

## ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ З ВИКОРИСТАННЯМ ЕФЕКТУ ГАСІННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ІОНУ ТЬ (III)

**Ключові слова:** кофеїн, сорбція, сенсibiliзована люмінесценція, тербій (III)

Алкалоїд кофеїн (1,3,7-триметилксантин) входить до складу багатьох лікарських засобів, які широко застосовують в терапевтичній практиці при захворюваннях, що мають такі прояви як пригніченість центральної нервової і серцево-судинної систем, для підвищення психічної і фізичної працездатності, зменшення втоми і сонливості. Кофеїн сприяє звуженню судин, прискорює процеси метаболізму, має сечогінний ефект [1]. Передозування кофеїну спричинює пригнічення центральної нервової системи. Таким чином, безпечно та ефективно використання лікарських засобів потребує дуже ретельного контролю за дозуванням. Окрім того, у зв'язку з випадками фальсифікації лікарських препаратів, що почастишали, зростає необхідність у швидких і надійних методиках кількісного визначення кофеїну в лікарських формах.

Для визначення кофеїну використовують титриметричні [4], спектрофотометричні [2–4], хроматографічні методи [5–7], а також метод капілярного електрофорезу [8, 9].

Відповідно до вимог ДСТУ [2] основним методом визначення кофеїну є фотометричний метод, що базується на екстракційному відокремленні кофеїну, його гідролітичному окисненні у тетраметилпурпурову кислоту та визначенні оптичної густини забарвленого продукту при  $\lambda = 540$  нм. Спектрофотометрична методика визначення кофеїну, заснована на реакції азосполучення тетрафторбората-4-нітрофенілдіазонія з продуктами лужного гідролізу кофеїну з утворенням забарвлених продуктів запропонована в [3]. Визначення кофеїну методом похідної спектрофотометрії наведено в [4]. Титриметричний і спектрофотометричний методи застосовують загалом для визначення кофеїну у простих за складом фармацевтичних препаратах [1, 3]. У разі визначення кофеїну у сировині та складних лікарських формах найчастіше використовують хроматографічні методи [5–7] або методи капілярного електрофорезу [8, 9]. Порівняльна характеристика методів визначення кофеїну дана у [10]. Автори зазначають, що у разі визначення кофеїну у каві переважним є метод вискоефективної рідинної хроматографії.

В останній час при визначенні біологічно активних сполук успішно використовують [11] люмінесцентні сенсори на основі комплексних сполук іонів лантанідів (III) – європію (III) і тербію (III), в яких здійснюється внутрішньо-молекулярне перенесення енергії збудження від молекули органічного ліганда до іона лантаніда, внаслідок чого інтенсивність люмінесценції останніх значно збільшується. Введення в систему лантанід–ліганд–сенсibiliзатор різноманітних органічних сполук може призвести як до гасіння, так і до збільшення  $I_{\text{люм}}$  іона лантаніда. Ефект гасіння  $I_{\text{люм}}$  лантанідного сенсора використовують під час

визначення фосфатовмісних органічних лігандів – лужної фосфатази, аденозинтрифосфату, лецитину, прогестерону, карведіолу та інших речовин [12].

**Мета** роботи – розроблення експресної методики визначення кофеїну в таблетованих лікарських препаратах Кофетамін і Пірамеїн з використанням ефекту гасіння кофеїном люмінесценції лантанідного люмінесцентного сенсора – комплексу Tb (III) з 1,10-фенантроліном (Фен) і  $\beta$ -циклодекстріном (ЦД) у твердій фазі сорбенту.

### **Матеріали та методи дослідження**

Об'єкт дослідження – застосування ефекту гасіння кофеїном  $I_{\text{люм}}$  комплексної сполуки іона Tb (III), Фен і ЦД. Хлорид тербію готували розчиненням високочистого оксиду «Acros», 99,98% у хлороводневій кислоті (1:1) з подальшим видаленням її надлишку випарюванням. Концентрацію Tb (III) встановлювали комплексометрично. Розчини кофеїну і  $\beta$ -циклодекстріну (Sigma) готували розчиненням точних наважок речовин у дистильованій воді. Точну наважку Фен (Chemopol) розчиняли у дистильованій воді з додаванням хлороводневої кислоти до рН 4,5–5,0. Спектри люмінесценції іону Tb (III) реєстрували в області 500–600 нм за допомогою спектрометру ИСП-51 (ЛОМО, Санкт-Петербург) з фотоелектричною приставкою ФЕП-1. Люмінесценцію збуджували ртутно-кварцевою лампою ДРШ-250 із світлофільтром УФС-2. Всі виміри здійснювали за температури 19–21 °С. рН розчинів вимірювали скляним електродом на рН-метрі ОР-2Н/1 (Redelkies, Угорщина).

### **Результати дослідження та обговорення**

Було встановлено, що більшою мірою ефект гасіння люмінесценції іона Tb (III) спостерігають в комплексах з Фен і  $\beta$ -циклодекстріном на силікагелі Merck. Було встановлено оптимальні люмінесцентні характеристики застосовуваного сенсора. Згідно з даними літератури іони Ln (III) утворюють з Фен комплекси із співвідношенням компонентів 1:2, в яких іони Tb (III) і Eu (III) проявляють інтенсивну люмінесценцію [13]. Інтенсивність люмінесценції значно зростає в тонкому шарі сорбенту – силікагелю. З метою оптимізації аналітичного сигналу вивчено вплив на люмінесцентні властивості комплексу поверхнево-активних речовин (Тритон X-100, Брідж-35, Твін-80, лаурилсульфату натрію, цетилпіридинію хлориду та  $\beta$ -циклодекстріну) та розчинників різної природи. Встановлено, що ПАВ та розчинники значно не впливають на  $I_{\text{люм}}$  іонів Tb (III) в цьому комплексі. Найбільшу  $I_{\text{люм}}$  виявляють у разі сорбції з водних розчинів.

$I_{\text{люм}}$  сорбата комплексу Tb (III)–Фен в 5–7 разів збільшується у присутності  $\beta$ -циклодекстріну. Згідно з даними літератури [14] у комплексах лантанідів з Фен, так як і в комплексах з дигідроксифенолами, молекула ліганду знаходиться у порожнині  $\beta$ -циклодекстріну і утворюється сполучення включення типу «гість–хазяїн». Молекули  $\beta$ -циклодекстріну гідрофобні всередині і гідрофільні по «краях», що сприяє утворенню міцних комплексів включення з Фен, в яких останній виступає як «гість». Витіснення молекул води з внутрішньої сфери комплексу сприяє зменшенню безвипромінювальних втрат енергії збудження і, відповідно, збільшенню інтенсивності люмінесценції. Залежність  $I_{\text{люм}}$  сорбата комплексу Tb (III) від концентрації  $\beta$ -циклодекстріну подано на рис. 1. Найбільшу інтенсивність люмінесценції виявляють при концентрації  $\beta$ -циклодекстріну  $3 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

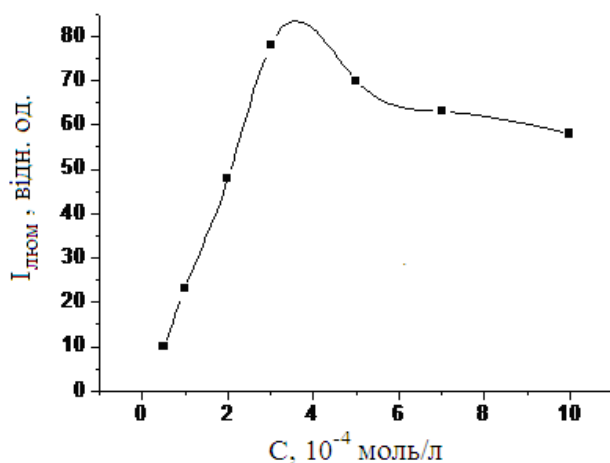


Рис. 1. Залежність  $I_{\text{люм}}$  сорбата комплексу Tb (III) від концентрації  $\beta$ -циклодекстрину ( $C_{\text{Tb(III)}} = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л)

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції сорбата комплексу від кількості 1,10-фенантроліну свідчить, що оптимальною є концентрація 0,05%.

Інтенсивна люмінесценція сорбата залежить від часу сорбції. Для одержання максимальної  $I_{\text{люм}}$  сорбата необхідно здійснювати сорбцію упродовж 10–15 хв. У разі подальшого збільшення часу сорбції  $I_{\text{люм}}$  сенсора не змінюється. Оптимальну  $I_{\text{люм}}$  спостерігають у разі висушування сорбатів протягом 15–20 хв за температури 80–100 °С.

Встановлено, що  $I_{\text{люм}}$  сорбата найбільша за збільшення концентрації іонів Tb (III) в фазі сорбенту, однак, при цьому значно збільшується і  $I_{\text{люм}}$  «холостої» проби. Найбільшу різницю між  $I_{\text{люм}}$  сорбата комплексу і «холостої» проби спостерігають за концентрації Tb (III)  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

В оптимальних умовах люмінесценції сенсора, що запропонований, в спектрі люмінесценції сорбата комплексу найбільш інтенсивною є смуга Tb (III), що відповідає надчутливому переходу  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$  (545 нм), значно слабкіші за інтенсивністю смуги з максимумами за 490, 586, 620 нм (переходи з рівня  ${}^5D_4$  на  ${}^7F_6$ ,  ${}^7F_4$  і  ${}^7F_3$  відповідно) (рис. 2).

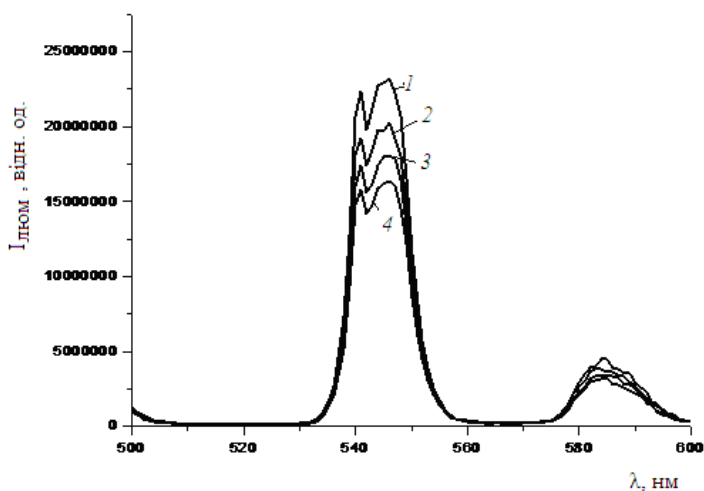


Рис. 2. Спектри люмінесценції сорбата комплексу Tb (III)–Фен– $\beta$ -циклодекстрин у присутності різних концентрацій кофеїну:  $C_{\text{кофеїну}} = 0$  моль/л (1);  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л (2);  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л (3);  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л (4)

Гасіння аналітичного сигналу комплексу Tb(III)–Фен– $\beta$ -циклодекстрін на поверхні тонкого шару сорбенту у присутності кофеїну спостерігається в широкому інтервалі рН від 3,0 до 9,5 з оптимальною кислотністю середовища при рН 6,8–7,0. Для створення рН розчинів використовували уротропін (4%-вий водний розчин). Виявлений ефект гасіння люмінесценції Tb (III) в люмінесцентному сенсорі Tb(III)–Фен– $\beta$ -циклодекстрін кофеїном використаний для люмінесцентного визначення останнього в дозованих лікарських засобах (рис. 2). Кількісне визначення проводили методом градуювального графіка.

#### Методика визначення

#### Побудова градуювального графіка

Вмірні пробірки об'ємом 10 мл вміщували по 60 мг силікагелю, додавали в кожную по 1 мл розчину хлориду тербію (0,01 моль/л), 0,5 мл розчину 1,10-фенанроліну (1%-го), 0,3 мл етанольного розчину  $\beta$ -циклодекстрину ( $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л) і 0,2 мл 4%-го водного розчину уротропіну, струшували протягом 1 хв, потім вносили в кожную з них 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 мл стандартного розчину кофеїну (1 мг/мл). Потім доводили об'єм розчину до 10 мл дистильованою водою. Сорбцію здійснювали змішуючи розчин протягом 10 хв, фільтрували та висушували у сушильній шафі протягом 15 хв за температури 80 °С. Інтенсивність люмінесценції сорбата Tb (III) вимірювали при  $\lambda_{\text{випр}} = 545$  нм ( $\lambda_{\text{збуд}} = 365$  нм). Паралельно готували розчин «холостої» проби, яка містила усі складові, окрім кофеїну. За одержаними даними будували градуювальний графік, для чого відкладали на осі абсцис концентрацію кофеїну, а на осі ординат – значення  $I_{\text{люм}}$  сорбата. Залежність  $I_{\text{люм}}$  сорбата від концентрації кофеїну лінійна в інтервалі концентрацій кофеїну 0,01–0,8 мг/мл.

#### Хід аналізу

Ретельно розтирали по 5 таблеток Кофетаміну і Пірамеїну. Наважки, що відповідають середній масі таблеток, що містять 0,1 г і 0,03 г кофеїну відповідно, переносили в мірні колби об'ємом 25 мл та розчиняли у дистильованій воді. Розчини доводили до мітки тим самим розчинником, фільтрували через паперовий фільтр «блакитна стрічка». Із одержаних розчинів на аналіз відбирали 1 мл фільтрату у разі Кофетаміну і 4 мл фільтрату у разі Пірамеїну. Відібрані фільтрати вміщували в мірні пробірки на 10 мл і потім додавали всі реагенти, як у разі побудування градуювального графіка. Після проведення сорбції і висушування сорбатів вимірювали  $I_{\text{люм}}$  при  $\lambda_{\text{випр}} = 545$  нм ( $\lambda_{\text{збуд}} = 365$  нм). Вміст кофеїну в зразках, що аналізували, визначали за градуювальним графіком (рис. 3).

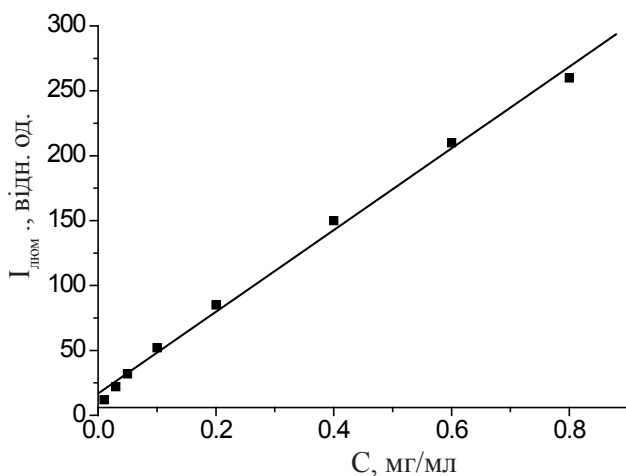


Рис. 3. Градуювальний графік для визначення вмісту кофеїну в лікарських засобах Кофетамін і Пірамеїн

Правильність методики кількісного визначення кофеїну в лікарських засобах Кофетамін і Пірамеїн перевірено методом добавок (таблиця). Запропоновані методики характеризуються задовільними метрологічними характеристиками і простотою виконання тесту «Кількісне визначення» лікарських засобів. Точність і достовірність визначення перевірено шляхом статистичної обробки результатів визначення. При  $n = 5$ ,  $P = 0,95$  величина відносного стандартного відхилення становить 1,7–2,6%.

Т а б л и ц я

**Результати визначення кофеїну в таблетках ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )**

Лікарській засіб	Введено, мг	Знайдено у пробі з добавкою, мг	Знайдено у пробі, мг $X_{cp} \pm \Delta X$	Sr
Кофетамін – кофеїну 100 мг	100,0	200,3 198,5 203,2 199,5 201,8	$100,60 \pm 1,96$	0,017
	150,0	250,5 247,8 252,3 248,8 251,9	$100,30 \pm 2,07$	0,018
Пірамеїн – кофеїну 30 мг	30,0	60,8 60,4 59,6 61,3 61,1	$30,60 \pm 0,91$	0,026
	45,0	75,4 75,2 74,9 74,7 75,3	$30,10 \pm 0,86$	0,025

### В и с н о в к и

1. Встановлено оптимальні умови гасіння люмінесценції іону Tb (III) в люмінесцентному сенсорі Tb(III)–1,10-фенантролін– $\beta$ -циклодекстрин кофеїном в твердій фазі сорбенту.

2. Розроблено експрес-методику визначення кофеїну в таблетованих лікарських засобах Кофетамін і Пірамеїн.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Глуценко Н. Н., Плешинева Т. В., Понков В. А. Фармацевтическая химия. – М.: Академия, 2004. – 320 с.
2. ГОСТ Р 51881-2002. Кофе натуральный растворимый. Общие технические условия. Введ. 2003–01–01. – М.: Изд-во стандартов, 2003. – 12 с.
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. Pieszko G., Baranovska I., Flores A. Determination of energizers in energy drinks // Журн. аналит. хим. – 2010. – Т. 12, № 65. – С. 1257–1263.

5. Карцова Л. А., Алексеева А. В. Использование селективного комплексообразования катехинов с ионами  $Fe^{3+}$  при определении кофеина в чае методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Там же. – 2009. – Т. 64, № 9. – С. 954–958.

6. Хасанов В. В., Дычко К. А., Куряева Т. Т. и др. Новый способ определения кофеина // Журн. прикл. хим. – 2005. – Т. 78, № 9. – С. 1451–1454.

7. Голубецкий Т. Б., Будко Е. В., Басова Е. М. и др. Хроматографическое разделение парацетамола, кофеина и аспирина на сорбенте с привитыми нитрильными группами и анализ таблеток «АскофенП» // Журн. аналит. хим. – 2007. – Т. 62, № 6. – С. 636–640.

8. Паниева И. С., Кирсанов Д. О., Легин А. В. и др. Анализ образцов чая с помощью мультисенсорной системы и капиллярного электрофореза // Там же. – 2011. – Т. 84, № 6. – С. 940–947.

9. 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 // Там же. – 2010. – Т. 65, № 2. – С. 212–217.

10. Пилипенко В. П., Бирик 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: Астрпринт, 2008. – 198 с.

12. Леоненко И. И., Александрова Д. И., Егорова А. В., Антонович В. П. Аналитическое применение эффектов тушения люминесценции (Обзор) // Методы и объекты хим. анализа. – 2012 – Т. 7, № 3. – С. 108–125.

13. 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. – V. 11. – P. 249–266.

14. Хоменко В. С. Исследование аддуктообразования иона лютеция с  $\beta$ -циклодекстрином, диаза-18-краун-6 и 1,10-фенантролином в растворе // Координационная хим. – 1992. – Т. 18, № 2. – С. 218–220.

Надійшла до редакції 09. 01. 2014.

С. В. Бельтюкова<sup>1</sup>, О. И. Теслюк<sup>2</sup>, Е. О. Ливенцова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Одесская национальная академия пищевых технологий

<sup>2</sup>Физико-химический институт им. О. В. Богатского НАН Украины, г. Одесса

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭФФЕКТА ТУШЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ИОНА ТЬ (III)

**Ключевые слова:** кофеин, сорбция, сенсibilизированная люминесценция, тербий (III)

### АННОТАЦИЯ

Кофеин входит в состав многих лекарственных препаратов и широко применяется в терапевтической практике, в связи с этим возникает необходимость тщательного контроля его дозировок. Для определения кофеина применяют спектрофотометрические методы, которые не селективны, а также метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, требующий дорогостоящего оборудования.

Цель работы – разработка простой и чувствительной методики количественного определения кофеина в лекарственных препаратах Кофетамин и Пирамеин с использованием эффекта тушения кофеином сенсibilизированной люминесценции иона тербия (III) в сорбатах комплекса с 1,10-фенантролином и  $\beta$ -циклодекстрином в твердой фазе сорбента.

Найдены оптимальные условия получения аналитического сигнала предлагаемого люминесцентного сенсора. Показано, что использование  $\beta$ -циклодекстрина в качестве второго лиганда способствует образованию комплексов включения «гость–хозяин», что приводит к вытеснению молекул воды из внутренней сферы комплекса и к уменьшению безызлучательных потерь энергии возбуждения. В результате этого  $I_{\text{люм}}$  значительно возрастает. Установлено, что  $I_{\text{люм}}$  сорбата зависит от концентрации иона ТЬ(III) в растворе и максимальна при концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л. В оптимальных условиях люминесценции в качестве аналитического сигнала выбрана полоса люминесценции иона ТЬ(III), соответствующая сверхчувствительному переходу  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$  ( $\lambda_{\text{излуч}} = 545$  нм,  $\lambda_{\text{возб}} = 365$  нм).

Установлено, что в наибольшей степени эффект тушения люминесценции иона ТЬ(III) в комплексе с 1,10-фенантролином и  $\beta$ -циклодекстрином проявляется в фазе сорбента – силикагеля. Изучены оптимальные условия сорбции – время сорбции, температура и время высушивания.

Разработана простая и надежная методика люминесцентного определения кофеина в дозированных лекарственных формах. Определение проводят по градуировочному графику. Предел обнаружения кофеина составляет 0,02 мкг/мл. Точность и достоверность определения проверены путем статистической обработки результатов определения. Относительное стандартное отклонение составляет 1,7–2,6%.

DETERMINATION OF CAFFEINE WITH THE USE OF EFFECTS OF THE LUMINESCENCE Tb (III) ION QUENCHING

**Key words:** caffeine, sorption, sensitized luminescence, terbium (III)

ABSTRACT

Caffeine is a part of many drugs and is widely used in therapeutic practice; therefore, there is the need for careful control of its dosage. For determination of caffeine used spectrophotometric methods, which are not selective, high performance liquid chromatography methods, which require expensive equipment.

The aim of this work was to develop a simple and sensitive methods of quantitative determination of caffeine in pharmaceutical drugs Kofetamin and Piramein quenching effect using caffeine sensitized luminescence of Tb(III) complex with a sorbate 1,10-phenanthroline and  $\beta$ -cyclodextrin in the solid sorbent.

The optimum conditions for obtaining the analytical signal of the proposed luminescent sensor have been investigated. It has been shown that the use of  $\beta$ -cyclodextrin as a second ligand promotes the formation of inclusion complexes of "guest-host", which leads to the displacement of water molecules of the inner sphere of the complex, and to reduce non-radioactive energy loss stimulation. As a result, this significantly increases luminescence. It was established that luminescence sorbate concentration dependent on ion Tb (III) in solution at the maximum concentration  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Under optimal conditions, the luminescence signal is selected as an analytical band luminescence of Tb(III), corresponding to supersensitive transition  $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$  ( $\lambda_{\text{emission}} = 545$  nm,  $\lambda_{\text{excitation}} = 365$  nm).

It was shown that most effect of luminescence quenching ion Tb(III) in complexes appears in the sorbent phase - silica gel. The optimal conditions of sorption - sorption time, temperature and drying time was studied.

The observed effect of luminescence quenching of Tb (III) ion in complex with 1,10-phenanthroline and  $\beta$ -cyclodextrin in the presence of caffeine was used by us at the development of methods for determining the of caffeine in dosage formed.

The content of caffeine was found from calibration curve. The detection limit of caffeine is 0.02  $\mu\text{g/ml}$ . The accuracy and reliability of the determination were verified by statistical processing of the results of determination. The relative standard deviation was 1.7–2.6%.

*Електронна адреса для листування з авторами: Liventsova\_helen@mail.ru*