

Інші процедури – періодичний контроль постачальника, аналіз документів з моніторингу і т.ін. – НАССР-група може внести з огляду на особливості постачальника та власного виробництва.

Настанови, які містяться в Інструкціях, можуть слугувати вихідною позицією для встановлення процедур перевіряння. Наприклад, для перевіряння управління хімічним небезпечним чинником (НЧ) «патулін» при виробництві яблучного пюре (критична точка керування (КТК) «приймання свіжих яблук») НАССР-група повинна обов'язково внести в НАССР-план періодичного контролю готового продукту на вміст патуліну, регламентований Інструкцією про порядок санітарно-технічного контролю консервів на виробничих підприємствах, оптових базах, у роздрібній торгівлі та на підприємствах громадського харчування І 4.4.4.077-2001.

Для НАССР-групи галузеві інструкції мають бути базою та допомогою при складанні НАССР-плану та операційних програм-передумов, тому що ці документи є результатом багаторічної плідної праці науковців та практиків нашої країни, але найновіші наукові здобутки щодо автоматизації методів контролю та ін. можуть дозволити НАССР-групі переглянути можливості проведення моніторингу і, як наслідок, визначення нових КТК, не передбачених Інструкціями. Використання групою НАССР сучасних наукових знань дозволить застосовувати більш прогресивні методи управління безпечністю в процесі виробництва, використовувати нові науково обгрунтовані критичні межі.

Висновки

Встановлено, що здобутки вітчизняної санітарії та гігієни, технічного контролю можуть бути використані при розробленні, запровадженні та підтримуванні систем управління безпечністю харчових продуктів, основаних на концепції НАССР. Вимоги відповідних чинних галузевих інструкцій щодо порядку санітарно-технічного контролю, а також вимоги чинної нормативної та технологічної документації, в сучасних умовах мають бути взяті виробниками за основу для розроблення стандартних санітарних робочих процедур та елементів НАССР-планів.

Література

1. «Про безпечність та якість харчових продуктів»: Закон України від 06.09.2005р. № 2809- IV.
2. «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо підтвердження якості та безпечності харчових продуктів і продовольчої сировини»: Закон України від 08.09.2005р. № 2863- IV.
3. «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів»: Закон України від 31.05.2007р. № 1103- V.
4. ДСТУ ISO 22000:2007 «Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга». – К.: Держспоживстандарт України. – 2007. – 30 с.
5. ДСТУ – Н ISO/TS 22004:2009 «Системи управління безпечністю харчових продуктів. Настави щодо застосування ISO 22000:2005». – К.: Держспоживстандарт України. – 2010. – 13 с.
6. Інструкція про порядок санітарно-технічного контролю консервів на виробничих підприємствах, оптових базах, в роздрібній торгівлі та на підприємствах громадського харчування І 4.4.4.077-2001: Постанова Головного державного санітарного лікаря України № 140 від 07.11.2001 р.
7. Посібник для малих та середніх підприємств плодоовочевої галузі з підготовки та впровадження системи управління безпечністю харчових продуктів на основі концепції НАССР / Міжнародний інститут безпечності та якості харчових продуктів (IFSQ). – 2-ге видання. Проект Агентства США з міжнародного розвитку (USAID) «Локальні інвестиції та національна конкурентоспроможність (ЛІНК)». – Київ. – 2010. – 183 с.
8. Сборник технологических инструкций и нормативно-технических документов по производству консервов для детского питания. – М.: Агропромиздат, 1986. – 431с.

УДК 543.426; 546.661; 541.49

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ ЧАЯ

**Ливенцова Е.О., канд. хим. наук, ассистент
Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса**

Изучен эффект тушения кофеином сенсibilизированной люминесценции иона Tb(III) в сорбатах комплекса с 1,10-фенантролином и β-циклодекстрином. Найдены оптимальные условия хроматографирования кофеина. В качестве проявляющего раствора предложено использовать хлорид тербия в при-

сутствии 1,10-фенантролина и β -циклодекстрина. Установлены оптимальные условия тушения люминесценции комплексного соединения иона Tb(III) кофеином в фазе сорбента. Разработана простая и надежная методика люминесцентного определения кофеина в биологически активных добавках.

The effect of luminescence of Tb(III) ion quenching by caffeine in sorbates complex with 1,10-phenanthroline and β -cyclodextrin was studied. The optimal condition for the determination of caffeine by layer chromatography method was investigated. The terbium chloride (III) with 1,10-phenanthroline and β -cyclodextrin was proposed as an enhanced solution. The optimal condition for the quenching luminescence of Tb(III) complex in sorbent phase was investigated. The simple and reliable method of the caffeine quantitative determination in biologically active additives by the thin-layer chromatography method was developed.

Ключевые слова: тушение люминесценции тербия, кофеин, сорбция, биологически активные вещества.

Пищевые продукты являются основными поставщиками в организм человека ряда биологически активных веществ, антиоксидантов. Их недостаток в пище может быть восполнен с помощью биологически активных добавок к пище (БАД). БАД – это композиции натуральных или идентичных натуральным биологически активных веществ, предназначенных для непосредственного приема с пищей или введения в состав пищевых продуктов с целью обогащения рациона отдельными биологически активными веществами и их комплексами [1,2]. В последнее время возрос интерес к природным антиоксидантам, особый интерес среди которых представляют компоненты фенольной природы, обладающие антиоксидантным эффектом, которые являются составной частью многих растений, в том числе листьев зеленого и черного чая. Основными полифенольными компонентами чая и БАД на его основе являются галловая кислота, катехины и кофеин. Кофеин является основным тонизирующим компонентом, стимулирует умственную, физическую, психическую деятельность, оказывает влияние на сердечнососудистую и нервную системы. Степень влияния на организм зависит от доз употребляемого продукта, содержащего кофеин. В связи с этим, а также с участвовавшими случаями фальсификации продуктов и БАД возрастает потребность в быстрых и надежных методиках обнаружения и количественного определения кофеина в БАДах.

Для определения кофеина используют титриметрические [3], спектрофотометрические [4,5], хроматографические [6–8] методы, а также метод капиллярного электрофореза [9,10].

В данной работе показана возможность определения кофеина по тушению интенсивности люминесценции ($I_{\text{люм}}$) люминесцентного сенсора – комплекса Tb (III) с 1,10-фенантролином (Фен) в присутствии β -циклодекстрина (β -ЦД) в твердой фазе сорбента.

Экспериментальная часть. Хлорид тербия готовили растворением высокочистого оксида (99,98 %) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением ее избытка упариванием. Концентрацию Tb (III) устанавливали комплексонометрическим титрованием. Растворы кофеина и β -циклодекстрина готовили растворением точных навесок в дистиллированной воде. Точную навеску 1,10-фенантролина растворяли в дистиллированной воде с добавлением хлористоводородной кислоты до pH 4,5 – 5,0.

Выделение кофеина из БАД проводили следующим образом. 5 г БАД измельчали в фарфоровой ступке, точную навеску БАД (1 г) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, довели дистиллированной водой до объема 50 – 60 мл, выдерживали 1 час на водяной бане, охлаждали до комнатной температуры, довели до метки дистиллированной водой, фильтровали.

Спектры люминесценции иона Tb (III) регистрировали в области 500 – 600 нм с помощью спектрометра ИСП–51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП–1. Люминесценцию возбуждали ртутно-кварцевой лампой ДРШ–250 со светофильтром УФС–2. Все измерения проводили при комнатной температуре (19 – 21 °C). pH растворов измеряли стеклянным электродом на pH метре ОР–2Н/1 (Radelkies, Венгрия).

Результаты и их обсуждение. Для выделения кофеина из экстракта использовали метод тонкослойной хроматографии. С целью выбора оптимальных условий и режимов хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по своим свойствам (пластинки Silufol, Sorbfil, СТХ – 1А, марки Merch). Наилучшим оказалось применение хроматографических пластинок марки Merch TLC Aluminium Plates.

Подвижная фаза при хроматографировании выбрана экспериментально (табл. 1). Как видно из таблицы 1, наибольшая подвижность кофеина R_f 0,58 и 0,52 обнаруживается при использовании смесей органических растворителей бензол : метанол : уксусная кислота и этилацетат : метанол.

Таблица 1 – Влияние состава подвижной фазы на подвижность (R_f) кофеина

Подвижная фаза	R_f
Этилацетат : уксусная кислота (95:5)	0,26
Этилацетат : метанол (5:2)	0,52
н-гексан : этилацетат : этанол (50:30:8)	0,17
Бензол : метанол : уксусная кислота (10:5:1)	0,58
Хлороформ : этилацетат : муравьиная кислота (50:40:1)	0,33

Изучение влияния объема пробы, наносимого на пластинку, показало, что лучший результат достигается при нанесении пробы объемом 20 мкл. При меньших или больших количествах пробы пятна на пластинке приобретают вытянутую форму.

В качестве проявляющих использовали растворы хлорида Tb (III), 1,10-фенантролина и β -циклодекстрина. Согласно литературным данным [11], ионы Tb (III) образуют с 1,10-фенантролином комплекс с соотношением компонентов 1:2, в котором ионы Tb (III) проявляют интенсивную люминесценцию. Интенсивность люминесценции значительно возрастает в тонком слое сорбента на пластинках для ТСХ. С целью оптимизации аналитического сигнала изучено влияние поверхностно-активных веществ различной природы: Тритона X-100, Бридж-35, Твин-80, лаурилсульфата натрия, цетилпиридиний хлорида, а также β -циклодекстрина и различных растворителей на люминесцентные свойства комплекса. Установлено что ПАВ и растворители не оказывают значительного влияния на $I_{\text{люм}}$ ионов Tb (III) в данном комплексе и максимальная $I_{\text{люм}}$ наблюдается при использовании в качестве проявляющих водных растворов.

$I_{\text{люм}}$ сорбата комплекса Tb (III) – Фен в 5 – 7 раз возрастает в присутствии β -циклодекстрина. Молекулы β -циклодекстрина гидрофобны внутри и гидрофильны по «краям», что способствует образованию прочных комплексов включения с Фен типа «гость–хозяин», в которых последний выступает в качестве «гостя». Вытеснение молекул воды из внутренней сферы комплекса способствует уменьшению безызлучательных потерь энергии возбуждения и, соответственно, увеличению интенсивности люминесценции. Циклодекстрины применялись ранее в качестве подвижных фаз в ТСХ органических реагентов ксантеинового и хинолонового рядов [12].

Наибольшая интенсивность люминесценции сорбата Tb (III) обнаруживается при концентрации β -циклодекстрина $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Изучение зависимости интенсивности люминесценции сорбата от количества 1,10-фенантролина показало, что оптимальным является использование 0,05 % раствора.

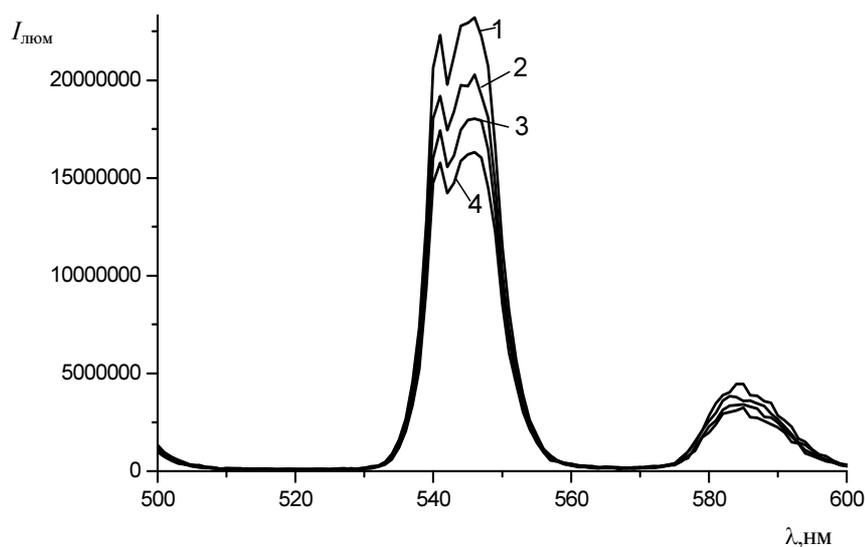
В оптимальных условиях люминесценции предлагаемого сенсора в спектре люминесценции сорбата комплекса наиболее интенсивной является полоса, соответствующая сверхчувствительному переходу ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ ($\lambda_{\text{изл}} = 545$ нм).

В присутствии кофеина наблюдается тушение $I_{\text{люм}}$ иона Tb (III) в комплексе с Фен и β -ЦД (рис. 1), а также уменьшение интенсивности спектра возбуждения. Тушение аналитического сигнала сенсора Tb (III) – Фен – β -ЦД в присутствии кофеина наблюдается на поверхности тонкого слоя сорбента в широком интервале pH 3,0 – 9,5, с максимальным тушением $I_{\text{люм}}$ при pH 6,8 – 7,0. Для создания pH раствора использовали уротропин (4 % водный раствор).

Обнаруженный эффект тушения люминесценции Tb (III) кофеином использован для определения последнего в биологически активных добавках на основе экстрактов чая.

Методика определения. Анализируемую пробу разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:10. Микрошприцем 20 мкл пробы наносят на линию старта хроматографической пластинки. Параллельно на пластинку наносят стандартный раствор кофеина, который содержит $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л кофеина, в зависимости от предполагаемого содержания в пробе. Пластинку высушивают и помещают в хроматографическую камеру в подвижную фазу (смесь бензол: метанол: уксусная кислота = 10:5:1). Когда фронт растворителя достигает высоты 70 мм, пластинку извлекают из камеры и отмечают положение фронта растворителя. Полученную хроматограмму высушивают и равномерно последовательно обрабатывают растворами хлорида тербия (III) ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л), 1,10-фенантролина (0,05 %), β -циклодекстрина ($3 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и уротропина (4 % водный раствор). После нанесения проявляющих растворов пластинку сушат и идентифицируют кофеин согласно положению пятна на хроматографической пластинке в свете ультрафиолетовой лампы с $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм. Значение R_f для кофеина составляет 0,58. В зависимости от содержания кофеина в пробе наблюдают более или менее интенсивную люминесценцию иона Tb (III) зеленого цвета.

Количественное определение кофеина проводят по градуировочному графику (рис. 2), для построения которого поступают таким образом. На пластинку наносят различные количества стандартного раствора кофеина и далее проводят хроматографирование и проявление хроматограммы, как описано выше. Затем из пластинки вырезают пятна с кофеином, помещают в кювету для твердых образцов и измеряют $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{изл}} = 545$ нм. По полученным данным строят градуировочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию кофеина, а на оси ординат – значения интенсивности люминесценции. Зависимость $I_{\text{люм}}$ сорбата от $C_{\text{кофеина}}$ линейна в интервале концентраций кофеина 0,01 – 0,8 мг/мл. Предел обнаружения кофеина составляет 0,002 мг/мл.



$C_{\text{кофеин}} = 0 \text{ моль/л (1); } 1 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л (2); } 1 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л (3); } 1 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л (4)}$

Рис. 1 – Спектры люминесценции сорбата комплекса Tb(III)–Фен– β-циклодекстрина в присутствии разных концентраций кофеина

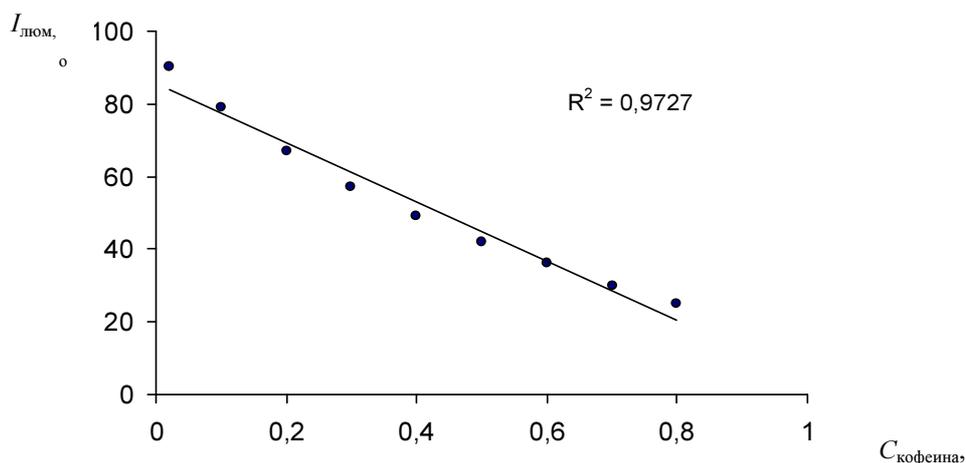


Рис. 2 – Градуировочный график для определения кофеина

Результаты определения кофеина и проверка правильности полученных результатов методом добавок приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты определения кофеина в БАД ($n = 5; P = 0,95$)

Наименование БАД	Введено, мг/100 мл	Найдено в пробе с добавкой, мг/100 мл	Найдено в пробе, мг/100мл	Sr, %
«Грацилак»	10,00	16,450±0,900	6,45	5,4
«Менопауза день-ночь»	30,00	52,300±2,500	22,30	4,9
«Алфавит эффект»	10,00	23,000±1,200	13,00	5,5
«Тианин»	40,00	78,300±3,600	38,30	4,7
«Эпигал Велес»	1,00	1,630±0,100	0,63	6,5
«Теавит»	0,01	0,020±0,002	0,01	7,0
«Сарасвати»	2,00	3,100±0,200	1,10	6,6

Точность и достоверность определения проверена путем статистической обработки результатов определения. При $n = 5$, $P = 0,95$ величина относительного стандартного отклонения составляет 4,7 – 7,0 %.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что некоторые БАД («Эпигал Велес», «Теавит», «Сарасвати») не могут рассматриваться как существенный регулярный источник кофеина. Таким образом, стандартизация БАД на основе экстрактов чая по содержанию кофеина позволяет выявить недоброкачественные продукты (фальсификаты) и оценить суточное потребление биологически активных веществ, в частности, кофеина с данным продуктом.

Выводы. Показана возможность применения эффекта тушения сенсibilизированной твердофазной люминесценции ионов Tb (III) в комплексе с 1,10-фенантролином и β -циклодекстрином в присутствии алкалоида кофеина для определения последнего в биологически активных добавках.

Литература

1. Суханов, Б.П. Биологически активные добавки к пище. Сообщ. 1 / Б.П. Суханов, М.Г. Керимова // Вопр. питания. – 2004. – № 3. – С. 31–34.
2. Биологически активные добавки в питании человека (оценка качества и безопасность, эффективность, характеристика, применение в профилактической и клинической медицине) [Текст] / В.А. Тутельян, Б.П. Суханов, А.Н. Астриевский, В.М. Позняковский // Томск: Из-во НТЛ, 1999. – 296 с.
3. Глушенко, Н.Н. Фармацевтическая химия [Текст] / Н.Н. Глушенко, Т.В. Плешнева, В.А. Попков. – М.: Академия, 2004. – 384 с.
4. ГОСТ Р 51881–2002. Кофе натуральный растворимый. Общие технические условия. – Введ. 2003–01–01. – М.: Изд-во стандартов, 2003. – 12 с.
5. Андреева, К.Ю. Спектрофотометрическое определение кофеина и теофиллина по реакции азосочетания с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония / К.Ю. Андреева, С.Г. Дмитренко, Ю.А. Золотов // Зав. лаб. Диагностика материалов. – 2010. – Т. 76, № 2. – С. 21–24
6. Новый способ определения кофеина / В.В. Хасанов, К.А. Дычко, Т.Т. Куряева и др. // Журн. прикладной химии. – 2005. – Т. 78, № 9. – С. 1451–1454.
7. Хроматографическое разделение парацетамола, кофеина и аспирина на сорбенте с привитыми нитрильными группами и анализ таблеток «АскофенП» / Т.Б. Голубецкий, Е.В. Будко, Е.М. Басова и др. // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, № 6. – С. 636–640.
8. Карцова, Л.А. Использование селективного комплексообразования катехинов с ионами Fe^{3+} при определении кофеина в чае методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / Л.А. Карцова, А.В. Алексеева // Журн. аналит. химии. 2009. – Т. 64, – № 9. – С. 954–958.
9. Карцова, Л.А. Возможности и ограничения различных режимов капиллярного электрофореза для количественного определения катехинов и кофеина в черном и зеленом чае / Л.А. Карцова, О.В. Ганжа, А.В. Алексеева // Журн. аналит. химии. 2010. – Т. 65, – № 2. – С. 212–217.
10. Анализ образцов чая с помощью мультисенсорной системы и капиллярного электрофореза / И.С. Папиева, Д.О. Кирсанов, А.В. Легин и др. // Журн. аналит. химии. 2011. – Т. 84, – № 6. – С. 940–947.
11. Химия комплексных соединений редкоземельных элементов [Текст] / К.Б. Яцимирский, Н.А. Костромина, З.А. Шека и др. – К.: «Наукова думка», 1966. – 493 с.
12. Сумина, Е.Г. Применение циклодекстриновых подвижных фаз в тонкослойной хроматографии органических реагентов ксантенового и хинолинового ряда / Е.Г. Сумина, В.В. Атаян, С.И. Штыков // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. – Т. 8, вып. 1. – С. 83–93.

УДК [602.1:53.082.9]-047.64:664-027.3

БІОСЕНСОРИ В КОНТРОЛІ ЯКОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Пилипенко Л.М., д-р техн. наук, професор, Данилова О.І., канд. хім. наук, ст. наук. співр.,
Пилипенко І.В., канд. техн. наук, доцент, Гайдукевич Д.К., наук. співр.
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Розроблена композиція для отримання біосенсорів шляхом іммобілізації рослинних тканин, субклітинних структур або мікроорганізмів (наприклад, хлоропластів). Запропонована біосенсорна детекція токсичних контамінантів різної хімічної природи у харчових продуктах.