

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КРИВОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Природничий факультет
Кафедра хімії та методики її навчання

«Допущено до захисту»

Завідувач кафедри

_____ Старова Т.В.
(підпис)

«__» _____ 20__ р.

Реєстраційний № _____

«__» _____ 20__ р.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ В РЕАЛЬНИХ
ОБ'ЄКТАХ

Кваліфікаційна робота студента
групи ХІм-14

ступінь вищої освіти «магістр»
спеціальності 014.06

«Середня освіта (Хімія)»

Антімонова Теодора Роландовича

Керівник: к.х.н., ст. викладач кафедри
хімії та методики її навчання

Селіванова Тетяна Валеріївна

Оцінка:

Національна шкала _____

Шкала ECTS _____ Кількість балів _____

Голова ЕК _____
(підпис) (прізвище, ініціали)

Члени ЕК _____
(підпис) (прізвище, ініціали)

_____ (підпис) (прізвище, ініціали)

_____ (підпис) (прізвище, ініціали)

_____ (підпис) (прізвище, ініціали)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ	8
1.1. Алкалоїди. Класифікація і властивості.....	8
1.1.1. Алкалоїди пуринового ряду. Кофеїн.	13
1.2. Методи визначення кофеїну	29
1.2.1. Методи якісного визначення кофеїну.....	30
1.2.2. Методи кількісного визначення кофеїну	34
1.2.3. Фотометричні методи визначення кофеїну.....	37
Висновки до розділу 1	47
РОЗДІЛ 2 РЕАГЕНТИ, АПАРАТУРА, МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ ..	49
2.1. Реагенти та апаратура.....	49
2.2. Методики дослідження	50
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ У ВИГЛЯДІ ТЕТРАМЕТИЛПУРПУРОВОЇ КИСЛОТИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ.....	54
3.1. Дослідження умов реакції утворення тетраметилпурпурової кислоти	54
3.1.1. Вивчення впливу рН на утворення тетраметилпурпурової кислоти	55
3.1.2. Вплив концентрації пероксиду водню на утворення тетраметилпурпурової кислоти.	57

3.1.3. Вплив часу на повноту утворення тетраметилпурпурової кислоти.	59
3.2. Визначення кофеїну у вигляді ТМПК в реальних об'єктах	60
3.3. Розробка методичного комплексу для впровадження спектрофотометричної методики визначення кофеїну у вигляді ТМПК при викладанні спецкурсу курс «Прикладні аспекти хімії» у КДПУ.....	63
Висновки до розділу 3	69
ВИСНОВКИ	71
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	72

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДМФА - диметилфталат;

ТМПК - тетраметилпурпурова кислота;

HPLC - високоефективна рідинна хроматографія;

МВТН - 3-метил-2-бензотіазолін гідрозон;

Rf - час утримання.

ВСТУП

В сучасному суспільстві темп життя дуже швидкий. Напої з кофеїном серед населення планети дуже популярні. І це є не лише натуральна кава, а і сублімована кава (так звана розчинна кава), також енергетичні напої з вмістом кофеїну і шоколад.

Кофеїн – це речовина природного походження з групи алкалоїдів, яка міститься в кавових зернах, листках чаю, плодах какао, а також у листі, насінні та плодах інших рослин. Неодмінно треба не забувати, що кофеїн належить до психостимуляторів, які підвищують настрій людини, здатність до сприйняття зовнішніх подразників, психомоторну активність. Завдяки цій речовини ми можемо усувати відчуття втоми, сприяти підвищенню розумової та фізичної активності, і на деякий час знижувати потребу у сні. Саме дози кофеїну, які вживає людина, визначають яким буде вплив речовини на нервову систему. Невеликі дози стимулюють нервову систему, великі – пригнічують. Якщо у людини нервова система слабка, для її порушення досить зовсім малої кількості кофеїну; і навпаки – для сильної нервової системи доза кофеїну може бути більшою за норму. На це слід зважати кожному, хто споживає кофеїновмісні напої.

Дана тема є актуальною так як у населення України більш популярні саме сублімовані кавові напої. На пакуванні не подається інформація про кількість кофеїну в тому чи іншому продукті. Проте кофеїн, являючи собою фізіологічно-активну речовину, в залежності від дози, може по-різному впливати на організм. Високі дози кофеїну можуть призвести до порушення сну, тахікардії, аритмії, тривоги, та інших симптомів інтоксикації.

Мета дослідження: проаналізувати можливість використання існуючої методики спектрофотометричного визначення кофеїну у вигляді ТМПК зі зміненими параметрами методики.

Завдання дослідження:

Проаналізувати наукову літературу з теми дослідження.

Експериментально проаналізувати основні параметри проведення реакції утворення ТМПК за стандартною методикою [9].

Експериментально перевірити вплив зміни часу, показника рН та концентрації окисника, послідовність внесення реагентів на повноту утворення тетраметилпурпурової кислоти з метою поліпшення відтворюваності методики.

Використати досліджувану методику для визначенні кофеїну у реальних об'єктах.

Створення метод комплексу для впровадження в освітній процес курсу «Прикладні аспекти хімії» Криворізького державного педагогічного університету.

Об'єктом дослідження є кількісне визначення кофеїну у реальних об'єктах.

Предмет дослідження: вивчення умов проведення спектрофотометричної методики визначення кофеїну у вигляді тетраметилпурпурової кислоти.

Практичне значення дослідження: предствалена методика може бути використані у курсі «Прикладні аспекти хімії» розділ «Хімія харчових продуктів».

Апробація результатів дослідження: підчас виробничої практики у ЗВО встановлені оптимальні умови утворення ТМПК були апробовані в межах лабораторного курсу «Прикладні аспекти хімії». Етапи методики спектрофотометричного визначення кофеїну у вигляді ТМПК у сублімованій каві та кавових напоях у виконанні студентів магістратури показали достатньо високу відтворюваність після внесення змін автором у стандартру методику ДСТУ.

Структура роботи: робота складається із вступу, 3-х розділів, висновків, списку використаної літератури (38).

РОЗДІЛ 1

ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВИЗАЧЕННЯ КОФЕЇНУ

1.1. Алкалоїди. Класифікація і властивості

Кофеїн є представником пуринових алкалоїдів, які в свою чергу є представниками великої групи алкалоїдів з нітрогеновмісними гетероциклами. Тому перед тим, як розглядати хімічні та фізичні властивості кофеїну, знання яких необхідне для фотоколориметричного визначення кофеїну, розглянемо поняття «алкалоїди» взагалі, їх класифікацію, загальні фізичні та хімічні властивості, місце кофеїну серед інших алкалоїдів, споріднені з кофеїном сполуки[1].

Алкалоїди (від лат. Alkali - луг або араб. Al-qali - рослинна зола і грец. Εἶδος - вид, вигляд) - група азотовмісних органічних сполук природного походження (найчастіше рослинного), переважно гетероциклічних, більшість з яких має властивості слабкої основи; до них також відносяться деякі биогенетично пов'язані з основними алкалоїдами нейтральні і навіть слабкокислотні сполуки. Амінокислоти, нуклеотиди, аміноцукри і їх полімери до алкалоїдів не належать. Іноді алкалоїдами називаються і синтетичні сполуки аналогічного будови. Крім вуглецю, водню і азоту в молекули алкалоїдів можуть входити атоми сірки, рідше - хлору, бромю або фосфору. Для алкалоїдів характерна виражена фізіологічна активність. До алкалоїдів відносяться, наприклад, такі речовини, як морфін, кофеїн, кокаїн, стрихнін, хінін і нікотин. Багато алкалоїдів в малих дозах чинять лікувальну дію, а у великих - токсичні. Алкалоїди різні за своїм фізіологічним впливом: одні з них пригнічують або збуджують нервову систему, інші паралізують нервові закінчення, розширюють або звужують судини, треті мають знеболюючу дію[3].

Кордон між алкалоїдами і іншими азотовмісними природними сполуками різними авторами проводиться по-різному. Іноді вважається, що природні сполуки, що містять азот в екзоциклічній позиції (мескалін, серотонін, дофамін та ін.), Відносяться до біогенних амінів, а не до алкалоїдів. Інші ж автори, навпаки, вважають алкалоїди окремим випадком амінів або зараховують біогенні аміни до алкалоїдів[5].

Єдиного методу призначення тривіальних назв алкалоїдів не існує. У багатьох випадках алкалоїдам привласнюють назви, утворюючи індивідуальні назви алкалоїдів приєднанням суфікса «-ін» до видовим або родовим назвам алкалоїдоносів. Наприклад, атропін виділений з рослини Беладонна (*Atropa belladonna* L.), стрихнін отриманий з блювотних горішків - насіння дерева Чілібуха (*Strychnos nux-vomica* L.). При виділенні декількох алкалоїдів з однієї рослини замість суфікса «-ін» часто використовуються суфікси «-ідин», «-анін», «-інін». Така практика призвела до того, що існує, наприклад, не менше 86 алкалоїдів, що містять в назві корінь «він» (виділені з барвінку, лат. *Vinca*). В даний час відкрито близько 10 000 алкалоїдів, з яких майже 4 000 мають доведену будова. Така величезна кількість і різноманіття алкалоїдів не дають можливості розробити єдину класифікацію[4].

В основу класифікації алкалоїдів можуть бути покладені різні принципи, тому розрізняють кілька видів класифікацій алкалоїдів[13]. А саме:

1. Фармакологічна класифікація. В основі фармакологічної класифікації лежить характер фармакологічної дії алкалоїдів на організм: наркотичні алкалоїди, місцевоанестезуючі алкалоїди; спазмолітичні алкалоїди тощо.

2. Ботанічна класифікація. В основі ботанічної класифікації лежить систематична приналежність рослин, з яких виділені алкалоїди, до певного роду чи родини: алкалоїди тютюну, алкалоїди маку, алкалоїди ріжків та ін.

3. Біогенетична класифікація. В основі біогенетичної класифікації, запропонованої англійським вченим Хегнауером, лежить будова амінокислот, які є вірогідними попередниками алкалоїдів в рослинах: алкалоїди триптофану, алкалоїди фенілаланіну та інші.

4. Хімічна класифікація. Найбільш зручна і найчастіше використовується. В основі хімічної класифікації лежать особливості хімічної будови алкалоїдів, зокрема, структура азотовмісного гетероциклу [3].

Основні класи алкалоїдів, згідно з хімічною класифікацією:

1. Алкалоїди з азотом в бічному ланцюзі або ациклічні алкалоїди (без гетероциклів): ефедрин з видів ефедри, капсаїцин з плодів стручкового перцю, колхіцин і колхамин з клубнелуковиць видів безвременника.

2. Алкалоїди, похідні піролідину і пірролізидину: платифілін з крестовнику плосколистоого.

3. Алкалоїди, похідні піридину і піперидину, діляться на кілька груп:

а) прості похідні піридину і піперидину: лобелін з лобелії роздутої, коніїн з плодів болиголова плямистого;

б) бициклічні неконденсовані системи: анабазин з анабазис безлистоого, нікотин з листя тютюну;

в) бициклічні конденсовані системи пиперидина і піролідину (похідні тропану): гіосциамін, скополамін з беладони, блекоти, видів дурману.

4. Алкалоїди, похідні хінолізидіна: пахікарпін, термопсин, цитізін (софора товстоплідна, види термопсису).

5. Алкалоїди, похідні хіноліну: хінін з хінної кірки, ехінопсин з плодів мордовнику.

6. Алкалоїди, похідні ізохіноліну: морфін, кодеїн і папаверин з коробочок маку, хелеритрин, сангвінарін з трави чистотілу і маклейю, глауцин з трави мачка жовтого, берберин з коренів барбарису.

7. Алкалоїди, похідні індолу: алкалоїди ріжків, барвінку малого, резерпін і аймалин з коренів раувольфії, стрихнін з насіння чилибухи, вінбластин і вінкристин з листя катарантуса рожевого.

8. Алкалоїди, похідні пурину: кофеїн з листя чаю, насіння кави, теобромін з насіння шоколадного дерева.

9. Алкалоїди, похідні хіназоліну: пеганін з трави гармали звичайної.

10. Алкалоїди, похідні імідазолу: пилокарпін з листя видів пилокарпус.

11. Стероїдні алкалоїди: соласонін з трави пасльону часточкової, алкалоїди чемериці, соланін з картоплі.

12. Дитерпенові алкалоїди: аконітин, дельфінін.

13. Пептидні (ціклопептидні) алкалоїди: нумуларин С, нумуларин S, інтегеррин, діскарин D, Мукронін А.

Що до фізичних властивостей, алкалоїди, молекули яких містять атоми кисню (що справедливо для переважної більшості алкалоїдів) за стандартних умов, як правило, являють собою безбарвні кристали. Алкалоїди, молекули яких не містять атомів кисню, найчастіше є летючими безбарвними маслянистими рідинами (як нікотин або коніїн). Деякі алкалоїди не є безбарвними: так, берберин жовтий, сангвінарін помаранчевий. Більшість алкалоїдів має властивості слабких основ, але деякі з них амфотерні (як теобромін і теофілін).

Як правило, алкалоїди погано розчиняються у воді, але добре розчинні у багатьох органічних розчинниках (етери, естери, бензен, гексан, дихлорметан, хлороформ, дихлоретан, тетрахлорметан). Винятком є, наприклад, кофеїн, добре розчинний у киплячій воді. При взаємодії з кислотами алкалоїди утворюють солі різного ступеня міцності. Солі алкалоїдів, як правило, добре розчинні у воді і спиртах і погано розчиняються в більшості органічних розчинників, хоча відомі солі, погано розчинні у воді (сульфат хініну) і добре розчинні в органічних розчинниках (гідробромід скополаміну)

Більшість алкалоїдів має гіркий смак. Передбачається, що таким чином природний відбір захистив тварин від вироблюваних рослинами алкалоїдів, багато з яких сильно отруйні.

Алкалоїди синтезуються різними живими організмами. Найбільш широко вони поширені в вищих рослинах: за наявними оцінками, від 10 до 25% видів вищих рослин містять алкалоїди. Характерним є те, що в минулому термін «алкалоїд» найчастіше застосовувався тільки по відношенню до речовин рослинного походження. До найважливіших рослин-алкалоїдоносів, відносяться: беладона, скополія, дурман звичайний, опійний мак, хінне дерево, тютюн, анабазис, какао, куш коки, пілокарпус, хвойник, чілібуха, крестовник, чайний куш[13].

Вміст алкалоїдів в рослинах, як правило, не перевищує кількох відсотків. Як правило концентрація невелика і складає долі відсотка. При вмісті 1-3% рослина вважається багатую алкалоїдами. Лише поодинокі рослини, наприклад, культивовані форми хінного дерева, містять до 15-20% алкалоїдів. Особливо багаті алкалоїдами рослини таких родин, як Макові, Пасльонові, Бобові, Кутрові, Маренові. У водоростях, грибах, мохах, папороті і голонасінних вони зустрічаються порівняно рідко. У більшості рослин розподіл алкалоїдів по тканинах нерівномірно. Залежно від виду рослини максимальний вміст алкалоїдів може досягатися в листі (блекота чорна), плодах або насінні (чілібуха), коріння (раувольфія зміїна) або корі (хінне дерево). У рослинах алкалоїди перебувають у вигляді солей переважно органічних кислот в активно зростаючих тканинах, епідермальних і гіподермальних клітинах, в обкладках судинних пучків і латексних ходах. Вони розчинені в клітинному соку. Крім того, в різних тканинах одного і того ж рослини можуть міститися різні алкалоїди, наприклад, катарантус рожевий містить понад 60 алкалоїдів, в

молочці маку міститься до 22 алкалоїдів; по кілька алкалоїдів міститься в корі хінного дерева, в блекоті, беладони, скополії.

Крім рослин, алкалоїди містяться в деяких видах грибів (псилоцибін, що міститься в грибах роду псилоцибе) і тварин (буфотенін, що міститься в шкірі деяких жаб). Біогенні аміни, такі як адреналін або серотонін, які відіграють важливу роль в організмах вищих тварин, схожі з алкалоїдами за будовою і шляхах біосинтезу і іноді також називаються алкалоїдами. Крім того, алкалоїди містяться в багатьох морських організмах.

1.1.1. Алкалоїди пуринового ряду. Кофеїн.

Родоначалником алкалоїдів пуринового ряду є пурин. Пурин, 9Н-імідазо-[4,5-d]-піримідин ($C_5N_4H_4$) – конденсована гетероциклічна система, яка складається з двох циклів: піримідинового (А) і імідазольного (Б). (Рис. 1.1).

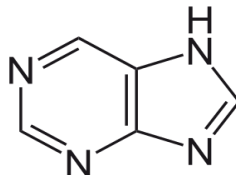


Рис. 1.1 Структурна формула пурину

Пурин являє собою безкольорові кристали, з температурою плавлення 216-217°C. Пурин легко випаровується в вакуумі, добре розчиняється в воді, гарячому етанолі, бензолі, толуолі, погано - в ацетоні, діетиловому ефірі, етилацетаті, хлороформі. Стійкий до нагрівання у водних розчинах кислот та лугів, а також дії окисників (HNO_3 конц. та ін.). Пурин є амфотерною сполукою (pK_a 2,39 і 9,93). Утворює солі з HCl , HBr , HNO_3 , пікриною кислотою (з т. пл. 208°C, що має аналітичну цінність), лужними металами металами (по атому водню імідазольного кільця). З бромом утворює нестійкий комплекс.

Для пурину характерна прототропна таутомерія (рис.1.2)

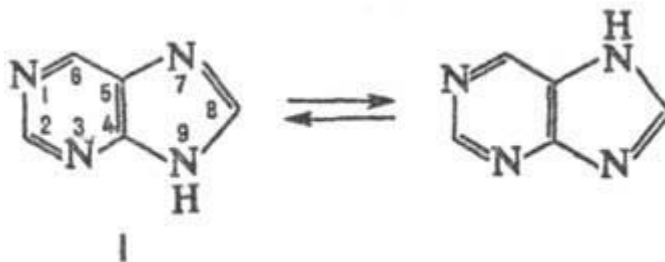


Рис.1.2. Таутомерія пурину.

Для пурину характерні реакції електрофільного та нуклеофільного заміщення. Електрофільні агенти приєднуються головним чином за атомами N. При нагрівання з оцтовим ангідридом перетворює його на суміш 7(9)-ацетил-похідних. Дія на пурин диметилсульфату в водному розчині луку або діазометану в спиртово-ефірному розчині, а також обробка його срібною або талієвою солі еквімолярною кількістю MeI в ДМФА (20°C) призводить до 9-метилпурину. З надлишком MeI в ДМФА з виходом 65% утворюється 7,9-диметилпуриний іодід; 6-метилпурин в аналогічних умовах перетворюється на 6,9-диметилпурин. Електрофільне заміщення по атомам С характерно тільки для похідних пурину з активуючими замістниками і йде завжди по положенню 8, напр. під час хлорування газоподібним хлором, прямому бромованні, нитруванні.

Похідні пурину легко вступають в реакції нуклеофільного заміщення (рис.1.3.)

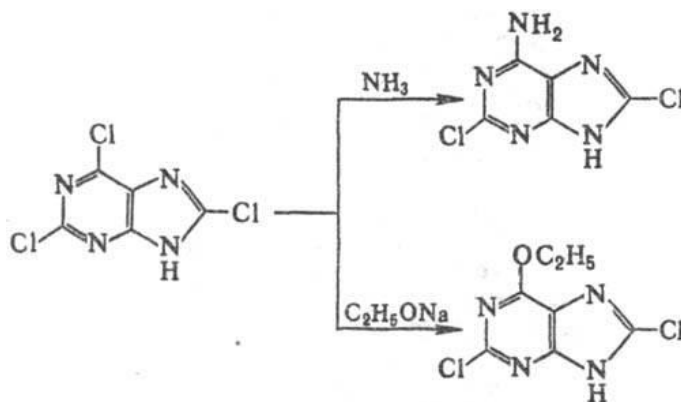


Рис.1.3. Реакції нуклеофільного заміщення 2,6,8-трихлорпурину.

Лужний гідроліз 2,6,8-трихлорпурину з послідуочим відновленням призводить до утворення гіпоксантину (безк. кристали, що розкладаються при 150°C) (рис. 1.4.).

Серед сполук пурину, нас перш за все цікавить гідроксильне похідне пурину – ксантин(3,7-дигідропурин-2,6-дион), який лежить в основі пуринових алкалоїдів. Ксантин, через наявність кето-єнольної таутомерії, існує у таутомерній рівновазі з гідроксоформою II (рис. 1.5.)

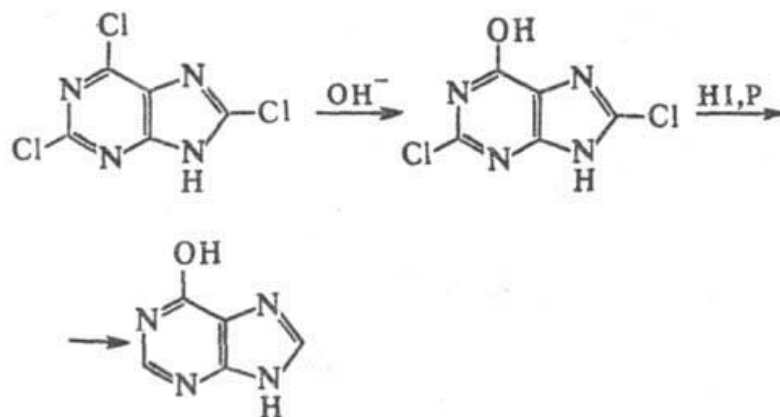


Рис. 1.4. Реакції лужного гідролізу 2,6,8-трихлорпурину з послідуочим відновленням.

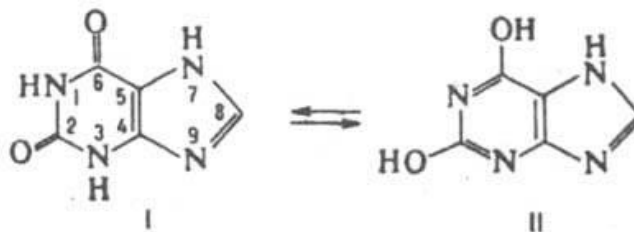


Рис.1.5. Структурна формула молекули ксантина.

Імідазольний цикл ксантину є нуклеофільним: ксантин галогенується з утворенням 8-галогенксантинів, азосполучення з солями діазонію також йде з утворенням 8-азоксантинів, які потім можуть бути відновлені до 8-аміноксантину. Ксантин проявляє амфотерні властивості, протонуючись за імідазольним нітрогеном і утворюючи солі з мінеральними кислотами (в тому числі добре кристалізується перхлорат), і утворюючи солі з металами, катіони

яких заміщують кислі атоми водню гидроксилів дигідроксіформи (наприклад, нерозчинну срібну сіль реактивом Толленса).

Ксантин стійкий до дії гарячих водних розчинів кислот та лугів. При взаємодії з HCl при 200°C розкладається на CO₂, NH₃, гліцин і мурашину к-ту. При окисленні за допомогою KMnO₄ або KClO₃ у присутності HCl утворює аллоксан (якісна реакція на ксантин).

Електрофільне заміщення відбувається в положення 8, напр. галогенування призводить до 8-галогенксантину, дія солей діазонію в лужному середовищі - до 8-азопохідного, який далі може бути відновлений до 8-аміноксантина. У лужному середовищі ксантин легко алкілюється спочатку в положення 3, потім в положення 7 і 1 (в порядку зменшення кислотності груп NH). Так, під дією диметилсульфату в залежності від рН реакц. середовища ксантин перетворюється на 3,7-диметилксантин (теобромін), 1,3-диметилксантин (теофілін) або 1,3,7-триметилксантин (кофеїн). У нейтральному або слабкокислому середовищі відбувається алкілювання ксантину диметилсульфатом за атомами N імідазольного кільця з утворенням бетаїнової форми пуринової основи (рис. 1.6).

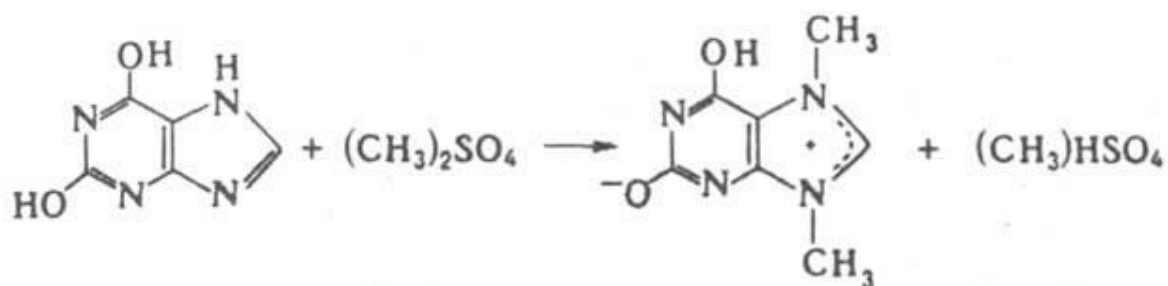


Рис. 1.6. Реакція алкілювання ксантину диметилсульфатом.

Ксантин – пуринова основа, що входить до складу нуклеїнових кислот в якості мінорної основи. У вільному стані в невеликих кількостях міститься в рослинах, крові, тканинах і виділеннях тварин (в т.ч. в сечі людини).

Похідні пурину - кофеїн, теобромін і теофілін, та ін. зазвичай називають пуриновими алкалоїдами. В природі існує понад 30 пуринових алкалоїдів. Також відомі синтетичні сполуки, що є похідними пуринових алкалоїдів. Пуринові алкалоїди можуть мати в якості замісників амінокислотні (лупінова кислота) і моносахаридні (еритиденін) фрагменти[14]. Кофеїн у формі напоїв, таких як чай, кава і кола, є одним з найбільш широко вживаних і загальноприйнятих природних стимуляторів. Він також використовується в медицині, але теофілін набагато важливіший як лікарська субстанція через його спазмолітичні властивості, які використовують для полегшення бронхіальної астми. Теобромін є основним компонентом какао і родини какаопродуктів.

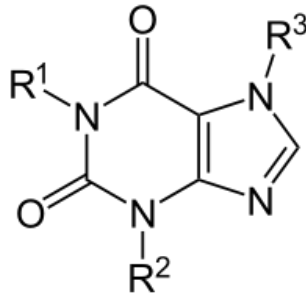


Рис. 1.7. Пуринові алкалоїди відрізняються, в залежності від замісника за атомом нітрогену: ксантин : $R^1 = R^2 = R^3 = H$; кофеїн: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$; теобромін: $R_1 = H, R^2 = R^3 = CH_3$; теофілін: $R^1 = R^2 = CH_3, R_3 = H$.

Щодо біохімічного походження пуринових алкалоїдів в клітині, то воно дуже тісно пов'язане з походженням пуринових основ аденіну і гуаніну - основних компонентів нуклеозидів, нуклеотидів і нуклеїнових кислот. Пуринове кільце поступово синтезується шляхом об'єднання невеликих компонентів первинного метаболізму. Найбільшим включеним компонентом є гліцин, який забезпечує одиницю C_2N , тоді як інші атоми вуглецю утворюються з форміату (за допомогою N_{10} -формілтетрагідрофолата) і бікарбонату. Два з чотирьох атомів нітрогену забезпечуються глютаміном, а третій - аспарагінової кислотою (рис.1.8.). Синтез нуклеотидів аденозин-5-монофосфату (АМФ) і

гуанозин-5-монофосфату (ГМФ) здійснюється за допомогою інозин-5-монофосфату (ІМФ) і ксантозин-5-монофосфату (ХМФ), а потім пуринові алкалоїди розгалужуються через ХМР. Метилування, а потім втрата фосфату, призводять до утворення нуклеозиду 7-метілксантозину, який потім вивільняється з цукру. Послідовні метилування за атомами нітрогену, дають кофеїн через теобромін, в той час як інша послідовність метилування може пояснювати синтез теофіліну[23].

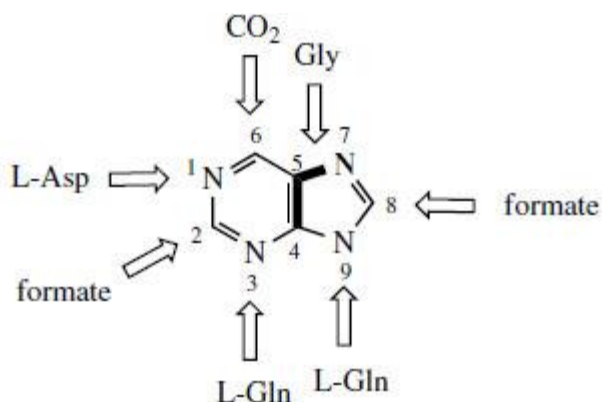


Рис. 1.8. Біосинтез пуринових алкалоїдів. Компоненти, з яких синтезується пуринове кільце, призначено у вигляді скорочень: Gly — гліцин, L-Asp — L-аспарагінова кислота, L-gln — L-глутамін, formate — форміат [23].

Теобромін (від лат. *Theobroma cacao* «какао») - алкалоїд пуринового ряду, ізомер теофіліну. Безбарвні кристали гіркокого смаку, нерозчинні у воді. Вперше виділено А. А. Воскресенським в 1841 році з насіння какао, або какао-бобів. Точний склад і гомологія з кофеїном була встановлена в 1847 році Карлом Едуардом Глассоном з Санкт-Петербурга в докторській дисертації «Про склад теоброміну і деяких його сполук»[24], захищеної в Гиссенському університеті. Синтетично був отриманий Германом Фішером в 1882 році алкілуванням йодистим метилом свинцевої солі ксантину C₅H₂PbN₄O₂. Крім какао, де теобромін (1,5%) міститься разом з кофеїном, він знаходиться також в невеликих кількостях в горіхах кола і в деяких видах падубових. Теобромін є

білим кристалічним порошком, злегка гіркою смаку, не розкладається на повітрі і при 100°C. При окисленні теоброміну він розпадається з утворенням метилсечовини та метилаллоксану. Теобромін важко розчиняється у воді (1:2000), етанолі (1: 2500), хлороформі (1: 6000), ще важче воно розчиняється в діетиловому етері. Розчинність теоброміну в воді підвищується при збільшенні температури. Теобромін екстрагується органічними розчинниками з кислих водних розчинів. Максимальні кількості теоброміну екстрагуються хлороформом при рН = 4 – 7. Так як в більшості природних джерел теобромін міститься разом з іншими пуриновими алкалоїдами, це дозволяє селективно екстрагувати пуринові алкалоїди, в залежності від рН розчину.

За хімічною будовою і дією на організм теобромін близький до кофеїну і теофіліну. Теобромін стимулює серцеву діяльність, розширює коронарні судини серця і мускулатуру бронхів, посилює діурез. Теобромін слабо збуджує центральну нервову систему, в порівнянні з кофеїном. У медичній практиці теобромін застосовується при спазмах мозкових судин, при хронічній серцевій недостатності. Теобромін застосовують у вигляді натрієвої солі в поєднанні з саліцилатом натрію (темісал) і з іншими фармацевтичними препаратами. Він входить до складу таблеток темісал, теоверін, теодінал, тепалюсал, тесамінал, а також є складовою частиною ряду інших складних лікарських форм[13].

Теобромін добре всмоктується з травного тракту. В організмі він метаболізується шляхом N-деметилування і окислення. В результаті цих перетворень в якості метаболітів теоброміну утворюються 3-метилксантин, 7-метилксантин і 7-метилсечова кислота, які виводяться з організму з сечею.

Теобромін якісно та кількісно можна визначити наступними реакціями та методами:

1. Теобромін дає мурексидну реакцію (це потрібно враховувати при визначенні кофеїну в природних джерелах, яке неможливе в присутності кофеїну).

2. При нагріванні теоброміну з реактивом Несслера з'являється слабо-коричневе забарвлення(кофеїн в цих умовах дає червоно-бурий осад).

3. Теобромін можна виявити за допомогою мікрокрісталоскопічної реакції з реактивом Драгендорфу. З цією метою розчин досліджуваної речовини в хлороформі наносять на предметне скло і при кімнатній температурі випаровують досуха. До сухого залишку додають краплю 10% -го розчину хлоридної кислоти і краплю реактиву Драгендорфа. При наявності теоброміну в досліджуваному розчині через 10-15 хв з'являються пучки темно-червоних голчастих кристалів. Межа виявлення: 19 мкг теоброміну в пробі.

4. Виявлення теоброміну по УФ- та ІЧ-спектрами. Лужні розчини теоброміну (рН = 9,4) мають максимум поглинання при довжині хвилі 273 нм. В ІК-області спектра (диск з бромідом калію) основа теоброміну має основні піки при 1690, 1221 і 1550 см^{-1} .

Теофілін (1,3-диметилксантин) є алкалоїдом пуринового ряду, який міститься в листях чаю. У наші часи теофілін отримують шляхом синтезу. Теофілін є ізомером теоброміну. При окисненні він розкладається на сечовину і диметілаллоксан. Основа теофіліну розчиняється в етанолі (1:80), хлороформі (1:86), слабо розчиняється у воді (1:120) та діетиловому етері. Теофілін екстрагується органічними розчинниками з кислих водних розчинів, як і теобромін, що унеможливорює їх окрему екстракцію. Максимальні кількості теофіліну екстрагуються при рН = 4 – 7.

Застосування. Дія на організм. Теофілін застосовується в медицині у вигляді порошку, він входить до складу свічок, таблеток (еуфілін, теофедрин, антастман і ін.), що містять суміш кількох препаратів.

Теофілін має діуретичну дію. Він стимулює скоротливу діяльність міокарда, розширює просвіт бронхіол, збуджує центральну нервову систему. З огляду на перелічені вище фармакологічні властивості теофіліну, він застосовується для регуляції серцево-судинної системи, як діуретик, протиастматичний засіб, а також використовується для лікування ішемічної хвороби серця.

Теофілін більш токсичний, ніж кофеїн і теобромін. Після прийому великих доз теофіліну порушується діяльність центральної нервової та серцево-судинної системи.

Метаболізм. В організмі теофілін зазнає метаболізму. При цьому утворюються 1,3-диметилсечовова кислота (близько 50%), 1-метилсечовова кислота (близько 20%) і сліди 3-метилсечової кислоти. Всі ці метаболіти виділяються з організму з сечею[13]. Що до якісного та кількісного визначення теофіліну, то методики є досить схожими з визначенням інших алкалоїдів цієї групи, проте, є й деякі відмінності:

1. Як і інші ксантинові алкалоїди, теофілін дає мурексидну реакцію.
2. Для того, щоб відрізнити теофілін від теоброміну використовують різне відношення цих речовин до діазореактиву. Теофілін дає реакцію з діазотованою сульфаніловою кислотою. Теобромін не дає цієї реакції.

3. Виявлення теофіліну за УФ- та ІЧ-спектрами. Основа теофіліну в 0,1N HCl має максимум поглинання при довжині хвилі, що дорівнює 270 нм; в ІЧ-області спектра основа теофіліну (диск з KBr) має основні піки з довжинами хвиль 1660, 1700, 1445 і 1560 см.

Кофеїн — алкалоїд пуринового ряду, який міститься в різних частинах багатьох рослин, таких, як кавове дерево, чайний кущ, какао, чай-мате, гуарана, горіхах кола і деяких інших. Він синтезується рослинами для захисту від комах, що поїдають листя, стебла і зерна, а також для заохочення комах запилювачів.

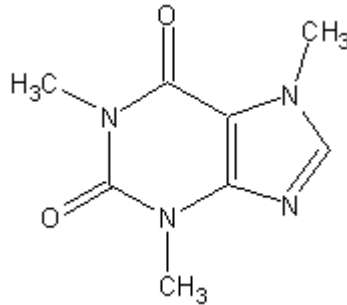


Рис. 1.9. Структурна формула кофеїну

Кофеїн є слабкою основою (рК спряженої кислоти $\sim 0,6$), що вимагає додавання сильної кислоти для протонування. Кофеїн не містить стереогенних центрів і, отже, класифікується як ахіральна молекула. Ксантинове ядро кофеїну містить два конденсованих кільця — піримідиндіон і імідазол. Піримідиндіон, в свою чергу, містить дві амідні функціональні групи, які існують переважно в цвіттер-йонному резонансі, де атоми нітрогену мають подвійний зв'язок з сусідніми атомами амідних атомів карбону. Отже, всі шість атомів всередині системи піримідиндіонових кілець sp^2 -гібридизовані і є плоскими. Отже, ядро кофеїну містить в цілому десять π -електронів і, згідно з правилом Хюккеля, є ароматичним. Кофеїн нестабільний у лужних розчинах[15]. Під дією водного розчину луку відбувається розкриття піримідинового кільця, з утворенням кофеїдину (рис.1.10.).

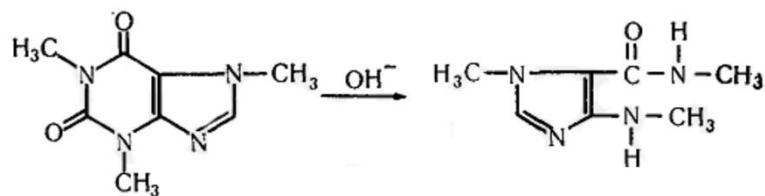


Рис.1.10. Схема взаємодії кофеїну з лугом.

Що до фізичних властивостей кофеїну, безводний кофеїн — порошок білого кольору без запаху з температурою плавлення $235\text{-}238^\circ\text{C}$. Кофеїн помірно розчинний у воді при кімнатній температурі, але дуже добре

розчиняється в киплячій воді (66 г/100 мл). Він також помірно розчинний в етанолі, і добре в галогеналканах (табл.1.1).

Таблиця 1.1

Розчинність кофеїну в деяких розчинниках

Розчинник	Розчинність, г/100г	Температура, °С
Етанол	1,32	25
Етилацетат	0,73	18
Метанол	1,14	25
Амілацетат	0,72	30,5
Оцтова к-та	2,6	21,5
Ацетон	2,32	30,5
Анілін	29,4	30,5
Бензальдегід	13,1	30,5
Бензен	0,91	18
Трихлорметан	12,3	25
Діетиловий етер	0,12	18
Піридин	34,39	25
Толуен	0,58	25
Вода	1,00	15
Вода	2,13	25
Вода	19,23	80

За фізіологічною дією кофеїн є стимулятором центральної нервової системи, який зменшує втому і сонливість. При звичайних дозах володіє різним впливом на навчання і пам'ять, але, як правило, покращує час реакції, неспання, концентрацію і координацію рухів. Кількість кофеїну, необхідна для отримання

цих ефектів, варіюється від людини до людини, в залежності від розміру тіла, індивідуальних особливостей (чутливості організму), особливостей метаболізму, толерантності, тощо. Бажані ефекти виникають приблизно через годину після вживання, а бажані ефекти помірної дози зазвичай проходять приблизно через три або чотири години. Кофеїн може затримувати або запобігати настанню сна, і покращує виконання завдань під час позбавлення сну[26, 37].

Кофеїн збільшує фізичну працездатність, покращує спортивні результати в аеробних (особливо витривалих) і анаеробних умовах.

Помірні дози кофеїну (близько 5 мг / кг) можуть поліпшити результати в спринті, показники в велоспорті і бігу за певний час, витривалість (тобто уповільнюють початок м'язової втоми і центральної втоми), і циклічну вихідну потужність. Кофеїн покращує м'язову силу, а також підвищує продуктивність в анаеробних тестах. Споживання кофеїну перед анаеробним тренуванням, пов'язано зі зниженням толерантності до фізичних навантажень. Хоча цей ефект відсутній під час вправ на витривалість, продуктивність в силових вправах значно поліпшується. Кофеїн має здатність підсилювати серцеву діяльність, прискорювати пульс, викликати розширення кровоносних судин (переважно судин скелетних м'язів, головного мозку, серця, нирок), збільшувати сечовиділення, зменшувати здатність тромбоцитів до агрегації. Кофеїн може викликати легку форму лікарської залежності – пов'язану з такими симптомами абстиненції, як сонливість, головний біль і дратівливість - коли людина припиняє вживати кофеїн після багаторазового щоденного прийому[15]. Дози кофеїну, еквівалентні кількості, яка зазвичай міститься в стандартних порціях чаю, кави і газованих безалкогольних напоїв, не володіють диуретичною (сечогінною) дією. Тим не менш, гостре споживання кофеїну у великих дозах (не менше 250-300 мг, що еквівалентно кількості, яка міститься в 2-3 чашках

кави або 5-8 чашках чаю), призводить до короточасної стимуляції виділення сечі. Це збільшення пов'язане як з діурезом (збільшення виведення води), так і з натрійурезом (збільшення виведення йонів Na^+); він опосередковується через блокаду аденозинових рецепторів у нефроні. Гостре збільшення сечовиділення може збільшити ризик зневоднення. Проте, хронічні споживачі кофеїну розвивають толерантність до цього ефекту і не відчують збільшення виділення сечі. Толерантність до вегетативних ефектів, таких як підвищений кров'яний тиск і частота серцевих скорочень, а також до діуретичного ефекту (збільшення сечовипускання) розвивається при хронічному застосуванні (тобто ці симптоми стають менш вираженими або не виявляються після постійного застосування).

Досліди на здорових добровольцях, які утримувалися від кофеїновмісних продуктів показують, що болюсна доза кофеїну в 250 мг призводила до 5-10% збільшення як систолічного, так і діастолічного артеріального тиску протягом 1-3 годин. Однак толерантність до цього ефекту розвивалася, коли кофеїн давали тричі на день, протягом семи днів. Що до впливу на серцевий ритм, кофеїн протягом тривалого часу, був залучений в етіологію серцевих аритмій, але тільки кілька добре розроблених досліджень були проведені на людях [21]. Зв'язок між екстрасистолією і споживанням великої кількості кави або чаю була виявлена в великому перехресному дослідженні, про яке повідомили [30].

В той же час, [36] не виявили збільшення тяжкості або частоти шлуночкових аритмій після прийому кофеїну (300 мг), в плацебо-контрольованому дослідженні пацієнтів з перенесеним інфарктом міокарда.

В той час, [23] встановили, що 200 мг кофеїну викликали значне збільшення частоти екстрасистол у суб'єктів з високою частотою спонтанних шлуночкових ектопічних ударів. Таким чином, відповідно до традиційного клінічного подання про вплив кофеїну на серцевий ритм, безпечні дози

кофеїну (до 300-400мг/добу) не призводять до виникнення клінічно значущих аритмій [37].

Кофеїн з кави або інших напоїв поглинається тонкою кишкою протягом ~1 години після прийому і розподіляється по всіх тканинах організму. Пікова концентрація в крові досягається протягом 1-2 годин. Біологічний період напіврозпаду кофеїну — час, необхідний організму для видалення половини дози — широко варіюється серед людей в залежності від таких факторів, як вагітність, інші ліки, рівень функції ферментів печінки (необхідний для метаболізму кофеїну) і вік. У здорових дорослих період напіввиведення кофеїну з організму становить від 3 до 7 годин. Куріння зменшує період напіврозпаду на 30-50%, тоді як оральні контрацептиви можуть подвоїти його, а вагітність збільшити до 15 годин (в третьому триместрі). У новонароджених період напіврозпаду може становити 80 годин і більше, причому з віком він дуже швидко падає, можливо, до значення, меншого, ніж у дорослих, до віку 6 місяців. Антидепрессант флувоксамин (Luvox) знижує кліренс кофеїну більше ніж на 90% і збільшує період його напіввиведення більш ніж в десять разів[13]; з 4,9 години до 56 годин. Кофеїн метаболізується в печінці шляхом окиснення за допомогою оксидази цитохрому P450, зокрема, за допомогою ізоферменту CYP1A2, з утворенням трьох основних метаболітів:

- Параксантину (84%): збільшує ліполіз, що призводить до підвищення рівня гліцерину і вільних жирних кислот в плазмі крові.
- Теоброміну (12%): розширює кровоносні судини і збільшує об'єм сечі. Теобромін є також основним алкалоїдом в какао - бобах (шоколад).
- Теофіліну (4%): Розслаблює гладкі м'язи на бронхи, і використовується для лікування астми. Терапевтична доза теофіліну, однак, у багато разів більше, ніж досягли рівня, що існував від метаболізму кофеїну.

Фізіологічні ефекти кофеїну обумовлені декількома механізмами. По-перше, він є антагоністом всіх чотирьох підтипів аденозинових рецепторів (A_1 , A_{2A} , A_{2B} і A_3), хоча і з різною активністю. Значення спорідненості (K_D) кофеїну до аденозинових рецепторів людини становлять 12 мкМ при A_1 , 2,4 мкМ при A_{2A} , 13 мкМ при A_{2B} і 80 мкМ при A_3 . Серцебиття викликано блокадою рецептора A_1 .

Оскільки кофеїн розчинний як в воді, так і в ліпідах, він легко проникає через гематоенцефалічний бар'єр, що відокремлює системний кровотік від мозкового. Опинившись у мозку, основним способом дії є неселективний антагонізм аденозинових рецепторів (іншими словами, кофеїн — агент, що знижує дію аденозину). Молекула кофеїну структурно подібна до аденозину і здатна зв'язуватися з рецепторами аденозину на поверхні клітин, не активуючи їх, тим самим діючи як конкурентний антагоніст. Аденозин виконує роль гальмівного нейромедіатора, який відповідає за фізіологічні процеси гальмування в ЦНС. За відсутності кофеїну і коли людина не спить, в нейронах (ЦНС) міститься мало аденозину. За період неспання аденозин накопичується в нейронних синапсах (міжнейронних контактах), в свою чергу зв'язуючись і активуючи аденозинові рецептори, виявлені в деяких нейронах ЦНС; при активації ці рецептори викликають клітинну відповідь, яка в кінцевому підсумку посилює сонливість. Коли кофеїн споживається, він протидіє аденозиновим рецепторам; іншими словами, кофеїн запобігає активації рецептора аденозином, блокуючи місце на рецепторі, де аденозин зв'язується з ним. В результаті кофеїн тимчасово запобігає або знімає сонливість і, отже, підтримує або відновлює бадьорість. По-друге, кофеїн, як і інші ксантини, також діє як інгібітор фосфодієстерази. Як конкурентний неселективний інгібітор фосфодієстерази, кофеїн підвищує внутрішньоклітинний цАМФ, та через активацію протеїну А, пригнічує синтез TNF-альфа і лейкотрієну і зменшує

запалення і вроджений імунітет(ефект здійснюється за рахунок інгібування ізоформи 4 ФДЕ). Кофеїн також впливає на холінергічну систему, де він пригнічує фермент ацетилхолінестеразу[11].

Споживання 1-1,5 г (1000-1500 мг) в день пов'язано зі станом, відомим як кофеїнізм, який зазвичай поєднує в собі залежність від кофеїну з широким спектром неприємних симптомів, включаючи нервозність, дратівливість, неспокій, безсоння, головні болі і серцебиття після вживання кофеїну. Передозування кофеїну може привести до надмірної стимуляції центральної нервової системи, яке називається інтоксикацією кофеїном. Цей синдром зазвичай виникає тільки після прийому великої кількості кофеїну, що значно перевищує кількість, що зустрічається в типових напоях з кофеїном і таблетках кофеїну (наприклад, більше ніж 400-500 мг за одноразово). Симптоми інтоксикації кофеїном можна порівняти з симптомами передозування інших стимуляторів: вони можуть включати занепокоєння, збудження, безсоння, гіперемія обличчя, прискорене сечовипускання, шлунково-кишкові розлади, посмикування м'язів, безладний потік думок і мови, дратівливість, нерегулярне або прискорене серцебиття і психомоторне збудження. У випадках набагато більших передозувань можуть виникнути манія, депресія, помилки в судженні, дезорієнтація, розгальмовування, марення, галюцинації або психоз, а також може викликати рабдоміоліз (руйнування скелетних м'язів). Масивне передозування може призвести до смерті. LD₅₀ кофеїну в організмі людини залежить від індивідуальної чутливості, але, за оцінками, дорівнює 150-200 міліграмів на кілограм маси тіла (75-100 чашок кави для 70 кг ваги дорослої людини). Летальна доза нижче в людей, чия здатність метаболізувати кофеїн порушується через генетичні особливості або хронічні захворювання печінки. Лікування легкої інтоксикації кофеїном направлено на полегшення

симптомів; тяжка інтоксикація може зажадати перитонеального діалізу, гемодіалізу або гемофільтрації[11].

Таблиця 1.2

Вміст кофеїну в продуктах харчування, медикаментах та харчових добавках [18].

Продукт	Об'єм або маса	Вміст кофеїну, мг (середній діапазон)
Кава(мелена)	125 мл	85 (60-135)
Кава(розчинна)	125 мл	65 (35-105)
Кава(декофеїнізована)	125 мл	3 (1-5)
Чай	150мл	32 (20-45)
Холодний чай	330 мл	20 (10-50)
Гарячий шоколад	150 мл	4 (2-7)
Енергетичні напої	330 мл	80 (70-120)
Шоколадний батончик	30 г	20 (5-36)
Молочний шоколад	30 г	6 (1-15)
Чорний шоколад	30 г	60 (20-120)
Анальгетики, антипіретики	1 доза	30 (25-65)
Спортивне харчування	1 порція	100 (75-200)

1.2. Методи визначення кофеїну

Кофеїн міститься в різних об'єктах, серед яких фармацевтичні препарати, спортивне харчування, безалкогольні та енергетичні напої, чай, кава. Для якісного і кількісного визначення кофеїну були розроблені різні методи аналізу. Моніторинг кофеїну має дуже важливе значення через його ефекти на організм людини. Розрізняють хімічні та фізико-хімічні методи визначення кофеїну. До хімічних методів відносять гравіметричні та титриметричні, до фізико-хімічних (інструментальних) - спектрофотометричні, електрохімічні, хроматографічні та

інші. Більш зручно, розглянути ці методи, розділивши їх на якісні і кількісні [32].

1.2.1. Методи якісного визначення кофеїну

За хімічними властивостями, кофеїн дуже схожий на інші пуринові алкалоїди. Через хімічну близькість цих сполук, більшість якісних реакцій є груповими на пуринові алкалоїди. В якості реактиву, що дозволяє відрізнити один від одного кофеїн, теофілін і теобромін, використовують розчин хлориду кобальту. Теобромін утворює осад сіривато-блакитного кольору, який випадає після появи швидко зникаючого фіолетового забарвлення (рис. 1.11.).

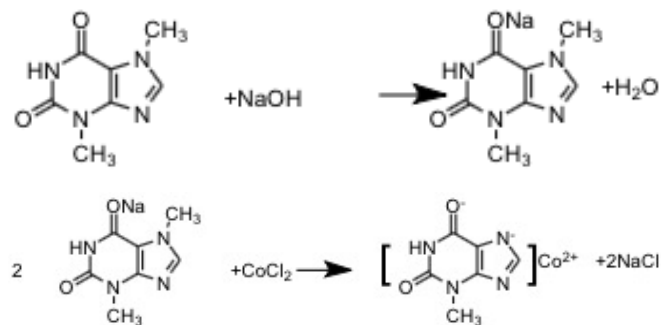


Рис. 1.11. Реакція теоброміну з хлоридом кобальту в лужному середовищі.

Теофілін в цих же умовах утворює білий, з рожевим відтінком осад (рис 1.12.).

Кофеїн, який не володіє кислотними властивостями, не дає позитивних реакцій з іоном кобальту.

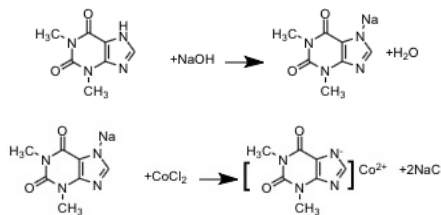


Рис 1.12. Реакція теофіліну з хлоридом кобальту в лужному середовищі.

Наступні методи використовують для визначення присутності кофеїну в досліджуваному зразку. Вони є груповими для пуринових алкалоїдів, тому перед визначенням кофеїну за допомогою цих реакцій, важливо бути впевненим, що досліджуваний зразок не містить інших пуринових алкалоїдів, провівши відповідні дослідження. Якщо досліджуваний зразок містить інші пуринові алкалоїди (теофілін, тембромін), необхідно провести селективну екстракцію кофеїну хлороформом у лужному середовищі, яка дозволяє вибірково екстрагувати кофеїн. Отриманий хлороформений екстракт випарюють досуха, а отриманий сухий залишок використовують для проведення якісної реакції на кофеїн.

Танін можна використовувати як реагент на кофеїн. При обережному додаванні до розчину кофеїну (1:1000) розчину таніну утворюється білий осад, розчинний в надлишку реактиву.

Мурексидна реакція. Суть пробопідготовки в даній методиці є наступною: з досліджуваної проби кофеїн сублімують в присутності магній оксиду. Температуру підтримують в інтервалі 230-240°C. Контроль температури здійснюють термопарою. Нагрівання продовжують до припинення процесу сублімації кофеїну. До отриманих таким методом голкоподібних білих кристалів кофеїну додають бромну воду або концентровану нітратну кислоту і випарюють досуха. Особливістю даного процесу є додавання кількох крапель розчину аміаку після охолодження. В результаті залишок забарвлюється в пурпуровий колір, через утворення амонієвої солі тетраметилпурпурової кислоти, що свідчить про те що проба позитивна, а зразок, відповідно, містив кофеїн.

Реакція кофеїну з гідраргірум хлоридом є мікрокристалоскопічною реакцією. Особливістю реакції є використання екстракту кофеїну у хлороформі. В результаті утворюється осад (рис. 1.13.), у вигляді великих, шовковистих,

безбарвних голковидних кристалів. Реакція вкрай чутлива з відкриваємим мінімумом 9,4 мкг.

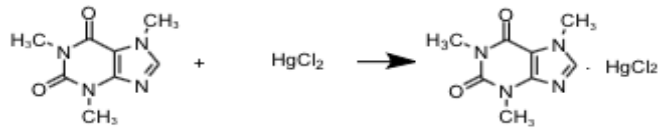


Рис. 1.13. Реакція кофеїну з гідраргіум хлоридом.

Реакція кофеїну з ацетилацетоном і диметиламінобензальдегідом (рис 1.14.). Розчин субстанції в суміші ацетилацетону і розчину натрію гідроксиду нагрівають на водяній бані, охолоджують і додають розчин диметиламінобензальдегіду і ще раз нагрівають. Охолоджують і додають воду - з'являється інтенсивне синє забарвлення.

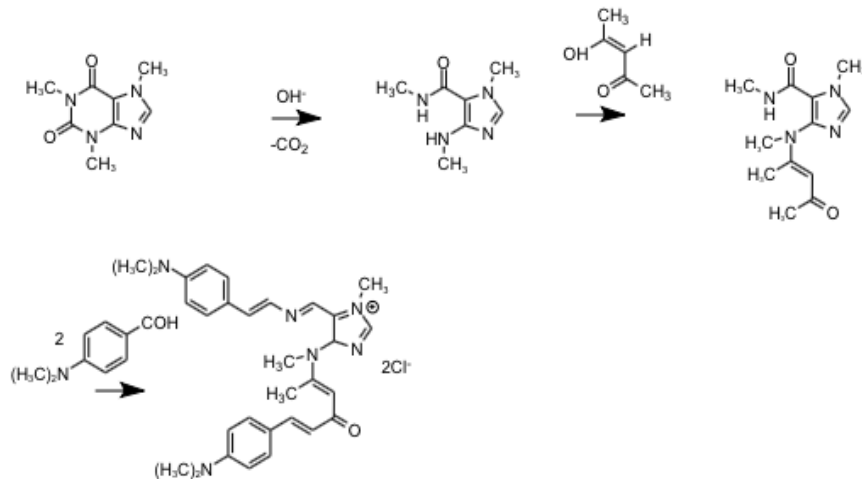


Рис 1.14. Реакція кофеїну з ацетилацетоном і диметиламінобензальдегідом.

Реакція кофеїну з гідроген тетрабромоауратом (III) (рис.1.15). До сухого залишку досліджуваної на кофеїн проби, додають краплю реактивна, що складається з 5% розчину аурум (III) хлориду, концентрованої хлоридної кислоти та ацетону (1: 1: 1). До утвореного осаду додають кілька кристалів броміду калію - осад забарвлюється в помаранчево-червоний колір. При

розгляданні осаду під мікроскопом спостерігають великі желтовато-коричневі та безбарвні голки [29].

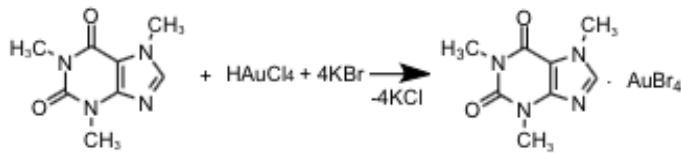


Рис.1.15. Реакція кофеїну з гідроген тетрабромоауратом (III)

Виявлення кофеїну за допомогою тонкошарової хроматографії. Виявлення кофеїну проводять на пластинках «Силуфол УФ-254» з шаром силікагелю. Хроматографують в системі розчинників хлороформ - ацетон (9:1) або толуол - ацетон - етанол - 25% розчин аміаку у відповідному співвідношенні 45:45:7,5:2,5. Сухий залишок розчиняють в 3-4 краплях хлороформу, наносять на стартову лінію хроматографічної пластинки. Поруч наносять «стандарт» (8-10 мкг) - розчин кофеїну. Пластинку після закінчення хроматографування висушують і обробляють реактивом Драгендорфа - утворюються помаранчеві плями за кольором і значенням Rf ідентичні плямі «стандарту» (Rf для кофеїну в першій системі розчинників становить $0,25 \pm 0,02$, у другій - $0,65 \pm 0,02$)[14].

Виявлення кофеїну за УФ- та ІЧ-спектрами. Частину досліджуваного зразка розчиняють в етанолі або в 0,1 М розчині соляної кислоти і реєструють спектр поглинання отриманого розчину. Спектр кофеїну має смугу поглинання з максимумом при 272-273 нм.

Частину залишку розтирають з калій бромідом, пресують, поміщають отриманий диск в прилад і реєструють ІК-спектр. При наявності в залишку кофеїну виявляються основні характеристичні смуги поглинання при 1695, 1658, та 745 cm^{-1} . Ці методи, можуть використовуватися також для кількісного визначення кофеїну, за інтенсивністю поглинання на певній довжині хвилі.

1.2.2. Методи кількісного визначення кофеїну

Ацидиметрія. Неводне титрування хлорною кислотою в середовищі протонного розчинника (рис 1.16.). Метод заснований на наявності у кофеїну слабких основних властивостей, які посилюються в середовищі протонного розчинника. Метод застосовують як арбітраж сировини яку використовують у фармацевтичній промисловості. Титрування проводять хлорною кислотою у присутності оцтового ангідриду з попереднім при нагріванням на водяній бані до температури 80°C. Кінцеву точку титрування визначають по зміні забарвлення кристалічного фіолетового. А саме до отримання жовтого забарвлення титрованого розчину[2].

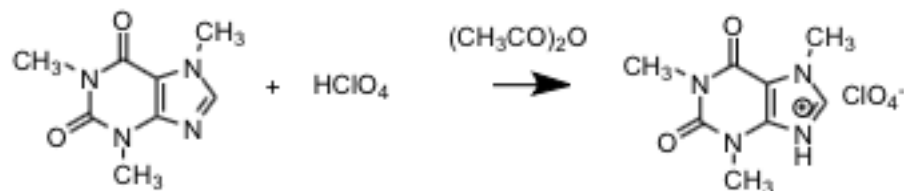


Рис 1.16. Реакція кофеїну з хлорною кислотою в середовищі оцтового ангідриду.

Йодометрія. Метод йодометричного титрування заснований на кількісному осадженні кофеїну в формі його перйодату в середовищі сульфатної кислоти розчином йоду в калій йодиді (рис.1.17.), з подальшим руйнуванням цієї сполуки етанолом.

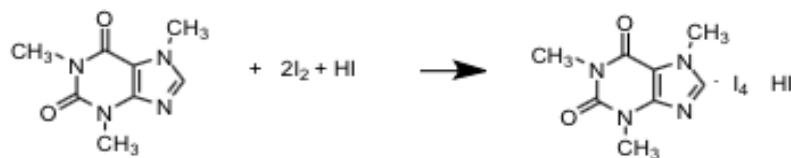
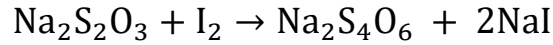


Рис. 1.17. Реакція кофеїну з йодом в середовищі сульфатної кислоти.

Йод, що виділився, титрують розчином натрію тіосульфату з додаванням в якості індикатора крохмалю в кінці титрування.



Цириметрія. Кофеїн, теобромін і теофілін можна кількісно визначити по надлишку церій (IV) сульфату, який використовують як титрант, який при нагріванні окисляє їх в кислому середовищі до утворення алоксану (рис. 1.18.).

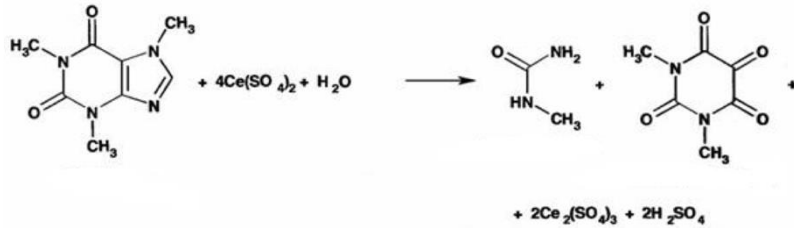


Рис. 1.18. Реакція кофеїну з сульфатом церію.

Надлишок церій (IV) сульфату встановлюють йодометричним методом після додавання 10% розчину йодиду калію та хлороформу. В якості титранту використовують тіосульфат натрію.

Визначення кофеїну за допомогою **високоєфективної рідинної хроматографії**. Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, англ. high-performance liquid chromatography, HPLC) — один з ефективних хроматографічних методів аналізу. Метод дозволяє швидко та з високою точністю визначати вміст кофеїну у складних сумішах. Аналізують водні екстракти проб, що містять кофеїн [34, 36, 38]. Рідкі проби, які являють собою водні розчини, що містять кофеїн та інші розчинні у воді речовини, аналізують без пробопідготовки. Метод визначення кофеїну за допомогою HPLC заснований на вимірюванні оптичної густини розчину з використанням спектрофотометричного або діод-матричного детектора при довжині хвилі 274 нм після елюювання екстракту на хроматографічній колонці. Використовують колонки з оберненою фазою, наприклад Hypersil ODS C18, заповнені силікагелем з октадецильною групою. Ідентифікують кофеїн порівнянням часу

утримування на хроматограмах стандартних розчинів і аналізованих проб (рис.1.19.). Вміст кофеїну вимірюють за площею піку на хроматограмі, використовуючи метод градувального графіку. Для побудови градувального графіку, вимірюють площі піків, відповідні концентрації кофеїну в градувальних розчинах. Нижня межа вимірювання складає 0,004 мкг кофеїну. Інтервал визначуваних концентрацій становить 0,1-10% [25].

Мас-спектрометричне визначення кофеїну. Метод дозволяє швидко аналізувати складні суміші без попереднього розділення, з використанням простої процедури пробопідготовки [32]. Рідкі проби аналізують безпосередньо, з твердих проб, кофеїн екстрагують за допомогою гарячої дейонізованої води. Для кількісного визначення кофеїну зазвичай використовують зовнішнє калібрування, з додаванням ізотопно маркованого $^{13}\text{C}_3$ -кофеїну (рис. 1.20.).

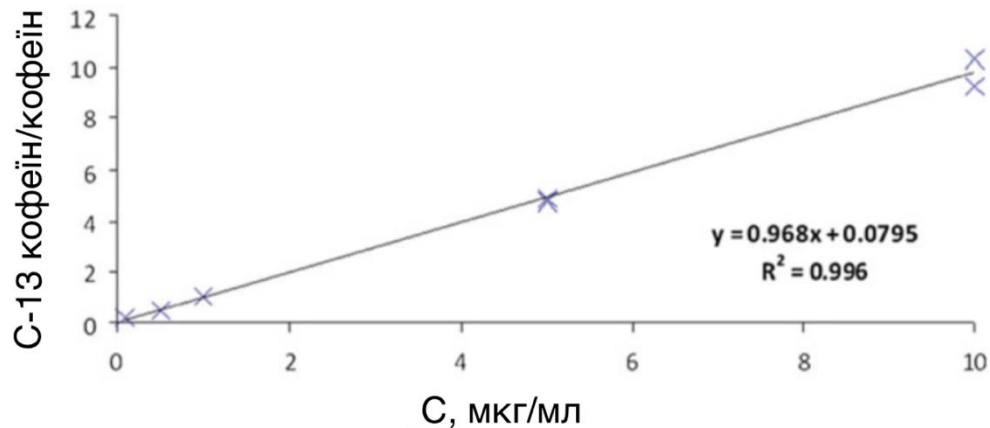


Рис. 1.20. Градувальний графік для мас-спектрометричного визначення кофеїну.

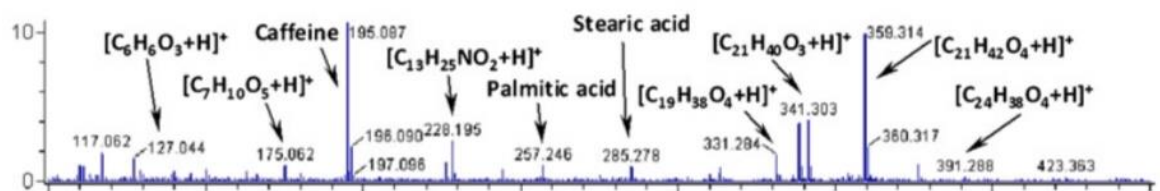


Рис.1.21.Спектр водного екстракту мелених зерен кави Арабіка.

1.2.3. Фотометричні методи визначення кофеїну.

Фотометрія, як аналітичний інструмент для визначення кофеїну в різних видах проб дуже проста і доступна для всіх. Добре відомо, що спектрофотометричне визначення кофеїну менш затратно, є відносно простою процедурою, та забезпечує високу точність і відтворюваність при невеликій кількості зразків. Спектрофотометрія широко використовується у всіх університетах і дослідницьких інститутах. Практично всі дослідники здатні працювати з цим інструментом. А спектрофотометри та фотоелектроколориметри є доступними, відносно недорогими і розповсюдженими приладами. Багато складних помилок, пов'язаних із спектром, полягає в тому, що записаний спектр – сума поглинання аналіту та матриці. У випадку простих зразків це можна легко виправити, проводячи порівняльне вимірювання проти «холостого» зразка, який являє собою чистий розчинник. Фотометричні методи включають в себе фотоколориметрію і спектрофотометрію. Залежно від використовуваної апаратури у фотометричному аналізі розрізняють фотоколориметричні і спектрофотометричні методи визначення кофеїну. Фотоколориметричні методи, в яких вимірюється світлопоглинання забарвлених розчинів, використовують порівняно нескладну апаратуру і при цьому забезпечують достатню точність вимірювань ($d = \pm 1-2 \%$). Їх широко застосовують в концентраційному аналізі (визначення концентрації розчинів). У більшості фотоколориметрів монохроматизація здійснюється за допомогою світлофільтрів. У спектрофотометричних методах, застосовують більш складні прилади — спектрофотометри, що дозволяють проводити аналіз як забарвлених, так і безбарвних сполук по вибіркового поглинанию монохроматичного світла у видимій (400 - 700 нм), ультрафіолетовій (200 - 400 нм) або ближній інфрачервоній (700 - 1500 нм) областях спектра [33].

Таблиця 1.3

Фотометричні методи аналізу

Назва	Область спектру	Монохроматор	Спосіб реєстрації світлопоглинання
Фотоколориметрія	Видима	Світлофільтр	Фотоелектричний
Спектрофотометрія	Видима, УФ	Дифракційна решітка, призма	Фотоелектричний

Відмінності в фотометричних методах видно з таблиці 1.3.

Спектрофотометричні методи визначення кофеїну, можна розділити на методи, що базуються на визначенні поглинання безпосередньо кофеїну в УФ-діпазоні, та на методи, в яких кофеїн перетворюють на забарвлені сполуки, світлопоглинання яких вимірюють у видимому діапазоні спектру. Для визначення кофеїну за поглинанням світла в УФ-діпазоні, спочатку готують розчин кофеїновмісного зразка у воді, після чого екстрагують кофеїн з водного розчину, за допомогою органічного розчинника. Органічну фазу відокремлюють від водної за допомогою ділильної лійки, переносять у кварцеву або пластикову кювету, та вимірюють поглинання в УФ-діпазоні за допомогою спектрофотометра. Концентрацію кофеїну зазвичай розраховують за градувальним графіком, побудованим за значенням світлопропускання стандартних розчинів кофеїну в органічному розчиннику. В якості розчинників, використовують галогеналкани (дихлорметан, трихлорметан, тетрахлорметан), етилацетат, бензен, та ін. Розчинність кофеїну в цих речовинах перевищує розчинність у воді, що дозволяє екстрагувати кофеїн з водного розчину в органічну фазу. Пік поглинання кофеїну в УФ-діпазоні відрізняється, в залежності від природи розчинника [24, 28].

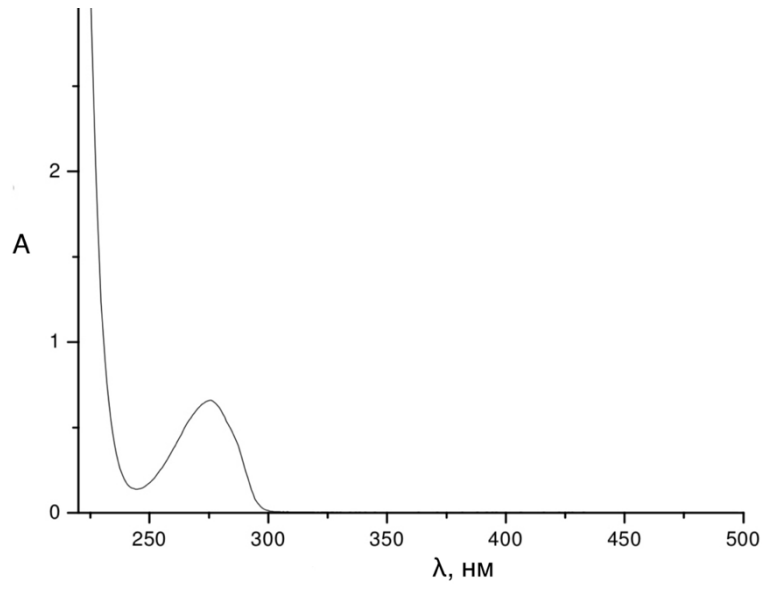


Рис. 1.22. Спектр кофеїну в дихлорметані.

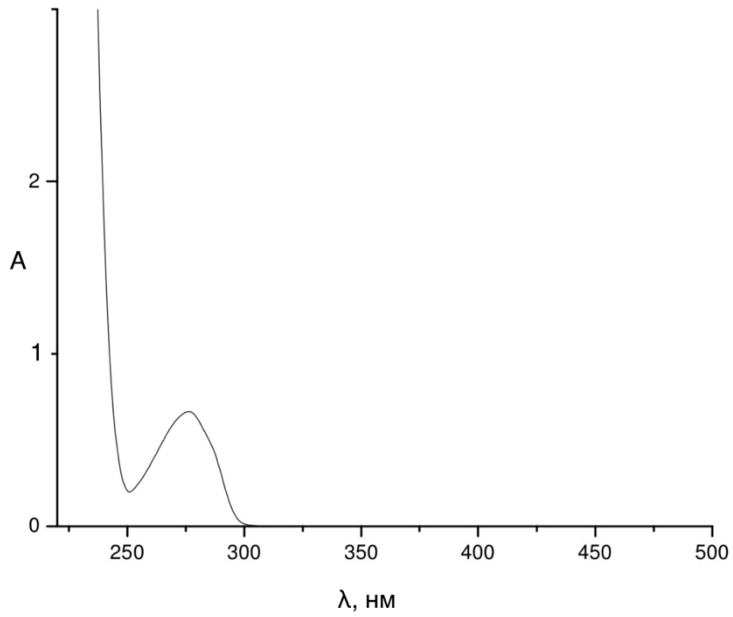


Рис. 1.23. Спектр кофеїну в хлороформі

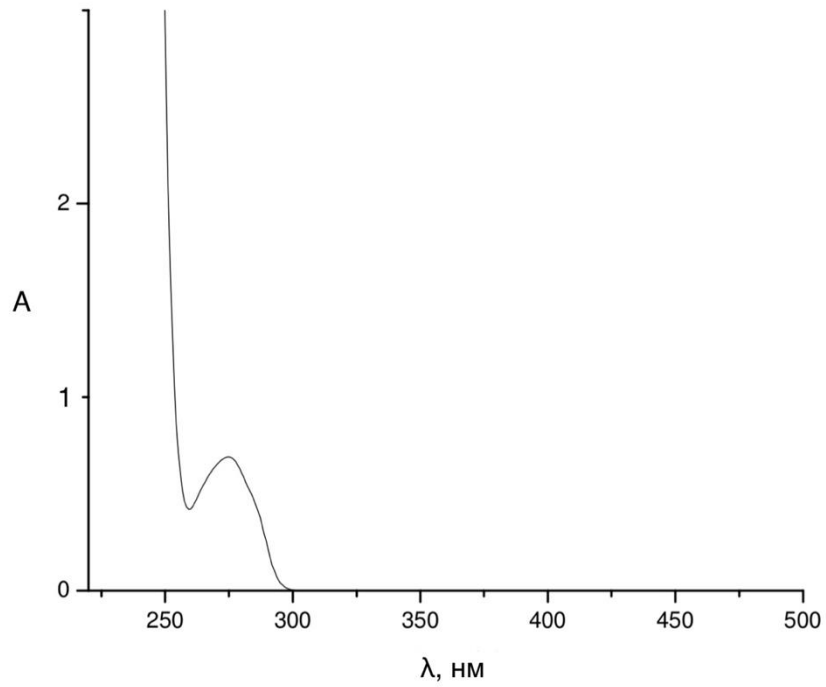


Рис. 1.24. Спектр кофеїну в етилацетаті

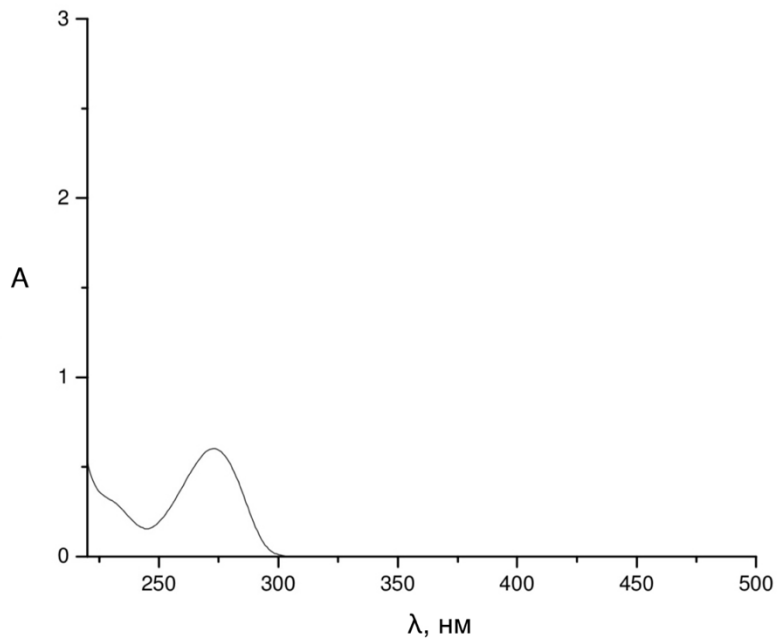


Рис. 1.25. Спектр кофеїну в водному розчині

З спектрів видно, що кофеїн поглинає в спектральному діапазоні між 244 нм і 300 нм в дихлорметані та воді з λ_{\max} при 276 нм і 272,8 нм відповідно, 250 нм до 300 нм при λ_{\max} 276 нм у хлороформі та 258 нм до 300 нм при λ_{\max} 274,4 нм в етилацетаті.

В якості прикладу, розглянемо методику, описану Tadelech Atomssa та ін.[16].

У цьому дослідженні описано метод визначення вмісту кофеїну у дванадцяти зразках чаю за допомогою спектрофотометра, в УФ області спектру. Для визначення поглинання за довжини хвилі 272,8 нм, використовували спектрофотометр Perkin-Elmer Lambda 19, з діапазоном довжин хвиль від 170 нм до 3200 нм, з подвійним монохроматором. До зразків чаю масою 50 мг додавали 30 мл дистильованої води з температурою 94°C. Потім розчин фільтрували через скляний фільтр і охолоджували до кімнатної температури (21°C). 40 мл дихлорметану виливали в чайну настоянку і перемішували протягом 10 хв магнітною мішалкою. Оскільки кофеїн більше розчинний у дихлорметані (140 мг/мл), ніж у воді (22 мг/мл), він легко розчиняється в дихлорметані. Потім водну та дихлорметанову фазу відокремлювали ділільною воронкою. Органічну фазу виливали в 1 см кварцеву кювету і фіксували спектр поглинання. Щоб зробити результат більш надійним, було проведено три незалежні вимірювання для кожного зразка та розраховано середні значення. Вміст кофеїну розраховували за градууювальним графіком. Для зручності використовували наступні представлення зразків чаю символами: чорний чай Аддіс (A), ефіопський зелений чай (B), чай чорний лев (C), чорний чай з корицею (D), чорний чай (E), імбирний чорний чай (F), зелений чай Шрі-Ланки (G), чорний чай індійського татагольда (H), чай індійський Тадж-Махал (I), чорний чай кенійський (J), чорний чай Південної Африки (K) та чорний чай Зімбабвійської таганди (L). Результати дослідження зображено на (табл 1.4.).

Таблиця 1.4

Вміст кофеїну в чаях з африканського ринку

Зразок	λ_{\max} , нм	A_{\max}	Кофеїн, %
A	274,8	0,468	2,01
B	275,2	0,478	2,08
C	274,4	0,346	1,50
D	276,8	0,462	1,98
E	275,2	0,458	1,94
F	275,2	0,382	1,63
G	275,6	0,317	1,34
H	275,6	0,430	1,87
I	275,2	0,538	2,30
J	275,6	0,547	2,36
K	275,2	0,401	1,70
L	275,2	0,357	1,52

Дещо відмінний метод спектрофотометричного визначення кофеїну в чаї та каві, з використанням плюмбум ацетату для видалення домішок таніну та глікозидів описано в [17]. 50 г чайного листя або кавового порошку змішували з 150 мл води і нагрівали до сильного кипіння. Потім прозорий розчин обробляли плюмбум ацетатом для осадження глікозидних сполук у вигляді свинцевого комплексу. Розчин фільтрували і до фільтрату додавали ацетат свинцю і отримували сирнистий коричневий осад. Ацетат свинцю додавали до припинення випадання осаду. Його знову фільтрували і фільтрат кип'ятили до об'єму 50 мл. Розчину давали охолонути і екстрагували кофеїн за допомогою хлороформу. Вміст кофеїну розраховували за калібрувальним графіком. У цьому дослідженні було вивчено вміст кофеїну в різних зразках чаю та кави, і встановлено, що вміст кофеїну коливається в межах 1-5% (табл.1.5.). Ці

значення, як правило, добре узгоджуються з цитованими літературою значеннями 2-5%.

Таблиця 1.5

Вміст кофеїну в різних зразках чаю та кави за результатами дослідження [17]

Зразок	Назва	Вміст кофеїну, г/50г
1	Brook Bond Red Label	0,01
2	AVT	0,03
3	Eastern Eastea	0,02
4	Palat	0,04
5	3 Roses	0,02
6	Kannan Devan	0,01
7	Bru gold coffee	0,68
8	AVT coffee	0,62

Іншу методику визначення кофеїну, за допомогою спектрофотометра, в УФ-діапазоні, з використанням тетрахлорметану в якості розчинника, було описано Amos-Tautua та ін. [18]. Для приготування стандартного розчину кофеїну в мірній колбі на 250 мл розчиняли 25 мг кофеїну в 250 мл очищеного тетрахлорметану (CCl₄). Калібрувальні розчини готували шляхом додавання 10, 20, 30, 40 і 50 мл відповідно аликвоти вихідного стандартного розчину в окремі мірні колби (100 мл) і доведення до мітки очищеним тетрахлорметаном, для отримання концентрацій 10, 20, 30, 40 і 50 мг / л відповідно. Поглинання кожного розчину вимірювали при максимумі поглинання 270 нм,

використовуючи 10 мм кварцову кювету. За отриманими даними будували калібрувальний графік. Для вилучення кофеїну з напою, аликвоту (5 мл) зразка відбирали піпеткою і переносили у ділильну воронку на 125 мл з подальшим додаванням дистильованої води (10 мл), потім 20% водного розчину Na_2CO_3 (1 мл) та тетрахлорметану (20 мл). Кофеїн екстрагували шляхом перевертання воронки щонайменше три рази. Неводний шар CCl_4 у колбу об'ємом 50 мл. Ще 20 мл тетрахлорметану додавали до водного розчину в ділильній воронці і процедуру екстрагування повторювали ще двічі і об'єднували шари розчинника (CCl_4). Цей об'єм доводили до 50 мл розчинником у мірній колбі. Процедуру повторювали для всіх зразків напою. Потім вимірювали поглинання отриманих розчинів на спектрофотометрі 6405 Jenway UV/Vis Spectrophotometer при 270 нм, використовуючи 10 мм кварцову кювету. Концентрацію кофеїну у зразках (проміле) визначали за допомогою калібрувального графіку. Паралельно з цим було виміряно рН напоїв. Вміст кофеїну та рН зразків напоїв представлений на (табл.1.6.)

Таблиця 1.6

Вміст кофеїну та рН зразків напоїв, за даними [18]

Назва напою	рН	Вміст кофеїну, ppm
Pepsi cola	5,52	44,22
Diet coke	5,79	45,83
Coca cola	5,50	43,71
Mountain dew	5,54	44,31
Bullet	5,92	50,42
Power horse	5,85	52,65
Lucozade boost	5,79	47,56
Red Bull	6,44	58,31

Мікрометод визначення кофеїну. Чаї також аналізували на вміст кофеїну згідно з методом, про який повідомив [39]. Коротко, екстракти чаю (рН = 8–9) екстрагували бензолом та H_2SO_4 . Поглинання екстрактів зчитували при 273 нм

проти заготовки (H_2SO_4). Результати, отримані з триразового аналізу, розраховували за допомогою стандартної кривої і виражали у мг/л.

Спектрофотометричні методи визначення кофеїну, що базуються на визначенні забарвлених продуктів реакції кофеїну з певними реагентами, використовуються широко, через те, що вимагають ще більш простих та дешевих приладів, а отже є широкодоступними. Ці методи також починаються з отримання водного екстракту кофеїновмісної сировини, з якого кофеїн екстрагують органічним розчинником. Після цього, органічну фазу відокремлюють від водної за допомогою ділильної воронки, та видаляють розчинник шляхом випарювання. Сухий залишок кофеїну використовують для хімічних реакцій, що кількісно перетворюють кофеїн на забарвлену сполуку, світлопоглинання якої лежить у видимому діапазоні хвиль. Подальше вимірювання оптичної густини розчину забарвленої сполуки, дає її концентрацію, що є пропорційною концентрації кофеїну. Визначення концентрації частіше проводять методом калібрувального графіку, використовуючи стандартні розчини з відомою концентрацією. В якості прикладу, розглянемо декілька методик [31].

Так, Сингх і Саху [20] розробили фотоколориметричний метод визначення кофеїну, заснований на окисненні кофеїну метаперіодатом натрію в присутності оцтової кислоти, з наступною взаємодією з гідрохлоридом 3-метил-2-бензотіазолін гідразону (МВТН), що призводить до отримання продукту синього кольору з λ_{max} при 630 нм.

Методика спектрофотометричного визначення кофеїну, заснована на реакції азосполучення тетрафторборатів-4-нітрофенілдіазонію з продуктами лужного гідролізу кофеїну, з утворенням забарвлених продуктів, запропонована [21].

Згідно цієї методики, до 1 мл досліджуваного розчину додавали 1 мл 50% -го розчину гідроксиду калію, проводили лужний гідроліз протягом 30 хв при кімнатній температурі, потім до розчину додавали 4,25 мл води і 0,75 мл водного розчину тетрафторборатів 4-нітро-фенілдіазонію і через 2 хв розчин підкислюють 3 мл безводної оцтової кислоти. Оптичну щільність розчину вимірювали при 500 нм, а концентрацію розраховували за калібрувальним графіком.

В [22] описано метод визначення кофеїну в зразку вуличного героїну (діацетилморфіну), вилученого з чорного ринку США. Зразок являв собою так званий героїн для паління, який являє собою кофеїн з домішками героїну. Кофеїн дозволяє суміші легко сублімуватись при нагріванні. В подібних зразках, кофеїн може бути кількісно осаджений з водного розчину фосфомолібденовою кислотою. Фосфомолібдат кофеїну може бути розчинений в ацетоні і визначений колориметрично при 440 нм. Спосіб може бути застосований до наважок, що містять від 1 до 5 мг кофеїну. Пробу розчиняють в 100 мл дистильованої води, і доводять до кипіння. Після охолодження, до розчину додають 10 мл 1М хлоридної кислоти та 2 мл 20% фосфомолібденової кислоти і залишають на 15 хв. Утворений осад жовтого кольору відфільтровують за допомогою скляного фільтру і промивають розбавленою хлоридною кислотою на фільтрі. Осад кількісно переносять в мірну колбу на 100 мл, та розчиняють в ацетоні, доводячи об'єм до мітки. 10 мл цього розчину доводять до мітки в колбі на 25 мл, після чого вимірюють його поглинання за λ 440 нм. Вміст кофеїну розраховують за калібрувальним графіком. Для побудови калібрувального графіка використовують аліквоти стандартного розчину кофеїну з концентрацією 1 мг/мл, об'ємом від 1 до 5 мл.

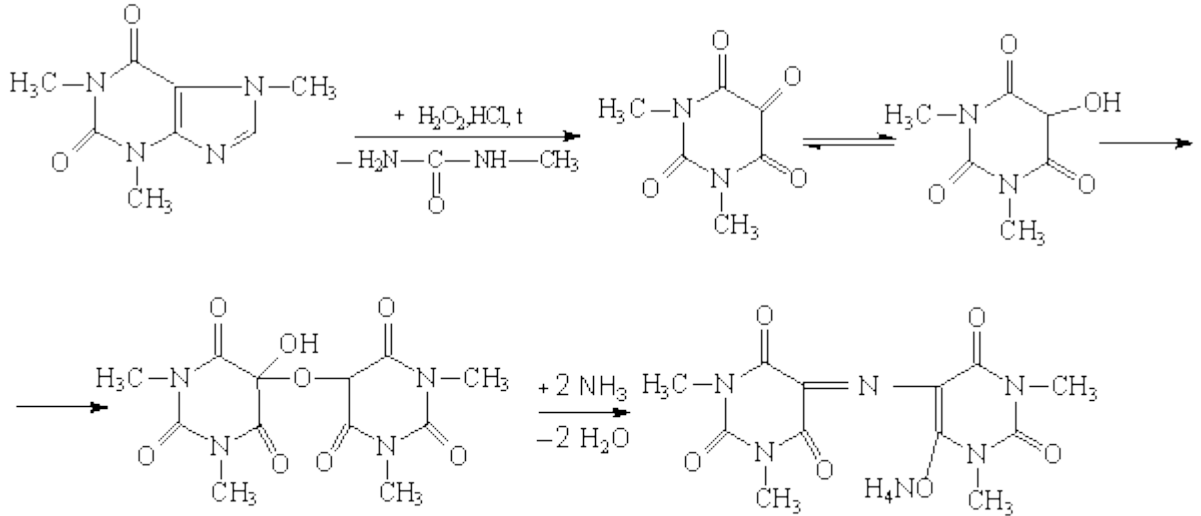


Рис. 1.27. Гідролітичне окиснення кофеїну пероксидом водню в кислому середовищі.

У [9] описано фотометричний метод визначення кофеїну, заснований на екстракційному виділенні кофеїну з водного розчину за допомогою хлороформу, з подальшим гідролітичним окисненням пероксидом водню в присутності хлоридної кислоти в забарвлений продукт — тетраметилпурпурову кислоту (рис.1.27.) і вимірі оптичної щільності тетраметилпурпурової кислоти при $\lambda = 540$ нм. Визначення вмісту кофеїну проводять за калібрувальним графіком. Методику проведення аналізу розглянуто в розділі 2.

Висновки до розділу 1

Наведені та проаналізовані літературні дані свідчать про актуальність дослідження умов фотометричного визначення кофеїну в об'єктах навколишнього середовища, особливо в таких, вміст кофеїну в яких є регламентованим. До таких належать чай, кава, енергетичні напої та біологічно-активні добавки. Така необхідність зумовлена тим, що кофеїн, належачи до пуринових алкалоїдів, проявляє певний фізіологічний вплив на організм людини.

Розглянуто якісні та кількісні методи визначення кофеїну. В якісних реакціях, розглянуто групові реакції на пуринові алкалоїди, та специфічні для кофеїну, завдяки яким їх можна розрізнити. В кількісних методах розглянуто як суто хімічні, так і фізико-хімічні методи, такі як мас-спектрометрія та хроматографія.

Окремим пунктом, розглянуто фотометричні методи. Серед великої кількості методів визначення кофеїну, фотометричні методи є найбільш часто використовуваними. Це пов'язано з тим, що фотометрія, як інструмент для визначення кофеїну в різних об'єктах є простою і доступною, в порівнянні з багатьма іншими методами.

Фотометричне визначення кофеїну є менш затратним, відносно простим, та забезпечує достатню точність і відтворюваність. Спектрофотометрія широко використовується у всіх університетах і дослідницьких інститутах. Практично всі дослідники здатні працювати з цим інструментом. А спектрофотометри та фотоелектроколориметри є доступними, відносно недорогими і розповсюдженими приладами.

РОЗДІЛ 2

РЕАГЕНТИ, АПАРАТУРА, МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Реагенти та апаратура

Під час виконання експериментальних досліджень були використані наступні реактиви та їх розчини:

кислота соляна згідно [9], х. ч., з густиною 1.190 г/см^3 , розчин молярною концентрацією $(\text{HCl}) = 3 \text{ моль/дм}^3$ (Розчин готували шляхом розведення заздалегідь розрахованого об'єму вихідного розчину хлоридної кислоти з концентрацією 10.6 М в мірній колбі, з доведенням до мітки дистильованою водою. Концентрація вихідного розчину хлоридної встановлювалася шляхом визначення щільності за допомогою набору денсиметрів, та знаходження відповідної молярної концентрації);

гідроген пероксид, х. ч., розчин з масовою концентрацією 150 г/л , який одержували шляхом розведення вихідного розчину пероксиду водню з концентрацією 300 г/л у співвідношенні $1:1$ водою дистильованою у мірній колбі на 25 мл .

хлороформ марки «х. ч.»;

калію гідроксид, розчин з масовою концентрацією 150 г/л , для приготування якого попередньо розраховану кількість калій гідроксиду, зважену на аналітичних вагах у скляному бюксі, кількісно переносили в мірну колбу на 25 мл , та після розчинення в невеликому об'ємі дистильованої води, доводили до мітки дистильованою водою.

стандартний розчин кофеїну, з концентрацією 1 мг/мл , який готувався шляхом розведення аптечного розчину кофеїну бензоату натрію (фарм.) в ампулах, з концентрацією 100 мг/мл ; 2.50 мл розчину кофеїн-бензоат натрію (що згідно розрахункам еквівалентно 100 мг кофеїну) за допомогою піпетки на 5 мл ,

з ціною поділки 0,01 мл, додавали до мірної колби місткістю 200 мл, та доводили об'єм розчину у мірній колбі дистильованою водою до мітки, весь час перемішуючи розчин;

Під час виконання експериментальних досліджень були використані наступна апаратура:

терези лабораторні загальної призначеності другого класу точності з найбільшою границею зважування 220 г;

термометр рідинний скляний з діапазоном вимірювання від 0°C до 100°C ціна поділки шкали повинна бути не більшою ніж 1 °C;

електроплитка побутова;

баня водяна лабораторна;

Спектри поглинання та оптичну щільність досліджуваних розчинів вимірювали за допомогою фотоколориметра КФК-2 УХЛ, з спектральним діапазоном від 315 до 980 нм та межею вимірювання на коефіцієнтів пропускання від 100 до 0 % (оптична щільність від 0 до 0,5). Основна абсолютна похибка колориметра при вимірюванні коефіцієнтів пропускання не більше $\pm 1\%$.

2.2. Методики дослідження

1. Пробопідготовка реального об'єкту. Приготування розчинів розчинних і нерозчинних кавових напоїв до вимірювання проводили за наступною методикою: наважку аналітичної проби розчинного кавового напою масою від 2,0 до 25,0 г (залежно від вмісту натуральної кави в кавовому напої) кладуть у стакан місткістю 250 мл, наливають 50 мл киплячої дистильованої води.

Одержаний розчин охолоджують до 18—20 °C, переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину в колбі з дистильованою водою до позначки і використовують розчин для вимірювання.

Наважку нерозчинного кавового напою масою від 10,0 до 20,0 г (залежно від вмісту натуральної кави в кавовому напої) кладуть у стакан об'ємом 250 мл, наливають 150 мл киплячої дистильованої води і кип'ячать 5 хв.

Одержану суспензію охолоджують до 18—20 °С, кількісно переносять у мірну колбу місткістю 250 мл, доливають здистильованою водою до позначки. Вміст колби збовтують 2—3 хв, потім фільтрують. Одержаний фільтрат використовують для вимірювання.

2. Методика фотокolorиметричного визначення кофеїну. Фотометричний метод визначання масової частки кофеїну [9]. Діапазон вимірювання масової частки кофеїну в розчині від 0,03 % до 5,40 %. Суть методу полягає в фотометричному вимірюванні оптичної щільності розчину тетраметилпурпурової кислоти(ТМПК), одержаної гідролітичним окисненням екстрагованого з кавопродуктів кофеїну, і визначенні за графіком залежності оптичної щільності розчину від концентрації кофеїну ($D = f(c)$) масової концентрації кофеїну.

3. Методика побудови градуювального графика. У випарювальні чашки вносять піпеткою 0,5; 1,0; 1,5 мл стандартного розчину кофеїну. Розчинник (воду) відганяють на водяній бані досуха, що визначають візуально. До сухого залишку кофеїну послідовно додають 1,0 мл розчину соляної кислоти, змиваючи кофеїн на дно чашки, і 0,2 мл розчину пероксиду водню. Вміст чашки перемішують обертальним рухом, витримують 20 хв за кімнатної температури і нагрівають на киплячій водяній бані до одержання сухого забарвленого залишку тетраметилпурпурової кислоти. Готуючи водний розчин до сухого залишку, охолодженого до кімнатної температури, приливають від 5 до 10 мл дистильованої води і залишають до його повного розчинення. Одержаний розчин пурпурового кольору кількісно переносять у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину в колбі з дистильованою водою до позначки.

Вимірюють оптичну щільність цих розчинів на колориметрі за довжини хвилі $(540 + 10)$ нм у кюветах з робочою довжиною 30 мм відносно до води. Будують графік залежності оптичної щільності розчину від концентрації кофеїну $D = f(c)$, відкладаючи на осі абсцис значення концентрацій кофеїну, а на осі ординат — відповідні значення оптичної щільності.

4. Методика проведення аналізу реального об'єкту. У ділильну лійку місткістю 25 мл послідовно вносять від 10 мл до 15 мл хлороформу, 2 мл розчину кави для випробовування і 0,5 мл розчину гідроксиду калію. Закривають лійку притертою пробкою і екстрагують, обережно багаторазово перемішуючи вміст лійки, протягом однієї хвилини. Після розшарування суміші нижній хлороформний шар переносять у випарну чашку. Хлороформ відганяють на водяній бані досуха, що визначають візуально. Примітка. Не дозволено попадання верхнього забарвленого водяного шару в нижній хлороформний шар. До сухого залишку, який містить кофеїн, послідовно додають 1,0 мл розчину хлоридної кислоти, змиваючи залишок з дна чашки і 0,2 мл розчину гідроген пероксиду. Вміст чашки перемішують обертальним рухом, витримують 20 хв за температури навколишнього середовища, потім нагрівають на киплячій водяній бані до одержання сухого забарвленого залишку ТМПК.

Для приготування водного розчину ТМПК до сухого залишку в охолоджену до температури навколишнього середовища чашку доливають від 5 мл до 10 мл дистильованої води і залишають до його повного розчинення. Одержаний розчин пурпурового кольору кількісно переносять у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки. Оптичну щільність одержаного розчину вимірюють на колориметрі, проти холостого розчину. В якості холостого розчину використовують бідистильовану воду. Для вимірювань використовують кювети з товщиною світлопоглинаючого

шару 3 см. Вимірювання проводять за довжини хвилі 540 нм. Оптична щільність розчину, який досліджують, не змінюється протягом 20 хв.

Правила опрацювання результатів. Масову частку кофеїну $X, \%$ в перерахуванні на суху речовину, обчислюють за формулою:

$$X, \% = \frac{1,03c \cdot V_{\phi} \cdot V}{m \cdot V_e \cdot 10^6}$$

де 1,03— коефіцієнт, який враховує повноту вилучення кофеїну хлороформом на першому етапі екстрагування;

c — концентрація кофеїну, знайдена за градувальним графіком, мкг/см³;

$V_{\phi} = 25$ — об'єм розчину ТМПК, що фотометрується, який одержали в результаті гідролітичного окислення кофеїну, см³;

$V = 250$ — об'єм розчину кави для вимірювання, см³;

10^6 — коефіцієнт переведення 1 мкг в 1 г;

V_e — об'єм розчину кави, який відібрали на екстрагування, см³;

m — маса наважки розчинної кави, г;

Правила оформлювання результатів

Результат обчислюють до другого десяткового знака, округлюючи до першого десяткового знака. За кінцевий результат випробовування приймають середнє арифметичне значення результатів трьох паралельних вимірювань, допустима абсолютна розбіжність між якими не повинна перевищувати 0,15 % за довірчої імовірності $R = 0,95$.

РОЗДІЛ 3
ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ У ВИГЛЯДІ
ТЕТРАМЕТИЛПУРПУРОВОЇ КИСЛОТИ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

**3.1. Дослідження умов реакції утворення тетраметилпурпурової
 кислоти**

Для вивчення спектрофотометричних властивостей ТМПК, був побудований її спектр поглинання у видимій ділянці спектру. Для отримання ТМПК використовували методику, описану в розділі 2. Вимірювали спектри світлопоглинання розчину в скляній кюветі з товщиною світлопоглинального шару $\ell=1,0$ см, в діапазоні від 400 нм до 750 нм, використовуючи світлофільтри з довжинами хвиль 400, 440, 490, 540, 590, 670 та 750 нм. Будували графічну залежність оптичної густини A від довжини хвилі λ , нм (рис.3.1.).

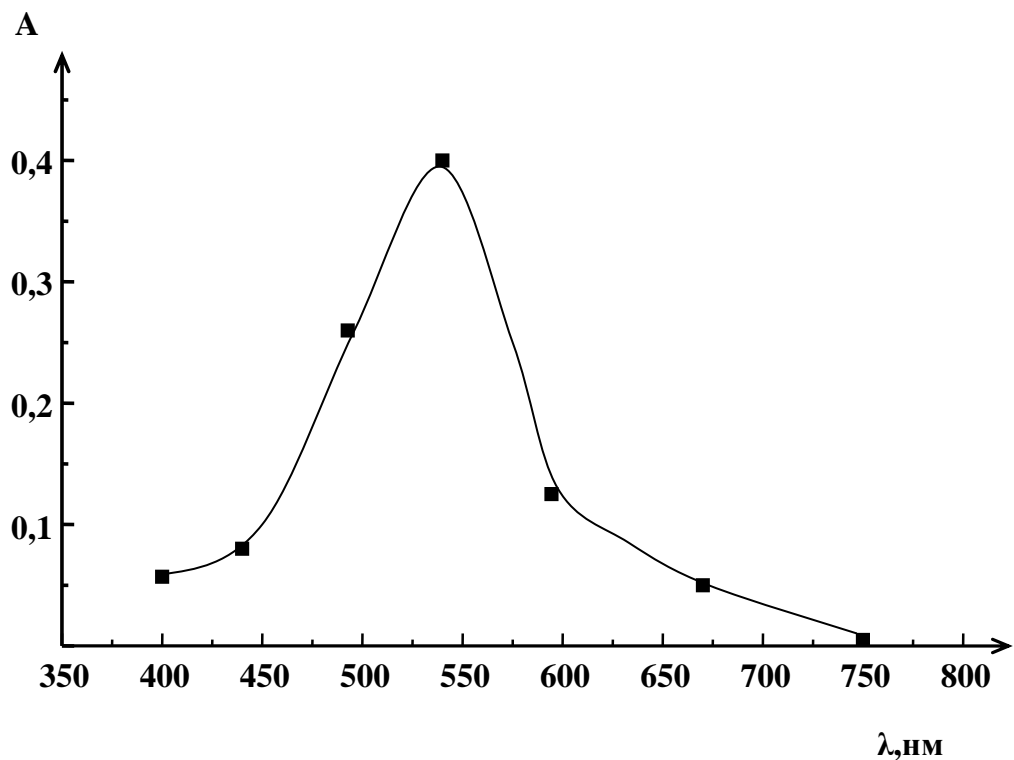


Рис. 3.1. Спектри поглинання ТМПК у водному середовищі $C_{\text{коф.}} = 4,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\ell = 1$ см. Час утворення: ТМПК – 20 хв, рН = -0,48.

Аналіз одержаного спектра (рис. 3.1.) демонструє пік світлопоглинання при довжині хвилі 540 нм. Таким чином, найбільшу чутливість забезпечить проведення аналізу за максимумом смуги поглинання водного розчину ТМПК при λ_{\max} 540 нм. Ці дані відповідають тим, що представлені в літературі, та [9], згідно яким проводились дослідження.

3.1.1. Вивчення впливу рН на утворення тетраметилпурпурової кислоти

Реакція гідролітичного окиснення кофеїну пероксидом водню, протікає в сильноокислому середовищі, для створення якого використовується розчин хлоридної кислоти, з концентрацією хлоридної кислоти 3 моль/л. Ми дослідили вплив рН розчину кислоти, використаної для проведення реакції, на кількісні показники утворення продукту реакції – тетраметилпурпурової кислоти. Для визначення впливу рН розчину хлоридної кислоти на кількісне утворення тетраметилпурпурової кислоти (ТМПК), було проведено дослідження, з використанням стандартного розчину кофеїну 2мг/мл та 15% гідроген пероксиду (H_2O_2), як зазначено в [9]. Для визначення оптимального показника рН утворення ТМПК було взято наступний діапазон рН - 0,48 до 3.

Для цього, у випарювальну чашку піпеткою вносили по 2 мл стандартного розчину кофеїну з концентрацією 1 мг/мл. Розчинник (воду) відганяли досуха, під візуальним контролем [9]. До сухого залишку кофеїну послідовно додавали 1,0 мл хлоридної кислоти, з одним з наступних рН: -0.48, 0,5, 1, 2, 3. Після чого додавали 0,2 мл 15% розчину гідроген пероксиду. Випарювальні чашки маркували відповідно рН розчину кислоти, що застосовувався. Вміст чашки перемішували обертальним рухом, витримували 20 хв за кімнатної температури і нагрівали до одержання сухого забарвленого залишку тетраметилпурпурової кислоти. Готуючи водний розчин, до сухого залишку, охолодженого до кімнатної температури, приливали від 5 до 10 мл дистильованої води і залишали

до його повного розчинення. Одержаний розчин пурпурового кольору кількісно переносили у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм розчину в колбі до позначки дистильованою водою. Вимірювали оптичну щільність цих розчинів на колориметрі КФК-2 за довжини хвилі $(540 + 10)$ нм у кюветах з робочою довжиною 30 мм відносно дистильованої води.

Отримані результати приведено в таблиці. За результатами дослідження було побудовано криву залежності оптичної густини (A) від рН розчину, відкладаючи на осі абсцис значення рН, а на осі ординат - відповідні значення оптичної щільності (рис.3.2.).

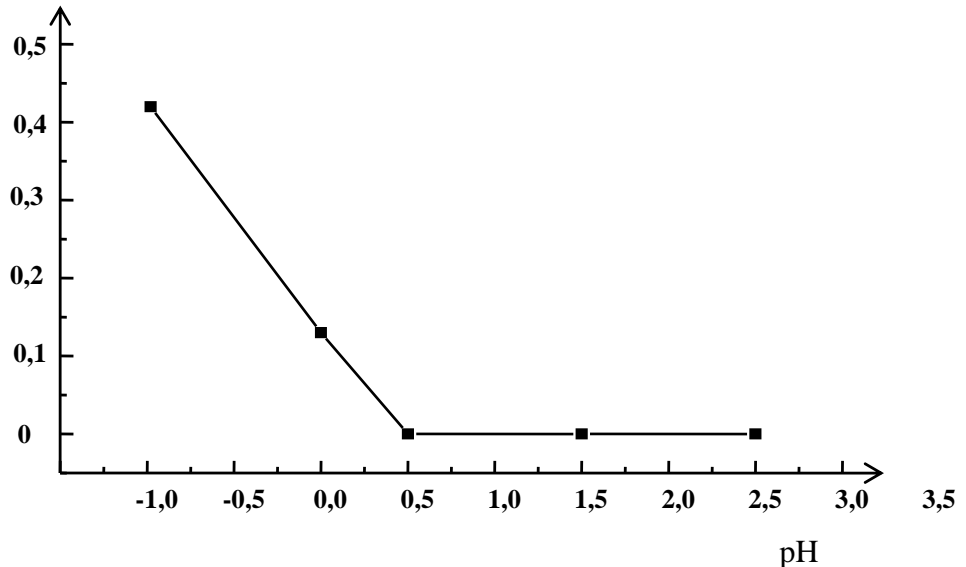


Рис. 3.2. Залежність оптичної густини розчину ТМПК від рН. $C_{\text{коф.}} = 4,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\ell = 3$ см. Час утворення: ТМПК – 20 хв.

Аналіз кривої залежності оптичної густини розчину тетраметилпурпурової кислоти від рН, який демонструє повноту протікання реакції гідролітичного окиснення кофеїну пероксидом водню в кислому середовищі показав, що повнота утворення ТМПК була найбільшою при використанні в якості реактиву розчину хлоридної кислоти з рівнем рН -0,48. Це відповідає концентрації хлоридної кислоти, що зазначена в [9].

3.1.2. Вплив концентрації пероксиду водню на утворення тетраметилпурпурової кислоти.

Для визначення впливу концентрації пероксиду водню на кількісне утворення ТМПК було проведено дослідження з використанням стандартного розчину кофеїну з концентрацією 1 мг/мл та 3М хлоридної кислоти (HCl) [9] за різних концентрацій пероксиду водню, в діапазоні від концентрації зазначеної згідно [9] 15% розчин гідроген пероксиду (H_2O_2), до концентрації 3%, з інтервалом в 2%. Для цього, у випарювальні чашки, піпеткою, вносили по 2 мл стандартного розчину кофеїну, з концентрацією 1 мг/мл. Розчинник (воду) відганяли досуха, під візуальним контролем. До сухого залишку кофеїну послідовно додавали 1,0 мл 3М HCl, змиваючи кофеїн на дно чашки, та 0,2 мл розчину пероксиду водню з однією з наступних концентрацій: 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13% або 15% відповідно. Випарювальні чашки маркували відповідно до концентрації пероксиду водню, що застосовувався. Вміст чашки перемішували обертальним рухом, витримували 20 хв за кімнатної температури і нагрівали до одержання сухого забарвленого залишку тетраметилпурпурової кислоти. Готуючи водний розчин, до сухого залишку, охолодженого до кімнатної температури, приливали від 5 до 10 мл дистильованої води і залишали до його повного розчинення. Одержаний розчин пурпурового кольору кількісно переносили у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм розчину в колбі до позначки дистильованою водою. Вимірювали оптичну щільність цих розчинів на колориметрі КФК-2 за довжини хвилі ($540 + 10$) нм у кюветах з робочою довжиною 30 мм відносно дистильованої води. Результати дослідження, приведені в таблиці. За результатами дослідження було побудовано графік залежності оптичної щільності розчину (A) від концентрації гідроген пероксиду ($C_{(H_2O_2)}$, %), відкладаючи на осі абсцис значення концентрацій гідроген

пероксиду, а на осі ординат — відповідні значення оптичної щільності (рис. 3.3.).

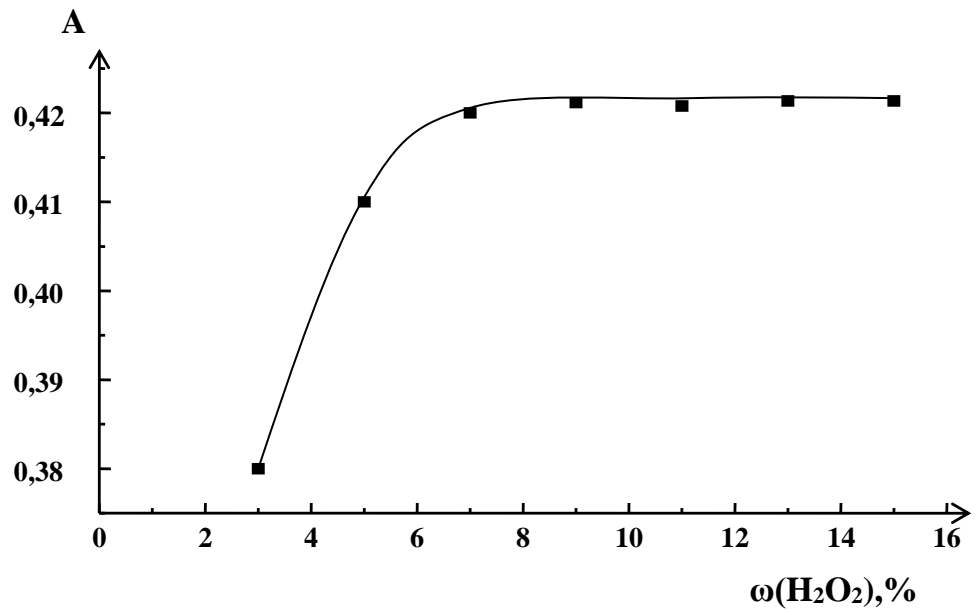


Рис. 3.3. Залежність оптичної густини від масової частки гідроген пероксиду. $C_{\text{коф.}} = 4,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\ell = 3$ см. Час утворення: ТМПК – 20 хв.

Аналіз кривої залежності оптичної густини розчину тетраметилпурпурової кислоти від концентрації гідроген пероксиду, який демонструє повноту протікання реакції гідролітичного окиснення кофеїну пероксидом водню в кислому середовищі показав, що повнота утворення ТМПК була найбільшою при використанні в якості реактиву розчину гідроген пероксиду з діапазоном концентрацій від 7% до 15%. Це дає змогу використовувати розчини гідроген пероксиду з меншою концентрацією, ніж зазначено в [9].

3.1.3. Вплив часу на повноту утворення тетраметилпурпурової кислоти.

Для визначення оптимального часу утворення тетраметилпурпурової кислоти, реакцію гідролітичного окиснення кофеїну проводили за умов різного часу протікання реакції. Для цього, у випарювальні чашки, вносять піпеткою 2 мл стандартного розчину кофеїну з концентрацією 1 мг/мл. Розчинник (воду) відганяють на водяній бані досуха, що визначають візуально. До сухого залишку кофеїну послідовно додають 1,0 мл розчину хлоридної кислоти, змиваючи кофеїн на дно чашки, і 0,2 мл розчину гідроген пероксиду.

Вміст чашки перемішують обертальним рухом, та витримують 0, 5, 10, 15, 20, 25 або 30 хв за кімнатної температури, маркуючи чашки відповідно до проміжку часу. Після цього, чашку нагрівають на киплячій водяній бані до одержання сухого забарвленого залишку ТМПК. Готуючи водний розчин до сухого залишку, охолодженого до кімнатної температури, приливають від 5 до 10 см³ дистильованої води і залишають до його повного розчинення. Одержаний розчин пурпурового кольору кількісно переносять у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину в колбі до позначки дистильованою водою. Вимірюють оптичну щільність цих розчинів на колориметрі за довжини хвилі (540 + 10) нм у кюветах з робочою довжиною 30 мм відносно води. За результатами дослідження будують графік залежності оптичної густини розчину (A) від часу (τ), відкладаючи на осі абсцис проміжок часу у хвиликах, а на осі ординат — відповідні значення оптичної щільності (рис. 3.4.).

Як видно з (рис. 3.4.), оптична густина розчину ТМПК збільшується до точки, із значенням абсциси 20 хв, після чого залишається сталою. Отже, оптимальний час реакції – 20 хв.

У стандартній методиці пропонується той же самий час що не дає змоги скоротити час утворення ТМПК.

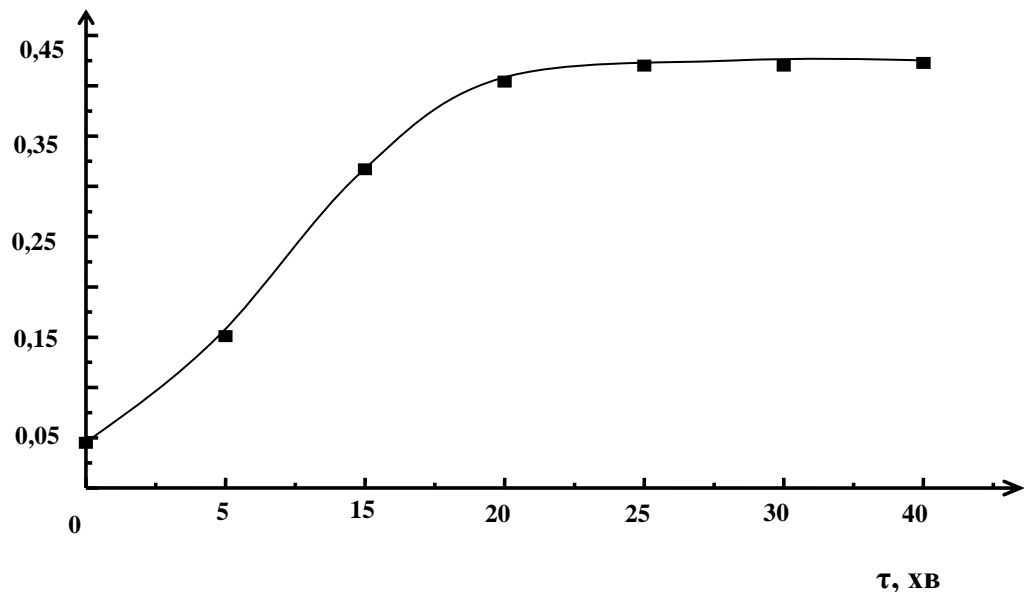


Рис. 3.4. Залежність повноти утворення ТМПК від часу.
 $C_{\text{(кофеїну)}} = 4,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\ell = 3$ см.

3.2. Визначення кофеїну у вигляді ТМПК в реальних об'єктах

Визначення вмісту кофеїну в зразках розчинної кави «Jacobs», «Carte Noire», «MacCoffee Gold», «Nescafé Gold», «Nescafé Espresso» проводилося згідно методики, що описана в розділі 2. В якості стандарту використовували фармацевтичну субстанцію кофеїну. За вказаною методикою, було приготовано калібрувальні розчини з наступними концентраціями кофеїну (мкг/мл): 500, 1000, 1500, 2000, 2500. Визначення оптичної густини для кожного зразку проводилося 3 рази, та розраховувались середні значення. За результатами вимірювань оптичної густини калібрувальних розчинів, будували градувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення оптичної густини (A), а на осі ординат — відповідні значення концентрації кофеїну в мкг/мл (рис. 3.5.).

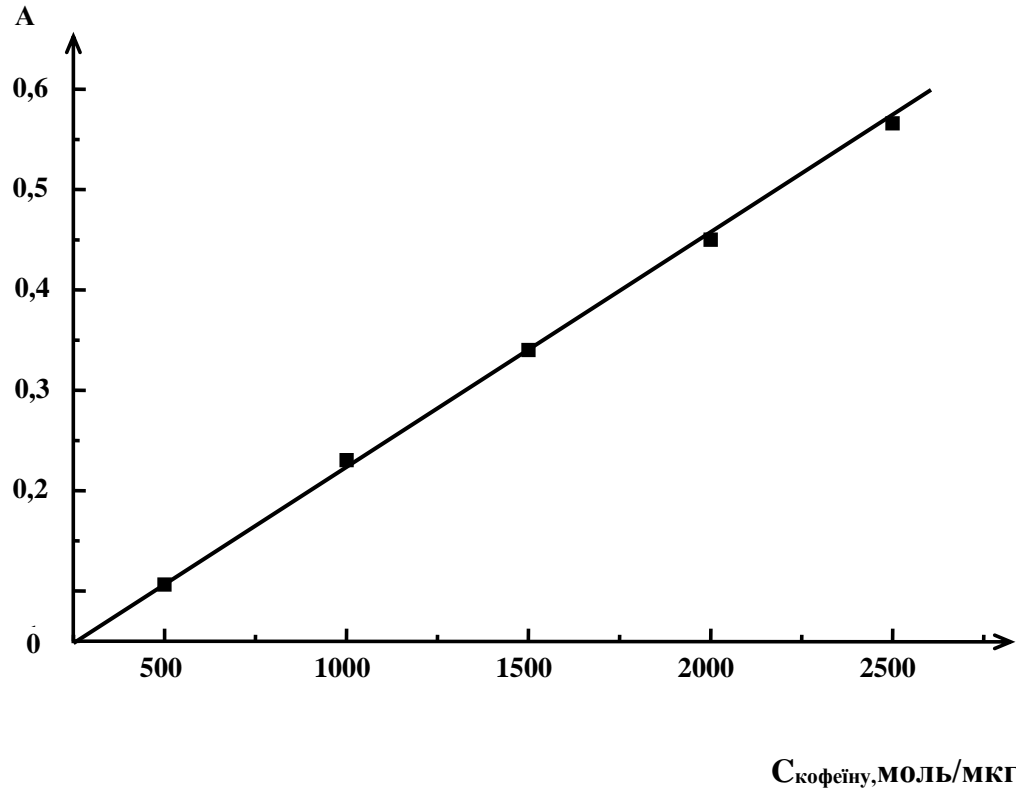


Рис 3.5. Залежність світлопоглинання ТМПК від концентрації кофеїну у розчині. $\tau_{\text{утворення}} = 20$ хв, $C_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 15\%$, $\ell = 3$ см, $\lambda = 540$ нм.

Градувальний графік для визначення кофеїну лінійний в інтервалі концентрацій кофеїну $5,0 \cdot 10^{-4} - 1,02 \cdot 10^{-4}$ моль/л (рис. 3.5) і описується рівнянням:

$$\Delta A = (0,019 \pm 0,019) + (2,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \cdot C_{\text{кофеїну}}, R = 0,995$$

Молярний коефіцієнт поглинання ТМПК в перерахунку на вихідний об'єм 25 мл склав $2,2 \cdot 10^3$ моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$.

Визначення концентрації кофеїну в досліджуваних зразках проводили за градувальним графіком, дані заносили в таблицю (табл. 3.1.). Після чого, використовуючи ці дані, було розраховано масову частку кофеїну в досліджуваних зразках кави, X, % (табл. 3.2.).

Таблиця 3.1

Визначення концентрації за градуйованим графіком розчинної кави

Назва кави	A	C, мкг/мл
«Jacobs»	0,31	1409
«Carte Noire»	0,39	1777
«MacCoffee Gold»	0,17	772
«Nescafé Gold»	0,19	863
«Nescafé Espresso»	0,20	909

Таблиця 3.2

Масова частка кофеїну в досліджуваних зразках, X, %

Назва кави	X, %
«Jacobs»	1,21%
«Carte Noire»	1,53 %
«MacCoffee Gold»	0,66%
«Nescafé Gold»	0,74%
«Nescafé Espresso»	0,78%

Як видно з табл. 3.2., масова частка кофеїну в досліджуваних зразках коливається в межах від 0,66% в каві «MacCoffee Gold», до 1,53% в каві «Carte Noire». Отримані дані узгоджуються з літературними даними про вміст кофеїну у розчинній каві.

3.3. Розробка методичного комплексу для впровадження спектрофотометричної методики визначення кофеїну у вигляді ТМПК при викладанні спецкурсу курс «Прикладні аспекти хімії» у КДПУ.

Лабораторні роботи (від лат. labor – труднощі, робота; laboro – трудитися, працювати, долати труднощі, турбуватися) – вид самостійної навчальної роботи студентів, яка проводиться за завданням викладача із застосуванням навчальних приладів, інструментів, матеріалів, установок та інших технічних засобів. Зміст лабораторних робіт також може бути пов'язаний з іншими видами робіт: демонстраційними дослідженнями, розв'язанням експериментальних задач та певними науковими спостереженнями. Виконання лабораторних робіт вимагає від студентів самостійності у прийнятті рішень, глибокого знання і розуміння навчального матеріалу, позитивно впливає на розвиток пізнавальних інтересів та здібностей [11].

Пропонується власна методика проведення лабораторних занять з використанням якісного та кількісного визначення кофеїну в межах курсу «Прикладні аспекти хімії» для студентів магістрів.

Тема 1: Якісне визначення алкалоїдів.

План:

1. Інструктаж
2. Ознайомитися з наданими матеріалами за темою заняття
3. Зробити висновки роботи

Обладнання та реактиви: штативи для пробірок, пробірки, одноразові піпетки, предметні скельця, розчини атропіну та папаверину; кадмій хлорид, реактиви Маркі, Фреде, Ердмана, Драгендорфа, Бушарда, Майера;

Хід аналізу

1. Якісні реакції на папаверин.

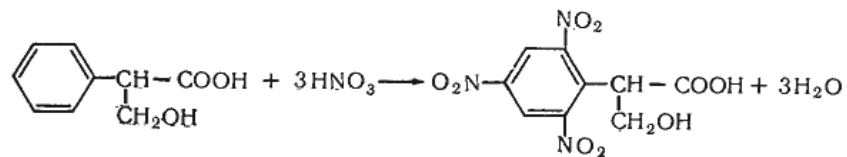
А. Кольорові реакції з реактивами Маркі, Фреде, Ердмана: На предметне скло наносять 1—2 краплі 1 %-вого розчину алкалоїду й 1 краплю загальноалкалоїдного реактиву. Спостерігають утворення забарвленого осаду.

Б. Реакція з кадмій хлоридом: на предметне скельце наносять декілька крапель дослідного розчину і випаровують досуха. До сухого залишку додають краплю 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Поруч наносять краплю 10% розчину кадмій хлориду, після чого з'єднують ці розчини, з'являються зростки тонких пластинок, які мають форму куба.

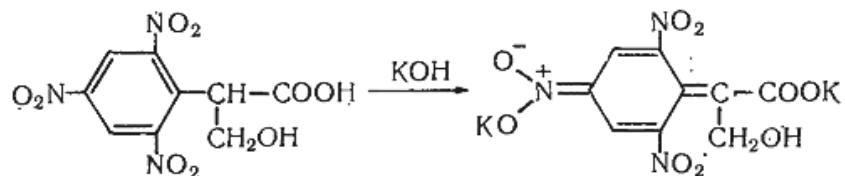
2. Якісні реакції на атропін:

А. Утворення осадів з реактивами Драгендорфа, Бушарда, Майєра: На предметне скло наносять 1—2 краплі 1 %-вого розчину алкалоїду й 1 краплю загальноалкалоїдного реактиву. Спостерігають утворення забарвленого осаду.

Б. Реакція Віталі-Морена: ця реакція оснований, на тому що при нагріванні атропіну з нітратною кислотою, він розкладається на тропін і тропову кислоту. При дії нітратної кислоти на тропову кислоту утворюється тринітропохідна цієї кислоти, яка має жовте забарвлення. При дії лугу на тринітропохідну тропової кислоти, утворюється фіолетове забарвлення.



Тропова кислота



В фарфорову чашку вносять декілька крапель дослідного розчину і при кімнатній температурі випаровують досуха. До сухого залишку додають 1 мл концентрованої нітратної кислоти, рідину на киплячій водяній бані

випаровують до сухого залишку. До сухого залишку з одного боку додають 3-5 крапель ацетона, з іншого 1-2 краплі 10% спиртового розчину лугу. При стиканні вказаних розчинів утворюється фіолетове забарвлення яке швидко зникає. Межа визначення 1мкг атропіна у пробі.

В. Реакція з пікриною кислотою:

Атропін з 0,5 % розчином пікринової кислоти дає світло-жовтий кристалічний осад у вигляді пластинок або їх зростків. Цей осад з'являється через 15-20 хвилин.

Виконання реакції: сухий залишок дослідного розчину розчиняють в краплі 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Поруч з одержаним розчином крапають краплю свіжоприготованого 0,5 % розчину тропової кислоти. При з'єднанні цих розчинів утворюються кристали з характерним забарвленням. Межа визначення 5 мкг атропіна в пробі.

Контрольні запитання:

1. Загальні, специфічні та окремі реакції виявлення алкалоїдів.
2. Реактиви Маркі, Фреде, Ердмана, Драгендорфа. Їх склад та застосування.
3. Знаходження в природі і методи виділення алкалоїдів.
4. Класифікація алкалоїдів.

Тема 2: Спектрофотометричне визначення кофеїну у вигляді ТМПК у реальних об'єктах

План:

1. Інструктаж
2. Ознайомитися з наданими матеріалами за темою заняття
3. Виконати завдання, заповнити таблиці, провести розрахунки, побудувати графіки.

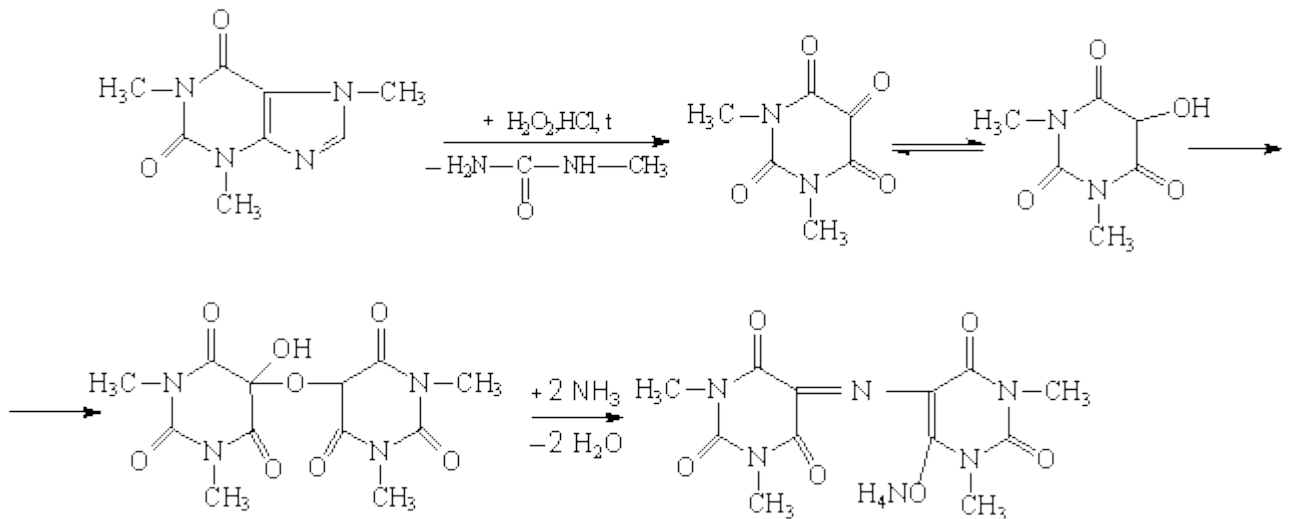
4. Зробити висновки роботи

5. Захист проведеної роботи

Обладнання та реактиви: Колби на 25 та 50 мл, піпетки, стакани, 3М хлоридної кислота, розчин калій гідроксиду, хлороформ, зразки кави, електрична плитка, спектрофотометр або фотоелектроколориметр, набір кювет.

Теоретичні відомості

Суть наступного методу полягає в фотометричному вимірюванні оптичної щільності розчину тетраметилпурпурової кислоти (ТМПК), одержаної гідролітичним окисненням екстрагованого з кавопродуктів кофеїну.



Визначення концентрації кофеїну проводять за графіком залежності оптичної щільності розчину від концентрації кофеїну ($D = f(c)$). Масову частку кофеїну розраховують за формулою.

Хід аналізу

1. Пробопідготовка. Розчини розчинних і нерозчинних кавових напоїв до вимірювання проводили за наступною методикою: наважку аналітичної проби розчинного кавового напою масою від 2,0 до 25,0 г (залежно від вмісту

натуральної кави в кавовому напої) кладуть у стакан місткістю 250 мл, наливають 50 мл киплячої дистильованої води.

Отриманий розчин охолоджують до 18—20 °С, переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину в колбі з дистильованою водою до позначки і використовують розчин для вимірювання.

Наважку нерозчинного кавового напою масою від 10,0 до 20,0 г (залежно від вмісту натуральної кави в кавовому напої) кладуть у стакан об'ємом 250 мл, наливають 150 мл киплячої дистильованої води і кип'ятять 5 хв.

Одержану суспензію охолоджують до 18—20 °С, кількісно переносять у мірну колбу місткістю 250 мл, доливають здистильованою водою до позначки. Вміст колби збовтують 2—3 хв, потім фільтрують. Одержаний фільтрат використовують для вимірювання.

2. Побудова градуювального графіка. У випарювальні чашки вносять піпеткою 0,5; 1,0; 1,5 мл стандартного розчину кофеїну. Розчинник (воду) відганяють на водяній бані досуха, що визначають візуально. До сухого залишку кофеїну послідовно додають 1,0 мл розчину соляної кислоти, змиваючи кофеїн на дно чашки, і 0,2 мл розчину пероксиду водню. Вміст чашки перемішують обертальним рухом, витримують 20 хв за кімнатної температури і нагрівають на киплячій водяній бані до одержання сухого забарвленого залишку тетраметилпурпурової кислоти. Готуючи водний розчин до сухого залишку, охолодженого до кімнатної температури, приливають від 5 до 10 мл дистильованої води і залишають до його повного розчинення. Одержаний розчин пурпурового кольору кількісно переносять у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину в колбі з дистильованою водою до позначки. Вимірюють оптичну щільність цих розчинів на колориметрі за довжини хвилі (540 + 10) нм у кюветах з робочою довжиною 30 мм відносно до води. Будують графік залежності оптичної щільності розчину від концентрації кофеїну $D = f(c)$,

вкладаючи на осі абсцис значення концентрацій кофеїну, а на осі ординат — відповідні значення оптичної щільності.

3. Методика проведення аналізу. У ділильну лійку місткістю 25 мл послідовно вносять від 10 мл до 15 мл хлороформу, 2 мл розчину кави для випробовування і 0,5 мл розчину гідроксиду калію. Закривають лійку притертою пробкою і екстрагують, обережно багаторазово перемішуючи вміст лійки, протягом однієї хвилини. Після розшарування суміші нижній хлороформний шар переносять у випарну чашку. Хлороформ відганяють на водяній бані досуха, що визначають візуально. Примітка. Не дозволено попадання верхнього забарвленого водяного шару в нижній хлороформний шар. До сухого залишку, який містить кофеїн, послідовно додають 1,0 мл розчину хлоридної кислоти, змиваючи залишок з дна чашки і 0,2 мл розчину гідроген пероксиду. Вміст чашки перемішують обертальним рухом, витримують 20 хв за температури навколишнього середовища, потім нагрівають на киплячій водяній бані до одержання сухого забарвленого залишку ТМПК.

Для приготування водного розчину ТМПК до сухого залишку в охолоджену до температури навколишнього середовища чашку доливають від 5 мл до 10 мл дистильованої води і залишають до його повного розчинення. Одержаний розчин пурпурового кольору кількісно переносять у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки. Оптичну щільність одержаного розчину вимірюють на колориметрі, проти холостого розчину. В якості холостого розчину використовують бідистильовану воду. Для вимірювань використовують кювети з товщиною світлопоглинаючого шару 3 см. Вимірювання проводять за довжини хвилі 540 нм. Оптична щільність розчину, який досліджують, не змінюється протягом 20 хв.

Правила опрацювання результатів. Масову частку кофеїну $X, \%$ в перерахуванні на суху речовину, обчислюють за формулою:

$$X, \% = \frac{1,03c \cdot V_{\phi} \cdot V}{m \cdot V_e \cdot 10^6}$$

де 1,03— коефіцієнт, який враховує повноту вилучення кофеїну хлороформом на першому етапі екстрагування;

c — концентрація кофеїну, знайдена за градувальним графіком, мкг/см³;

$V_{\phi} = 25$ — об'єм розчину ТМПК, що фотометрується, який одержали в результаті гідролітичного окислення кофеїну, см³;

$V = 250$ — об'єм розчину кави для вимірювання, см³;

10^6 — коефіцієнт переведення 1 мкг в 1 г;

V_e — об'єм розчину кави, який відібрали на екстрагування, см³;

m — маса наважки розчинної кави, г;

Результати оформлюють у вигляді таблиці.

Контрольні запитання:

1. Напишіть схему мурексидної реакції на прикладі кофеїну.
2. Як проводиться пробопідготовка для фотометричного визначення кофеїну?
3. Чому в якості розчинника використано хлороформ?
4. Яке значення має кількісне визначення кофеїну?

Висновки до розділу 3

Досліджено умови фотометричного визначення кофеїну у вигляді тетраметилпурпурової кислоти. Досліджувався вплив рН, концентрації гідроген пероксиду та часу реакції на повноту утворення забарвленого продукту гідролітичного окиснення кофеїну — тетраметилпурпурової кислоти.

Дослідження впливу рН на повноту протікання реакції показало, що повнота утворення ТМПК була найбільшою при використанні в якості реактиву розчину хлоридної кислоти з рН -0,48. Це відповідає концентрації хлоридної кислоти, що зазначена в [9].

Визначення впливу концентрації гідроген пероксиду на повноту протікання реакції гідролітичного окиснення кофеїну пероксидом водню в кислому середовищі показало, що повнота утворення ТМПК була найбільшою при використанні в якості реактиву розчину гідроген пероксиду з діапазоном концентрацій від 7% до 15%. Це дає змогу використовувати розчини гідроген пероксиду з меншою концентрацією.

Дослідження впливу часу на повноту утворення тетраметилпурпурової кислоти показало, що оптимальний час реакції становить 20 хв. Це відповідає часу, зазначеному в [ДСТУ 4102-2002.]

Проведено визначення кофеїну в зразках розчинної сублімованої кави. Аналіз показав, що метод градувального графіку є добре відтворюваним, у порівнянні з [ДСТУ 4394:2005], в якому використано метод визначення концентрації кофеїну за допомогою стехіометричного коефіцієнту.

Оптимальні умови утворення ТМПК, встановлені під час проходження виробничої практики були апробовані в межах лабораторного курсу «Прикладні аспекти хімії». Модифікована методика спектрофотометричного визначення кофеїну у вигляді ТМПК у сублімованій каві та кавових напоях у виконанні студентів магістратури показали достатньо високу відтворюваність після внесення змін автором у стандартну методику ДСТУ.

ВИСНОВКИ

Проаналізувавши наукову літературу було визначено теоретичні аспекти різних методів визначення кофеїну в різних об'єктах. І достатньо добре розглянута специфіка спектрофотометричних методів визначення кофеїну.

В якості джерел використано книжки, періодичні видання, статті в електронних джерелах, таких як PubChem, PubMed, ACS Publication, ScienceDirect. При використанні електронних джерел, було взято до уваги такий показник, як кількість цитувань.

Експериментально проаналізовано основні параметри проведення реакції гідролітичного окиснення кофеїну в кислому середовищі з утворенням тетраметилпурпурової кислоти згідно стандартної методики, приведеної в [дсту].

Експериментально перевірено вплив зміни часу, показника рН та концентрації окисника на повноту протікання реакції утворення тетраметилпурпурової кислоти, з метою поліпшення відтворюваності методики.

Використано досліджувану методику для визначення кофеїну у реальних об'єктах. Визначено вміст кофеїну в сублімованій каві 5 популярних виробників.

Розроблено методичний комплект для впровадження в освітній процес курсу «Прикладні аспекти хімії» Криворізького державного педагогічного університету. Методичний комплект складається з двох лабораторних занять, в яких присутній якісний і кількісний аналіз кофеїновмісних реальних об'єктів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Беликов В. Г. Фармацевтическая химия / Виктор Григорьевич Беликов. – Москва: МЕДпресс, 2007. – 624 с.
2. Белова А. В. Руководство к практическим занятиям по токсикологической химии / Анастасия Викторовна Белова. – Москва: Медицина, 1976. – 232 с.
3. Блинова К. Ф. Ботанико-фармакогностический словарь / К. Ф. Блинова, Г. П. Яковлев. – Москва: Высшая школа, 1990. – 60 с.
4. Васильев В. П. Аналитическая химия / Виктор Петрович Васильев. – Москва: Высшая школа, 1989. – 375 с. – (1989).
5. Гринкевич Н. И. Химический анализ лекарственных растений / Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. – Москва: Высшая школа, 1990. – 188 с.
6. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: PIPER, 2001. – 531 с.
7. Дорохова Е. Н. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа / Е. Н. Дорохова, Г. В. Прохорова. – Москва: Высшая школа, 1999. – 400 с.
8. Золотов Ю. А. Основы аналитической химии / Ю. А. Золотов, Б. Н. Дорохова, В. И. Фадеева. – Москва: Высшая школа, 2000. – 383 с.
9. Кавопродукти. Методи визначання масової частки кофеїну. (ISO 4052-83):ДСТУ 4102-2002. [чинний від 2002-03-03]. К.: Держспоживстандарт України, 2002. — 31 с.
10. Кретович В. Л. Биохимия растений / В. Л. Кретович. – Москва: Высшая школа, 1986. – 503 с.
11. Машковский М. Д. Лекарства XX века / Михаил Давыдович Машковский. – Москва: Издательство Новая волна, 1998. – 320 с.

12. Набиванець Б. Й. Аналітична хімія природного середовища / Б. Й. Набиванець, В. В. Сухан, Л. В. Калабіна. – Київ: Либідь, 1996. – 280 с.
13. Орехов А. П. Химия алкалоидов / Александр Павлович Орехов. – Москва: АН СССР, 1955. – 600 с. – (2).
14. Племенников В. В. Введение в химию природных соединений / Виктор Викторович Племенников. – Казань, 2001. – 242 с.
15. Швайкова М. Д. Токсикологическая химия / М. Д. Швайкова. – Москва: Медицина, 1975. – 357 с.
16. Abbaspour A. Simultaneous determination of phenytoin, barbital and caffeine in pharmaceuticals by absorption (zero-order) UV spectra [Електронний ресурс] / Abbaspour // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2005. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925242>.
17. Atomssa T. Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using uv-visible spectrometer [Електронний ресурс] / Т. Atomssa // African Journal of Pure and Applied Chemistry. – 2011. – Режим доступу: <http://www.academicjournals.org/AJPAC>.
18. Bamidele Martin W. Ultra-violet Spectrophotometric Determination of Caffeine in Soft and Energy Drinks [Електронний ресурс] / Bamidele Martin // Advance Journal of Food Science and Technology. – 2005. – Режим доступу: doi: 10.1016/j.ab.2005.03.007
19. Bharate S. S. Spectrophotometric and chromatographic determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pure and tablet dosage form [Електронний ресурс] / S. S. Bharate, S. B. Bharate // Journal of Advanced Scientific Research. – 2012. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600288>.
20. Bhawani A. Spectrophotometric Analysis of Caffeine [Електронний ресурс] / A. Bhawani, S. Siong Fong, M. Nasir. – 2015. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4641934/#!po=2.17391>.

21. Christophe B. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review [Электронный ресурс] / Bernard Christophe // Front Psychiatry. – 2017. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445139/#_ffn_sectitle.
22. Ferreyra C. F. Simultaneous spectrophotometric determination of phenilpropranolamine HCL, caffeine and diazepam in tablets [Электронный ресурс] / C. F. Ferreyra, C. S. Ortiz // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2002. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093513>.
23. Groisser D. S. A study of caffeine in tea. I. A new spectrophotometric micro-method. II. Concentration of caffeine in various strengths, brands, blends, and types of teas [Электронный ресурс] / Groisser // American Journal of Clinical Nutrition.. – 1978. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/707326>.
24. He K. Determination of Caffeine and Its Metabolites in Wastewater Treatment Plants Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. [Электронный ресурс] / К. He, О. Yasuhiro // Analytical Sciences. – 2018. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29526904?dopt=AbstractPlus>.
25. Lewis H. Determination of caffeine in tea by high-performance liquid chromatography and a modified digestion procedure. [Электронный ресурс] / H. Lewis, E. De la Teja, M. Dulitzky. – 2002. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6530446>.
26. Luiz A. Chemical Analysis of Caffeine Content in Tea and Coffee Samples [Электронный ресурс] / A. Luiz, T. Varkey // Asian Journal of Science and Applied Technology – Режим доступа: www.trp.org.in.
27. Martini D. Coffee Consumption and Oxidative Stress: A Review of Human Intervention Studies. Molecules. [Электронный ресурс] / D. Martini, С. Во,

M. Tassotti. – 2011. – Режим доступа: <http://doi.org/10.3390%2Fmolecules21080979>.

28. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer [Электронный ресурс] / A. Belay, K. Ture, M. Redi, A. Asfaw // Food Chemistry. – 2008. – Режим доступа: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.foodchem.2007.10.024>.

29. Nehlig A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data [Электронный ресурс] / Nehlig // Neurosci Biobehav Rev. – 1999. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073894>.

30. Pelozo M. I. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine [Электронный ресурс] / M. I. Pelozo, J. C. Palazzo de Mello // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2008. – Режим доступа: <https://dx.doi.org/10.1590%2Fs1516-89132008000300002>.

31. Phan T. T. Determination of caffeine contents of coffee brands in the Vietnamese market [Электронный ресурс] / T. T. Phan, V. Kuban, S. Красмар // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2012. – Режим доступа: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.foodchem.2006.07.035>.

32. Rieg T. Adenosine A1 receptors determine effects of caffeine on total fluid intake but not caffeine appetite [Электронный ресурс] / T. Rieg, J. Schnermann, V. Vallon. – 2007. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126319>.

33. Sena M. M. N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine [Электронный ресурс] / M. M. Sena, R. J. Poppi // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738916>.

34. Stephenson P. E. Physiologic and psychotropic effects of caffeine on man. [Электронный ресурс] / Stephenson // Am Diet Assoc. – 2007. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/328554>.

35. Tanaka E. Simultaneous determination of caffeine and its primary demethylated metabolites in human plasma [Электронный ресурс] / Tanaka // J Chromatogr. – 1992. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629311>.

36. Van der Meer C. Determination of caffeine [Электронный ресурс] / Van der Meer. – 1999. – Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700816606?via%3Dihub>.

37. Verenitch S. S. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry [Электронный ресурс] / S. S. Verenitch, S. J. Lowe // Journal of Chromatography. – 2006. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545821>.

Yisak H. New fluorescence spectroscopic method for the simultaneous determination of alkaloids in aqueous extract of green coffee beans [Электронный ресурс] / H. Yisak, M. Redi-Abshiro // Department of Environmental Health, National Institute of Public Health. – 2018. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5945572/#!po=98.0769>