

УДК 543.426; 546.661; 541.49

О. И. Теслюк¹, С. В. Бельтюкова², Е. О. Ливенцова²

¹Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, отдел аналитической химии и физико-химии координационных соединений, 65080, г.Одесса, Люстдорфская дорога, 86

²Одесская национальная академия пищевых технологий, кафедра химии и безопасности пищевых продуктов, 65039, г.Одесса, Канатная, 112

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА ПО ТУШЕНИЮ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ ИОНА ТЬ (III)

Изучен эффект тушения кофеином сенсibilизированной люминесценции иона ТЬ(III) в сорбатах комплекса с 1,10-фенантролином и β -циклодекстрином. Найдены оптимальные условия хроматографирования кофеина. В качестве проявляющего раствора предложено использовать хлорид тербий в присутствии 1,10-фенантролина и β -циклодекстрина. Установлены оптимальные условия тушения люминесценции комплексного соединения иона ТЬ(III) кофеином в фазе сорбента. Разработана простая и надежная методика люминесцентного определения кофеина в напитках, содержащих кофеин.

Ключевые слова: сенсibilизированная люминесценция, тербий, кофеин, сорбция.

Алкалоид кофеин (1,3,7-триметилксантин) содержится в листьях чая, зернах кофе, орехах кола, гуаране, мате [1], широко используется в качестве пищевых добавок, входит в состав многих энергетических напитков. Он применяется при заболеваниях, сопровождающихся угнетением центральной нервной и сердечно-сосудистой системы, для повышения психической и физической работоспособности, уменьшения усталости и сонливости, понижает агрегацию тромбоцитов. Кофеинсодержащие напитки находят широкое применение, в то же время границы диапазонов лечебной и токсической концентрации этого препарата близки, в связи с чем возникает необходимость контроля за содержанием кофеина в растительном сырье и пищевых продуктах.

Для определения кофеина используют титриметрические [1], спектрофотометрические [2,3], хроматографические [5-7] методы, а также метод капиллярного электрофореза [8-9].

Согласно ГОСТ [2] основным методом определения кофеина является фотометрический, основанный на экстракционном выделении кофеина, с последующим его гидролитическим окислением в тетраметилпурпуровую кислоту и измерении оптической плотности окрашенного продукта при $\lambda=540$ нм. Методика спектрофотометрического определения кофеина, основанная на реакции азосочетания тетрафторбората-4-нитрофенилдиазония с продуктами щелочного гидролиза кофеина с образованием окрашенных продуктов, предложена в [3]. Определение кофеина спектрофотометрическим методом описано в [4].

Титриметрические и спектрофотометрические методы применяются в основном для определения кофеина в простых по составу фармацевтических препаратах [1-3]. При определении кофеина в растительном сырье чаще всего используются

хроматографические методы [5-7] или метод капиллярного электрофореза [8,9]. Сравнительная характеристика методов определения кофеина дана в [10]. Авторы отмечают, что предпочтительным при определении кофеина в кофе является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В последнее время при определении биологически активных веществ широко применяют [11] люминесцентные сенсоры на основе комплексных соединений ионов лантанидов (III) – Eu(III) и Tb(III), в которых осуществляется внутримолекулярный перенос энергии возбуждения от молекулы органического лиганда к иону лантанида, благодаря чему интенсивность люминесценции ($I_{\text{люм}}$) последних значительно возрастает. Введение в систему лантанид–лиганд–сенсориализатор различных органических соединений может приводить как к тушению, так и к увеличению $I_{\text{люм}}$ иона лантанида. Эффект тушения $I_{\text{люм}}$ лантанидного сенсора используют при определении фосфатсодержащих органических лигандов – щелочной фосфатазы [12], аденозинтрифосфата [13], лицетина [14], прогестерона [15], карведиола [16] и др. соединений.

В данной работе показана возможность определения кофеина по тушению $I_{\text{люм}}$ люминесцентного сенсора – комплекса Tb(III) с 1,10 – фенантролином (Фен) в присутствии β -циклодекстрина (β -ЦД) в твердой фазе сорбента.

Экспериментальная часть

Хлорид тербия готовили растворением высокочистого оксида (99,98%) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением ее избытка упариванием. Концентрацию Tb(III) устанавливали комплексонометрическим титрованием. Растворы кофеина и β -циклодекстрина готовили растворением точных навесок в дистиллированной воде. Точную навеску 1,10-фенантролина растворяли в дистиллированной воде с добавлением хлористоводородной кислоты до pH 4,5-5,0.

Спектры люминесценции иона Tb(III) регистрировали в области 500-600 нм с помощью спектрометра ИСП-51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1.

Люминесценцию возбуждали ртутно-кварцевой лампой ДРШ-250 со светофильтром УФС-2.

Выделение кофеина из листьев чая проводили по методике [17]. При этом образец чая измельчали в фарфоровой ступке, точную навеску чая (1г) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили дистиллированной водой до объема 60-70мл, выдерживали 45 мин на водяной бане, охлаждали до комнатной температуры, доводили до метки дистиллированной водой, фильтровали.

Все измерения проводили при комнатной температуре (19-21°C). pH растворов измеряли стеклянным электродом на pH метре ОР-2Н/1 (Radelkies, Венгрия).

Результаты и их обсуждение

Для выделения кофеина из экстракта использовали метод тонкослойной хроматографии. С целью выбора оптимальных условий и режимов хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по своим свойствам (пластинки Silufol, Sorbfil, СТХ – 1А, марки Merck). Наилучшим оказалось применение хроматографических пластинок марки Merck TLC Aluminium Plates.

Подвижная фаза при хроматографировании выбрана экспериментально (табл.1). Как видно из таблицы 1, наибольшая подвижность кофеина R_f 0,58 и 0,52 обнаруживается при использовании смесей органических растворителей бензол: метанол: уксусная кислота и этилацетат: метанол.

Таблица 1

Влияние состава подвижной фазы на подвижность (R_f) кофеина

Подвижная фаза	R_f
Этилацетат: уксусная кислота (95:5)	0,26
Этилацетат:метанол (5:2)	0,52
н-гексан: этилацетат: этанол (50:30:8)	0,17
Бензол: метанол: уксусная кислота (10:5:1)	0,58
Хлороформ: этилацетат: муравьиная кислота (50:40:1)	0,33

Изучение влияния объема пробы, наносимого на пластинку, показало, что лучший результат достигается при нанесении пробы объемом 20 мкл. При меньших или больших количествах пробы пятна на пластинке приобретают вытянутую форму.

В качестве проявляющих использовали растворы хлорида Tb (III), 1,10-фенантролина и β -циклодекстрина. Согласно литературным данным [18], ионы Tb (III) образуют с 1,10-фенантролином комплекс с соотношением компонентов 1:2, в котором ионы Tb (III) проявляют интенсивную люминесценцию [19]. Интенсивность люминесценции значительно возрастает в тонком слое сорбента на пластинках для ТСХ. С целью оптимизации аналитического сигнала изучено влияние поверхностно-активных веществ различной природы: Тритона X-100, Бридж-35, Твин-80, лаурилсульфата натрия, цетилпиридиний хлорида, а также β -циклодекстрина и различных растворителей на люминесцентные свойства комплекса. Установлено что ПАВ и растворители не оказывают значительного влияния на $I_{\text{люм}}$ ионов Tb (III) в данном комплексе и максимальная $I_{\text{люм}}$ наблюдается при использовании в качестве проявляющих водных растворов.

$I_{\text{люм}}$ сорбата комплекса Tb (III) – Фен в 5-7 раз возрастает в присутствии β -циклодекстрина. Согласно литературным данным [20,21], в комплексах лантанидов с Фен, так же, как и в комплексах с дигидроксифенолами, молекула лиганда находится в полости β -циклодекстрина, образуя соединения включения типа «гость-хозяин». Молекулы β -циклодекстрина гидрофобны внутри и гидрофильны по «краям», что способствует образованию прочных комплексов включения с Фен, в которых последний выступает в качестве «гостя». Вытеснение молекул воды из внутренней сферы комплекса способствует уменьшению безызлучательных потерь энергии возбуждения и, соответственно, увеличению интенсивности люминесценции.

Циклодекстрины применялись ранее в качестве подвижных фаз в ТСХ органических реагентов ксантенового и хинолонового рядов [22].

Зависимость $I_{\text{люм}}$ сорбата Tb(III) от концентрации β -циклодекстрина приведена на рис.1. Наибольшая интенсивность люминесценции обнаруживается при концентрации β -циклодекстрина $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Изучение зависимости интенсивности люминесценции сорбата от количества 1,10-фенантролина показало, что оптимальным является использование 0,05%-го раствора.

В присутствии кофеина наблюдается тушение аналитического сигнала комплексного соединения Tb (III) с Фен и β -ЦД на поверхности тонкого слоя сорбента в широком интервале рН 3,0-9,5, с максимальным тушением аналитического сигнала при рН 6,8-7,0. Для создания рН раствора использовали уротропин (4%-ный водный раствор).

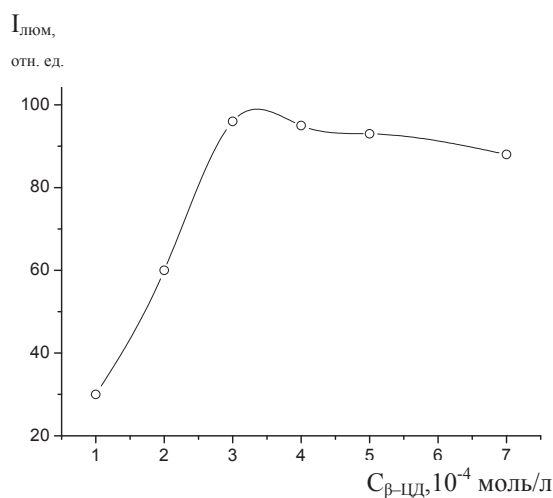


Рис. 1. Зависимость $I_{\text{люм}}$ Tb(III) в комплексе с 1,10-фенантролином и β -ЦД от концентрации β -ЦД ($C_{\text{Tb}^{3+}}=1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

Определение кофеина проводили в чаях, кофе и «энергетических» напитках.

Методика определения

Анализируемую пробу разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:10. Микрошприцем 20 мкл пробы наносят на линию старта хроматографической пластинки. Параллельно на пластинку наносят стандартный раствор кофеина, который содержит $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л кофеина, в зависимости от предполагаемого содержания в пробе. Пластинку высушивают и помещают в хроматографическую камеру в подвижную фазу (смесь бензол: метанол: уксусная кислота=10:5:1). Когда фронт растворителя достигает высоты 70 мм, пластинку извлекают из камеры и отмечают положение фронта растворителя. Полученную хроматограмму высушивают и равномерно последовательно обрабатывают растворами хлорида тербия ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л), 1,10-фенантролина (0,05% раствора), β -циклодекстрина ($3 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и уротропина (4%-ый водный раствор). После нанесения проявляющих растворов пластинку сушат и идентифицируют кофеин согласно положению пятна на хроматографической пластинке в свете ультрафиолетовой лампы с $\lambda_{\text{возб}}=365$ нм. Значение R_f для кофеина составляет 0,58. В зависимости от содержания кофеина в пробе наблюдают более или менее интенсивную люминесценцию иона Tb (III) зеленого цвета.

Количественное определение кофеина проводят по градуировочному графику (рис. 2), для построения которого поступают таким образом. На пластинку наносят различные количества стандартного раствора кофеина и далее проводят хроматографирование и проявление хроматограммы, как описано выше. Затем из пластинки вырезают пятна с кофеином, помещают в кювету для твердых образцов и измеряют $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{изл}} = 545\text{нм}$. По полученным данным строят градуировочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию кофеина, а на оси ординат – значения интенсивности люминесценции. Зависимость $I_{\text{люм}}$ сорбата от $C_{\text{кофеина}}$ линейна в интервале концентраций кофеина 0,01–0,8 мг/мл. Предел обнаружения кофеина составляет 0,002 мг/мл.

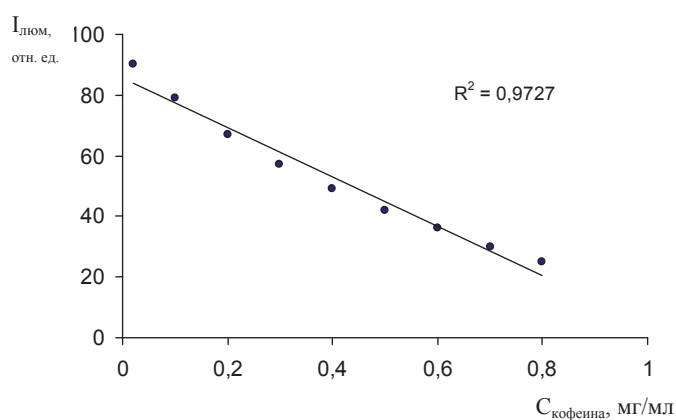


Рис. 2. Градуировочный график для определения кофеина

Результаты определения кофеина и проверка правильности полученных результатов методом добавок приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты определения кофеина в напитках методом ТСХ (n=5; P=0.95)

Объект анализа	Введено, мг/мл	Найдено в пробе с добавкой, мг/мл	Найдено в пробе, мг/мл	S_r , %
Черный чай «Dilmah»	0,1	0,287±0,021	0,187	6,3
	0,2	0,389±0,024	0,189	5,5
Зеленый чай «Greenfield»	0,1	0,455±0,028	0,355	5,4
	0,2	0,553±0,030	0,353	4,7
Кофе растворимый Nescafe	0,1	0,458±0,030	0,358	5,8
	0,2	0,560±0,031	0,360	4,9
Coca-cola	0,1	0,265±0,019	0,165	6,3
	0,2	0,363±0,023	0,163	5,5
Pepsi cola	0,1	0,237±0,017	0,137	6,1
	0,2	0,339±0,019	0,139	4,8
Red Bull	0,1	0,449±0,027	0,349	5,2
	0,2	0,552±0,031	0,352	4,9

При n=5, P=0.95 величина относительного стандартного отклонения составляет 4,7-6,3%.

Выводы

Показана возможность применения эффекта тушения сенсibilизированной твердофазной люминесценции ионов Tb(III) в комплексе с 1,10-фенантролином и β -циклодекстрином в присутствии алкалоида кофеина для определения последнего в напитках, содержащих кофеин. Разработана простая, высокочувствительная методика количественного сорбционно-люминесцентного определения кофеина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глущенко Н.Н., Плишченева Т.В., Попков В.А. Фармацевтическая химия. М.: Академия, 2004. – 384с.
2. ГОСТ 29148-97 «Кофе натуральный растворимый»: Технические условия.
3. Андреева К.Ю., Дмитренко С.Г., Золотов Ю.А. Спектрофотометрическое определение кофеина и теофиллина по реакции азосочетания с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония // Зав. лаб. Диагностика материалов. – 2010. – Т.76, №2. – С.21–24
4. Piezko G., Baranovska I., Flores A. Determination of energizers in energy drinks // Журн. аналит. хим. – 2010. – Т.12, №65. – С.1257–1263.
5. Хасанов В.В., Дычко К.А., Куряева Т.Т., Рыжова Т.Л., Мальцева Е.В. Новый способ определения кофеина // Журн. прикладной химии. – 2005. – Т.78, №9. – С.1451–1454.
6. Голубецкий Т.Б., Будко Е.В., Басова Е.М., Иванов В.М., Костарной А.В. Хроматографическое разделение парацетамола, кофеина и аспирина на сорбенте с привитыми нитрильными группами и анализ таблеток «АскофенП» // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т.62, №6. – С.636–640.
7. Карцова Л.А., Алексеева А.В. Использование селективного комплексообразования катехинов с ионами Fe³⁺ при определении кофеина в чае методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Журн. аналит. химии – 2009. – Т.64, №9. – С.954–958.
8. Карцова Л.А., Ганжа О.В., Алексеева А.В. Возможности и ограничения различных режимов капиллярного электрофореза для количественного определения катехинов и кофеина в черном и зеленом чае // Журн. аналит. химии. – 2010. – Т.65 №2. – С.212–217.
9. Паниева И.С., Курсанов Д.О., Легин А.В., Карцова Л.А., Алексеева А.В., Власов Ю.Г., Бхаттачария Н., Саркар С., Бандиопадхай Р. Анализ образцов чая с помощью мультисенсорной системы и капиллярного электрофореза // Журн. аналит. химии. – 2011. – Т.84, №6. – С.940–947.
10. Пилипенко В.П., Бибиб О.В., Прихода Н.Н. Сравнительная характеристика методов определения кофеина // Вопросы химии и хим.технол. – 2009. – №2. – С.89–91.
11. Егорова А.В., Скрипинец Ю.В. Применение сенсibilизированной люминесценции ионов лантанидов в биоанализе. – Одесса: Астропринт, 2008. – 198с.
12. Schrenkhammer P., Rosnicek Y.C., Duerkop A., Wolfbeis O.S., Schaferling M. Time-resolved fluorescence-based assay for the determination of alkaline phosphatase activity and application to the screening of inhibitors // J. Biomol. Screen. – 2008. – Vol.13, N1. – P.9–16.
13. Штыков С.Н., Смирнова Т.Д., Былинкин Ю.Г. Определение аденозинтрифосфорной кислоты по тушению флуоресценции дикетонатного хелата европия (III) в мицеллах неонного ПАВ Бридж-35 // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т.59, №5. – С.495–499.
14. Bian W., Jrang C. Highly sensitive spectrofluorimetric determination of trace amounts of lecithin using a norfloxacin-terbium probe // Chim. Acta. – 2006. – Vol. 368. – P.144–148.
15. Леоненко И.И., Александрова Д.И., Егорова А.В., Антонович В.П., Украинец И.В. Определение погестерона с использованием эффекта тушения комплексного соединения Tb(III) // Вісник ОНУ. Серія «Хімія». – 2010. – Т.15, вип.2. – С.29–39.
16. Leonenko I., Aleksandrova D., Yegorova A. Determination of carvedilol by its quenching effect on the luminescence of terbium complex in dosage form // Acta Polonica Pharmaceutica. – 2011. – Vol.68, N3. – P.325–330.
17. ГОСТ 1936-85. Чай. Правила приемки и методы анализа.
18. Яцимирский К.Б., Костромин Н.А., Шека З.А., Давиденко Н.К., Крисс Е.Е., Ермоленко В.И. Химия комплексных соединений редкоземельных элементов. – К.: «Наукова думка», 1966. – 493 с.
19. Kallistratos G., Kallistratos U., Mündner H. Fluorescent properties of aromatic complexes with Rare earths and other elements of the (III)a-group // Chim. Chronica New Series. – 1982. – Vol.11. – P. 249–266.
20. Хоменко В.С. Исследование аддуктообразования иона лантанида с β -циклодекстрином, диаза-18-краун-6 и 1,10-фенантролином в растворе // Координационная химия. – 1992. – Т.18, №2. – С.218–220.

21. Грачев М.К., Сеньюшкина Н.А., Курочкина Е.Н., Лысенко С.А. Комплексы включения β -циклодекстрина с дигидроксифенолами различной природы // Журн. общей химии. – 2009. – Т.79, №9. – С.1476–1479.
22. Сумина Е.Г., Атаян В.В., Штыков С.И. Применение циклодекстриновых подвижных фаз в тонкослойной хроматографии органических реагентов ксантенового и хинолинового ряда // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т.8, вып.1. – С.83–93.

Стаття надійшла до редакції 17.02.13

О. І. Теслюк¹, С. В. Бельтюкова², Е. О. Лівенцова²

¹Фізико-хімічний інститут ім. А.В. Богатського НАН України, відділ аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук, 65080, м.Одеса, Люстдорфська дорога, 86

²Одеська національна академія харчових технологій, кафедра хімії та безпеки харчових продуктів, 65039, м.Одеса, Канатна, 112

ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ ЗА ГАСІННЯМ СЕНСИБІЛІЗОВАНОЇ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ КОМПЛЕКСНОЇ СПОЛУКИ ІОНУ ТЬ (III)

Резюме

Вивчено ефект гасіння кофеїном сенсibilизованої люмінесценції іону Ть (III) у сорбатах комплексу з 1,10-фенантроліном та β -циклодекстріном. Знайдено оптимальні умови хроматографування кофеїну. У якості проявляючого розчину запропоновано використовувати хлорид тербію у присутності 1,10-фенантроліну та β -циклодекстрину. Встановлено оптимальні умови гасіння люмінесценції комплексної сполуки іону Ть (III) кофеїном у фазі сорбенту. Розроблена проста та надійна методика люмінесцентного визначення кофеїну у напоях, що містять кофеїн.

Ключові слова: сенсibilизована люмінесценція, тербій, кофеїн, сорбція.

O. I. Teslyuk¹, Beltyukova S.V.², Liventsova E.O.²

¹A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of National Academy of Sciences of Ukraine, 86 Lustdorfskaya doroga, 65080, Odessa, Ukraine

²National academy of food technologies of Odessa, Department of Chemistry and Safety of food products, St. Kanatnaya, 112, 65039, Odessa, Ukraine

DETERMINATION OF CAFFEINE WITH THE USE QUENCHING OF SENSIBILIZED LUMINESCENCE OF TERBIUM (III) COMPLEX

Summary

The effect of luminescence of Tb(III) ion quenching by caffeine in sorbates complex with 1,10-phenanthroline and β -cyclodextrin was studied. The optimal condition for the determination of caffeine by layer chromatography method was investigated. The terbium chloride (III) with 1,10-phenanthroline and β -cyclodextrin was proposed as an enhanced solution. The optimal condition for the quenching luminescence of Tb(III) complex in sorbent phase was investigated. The simple and reliable method of the caffeine quantitative determination in caffeine beverages by the thin-layer chromatography method was developed.

Key words: sensibilized luminescence, terbium, caffeine, sorption.