

РАЗДЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА И УГЛЕВОДОВ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ НАПИТКАХ

Я.И. Коренман¹, А.А. Бычкова¹, О.А. Кривошеева¹, Н.Я. Мокшина²

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий,
кафедра физической и аналитической химии
394036, Воронеж, пр. Революции, 19

²Военный авиационный инженерный университет,
кафедра физики и химии
394064 Воронеж, ул. Старых большевиков, 54 а
moksнад@mail.ru

Поступила в редакцию 4 июня 2012 г., после исправления – 30 августа 2012 г.

Для раздельного определения кофеина и углеводов (фруктоза, глюкоза, сахароза) в энергетических напитках применены методы УФ-спектрофотометрии и потенциометрического титрования с предварительным экстракционным извлечением аналитов смесями органических растворителей. Методом «введено-найденно» установлено, что погрешность определения кофеина и углеводов в напитках не превышает 5 %.

Ключевые слова: кофеин, углеводы, экстракция, потенциометрическое титрование, УФ-спектрофотометрия.

Коренман Яков Израильевич – заслуженный деятель науки и техники РФ, доктор химических наук, профессор кафедры физической и аналитической химии Воронежского государственного университета инженерных технологий.

Область научных интересов – экстракция и сорбция органических соединений, физико-химические методы анализа концентратов.

Опубликовано более 2500 научных работ, в том числе 170 патентов.

Мокшина Надежда Яковлевна – доктор химических наук, профессор кафедры физики и химии Воронежского военного авиационного инженерного университета.

Область научных интересов – экстракция биологически активных веществ и физико-химические методы их определения.

Опубликовано около 300 научных работ и 12 патентов.

Бычкова Анна Александровна – аспирант третьего года обучения кафедры физической и аналитической химии Воронежского государственного университета инженерных технологий.

Область научных интересов – экстракция углеводов с последующим определением в изоляте физико-химическими методами с целью анализа пищевых продуктов.

Опубликована 4 статьи и 1 патент.

Кривошеева Олеся Александровна - аспирант второго года обучения кафедры физической и аналитической химии Воронежского государственного университета инженерных технологий.

Область научных интересов – экстракция пуриновых алкалоидов и разработка способов их количественного определения в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах.

Опубликовано 3 статьи, получены положительные решения по трем заявкам в Роспатент.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы заметное распространение получили алкогольные и безалкогольные энергетические напитки. В их состав входят витамины, аминокислоты, углеводы, а также кофеин, обеспечивающий тонизирующий эффект. Кофеин (1,3,7-триметилпурин-2,6-дион) – пуриновый ал-

калоид, применяется в медицине как стимулятор центральной нервной системы: ускоряет обмен веществ, усиливает кровообращение, мышечную активность, снижает утомляемость и боль. В то же время кофеин оказывает на организм человека и отрицательное влияние. По данным спортивных врачей и диетологов, добавление кофеина в энергетические напитки усиливает усвоение углеводов

(фруктозы, глюкозы, сахарозы) из кишечника на 26 %. Кофеин и углеводы в сочетании способствуют негативному воздействию алкоголя на мозг. При сильных физических нагрузках, когда организм функционирует на пределе возможностей, кофеин-алкогольная дегидратация может привести к летальному исходу [1].

Содержание кофеина и углеводов в продуктах спортивного питания и энергетических напитках строго регламентируется, поскольку максимальный эффект от их применения достигается при определенной концентрации компонентов, в том числе кофеина и углеводов. В связи с распространяющейся фальсификацией продуктов пищевой и фармацевтической промышленности актуальность приобретает разработка надежных и легко выполнимых методик раздельного определения компонентов и установления подлинности напитков. Количественное определение углеводов в энергетических напитках затруднено присутствием в их составе кофеина.

Известны многочисленные сведения о хроматографических методиках разделения и определения кофеина и углеводов [2]. Одновременное определение кофеина и углеводов в пробе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии затруднено различием условий хроматографирования соединений разных классов. В связи с этим предлагается методика предварительного извлечения отдельных компонентов из анализируемого напитка.

Цель исследования состоит в разработке методик раздельного определения кофеина и углеводов в энергетических напитках на уровне $0.05 \cdot 10^{-3}$ - $40 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ и $0.05 \cdot 10^{-3}$ - $20 \cdot 10^{-1}$ моль/дм³ соответственно (согласно ГОСТ 30059-93) с предварительной экстракцией бинарными смесями гидрофильных и гидрофобных растворителей. Кофеин в экстракте определяли УФ-спектрофотометрически, углеводы – методом потенциометрического титрования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика экстракции. Кофеин, содержащийся в напитках, экстрагировали смесью хлороформ–этилацетат, взятых в объемном соотношении 0.8 : 0.2 мол. доли; углеводы – смесью двух гидрофильных растворителей (изопропиловый спирт – этилацетат) в таком же соотношении. В пробу анализируемого напитка до экстракции вводили высаливатель практически до насыщения. Высаливание – распространенный прием повышения количественных характеристик экстракции [3]. При снижении молекулярной массы гидрофильных растворителей возрастает их растворимость в воде, образование двухфазной системы становится практически невозможным. Обязательное условие экстракции такими растворителями – насыщение анализируемого водного раствора электролитом,

понижающим растворимость извлекаемого вещества в воде и обеспечивающим расслаивание системы [4].

В качестве высаливателя нами применен сульфат аммония. Этот электролит оказывает наибольшее высаливающее действие на экстракцию кофеина и углеводов по сравнению с другими изученными солями вследствие более высокой растворимости в воде по сравнению, например, с Na_2SO_4 , NaCl или Li_2SO_4 [5]. С повышением растворимости соли возрастает конкурирующее влияние соответствующих ионов. Это приводит к уменьшению гидратации, следовательно, растворимости экстрагируемого вещества в воде и усилению высаливающего действия [3]. Взаимная растворимость воды и экстрагента уменьшается с повышением концентрации соли, поэтому при выполнении экстрактуры сульфата аммония (~ 38 % мас.).

Изучена зависимость эффективности экстракции кофеина и углеводов от pH водно-солевого раствора. Установлено, что изoeлектрическая точка находится в интервале pH = 4.2÷4.5. Дополнительное подкисление не требуется, так как необходимое значение pH достигается введением сульфата аммония.

Методика определения кофеина. К 10 см³ анализируемого напитка добавляли высаливатель до получения насыщенного раствора и 2 см³ смеси хлороформ–этилацетат. Экстрагировали на вибросмесителе, в течение 5-7 мин устанавливается межфазное равновесие, раствор оставляли на 3-5 мин для расслаивания системы.

К 1 см³ органического концентрата добавляли 24 см³ дистиллированной воды, измеряли оптическую плотность (A) полученного раствора на спектрофотометре SHIMADZU UV MINI-1240 при длине светопоглощающего слоя 1 см; максимум поглощения находится при 272 нм. Раствор сравнения: смесь хлороформ–этилацетат (0.8 : 0.2 мол. доли). По градуировочному графику $y = 0.4825X + 0.0133$, построенному в координатах «Оптическая плотность – Концентрация раствора кофеина», находили концентрацию кофеина в экстракте.

Содержание кофеина в экстракте (X, мкг/см³) рассчитывали по формуле [6]:

$$X = \frac{1.05 \cdot 25 \cdot A}{2000} \cdot 194.2,$$

где 1.05 – коэффициент, учитывающий потери кофеина при экстракции; 25 – кратность разбавления экстракта водой; 2000 – молярный коэффициент светопоглощения (установлен по градуировочному графику с погрешностью не более 2 %); 194.2 – молярная масса кофеина, г/моль.

Методика определения углеводов. После извлечения кофеина к 10 см³ анализируемого напитка добавляли 1 см³ смеси изопропиловый спирт–этилацетат и экстрагировали 5-7 мин. После расслаивания системы экстракт разбавляли

в 10 раз изопропиловым спиртом и количественно переносили в ячейку для потенциометрического титрования. Титровали 0.1 моль/дм³ раствором борной кислоты [7] в безводном изопропиловом спирте. Потенциометрические измерения проводили в стандартной ячейке с платиновым и хлоридсеребряным электродами, отстоящими друг от друга на 1 см. Содержание углеводов в экстракте (Q, г) рассчитывали по формуле [6]:

$$Q = 1.05 \cdot 0.1 \cdot V \cdot M \cdot 100,$$

где 1.05 – коэффициент, учитывающий потерю углеводов при экстракции; 0.1 – молярная концентрация титранта; V – объем титранта, затраченный на титрование, дм³; M – молярная масса углевода, г/моль; 100 – кратность разбавления концентрата изопропиловым спиртом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известны экстракционные системы для извлечения кофеина на основе октилового спирта [8], однако эффективность их невысока (степень извлечения не превышает 3–5 %). Этилацетат и хлороформ традиционно применяются для извлечения кофеина из зерен кофе и листьев чая с целью последующего получения химически чистого препарата кофеина [9].

Для извлечения органических соединений из водных сред применяются бинарные смеси растворителей, проявляющие синергизм [10]. Экстракция такими смесями часто приводит к значительному возрастанию коэффициентов распределения по сравнению с аддитивными величинами [4]. Синергетический эффект объясняется различными причинами: отклонением свойств смеси растворителей от законов Рауля, изменением степени ассоциации одного из компонентов смеси, взаимодействием растворителей друг с другом, образованием комплексов распределяемого вещества с обоими компонентами смеси растворителей.

Изучена экстракция кофеина из водно-солевых растворов смесью хлороформ–этилацетат с различным содержанием компонентов. Установлено, что при соотношении 0.8 мол. доли хлороформа : 0.2 мол. доли этилацетата степень извлечения кофеина максимальна (96 %).

Предварительно изучена экстракция углеводов смесями этилацетат–гидрофильный алифатический спирт C₃ – C₅ [11, 12]. Спирты относятся к ассоциированным растворителям, однако при введении в систему спирт–вода дополнительного растворителя, например этилацетата, происходит ослабление межмолекулярных водородных связей, образующихся при ассоциации спиртов. При этом усиливается сольватация моно- и дисахаридов. Экстракция сопровождается синергетическим эффектом, максимум отклонения коэффициентов распределения от аддитивности достигается при содержании этилацетата в смеси не более 0.4

мол. доли. Это указывает на снижение влияния эфира на самоассоциацию спирта при насыщении им органической фазы. Максимальные коэффициенты распределения углеводов установлены при экстракции смесью на основе изопропилового спирта, что объясняется наибольшим содержанием воды в изоляте по сравнению с экстракцией другими изученными нами спиртами. Наиболее эффективна для извлечения фруктозы система этилацетат–изопропиловый спирт в соотношении 1 : 4 (степень извлечения 81 %), для глюкозы и сахарозы – система этилацетат–изопропиловый спирт в соотношении 2 : 3 (степень извлечения 82 и 74 % соответственно).

Для анализа биологически активных веществ широко применяются электрохимические методы, имеющие известные преимущества: низкие пределы обнаружения, воспроизводимость полученных данных, точность определения, экспрессность. Электрохимические методы определения углеводов, главным образом, представлены амперометрией и вольтамперометрией с индикаторными электродами на основе металлов или графитовых материалов [13]. Известно также определение производного глюкозы сорбита методом потенциометрического титрования (титрант – борная кислота) [7]. Относительная погрешность определения 2 %, продолжительность анализа 10 мин. Сведения о применении потенциометрического титрования для количественного определения моно- и дисахаридов отсутствуют.

Нами разработана методика селективного потенциометрического титрования углеводов в неводной среде. Изучены условия анализа: выбор растворителя и электродов, природа и концентрация титранта. Титрование углеводосодержащего экстракта водным раствором борной кислоты в стандартной ячейке с ионоселективным стеклянным электродом не сопровождается заметным изменением pH экстракта. В то же время для титрования экстракта спиртовым раствором борной кислоты характерно резкое изменение электродного потенциала системы. Происходит окисление углеводов по карбонильной группе до урановых или сахариновых кислот. В качестве растворителя применяли изопропиловый спирт, входящий в состав селективного для углеводов экстрагента. Установлено, что углеводы титруются в порядке снижения их растворимости в спирте. Для выбора индикаторного электрода глюкозу титровали в водном растворе и в среде изопропилового спирта со стеклянным и платиновым электродами. Титрование углеводов с ионоселективным стеклянным электродом затруднено вследствие незначительного скачка на кривой титрования. Максимальное изменение потенциала вблизи точки стехиометричности характерно для титрования углеводов раство-

ром борной кислоты в изопропиловом спирте с применением платинового электрода в качестве индикаторного.

Методом «введено – найдено» установлено, что погрешность определения кофеина и углеводов в энергетических напитках по предлагаемым методикам не превышает 5 % (табл. 1).

Проанализированы следующие алкогольные и безалкогольные энергетические напитки, производимые в России: «Adrenaline nature» (производство ООО «Мегапак»), «Adrenaline rush» (ООО «Мегапак»), «Jaguar» (ООО «Юнатед Боттлинг групп»), «Strike» (ООО «Артисан»), «Coca-cola» (ООО «Кока-кола ЭйчБиСи Евразия»).

Содержание кофеина в напитках «Adrenaline nature», «Adrenaline rush», «Jaguar» и «Strike» по данным производителя не превышает 30 мг на 100 см³, углеводов – 12 мг на 100 см³. Установленные нами количества определяемых веществ приведены в табл. 2. В напитках найденные содержания кофеина и углеводов в общем со-

ответствуют заявленным производителями и находятся на безопасном уровне, достаточном для достижения необходимого эффекта от их применения. В изученных напитках в качестве подсластителя применяют сахарозу, гидролизующуюся в кислой среде, или глюкозно-фруктозный сироп. Невысокое содержание моносахаридов в проанализированных напитках указывает на применение при их производстве сахарозы как подсластителя.

Разработана методика, включающая экстракционное извлечение и определение кофеина спектрофотометрическим методом, углеводов – методом потенциометрического титрования. Методика легко выполнима, характеризуется точностью (табл. 2), низкими пределами обнаружения кофеина и углеводов (0.05·10⁻³ г/см³), малым расходом реактивов; экспрессностью (продолжительность анализа 40-50 мин). Методика применима для выполнения серийных анализов в производственных лабораториях пищевых предприятий.

Таблица 1

Метрологические характеристики определения кофеина и углеводов в водных растворах ($n = 3, P = 0.95$)

Аналит	Введено, мг	Найдено, мг	S	$\Delta\bar{x} = \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}}$	$\bar{x} \pm \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}}$
Кофеин	5.00	4.90	0.16	0.30	4.90 ± 0.30
	5.00	4.95	0.02	0.05	4.95 ± 0.05
Фруктоза	5.00	5.00	0.01	0.02	5.00 ± 0.02
	5.00	4.96	0.02	0.05	4.96 ± 0.05
Глюкоза	5.00	4.90	0.16	0.30	4.90 ± 0.30
	5.00	4.98	0.03	0.07	4.98 ± 0.07
Сахароза	5.00	4.90	0.16	0.30	4.90 ± 0.30
	5.00	4.95	0.02	0.05	4.95 ± 0.05

Примечания: \bar{x} – среднее найденное значение содержания теобромона; S – стандартное отклонение; Δx – доверительный интервал; $t_{p,f}$ – распределение Стьюдента; f – число степеней свободы ($f = n - 1$).

Таблица 2

Определение кофеина и углеводов в энергетических напитках ($n = 4, P = 0.95$)

Напиток	Аналит	Заявлено производителем, г/100 см ³	Найдено, г/100 см ³			
			кофеин (·10 ⁻³)	глюкоза	фруктоза	сахароза
Adrenaline nature	кофеин	30.0·10 ⁻³	30.7 ± 0.5	1.23 ± 0.06	4.26 ± 0.14	5.67 ± 0.27
	углеводы	12.40*				
Adrenaline rush	кофеин	30.0·10 ⁻³	31.4 ± 1.0	1.20 ± 0.06	2.03 ± 0.11	8.24 ± 0.36
	углеводы	12.54*				
Jaguar	кофеин	30.0·10 ⁻³	31.7 ± 1.5	0.83 ± 0.04	0.88 ± 0.05	9.52 ± 0.39
	углеводы	11.50*				
Strike	кофеин	30.0·10 ⁻³	32.8 ± 1.0	1.18 ± 0.05	1.57 ± 0.07	8.89 ± 0.38
	углеводы	11.50*				
Coca-cola	кофеин	-	9.5 ± 0.5	2.85 ± 0.13	2.91 ± 0.14	4.80 ± 0.24
	углеводы	10.60*				

Примечание: * – суммарное содержание углеводов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия: в двух томах. Пятигорск: Пятигорск. фарм. акад., 1996. Т. 2. 608 с.
2. Slimestad R., Slimestad R., Voagen I. Thermal stability of glucose and other sugar aldoses in normal phase high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1118, № 2. P. 281-284.
3. Мокшина Н.Я. Экстракция и определение ароматических α -аминокислот и водорастворимых витаминов – закономерности и новые аналитические решения. Дис. ... докт. хим. наук. Краснодар: Кубан. гос. ун-т, 2007. 328 с.
4. Суханов П.Т., Коренман Я.И., Губин А.С. Экстракция ароматических сульфокислот бинарными смесями растворителей // *Ж. физ. химии*. 2005. Т. 78, № 3. С. 548-551.
5. Коренман Я.И., Мокшина Н.Я., Зыков А.В. Экстракционное разделение и спектрофотометрическое определение витаминов группы В в бинарных смесях // *Хим. технологии*. 2010. № 5. С. 288-291.
6. Основы аналитической химии. Практическое руководство / [Под ред. Ю.А. Золотова]. М.: Высшая школа, 2001. 464 с.
7. Кислота борная. Технические условия. ГОСТ 18704-93. М.: Стандарт-информ, 1993. 33 с.
8. Коренман Я.И. Коэффициенты распределения органических соединений. Справочник. Воронеж: Воронеж. гос. ун-т, 1992. 336 с.
9. Пахомова О.А. Новые экстракционные системы для определения α -амино-кислот в водных средах. Дис. ... канд. хим. наук. Саратов: Саратов. гос. ун-т. 2007. 151 с.
10. Новый справочник химика и технолога. Основные свойства неорганических, органических и элементоорганических соединений / [Под ред. Н.К. Скворцова]. СПб.: АНО НПО «Мир и Семья», 2002. 1276 с.
11. Извлечение фруктозы из водных растворов алифатическими спиртами C_2-C_9 / Я.И. Коренман и [др.] // *Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация*. 2011. № 1. С. 44-48.
12. Закономерности экстракции глюкозы двойными и тройными смесями гидрофильных растворителей / Я.И. Коренман и [др.] // *В мире научных открытий*. 2011. № 5. С. 289-296.
13. Давлетшина Л.Н. Анодная вольтамперометрия биологически активных веществ на электродах, модифицированных гексациано-металлатами. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Казань: Казан. гос. ун-т. 2006. 26 с.

SEPARATE DEFINITION OF CAFFEINE AND CARBOHYDRATES IN POWER DRINKS

Ya.I. Korenman¹, N.Ya. Mokshina², A.A. Bychkova¹, O.A. Krivosheeva¹

¹*Voronezh State University of Engineering Technology chair of physical and analytical chemistry
394036 Voronezh, 19, pr. Revolutisii*

²*Air force engineering university physics and chemistry chair
394064 Voronezh, 54 A, Staryh Bolsheviks str.
moksнад@mail.ru*

Carbohydrates (fructose, glucose, sucrose) in power drinks are applied to separate definition of caffeine and carbohydrates UF-spektrifotometriya's methods and electrometric titration with preliminary extraction of analyzed substances by mixes of organic solvents. A method "is entered-is found" it is established that the error of definition of caffeine and carbohydrates in drinks doesn't exceed 5 %.

Keywords: caffeine, carbohydrates, extraction, electrometric titration, UF-spektrifotometry.