

УДК 547.857.4.01(045)

**МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ:  
ТЕОРЕТИЧНИЙ АСПЕКТ**

**Дудченко Олена**

**Науковий керівник: доктор пед. наук, доцент Плющ В.М.**

*Центральноукраїнський державний педагогічний університет імені  
Володимира Винниченка, м. Кропивницький, Україна*

*У статті охарактеризовано властивості та фізіологічну дію кофеїну на організм людини в залежності від дози споживання, індивідуальної сприйнятливості до кофеїну та існуючими медичними або психіатричними станами. Визначено особливості метаболізму в залежності від віку та узагальнено результати досліджень, що стосуються хімічних та фізико-хімічних методів кількісного визначення вмісту кофеїну в різних видах сировини, обґрунтовано переваги фотометричних методів.*

*Ключові слова: кофеїн, методи кількісного визначення, метаболізм кофеїну, спектрофотометрія, високоефективна рідинна хроматографія.*

**Methods for quantitative determination of caffeine: theoretical aspect**

**Dudchenko Olena**

**Scientific supervisor: Doctor of Pedagogical Sciences, Docent Plyushch V. M.**

*Volodymyr Vynnychenko Central Ukrainian State Pedagogical University, Kropyvnytskyi, Ukraine.*

*The article describes the properties and physiological effects of caffeine on the human body depending on the dose of consumption, individual susceptibility to caffeine and existing medical or psychiatric conditions. The features of metabolism depending on age are determined and the results of studies related to chemical and physicochemical methods for the quantitative determination of the content of caffeine in various types of raw materials are summarized, the advantages of photometric methods are substantiated.*

*Key words: caffeine, quantification methods, caffeine metabolism, spectrophotometry, high performance liquid chromatography.*

**Постановка проблеми.** Кофеїн (теїн, матеїн, гуаранін) представник групи пуринових алкалоїдів, похідних ксантину. Майже всі алкалоїди мають високу біологічну активність (фізіологічно і фармакологічно дуже активні речовини, часом отруйні або діють як наркотичні речовини). Вивченню різних

аспектів дії кофеїну на організм присвячено велика кількість досліджень, виконаних на біологічному, біохімічному, фізико-хімічному, генетичному та медичному рівнях. Разом з тим багато питань багато питань, пов'язаних з біохімією кофеїну залишаються нез'ясованими, часом суперечливими, що визначає необхідність їх подальшого вивчення. З урахуванням залежності дози кофеїну на терапевтичний ефект актуальною залишається проблема визначення кількісного вмісту кофеїну у різній сировині.

**Аналіз досліджень і публікацій.** Дослідженням впливу кофеїну на різні організми, виявленням його фізіологічної ролі та механізмів дії займалися вітчизняні (Д. Веселков, О. Веселков, А. Водовозов, Д. Девис, М. Гришин, Н. Гусев, О. Немерешина, Ю. Сиволап) та зарубіжні (А. Belay, М. Cornelis, Н. Lewis, А. Nehlig, V. Perera) вчені.

**Мета статті:** здійснити аналіз хімічних та фізико-хімічних методів кількісного визначення вмісту кофеїну в різних видах сировини та обґрунтувати їх переваги.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Кофеїн або 1,3,7-триметилксантин – кристалічна, безбарвна кристалічна речовина, кристали якої мають вигляд голок. Він впливає на процеси функціонування білків, включаючи рецептори та ферменти, нуклеїнових кислот і мембран, він має множинну дію на живі системи, включаючи людський організм.

Кофеїн володіє психостимулюючими властивостями. Вважається, що у здорової людини кофеїн стимулює когнітивні здібності та бореться зі втомою. Ці властивості можуть призводити до симптоматичного дистресу у невеликої частини населення. Сприйнятливість до кофеїну багато в чому визначається трьома факторами: дозою споживання, індивідуальною сприйнятливістю до кофеїну та існуючими медичними або психіатричними станами (афективні розлади, зокрема), які можуть посилюватись помірним використанням психостимуляторів. Передбачається, що споживання кави (основного джерела кофеїну у світі) обернено корелює з цукровим діабетом, деякими видами раку і, можливо, хворобою Альцгеймера. З іншого боку, кава може підвищити рівень

холестерину у крові. Кофеїн має стимулюючу дію на центральну нервову систему, серце, скелетні м'язи та секрецію шлункового соку, підвищує діурез.

Існує декілька гіпотез, що пояснюють механізми різноманітних ефектів впливу кофеїну на організм. До його найбільш важливих ефектів відносяться: блокада аденозинових рецепторів; інгібування ферменту фосфодіестерази; індукція транспорту внутрішньоклітинного кальцію.

Абсорбція кофеїну завершується через 45 хвилин, а рівень кофеїну в крові досягає піку через 15 хв – 2 години після прийому [8]. Він насичує всі тканини та рідини, у тому числі грудне молоко. Максимально дози для дорослих: разова 0,3 г, добова – 1 г. Кофеїн поширюється по всьому організму та проникає через гематоенцефалічний бар'єр. Метаболізується кофеїн у печінці цитохромами сімейства P-450 (CYP), зокрема CYP1A2. Основними метаболітами кофеїну є параксантин і, у менших кількостях, теофілін та теобромін, які далі метаболізуються в сечову кислоту і, зрештою, виводяться із сечею. Період напіввиведення у дорослих зазвичай становить 2,5 – 4,5 год, але в різних людей може змінюватись [8]. У новонароджених здатність засвоювати кофеїн дуже обмежена, тому період напіввиведення становить близько 80 годин, після 5-6 місяців ця здатність стабілізується. Куріння значно прискорює метаболізм кофеїну, скорочуючи період напіввиведення до 50%. Під час вагітності метаболізм кофеїну значно знижується, особливо у третьому триместрі, тоді період напіввиведення сягає 15 годин.

Активність ферментів, що метаболізують кофеїн, може частково передаватися у спадок [9]. Наприклад, зміни в гені, що кодує CYP1A2, пов'язані з підвищеним рівнем кофеїну в плазмі та нижчим ставленням параксантину до кофеїну, тобто з повільнішим метаболізмом [5]. Таким чином, люди з генетично детермінованим повільним метаболізмом кофеїну споживають значно менше [4].

Препарати, які містять кофеїн, застосовують в медицині при різних захворюваннях та отруєннях, які супроводжуються пригніченням функцій центральної нервової та серцево-судинної систем, при спазмах судин головного

мозку, для підвищення психічної та фізичної працездатності. Крім лікарських препаратів, кофеїн є складовою частиною продуктів харчування (наприклад: чорний, зелений чай, кава, какао, кола, енергетичні напої та інші). Кофеїн також входить до складу листя падуба («єрба-мате») та ягід гуарани (синтезується рослинами для захисту від комах). У чаї кофеїну міститься більше, ніж у каві, але ефект від нього більш м'який. Це пов'язано з тим, що кофеїн у чаї взаємодіє з таніном і утворює теїн чи таннат кофеїну. Теїн надає чаю гіркоти та створює тонізуючу дію на організм, покращує розумову працездатність, підвищує активність, стимулює роботу серцево-судинної та центральної нервової системи. Різні сорти чаю містять різний відсоток кофеїну, середньому від 1 до 4 %, міцні сорти чаю містять до 5 % кофеїну. Таннат кофеїну виводиться швидше з організму, ніж чистий алкалоїд, що унеможлиблює отруєння кофеїном при частому вживанні чаю. В елітних сортах чаю його більше, менше у зеленому чаї. Разом з тим існують дані про те, що теїн, утворюючись у чайних листках у процесі росту та розвитку рослин, у великих кількостях міститься у якісних сортах зеленого чаю молодого збору. Однак є дані про те, що кофеїн не визначає міцність чаю. Наприклад, в цейлонському чаї кофеїну міститься значно менше, ніж у китайських чаях. Крім теїну чай містить незначні кількості, приблизно 0,5 % від ваги сухого чайного листка, інших алкалоїдів: теоброміну і теофіліну, які мають судинорозширювальну та сечогінну дію та гуанін, який при тривалому підігріванні або тривалому стоянні завареного чаю може перетворюватися на гуанідин, що має токсичні властивості [1].

Методи кількісного визначення пуринових алкалоїдів можуть бути різноманітні та визначаються їх хімічними властивостями. Оскільки всі ці алкалоїди є слабкими органічними основами (константи дисоціації їх лежать у межах 7-9 – 10-14), визначення їх методом нейтралізації у водному середовищі утруднено. Тому, для визначення кофеїну використовують метод ацидиметрії - неводного титрування хлорною кислотою в середовищі протонного розчинника. 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 за зміною забарвлення кристалічного фіолетового (поява жовтого забарвлення) [2].

Наступним хімічним методом кількісного визначення кофеїну є йодометричне титрування, що засноване на кількісному осадженні кофеїну в формі його періодату в середовищі сульфатної кислоти розчином йоду в калій йодиді, з подальшим руйнуванням цієї сполуки етанолом. Йод, що виділився, титрують розчином натрію тіосульфату з додаванням в якості індикатора крохмалю в кінці титрування.

Також кофеїн, теобромін і теофілін можна кількісно визначити за надлишком церій (IV) сульфату (цериметрія). Кофеїн, який використовують як титрант, який при нагріванні окислює їх в кислому середовищі до утворення алоксану. Надлишок церій (IV) сульфату встановлюють йодометричним методом після додавання 10% розчину йодиду калію та хлороформу. В якості титранту використовують натрію тіосульфат.

Варто наголосити, що наразі для кількісного визначення кофеїну здебільшого застосовують різноманітні фізико-хімічні методи аналізу, а саме фотолюмінесцентні, спектроскопічні методи, вольтамперометрію та високоефективну рідинну хроматографію.

Спектрофотометричні методи визначення кофеїну, можна розділити на методи, що базуються на визначенні поглинання безпосередньо кофеїну в УФ-діапазоні, 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-діапазоні, 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

кварцову або пластикову кювету, та вимірюють поглинання в УФ-діапазоні 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 (ди-, три-, тетрахлорметан), етилацетат, бензен. Розчинність кофеїну в цих речовинах перевищує розчинність у воді, що дозволяє екстрагувати кофеїн з водного розчину в органічну фазу. Пік поглинання кофеїну в УФ-діапазоні відрізняється, в залежності від природи розчинника [7].

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 і вимірі оптичної щільності тетраметилпурпурової кислоти при довжині хвилі 540 нм. Визначення вмісту кофеїну проводять за калібрувальним графіком [3].

Метод високоефективної рідинної хроматографії дозволяє швидко та з високою точністю визначати вміст кофеїну у складних сумішах. Водні екстракти проб, що містять кофеїн та інші розчинні у воді речовини, аналізують без пробопідготовки. Метод визначення кофеїну за допомогою високоефективної рідинної хроматографії 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 Нуперсіл ODS C18, заповнені силікагелем з октадецильною групою. Ідентифікують кофеїн порівнянням часу утримування на хроматограмах стандартних розчинів і аналізованих проб. 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 концентрацій, що можна визначити становить 0,1-10% [6].

Заслуговує на увагу мас-спектрометричне визначення кофеїну. Метод дозволяє швидко аналізувати складні суміші без попереднього розділення, з використанням простої процедури пробопідготовки [10]. 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.

Використання хроматографічних, спектроскопічних, електрохімічних методів дає можливість визначати кількісний вміст кофеїну з високою точністю, чутливістю та селективністю.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Таким чином, на основі аналізу наукової літератури визначено теоретичні аспекти різних методів визначення кофеїну та з'ясовано, що використання фізико-мімічних методів кількісного визначення кофеїну має ряд переваг у порівнянні з хімічними. А саме, є менш затратними, відносно простими, не потребують пробопідготовки, дозволяють досліджувати вміст кофеїну у складних сумішах та забезпечують достатню точність і відтворюваність. Широкий спектр фізіологічного впливу на організм людини обумовлюють актуальність і необхідність подальших досліджень окресленої теми.

#### **Список використаної літератури**

1. Афонина С.Н. Химические компоненты чая и их влияние на организм /Афонина С. Н., Лебедева Е. Н. Успехи современного естествознания. – 2016. – № 6. – С. 59–63. URL: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=35966>
2. Белова А. В. Руководство к практическим занятиям по токсикологической химии. – М: Медицина, 1976. – 232 с.
3. Кавапродукти. Методи визначання масової частки кофеїну. (ISO 4052-83): ДСТУ 4102-2002. К.: Держспоживстандарт України, 2002. – 31 с.
4. Cornelis M.C. Genome-wide meta-analysis identifies six novel loci associated with habitual coffee consumption / Cornelis M.C., Byrne E.M., Esko T., et al. Mol Psychiatry 2015. – № 20. P. 647.
5. Cornelis M.C. Genome-wide association study of caffeine metabolites provides new insights to caffeine metabolism and dietary caffeine-consumption behavior / M. Cornelis, T. Kasprowski, C. Menni, et al. Hum Mol Genet 2016;25:5472-82.

6. Lewis H. Determination of caffeine in tea by high-performance liquid chromatography and a modified digestion procedure / H. Lewis, E. De la Teja, M. Dulitzky. – 2002. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6530446>.

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

8. Nehlig A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. Pharmacol Rev 2018;70:384-411.

9. Perera V. Influence of environmental and genetic factors on CYP1A2 activity in individuals of South Asian and European ancestry / Perera V, Gross AS, McLachlan AJ.. Clin Pharmacol Ther 2012;92:511-9.

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