



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97824** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 30/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 10338	(72) Винахідник(и): Бельтюкова Світлана Вадимівна (UA), Лівенцова Олена Олегівна (UA), Теслюк Ольга Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.09.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2015	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA), ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2015, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення кофеїну включає приготування проби, відокремлення кофеїну, взаємодію його з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу. Кофеїн відокремлюють сорбцією на силікагелі, піддають взаємодії з хлоридом тербію (III) в присутності 1,10-фенатроліну, β -циклодекстрину і уротропіну, та вимірюють інтенсивність люмінесценції тербію (III) у тонкому шарі сорбенту, за величиною якої визначають концентрацію кофеїну.

UA 97824 U

Корисна модель належить до аналітичної хімії, зокрема до способів визначення алкалоїду - кофеїну (1,3,7-триметилксантина) у фармацевтичних препаратах.

Відомий спосіб визначення кофеїну методом йодометричного титрування (див. Глущенко, Н.Н. Фармацевтическая химия /Н.Н. Глущенко, Т.В. Плетнева, В.А. Понков //М.: Академия, 2004. - 384 с.).

Метод заснований на кількісному осадженні кофеїну в формі його періодату в середовищі сульфатної кислоти розчином йоду в калію йодистому з подальшим руйнуванням цієї сполуки етиловим спиртом. Йод, що виділився, титрують розчином натрію тіосульфату з додаванням як індикатору крохмалю на кінці титрування. Похибки визначення можуть виникнути за рахунок втрати кофеїну при осушуванні хлороформних екстрактів безводним сульфатом натрію, а також при візуальному титруванні.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є визначення кофеїну у лікарському препараті "ПенталгінН" методом вискоєфективної рідинної хроматографії (див. Т.Б. Голубецкий, Е.В. Будко, В.М. Иванов. Количественный анализ таблеток "ПенталгинН" методами градиентной и изокритической высокоэффективной хроматографии //Журн. аналит. химии. - 2006. - Т. 61, № 1. - С. 74-79.)

Спосіб передбачає приготування проби, для чого 0,145 г попередньо розтертих пігулок лікарського засобу і наважку натрію сульфату 0,18 г розчиняють в мірній колбі ємністю 100 мл в 15 мл суміші (1:1) вода-ацетонітрил при змішуванні протягом 10 хв. Отриманий розчин доводять водою до мітки та фільтрують через гідрофільний фторопластовий мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм. Хроматографічний аналіз здійснюють на хроматографі Waters Alliance 2695 з діодно-матричним детектором Waters 2695. Отриманий розчин вводять у хроматографічну колонку, яка містить обернено-фазовий сорбент Novo-Pak C 18 з середнім діаметром часток 4,0 мкм (Waters) для градієнтного режиму. Як рухомих фаз використовують суміш ацетонітрил-вода- KH_2PO_4 (0,00625 моль/л). При цьому використовують ацетонітрил для хроматографії ос.ч., надчисту воду, удільний опір якої 18,2 МОм/см, отриману на установці Dsrect (Millipore).

Хроматографують елюат розчину, який аналізують та розчин стандартного зразку, отримуючи не менш трьох хроматограм для кожного. Визначувану речовину (кофеїн) детектують при 212 нм. Вміст кофеїну розраховують за площею піків, використовуючи метод стандартного зразку.

Згаданий спосіб вибрано як найближчий аналог.

Найближчий аналог і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

приготування проби;

відокремлення кофеїну;

взаємодія кофеїну з хімічними реагентами;

вимірювання аналітичного сигналу.

Проте спосіб, запропонований за найближчим аналогом, передбачає використання складного апаратурного оформлення, попереднє відокремлення з проби за допомогою спеціального сорбенту Novo-Pak C 18 з подальшим вимиванням з колонки із застосуванням органічного розчинника - ацетонітрилу. Все це ускладнює проведення аналізу, передбачає використання органічного розчинника, спеціальної підготовки надчистої води.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб кількісного визначення кофеїну, в якому за рахунок застосування силікагелю, як сорбенту, забезпечити спрощення аналізу та виключити використання органічного розчинника - ацетонітрилу.

Поставлена задача вирішена у способі кількісного визначення кофеїну, який включає приготування проби, відокремлення кофеїну, взаємодію його з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу тим, що, згідно з корисною моделлю, кофеїн відокремлюють сорбцією на силікагелі, піддають взаємодії з хлоридом тербію (III) в присутності 1,10-фенатроліну, β -циклодекстрину і уротропіну при рН 6,8-7,0, та вимірюють інтенсивність люмінесценції тербію (III) у тонкому шарі сорбенту при $\lambda_{\text{випр.}}=545$ нм, за величиною якої визначають концентрацію кофеїну.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є використання гасіння в присутності кофеїну сенсibiliзованої флуоресценції іона тербію (III) в комплексі з 1,10-фенатроліном (Фен) та (3-циклодекстрином (ЦД) на поверхні тонкого шару сорбенту - силікагелю.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляється, і досягнутим результатом можна пояснити наступним. Спрощення та скорочення часу проведення аналізу, виключення використанням органічних розчинників стало можливим завдяки:

1) використанню гасіння в присутності кофеїну сенсibilізованої флуоресценції іону Tb(III) в комплексі з Фен і ЦД внаслідок безвипромінювальних втрат енергії збудження при передачі її на триплетний рівень кофеїну, який знаходиться нижче, ніж резонансний рівень іона Tb(III).

2) застосуванню реакції взаємодії кофеїну з комплексом Tb(III)-Фен-ЦД в тонкому шарі сорбенту - силікагелю дозволяє виключити використання органічного розчинника - ацетонітрилу. Внаслідок того, що сорбція комплексу на силікагель проходить з водного розчину.

Оптимальні умови отримання аналітичного сигналу вибрані експериментально.

Сенсibilізована люмінесценція іона Tb(III) на силікагелі залежить від концентрації 1,10-фенантроліну в розчині та оптимальна при використанні його 0.05 %-вого розчину. Інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) залежить також від вмісту β -циклодекстрину, молекули якого здатні утворювати супрамолекулярні комплекси включення "гість-хазяїн". $I_{\text{люм}}$ Tb(III) на сорбенті оптимальна при вмісті ЦД $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від pH розчину, з якого проводиться сорбція. Найбільша $I_{\text{люм}}$ досягається при pH 6,8-7,0 (Фіг. 1 - залежність інтенсивності люмінесценції від pH розчину, з якого проводиться сорбція). Для створення оптимального значення pH розчину використовували 4 %-вий розчин уротропіну. У спектрі люмінесценції сорбату комплексу найбільш інтенсивною є смуга Tb(III), відповідна надчутливому переходу $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ (545 нм) (Фіг. 2 – спектри люмінесценції сорбату комплексу Tb(III)-Фен- β -циклодекстрин у присутності різних концентрацій кофеїну ($C_{\text{кофеїн}}=0$ моль/л (1); $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л (2); $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (3); $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (4))).

Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від часу сорбції комплексу. Для отримання максимальної $I_{\text{люм}}$ сорбату достатньо проводити сорбцію протягом 10-15 хв. (Фіг. 3). При подальшому збільшенні часу сорбції $I_{\text{люм}}$ не змінюється.

Для отримання максимальної $I_{\text{люм}}$ сорбату достатньо проводити висушування сорбату протягом 15-20 хв. при температурі 80-100 °C (Фіг. 3: 1) залежність $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексу Tb(III)-Фен- β -циклодекстрин від часу сорбції; 2) залежність $I_{\text{люм}}$ від температури висушування (а) та часу висушування (б) сорбатів комплексів Tb(III)-Фен- β -циклодекстрин).

Встановлено, що $I_{\text{люм}}$ сорбату збільшується із зростанням концентрації іонів Tb(III) у фазі сорбенту. Однак при цьому зростає і $I_{\text{люм}}$ "холостої" проби. Найбільша різниця між $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексу і "холостої" проби спостерігається при концентрації Tb(III) - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Гасіння аналітичного сигналу комплексу Tb(III)-Фен- β -циклодекстрин на поверхні тонкого шару сорбенту у присутності кофеїну спостерігається в широкому інтервалі концентрацій кофеїну (Фіг. 2).

Виявлений ефект гасіння люмінесценції Tb(III) в люмінесцентному сенсорі Tb(III)-Фен- β -циклодекстрин кофеїном використаний для люмінесцентного визначення останнього в дозованих лікарських формах "Кофетамін" і "Пірамеїн". Кількісне визначення проводили методом градуувального графіка.

Приклад.

Ретельно розтирали по 5 пігулок "Кофетаміну" і "Пірамеїну". Наважки, що відповідають середній масі пігулок та містять 0,1 г і 0,03 г кофеїну відповідно, переносили в мірні колби об'ємом 25 мл та розчиняли у воді, що дистильована. Розчини доводили до мітки тим же розчинником, фільтрували через паперовий фільтр "блакитна стрічка". З отриманих розчинів на аналіз відбирали 1 мл фільтрату у випадку "Кофетаміну" і 4 мл фільтрату у випадку "Пірамеїну". Відібрані фільтрати поміщали в мірні пробірки на 10 мл і додавали в кожен по 60 мг силікагелю, по 1 мл розчину хлориду тербію (0,01 моль/л), 0,5 мл розчину 1,10-фенантроліну (1 %-вого), 0,3 мл водного розчину β -циклодекстрину ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) і 0,2 мл 4 %-вого водного розчину уротропіну, доводили об'єм розчину до 10 мл дистильованою водою. Сорбцію проводили при струшуванні протягом 10 хв., фільтрували та висушували сорбат протягом 15 хв. при температурі 80 °C у сушильній шафі. Інтенсивність люмінесценції сорбату Tb(III) вимірювали при $\lambda_{\text{випр.}}=545$ нм ($\lambda_{\text{збвд.}}=365$ нм). Паралельно готували розчин "холостої" проби, яка містить усі складові, крім кофеїну. Визначення кофеїну проводили за калібрувальним графіком для побудови якого поступали таким чином. В мірні пробірки об'ємом 10 мл поміщали 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 додавали всі реагенти, як описано вище, проводили сорбцію, відфільтровували сорбати, висушували та заміряли $I_{\text{люм}}$. За отриманим даними будували калібрувальний графік, викладаючи на осі абсцис концентрацію кофеїну, а на осі ординат - значення інтенсивності люмінесценції. Межа виявлення кофеїну складає 0,05 мкг/мл.

Результати визначення кофеїну і перевірка правильності отриманих результатів методом добавок наведені у таблиці.

Точність і достовірність визначення перевірена шляхом статистичної обробки результатів визначення. При $n=5$, $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення складає 1,7-2,7 %.

Таблиця

Результати визначення кофеїну в дозованих лікарських формах (n=5; P=0,95)

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб кількісного визначення кофеїну, що включає приготування проби, відокремлення кофеїну, взаємодію його з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що кофеїн відокремлюють сорбцією на силікагелі, піддають взаємодії з хлоридом тербію (III) в присутності 1,10-фенатроліну, β -циклодекстрину і уротропіну при рН 6,8-7,0, та вимірюють інтенсивність люмінесценції тербію (III) у тонкому шарі сорбенту при $\lambda_{\text{випр.}}=545$ нм, за величиною якої визначають концентрацію кофеїну.

10

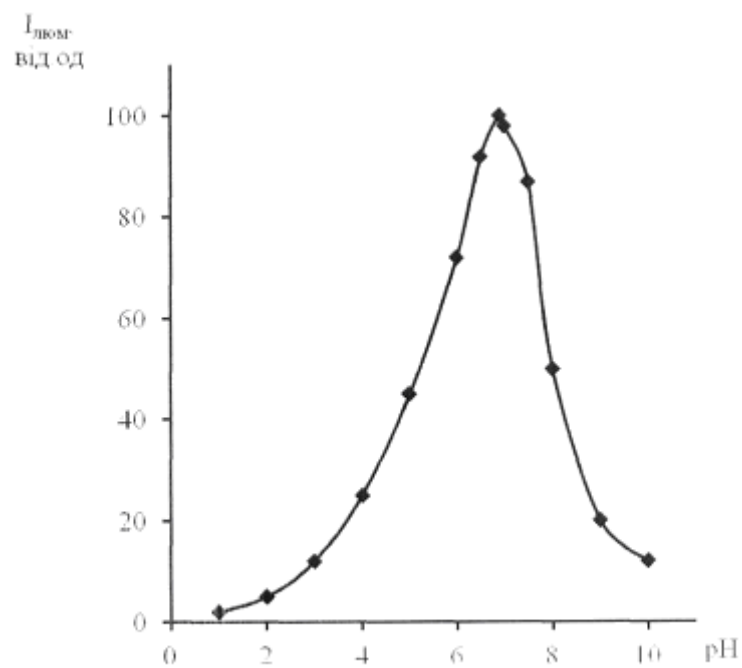


Fig. 1

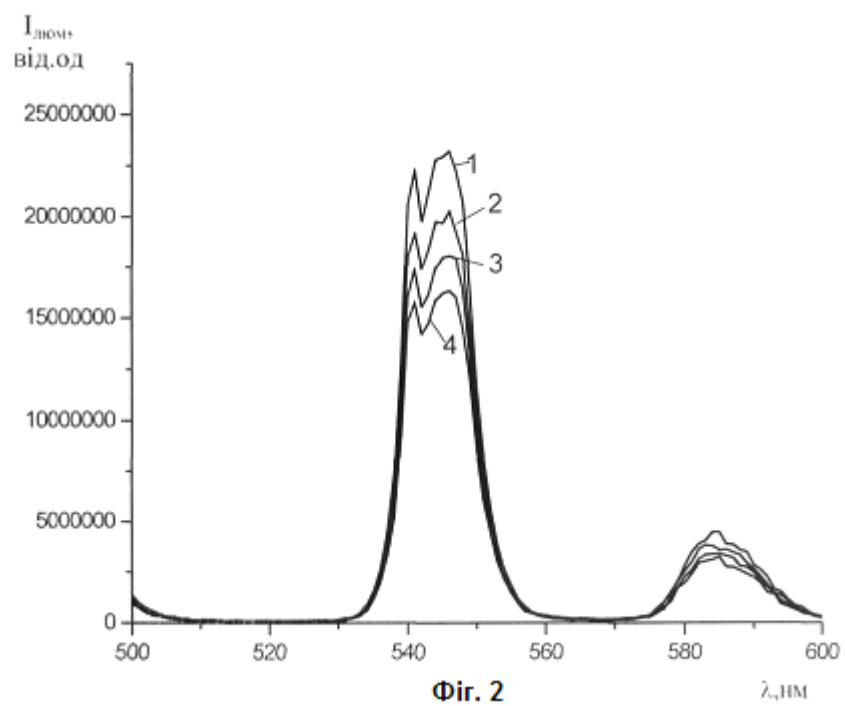


Fig. 2

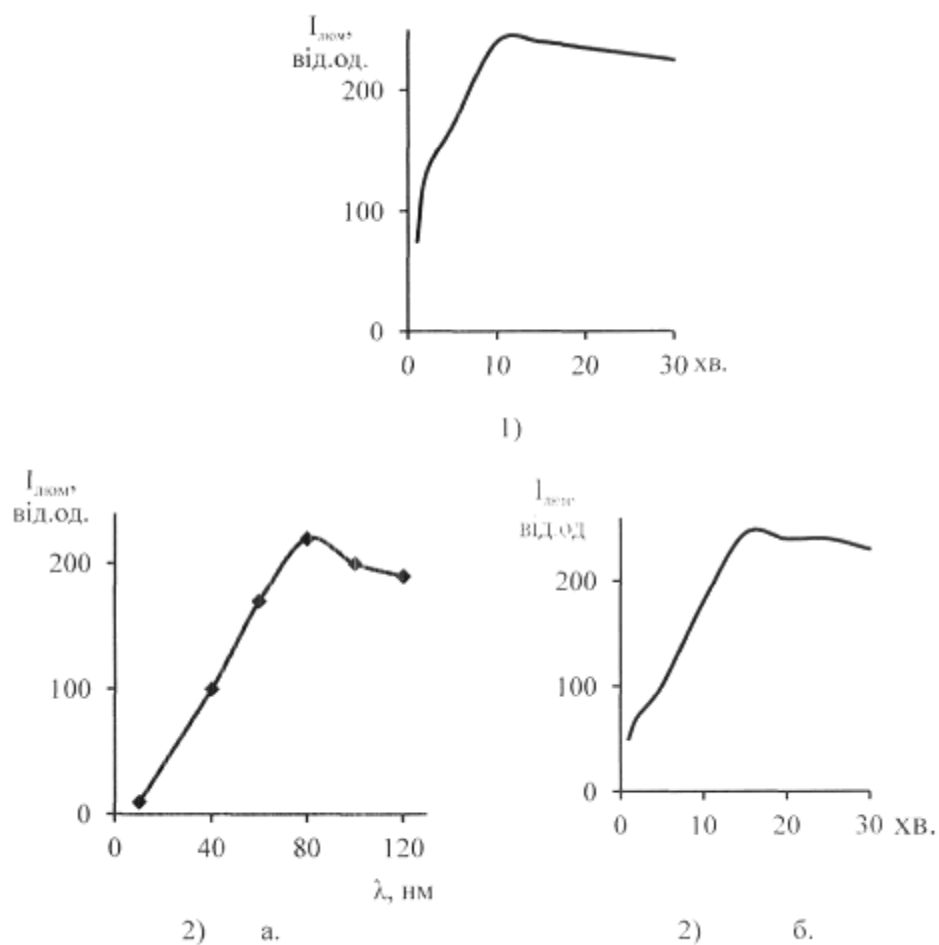


Fig. 3

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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

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