СП «Галка Лтд», м. Львів, Україна). Біля 1 г (точна наважка) попередньо подрібнених зерен кави висушують у доведеному до постійної ваги бюксі в сушильній шафі при 378 К при нормальному тиску впродовж 2 годин. Розрахунок остаточної вологи

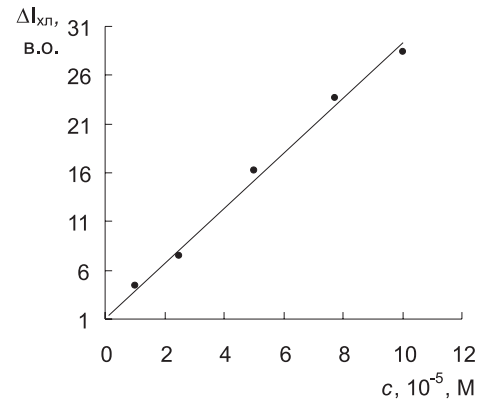


Рис. Депресія максимальної інтенсивності хемілюмінесценції в системі $H_2L - H_2O_2 - K - Hb$ залежно від концентрації K : $c(NaOH) = 0,05$ моль/л, $c(H_2O_2) = 0,075$ моль/л, $c(H_2L) = 10^{-4}$ моль/л, $C(Hb) = 3,75 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл

(втрата у масі при висушуванні кави, w , %) виконують за різницею мас бюксу з вмістом до і після висушування. Визначення виконували в бюксі діаметром 2,2 см і висотою 3,5 см.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчений вплив порядку змішування розчинів H_2L , натрію гідроксиду, H_2O_2 , K та Hb та їх концентрацій на інтенсивність виникаючої ХЛ. У результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальним є порядок змішування, коли останнім додається розчин Hb [1]. Наявність K у системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ призводить до зменшення максимальної інтенсивності ХЛ, що свідчить про інгібування хемілюмінесцентної реакції. Цей ефект зростає при збільшенні концентрації інгібітора процесу.

На рисунку наведена залежність депресії (зменшення) максимальної інтенсивності ХЛ в досліджуваній аналітичній системі від концентрації K . Лінійна залежність $\Delta I_{x,t}$ від концентрації інгібітора спостерігалась в інтервалі $(0,3-12) \cdot 10^{-5}$ моль/л ($\Delta I_{x,t} = 2,83c + 1,06$ ($r = 0,997$)). Нижня межа визначуваних концентрацій (LOQ) – $6,7 \cdot 10^{-7}$ г/мл ($3 \cdot 10^{-6}$ моль/л).

За допомогою спеціальних дослідів було встановлено, що інші пуринові сполуки, зокрема такі як теобромін та теофілін, у співмірних кількостях по відношенню до кофеїну не виявляли інгібіторної активності на ХЛ в досліджуваній системі. Також не спостерігалось синергічного ефекту чи будь-якого іншого впливу на параметри хемілюмінесценції досліджуваної системи в присутності сумішей кофеїну з теоброміном або теофіліном.

Для визначення K у зернах кави нами був використаний метод добавок. Оптимальними концентраціями реактивів у даній хемілюмінесцентній системі є: $c(NaOH) = 0,05$ моль/л, $c(H_2O_2) = 0,075$ моль/л, $c(H_2L) = 10^{-4}$ моль/л, $C(Hb) = 3,75 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл.

Таблиця

**РЕЗУЛЬТАТИ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ У ЗЕРНАХ КАВИ
«АРАБІКА» (P = 0,95, n = 7)**

Взято розчину кофеїну, мл	Знайдено кофеїну, %	Метрологічні характеристики
1,00 (розбавлення 1 : 100)	2,5531 2,6757 2,6058 2,6063	$\bar{X} = 2,6035 \%$ $S = \pm 0,0551 \%$ $S_{\bar{X}} = \pm 0,0208 \%$ $\Delta\bar{X} = \pm 0,0510 \%$
1,00 (фільтрату) + 1,00 (додаток розчину РСЗ)	2,5523 2,6770 2,5542	$RSD = \pm 2,12 \%$ $\delta = + 0,14 \%^*$

Примітка.*Вміст кофеїну у перерахунку на висушену каву за даними референт-методу становив $\mu = 2,6 \pm 0,1 \%$;

$$\delta = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \cdot 100 \%$$

ги в досліджуваному зразку, %, мас.; 10,00 – кінцевий об'єм розчину в кюветі, мл; 100,00 – розведення; 100,00 – об'єм мірної колби, мл; 100 % – перерахунок на відсотки; m_n – маса наважки кави, г.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена методика та показана можливість кількісного визначення кофеїну у зернах кави «Арабіка» (СП «Галка Лтд», м. Львів, Україна) методом інгібування хемілюмінесценції системи $H_2L - H_2O_2 - Hb$. Нижня межа визначуваних концентрацій (LOQ) – $6,7 \cdot 10^{-7}$ г/мл ($3 \cdot 10^{-6}$ моль/л).
2. Встановлено, що теобромін та теофілін у еквімолярних кількостях не чинили інгібіторного впливу на хемілюмінесценцію у досліджуваній системі. Вміст кофеїну у зернах кави становив $100,13 \pm 1,96 \%$, $RSD = \pm 2,12 \%$ ($\delta = + 0,14 \%$).

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Бондаренко Н. Ю. Кількісне визначення кофеїну хемілюмінесцентним методом в лікарських формах / Н. Ю. Бондаренко, М. Є. Блажеєвський // Фармац. журн. – 2005. – № 2. – С. 75-79.
2. Ечмаева Т. А. Природа быстрого затухания хемілюмінесценции при окислении люминола перекисью водорода / Т. А. Ечмаева, В. М. Бердников // Журн. физ. химии. – 1995. – Т. 69, № 6. – С. 1089-1091.
3. Федорова О. С. Хемілюмінесцентное окисление люминола и механизм разложения H_2O_2 в присутствии гомогенных катализаторов / О. С. Федорова, В. М. Бердников // Теор. і експ. химия. – 1983. – № 3. – С. 334-339.
4. Chittrakarn S. Quantitative analysis of mitragynine, codeine, caffeine, chlorpheniramine and phenylephrine in a kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) cocktail using high-performance liquid chromatography / S. Chittrakarn, P. Penjamras, N. Keawpradub // Forensic Sci. International. – 2012. – Vol. 217, Is. 1-3. – P. 81-86.

Вказаний метод полягає в тому, що спочатку отримують хемілюмінограму розчину речовини з невідомою концентрацією C_x , а потім після додавання до розчину певного об'єму розчину цієї речовини відомої концентрації, тобто стандартного розчину реєстрацію полярограм повторюють при тій же чутливості приладу та з отриманих результатів визначають C_x :

$$C_x = \frac{C_{st} \cdot (I_0 - I_x)}{(I_0 - I_{x+a}) - (I_0 - I_x)}$$

де: C_{st} – концентрація розчину робочого стандартного зразка (РСЗ), г/мл; $[(I_0 - I_{x+a}) - (I_0 - I_x)]$ – збільшення $\Delta I_{xл}$ після додавання в кювету стандартного розчину; I_{x+a} – максимальна інтенсивність $XЛ$, яка спостерігається у досліді з додаванням стандартного розчину K , відн. од.; $(I_0 - I_x) = \Delta I_{xл}$ – зміна інтенсивності $XЛ$ після додавання в кювету проби досліджуваного розчину на K , де: I_0 – максимальна інтенсивність $XЛ$ в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ (контрольний дослід); I_x – максимальна інтенсивність $XЛ$ у тій же системі з додаванням інгібітора: $H_2L - H_2O_2 - K - Hb$ (робочий дослід).

Методика кількісного визначення кофеїну у зернах кави «Арабіка» (метод додатків). Точну наважку (4,00 г) дрібнопомеленої кави суспендували у 100 мл двічі дистильованої води при 368-372 К. Перемішували впродовж 10 хв, фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка»), фільтрат розбавляли двічі дистильованою водою у 100 разів.

Приготування розчину робочого стандартного зразка (РСЗ) кофеїну 10,4 мкг/мл. У мірній колбі на 100 мл розчинили 0,1137 г кофеїну моногідрату, що відповідає 0,1040 г кофеїну основи безводної, у 80 мл двічі дистильованої води при 368-372 К, охолоджували та доводили об'єм розчину до позначки при 293 К. Одержаний розчин розбавляли двічі дистильованою водою точно у 100 разів.

У кварцову кювету хемілюмінометра послідовно приливали 1,0 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину H_2L , 5,0 мл 0,1 моль/л розчину натрію гідроксиду, $(10 - x)$ мл двічі дистильованої води, де x – сумарний об'єм усіх розчинів-компонентів, крім води, 0,5 мл 5 % розчину H_2O_2 , 1,0 мл розчину фільтрату. Одержану суміш перемішували і встановлювали кювету у світлозахисну камеру. Відкривали шторку і вливали за допомогою піпеткового дозатора 0,5 мл розчину Hb з концентрацією 75 мкг/мл. Паралельно аналогічно проводили визначення K в суміші фільтрату з додатком 1,00 мл РСЗ кофеїну (таблиця).

Вміст кофеїну X (% мас.) у каві знаходили за формулою: w

$$X = \frac{C_x \cdot 10,00 \cdot 100,00 \cdot 100,00 \cdot 100 \cdot 100 \%}{m_n \cdot (100 - w)}$$

де: C_x – концентрація K (в кюветі), знайдена методом порівняння інтенсивностей $XЛ$ у досліді з досліджуваним екстрактом кави і таким з екстрактом і додаванням кофеїну – стандарту, г/мл; w – вміст воло-

5. Danhelova H. Rapid analysis of caffeine in various coffee samples employing direct analysis in real-time ionization-high-resolution mass spectrometry / [H. Danhelova, J. Hradecky, S. Prinosilova et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 403. – P. 2883-2889.
6. *European Pharmacopoeia. Vol. 1-2 / European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care.* – 7-th ed. – Strassbourg: Council of Europe, 2010. – 3536 p.
7. Masoum S. Photoluminescence quantitative analysis of gallic acid and caffeine in green tea using multiway chemometric approaches / S. Masoum, S. Heshmat // *Iranian J. of Math. Chem.* – 2015. – Vol. 6, Is. 2. – P. 109-119.
8. Mnatsakanyan M. The analysis of café espresso using two-dimensional reversed phase-reversed phase high performance liquid chromatography with UV-absorbance and chemiluminescence detection / [M. Mnatsakanyan, P. G. Stevenson, X. A. Conlan et al.] // *Talanta.* – 2010. – Vol. 82, Is. 4. – P. 1358-1363.
9. Tobolkina E. Standard addition strip for quantitative electrostatic spray ionization mass spectrometry analysis: Determination of caffeine in drinks / E. Tobolkina, L. Qiao, Ch. Roussel, H. H. Girault // *Talanta.* – 2014. – Vol. 130, № 1. – P. 377-381.
10. Wei Y. Voltammetric determination of caffeine at Pt/Carbon nanotubes composite modified glassy carbon electrode / [Y. Wei, L. Zhang, Ch. Shao et al.] // *Chem. Anal.* – 2009. – Vol. 54. – P. 607-617.
11. Zhang X. Improvement of near infrared spectroscopic (NIRS) analysis of caffeine in roasted Arabica coffee by variable selection method of stability competitive adaptive reweighted sampling (SCARS) / [X. Zhang, W. Lia, B. Yin et al.] // *Spectrochim. Acta.* – 2013. – Vol. 114. – P. 350-356.

УДК 54.062:547.857.4:663.93**Н. Ю. Бондаренко, Н. Е. Блажеевский****ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА В КОФЕ МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ**

Разработана методика и показана возможность количественного определения кофеина в зернах кофе «Арабика» (СП «Галка Лтд», г. Львов, Украина) методом ингибирования хемилюминесценции системы $H_2L - H_2O_2 - Hb$. Установлено, что теобромин и теофиллин в эквимольных количествах не выявляли ингибиторной активности в отношении параметров хемилюминесценции исследуемой системы. Линейная зависимость депрессии хемилюминесценции $\Delta I_{\text{хл}}$ от концентрации ингибитора наблюдалась в интервале $(0,3-12) \cdot 10^{-5}$ моль/л ($\Delta I_{\text{хл}} = 2,83c + 1,06$ ($r = 0,997$)). Нижняя граница определяемых концентраций (LOQ) – $6,7 \cdot 10^{-7}$ г/мл ($3 \cdot 10^{-6}$ моль/л). Содержание кофеина в зернах кофе составило $100,13 \pm 1,96$ %, $RSD = \pm 2,12$ % ($\delta = + 0,14$ %, рассчитано по данным референс-метода).

Ключевые слова: количественное определение; люминол; гемоглобин; кофеин, кофе; хемилюминесцентный метод

UDC 54.062:547.857.4:663.93**N. Yu. Bondarenko, M. Ye. Blazheyevskiy****DETERMINATION OF CAFFEINE IN COFFEE BY CHEMILUMINESCENCE METHOD**

The method of caffeine chemiluminescence determination in coffee beans "Arabica" (Galka Ltd, Lviv, Ukraine) based on reaction of inhibition of chemiluminescent oxidation of luminol by hydrogen peroxide, catalyzed by blood hemoglobin have been elaborated. It was found that other purine compounds including theobromine and theophylline, in comparable amounts relative to caffeine showed no inhibitory activity or any other effect on chemiluminescence parameters of the system. A recovery was 100.13 ± 1.96 %, $RSD \leq 2.12$ % ($\delta = + 0.14$ %).

Key words: determination; luminol; hemoglobin; Caffeine; coffee; chemiluminescence method

Адреса для листування:

61204, м. Харків, пр. Перемоги, 66 В, кв. 272.

Тел.: 0661885308. E-mail: tropikana2003@ukr.net.

Блажеєвський Микола Євстахійович

Надійшла до редакції 17.03.2016 р.