



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **78914**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 09204**

(22) Дата подання заявки: **26.07.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.04.2013**

(46) Публікація відомостей **10.04.2013, Бюл.№ 7**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Теслюк Ольга Іванівна (UA),
Бельтюкова Світлана Вадимівна (UA),
Лівенцова Олена Олегівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В.
БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080
(UA),
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)**

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення кофеїну включає приготування проби, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу. Кофеїн відокремлюють методом тонкошарової хроматографії, який піддають взаємодії з проявляючим розчином, що включає хлорид тербію (III), 1,10-фенатролін, β -циклодекстрин при рН 6,8-7,0 у тонкому шарі сорбенту на хроматографічній пластинці, та вимірюють інтенсивність люмінесценції тербію (III) при $\lambda_{\text{випром}}=545$ нм, за величиною якої визначають концентрацію кофеїну.

UA 78914 U

Корисна модель належить до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення алкалоїду - кофеїну (1,3,7-триметилксантину) у чаї, каві та інших напоях.

Відомий спосіб визначення кофеїну методом вискоєфективної рідинної хроматографії (див. H.N.Wanyika, E.G.Gatebe, L.M.Gitu et al. Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in Kenyan market. - Afr. J. Food Sci.-2010., V.4(6), pp.353-358).

Визначення проводять наступним чином: спочатку екстракційно вилучають кофеїн з проб, що аналізують. Компоненти, які заважають (білки, крохмаль), відокремлюють розчинами, що осаджують - реактивами Кареза. Потім проводять перемішування та фільтрування. Отриманий водний розчин пререпускають крізь колонку ODS, довжиною 250 мм, та внутрішнім діаметром 4,6 мкм. Як елюент використовують суміш дистильованої води, оцтової кислоти та метанолу (79,9:0,1:20,0). Хроматограми проявляють при довжині хвилі світла 278 нм.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є визначення кофеїну у каві за допомогою спектрофотометричного методу. (Див. Эталонный метод. ГОСТ Р 51881-2002. Кофе натуральный растворимый. Общие технические условия. Кофе. Определение содержания кофеина.).

Спосіб передбачає вилучення кофеїну з проби кави за допомогою сорбенту діатомової землі з подальшим очищенням на двох колонках (з лужним та кислим середовищем) діетиловим ефіром, вилученням кофеїну за допомогою хлороформу та подальшим його кількісним визначенням спектрофотометричним методом. Для цього наважку натуральної розчинної кави масою 0,500 г поміщають у хімічний стакан місткістю 100 мл, додають 5 мл розчину аміаку та кип'ятять на водяній бані протягом 2 хв. Для вилучення кофеїну додають 6 г сорбенту діатомової землі. Отриману суміш переносять у лужну хроматографічну колонку (як наповнювач містить діатомову землю та луг). Кислотна колонка як наповнювач містить діатомову землю та сірчану кислоту. Для очищення кофеїну послідовно пропускають 150 мл діетилового ефіру крізь лужну та кислотну колонки. Для вилучення кофеїну крізь колонки пропускають 50 мл хлороформу. Елюат вміщують у колбу місткістю 50 мл, об'єм розчину доводять до мітки хлороформом. Оптичну густину розчину, що отримали, вимірюють спектрофотометрично при довжині хвилі поглинання 276 нм.

Дане рішення вибрано як прототип.

Прототип і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- приготування проби,
- взаємодія проби з хімічним реагентом,
- вимірювання інтенсивності аналітичного сигналу.

Проте спосіб, запропонований за прототипом, потребує попереднього відокремлення кофеїну з проби за допомогою сорбенту діатомової землі з подальшим очищенням на двох колонках (з лужним та кислим середовищем) діетиловим ефіром, та подальшим вилученням кофеїну за допомогою хлороформу. Все це ускладнює підготовку проби до аналізу та збільшує час проведення аналізу.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб кількісного визначення кофеїну, в якому за рахунок заміни реагентів забезпечити підвищення чутливості визначення, а також спрощення та скорочення часу проведення аналізу.

Поставлена задача вирішується у способі кількісного визначення кофеїну, який включає приготування проби, відокремлення кофеїну, взаємодію його на пластинці для тонкошарової хроматографії марки Merck TLC Aluminum Plates з розчином, який включає до складу хлорид тербію (III), 1,10- фенатролін (Фен) та (3-циклодекстрін (ЦЦ) при рН 6,8-7,0 з подальшим вимірюванням інтенсивності люмінесценції тербію (III) при $\lambda=545$ нм безпосереднє у тонкому шарі сорбенту на хроматографічній пластинці.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є використання гасіння в присутності кофеїну сенсibiliзованої люмінесценції іона тербію в комплексі з Фен та ЦД на поверхні тонкого шару сорбенту.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляється, і досягнутим результатом можна пояснити наступним. Спрощення та скорочення часу проведення аналізу, підвищення чутливості стало можливим завдяки використанню гасіння в присутності кофеїну сенсibiliзованої люмінесценції іона тербію в комплексі з Фен та ЦД внаслідок руйнування цієї комплексної сполуки на поверхні тонкого шару сорбенту.

Циклодекстрини є найбільш відомими і широко вживаними представниками природних молекул-рецепторів, що мають об'ємну гідрофобну порожнину і здатні утворювати супрамолекулярні комплекси включення "гість-хазяїн" [див. Сумина Е.Г., Атаян В.З., Штыков С.Н. Применение циклодекстриновых подвижных фаз в тонкослойной хроматографии органических реагентов ксантенового и хинолинового рядов. - Сорбционные и хроматографич.

процессы.-2008, Т. 8, Вып. 1., С. 83-93.]. Інтенсивність люмінесценції тербію у розчині оптимальна при вмісті ЦД-3-10 мол/л (фіг. 1).

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції сорбату від кількості 1,10 - фенатроліну показало, що оптимальним є використання 0,05 % - ого розчину.

5 У присутності кофеїну спостерігається гасіння аналітичного сигналу комплексної сполуки Tb(III) з ЦД та Фен на поверхні тонкого шару сорбенту в широкому інтервалі кислотності (рН 3,0-9,5) з максимальним гасінням аналітичного сигналу при рН 6,8-7,0. В способі, що пропонується, для створення рН розчину використовується уротропін (0,2 мл 4 %-го водного розчину).

10 Для хроматографування важливим також є склад рухомої фази. Вивчено вплив рухомої фази різного складу на рухомість (R_f) кофеїну (табл. 1).

Таким чином, найбільша рухомість кофеїну спостерігається при використанні системи розчинників бензол: метанол: оцтова кислота у співвідношенні 10:5: 1 та етилацетат: метанол (5:2).

15 Вивчення впливу об'єму проби, що наноситься на пластинку, показало, що найкращий результат досягається при нанесенні проби об'ємом 20 мкл. При менших або більших кількостях проби плями на пластинці набувають витягнутої форми.

Визначення кофеїну проводили у каві та напоях, до складу яких входить кофеїн.

Приклад

20 Пробу, що аналізують, розбавляють дистильованою водою в співвідношенні 1:10. Мікрошприцем 20 мкл проби наносять на лінію старту хроматографічної пластинки. Паралельно на пластинку наносять стандартний розчин кофеїну, що містить $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л кофеїну, залежно від вмісту в пробі, що передбачається. Пластинку підсушують і поміщають в хроматографічну камеру в рухому фазу (суміш бензол: метанол: оцтова кислота (10:5:1). Коли фронт розчинника досягає висоти 70 мм, пластинку витягають з камери і відмічають положення

25 фронту розчинника. Отриману хроматограму висушують і рівномірно послідовно оброблюють проявником - розчином, до складу якого входить хлорид тербію ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л), 1,10-фенантролін (0,05 % розчин), β -ЦД ($3 \cdot 10^{-4}$ мол/л) та уротропін (0,2 мл 4 %-го водного розчину). Після нанесення проявляючого розчину пластинку сушать і ідентифікують кофеїн згідно положенню плями на хроматографічній пластинці у світлі ультрафіолетової лампи з $\lambda_{\text{збудж}}=363$

30 нм. Обчислюють значення R_f для речовини, що аналізують. Рухомість кофеїну становить 0, 58.

Кількісне визначення кофеїну проводили за калібрувальним графіком (фіг.2), для побудови якого поступали таким чином. На пластинку наносили різні кількості стандартного розчину кофеїну і далі проводили хроматографування і проявку хроматограми, як описано вище. Потім з пластинки вирізали плями з кофеїном, вміщували в кювету для твердих зразків і вимірювали

35 $I_{\text{люм}}$ при $\lambda=545\text{нм}$. За отриманими даними будували калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію кофеїну, а на осі ординат - значення інтенсивності люмінесценції.

Межа виявлення кофеїну складає 0,02 мкг/мл.

40 Результати визначення кофеїну і перевірка правильності отриманих результатів методом добавок наведені у таблиці 2. Точність і достовірність визначення перевірена шляхом статистичної обробки результатів визначення. При $n=5$, $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення складає 0,04-0,06.

Таблиця 1

Вплив рухомої фази різного складу на рухомість (R_f) кофеїну

Рухома фаза	R_f
Етилацетат: оцтова кислота (95:5)	0,26
Етилацетат: метанол (5:2)	0,52
Н-гексан: етилацетат: етанол (50:30:8)	0,17
Бензол: метанол: оцтова кислота (10:5: 1)	0,58
Хлороформ: етилацетат: мурашина кислота (50:40:1)	0,33

Таблиця 2

Результати визначення кофеїну у напоях методом ТШХ (n=5; P = 0,95)

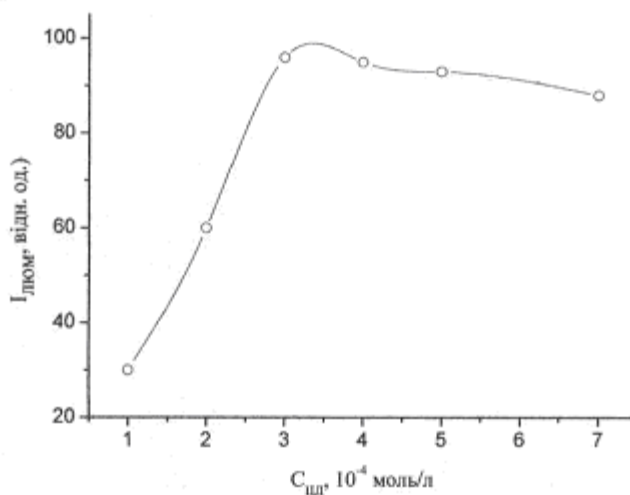
Об'єкт аналізу	Введено мг/мл	Знайдено у пробі з добавкою мг/мл	Знайдено у пробі мг/мл	S _r , %
Чорний чай "Ahmad"	0,1	0,287±0,035	0,187	6,3
	0,2	0,389±0,056	0,189	5,5
Зелений чай "Greenfield"	0,1	0,455±0,022	0,355	5,4
	0,2	0,553±0,018	0,353	4,7
Кава розчинна Nescafe	0,1	0,458±0,046	0,358	5,8
	0,2	0,560±0,034	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±0,065	0,137	6,1
	0,2	0,339±0,042	0,139	4,8
Red Bull	0,1	0,449±0,032	0,349	5,2
	0,2	0,552±0,014	0,352	4,9

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

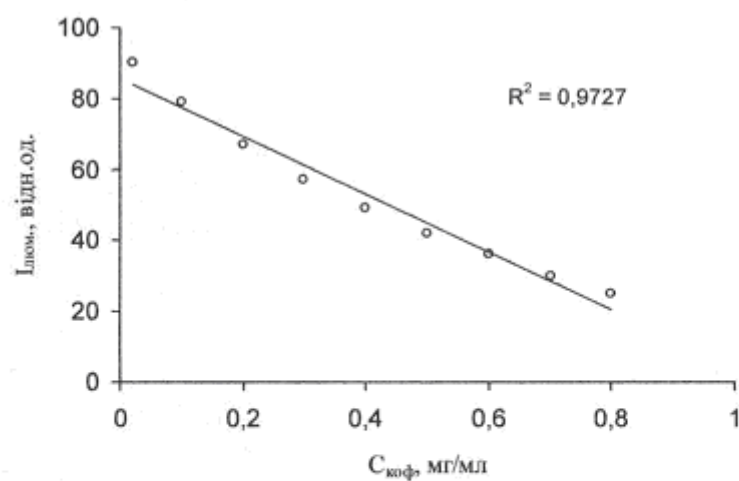
Спосіб кількісного визначення кофеїну, що включає приготування проби, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що кофеїн відокремлюють методом тонкошарової хроматографії, який піддають взаємодії з проявляючим розчином, що включає хлорид тербію (III), 1,10-фенатролін, β-циклодекстрин при рН 6,8-7,0 у тонкому шарі сорбенту на хроматографічній пластинці, та вимірюють інтенсивність люмінесценції тербію (III) при А, $\lambda_{\text{випром}}=545$ нм, за величиною якої визначають концентрацію кофеїну.

10



Залежність $I_{\text{люм}}$ Tb(III) у комплексі з 1,10-фенантроліном та β-ЦД від концентрації β-ЦД. ($C_{\text{Tb}^{3+}}=1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³).

Фіг. 1



Калібрувальний графік для визначення кофеїну.

Фіг. 2

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601