

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. Каразіна

Кафедра хімічної метрології

УДК 543.544

До захисту допускаю 
завідувач кафедри хімічної метрології

д.х.н., проф. Олег ЮРЧЕНКО

«15» травня 2024 року

**ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ. ЇЇ МІСЦЕ
ТА РОЛЬ В РОЗДІЛЕННІ ТА ВИДІЛЕННІ РЕЧОВИН**

Кваліфікаційна робота магістра II курсу
групи ХМ-22
хімічного факультету
ШЕМЕТ ЄВИ ВІКТОРІВНИ

Науковий керівник

к.х.н., доцент



Наталія НІКІТИНА

ХАРКІВ 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота містить 63 сторінки, 18 таблиць, 18 рисунків, 53 літературні джерела.

Мета роботи: контроль вмісту кофеїну та його первинних метаболітів, як індикаторів активності CYP1A2 та CYP2E1, а також стану організму людини методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

В даній кваліфікаційній роботі було поставлено наступні завдання:

1. провести літературний огляд методу високоефективної рідинної хроматографії, її основних можливостей в розділенні та виділенні речовин різної природи, зокрема кофеїну та його метаболітів;
2. оптимізувати методику ВЕРХ розділення та визначення кофеїну і продуктів його метаболізму.
3. застосувати запропоновану методику для визначення вмісту кофеїну та його первинних метаболітів в біологічних рідинах та енергетичних напоях.

Об'єкт дослідження: кофеїн, параксантин, теофілін, теобромін.

Метод дослідження: високоефективна рідинна хроматографія.

Отримані результати: запропоновано методику розділення та кількісного визначення кофеїну та його метаболітів, методику апробовано для аналізу біологічних рідин.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, КОФЕЇН, ПАРАКСАНТИН, ТЕОФІЛІН, ТЕОБРОМІН, МЕТАБОЛІЗМ, ПАРАЦЕТАМОЛ, ВНУТРІШНІЙ СТАНДАРТ.

ABSTRACT

The qualification work contains 63 pages, 18 tables, 18 figures, 53 literary sources.

The purpose of the work: control of the content of caffeine and its primary metabolites, as indicators of CYP1A2 and CYP2E1 activity, as well as human condition by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The following tasks were set in this qualification work:

1. to conduct a literature review of the method of high-performance liquid chromatography, its main components, possible separation and isolated substances of various nature, in particular caffeine and its metabolites;
2. to optimize the HPLC method of separation and determination of caffeine and its metabolic products.
3. to apply the proposed method to determine the content of caffeine and its primary metabolites in biological fluids and energy drinks.

Research object: caffeine, paraxanthine, theophylline, theobromine.

Research method: high performance liquid chromatography.

The obtained results: the method for the separation and quantitative determination of caffeine and its metabolites was offered, the method has been tested for the analysis of biological liquids.

Keywords: HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, CAFFEINE, PARAXANTHINE, THEOPHYLLINE, THEOBROMINE, METABOLISM, PARACETAMOL, INTERNAL STANDARD.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	8
1.1 Розділення сумішей методом рідинної хроматографії.....	8
1.1.1 Високоефективна рідинна хроматографія.....	8
1.1.2 Рухома фаза.....	11
1.1.3 Колонки.....	11
1.2 Розділення сумішей методом ВЕРХ	14
1.2.1 Нормально-фазова хроматографія	15
1.2.2 Хроматографія гідрофільної взаємодії	16
1.2.3 Обернено-фазова хроматографія (RPC)	19
1.3 Загальні відомості про кофеїн.....	21
1.3.1 Поширення кофеїну.....	22
1.3.2 Метаболіти кофеїну	22
1.3.2.1 Параксантин	23
1.3.2.2. Теобромін	24
1.3.3.3. Теофілін.....	24
1.4 Процес метаболізму кофеїну	25
1.5 Розділення суміші метилксантинів методом ВЕРХ	27
1.6 Пробопідготовка зразків.....	28
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	32
2.1 Обладнання та реактиви	32
2.2 Методики експерименту.....	33
2.2.1 Методика приготування вихідних розчинів	33
2.2.2 Методика приготування суміші метилксантинів	33
2.2.3 Методика приготування градуювальних розчинів	33
2.2.4 Методика приготування модельної суміші	34
2.2.5 Методика приготування проби зразка сечі.....	35
2.2.6 Методика хроматографічного розділення	36
2.2.7 Методика приготування проби енергетичного напою.....	37
2.3 Результати та обговорення	38
2.3.1 Підбір методу хроматографічного розділення	38

2.3.2 Результати визначення діапазону лінійності градуовальної залежності ..	43
2.3.3 Результати аналізу модельної суміші за методом «введено» - «знайдено»	46
2.3.4 Визначення вмісту кофеїну та метаболітів у зразку сечі.....	47
2.3.5 Результати визначення вмісту кофеїну та метаболітів у енергетичному напою	52
2.3.5.1. Результати визначення ступеню вилучення кофеїну та парацетамолу ДХМ	52
2.3.5.2. Результати аналізу енергетичного напою.....	53
2.4 Техніка безпеки.....	55
ВИСНОВКИ	57
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА.....	58

ВСТУП

До середини минулого століття значних успіхів досягли електрохімічні, спектрально-оптичні методи ідентифікації і кількісного визначення індивідуальних речовин, рентгеноструктурний аналіз, мас-спектрометрія, ЯМР тощо. Однак зазначені методи розділення складних сумішей речовин є іноді недостатніми для розв'язання найскладніших наукових задач, які стоять перед сучасною аналітичною хімією.

Усунення такої невідповідності між можливостями вивчення індивідуальної сполуки і можливостями виділення її із складної суміші привело до бурхливого розвитку хроматографічних методів. Універсальність хроматографії, можливість розділення і визначення складних сумішей органічних, неорганічних речовин, а також швидкої очистки, ідентифікації і концентрування, простота технічних прийомів завоювали їй визнання в аналітичних науково-дослідних і заводських лабораторіях.

Кофеїн є однією з найпоширеніших психоактивних речовин у світі, метаболізм якої дуже різноманітний. Це може бути потенційно несприятливим або мати корисний вплив на здоров'я. При цьому наявність кофеїну та його метаболітів у біологічних рідинах в певній визначеній кількості є деяким маркером стану організму як дорослої людини, так і немовлят.

Кофеїн значною мірою метаболізується печінковим цитохромом P450 1A2 (CYP1A2) до параксантину, теоброміну та теофіліну, які далі метаболізуються. Перетворення на параксантин становить близько 80% первинних метаболічних продуктів і каталізується виключно CYP1A2. Таким чином, співвідношення кофеїн/параксантин у плазмі було підтверджено як фенотипічний показник активності CYP1A2. CYP2E1 також сприяє утворенню теоброміну та теофіліну, а також інших наступних метаболітів. Кофеїн та його основні метаболіти є неселективними рецепторами аденозину та інгібіторами фосфодіестерази, які призводять до стимулюючої дії на кардіореспіраторну та центральну нервову системи. CYP1A2 відіграє важливу роль в активації або пригніченні багатьох препаратів.

Тому актуальним є контроль вмісту кофеїну та його первинних метаболітів, як індикаторів активності CYP1A2 та CYP2E1, а також стану організму людини, це і стало темою кваліфікаційної роботи.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. провести літературний огляд методу вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), її основних можливостей в розділенні та виділенні речовин різної природи, зокрема кофеїну та його метаболітів;
2. оптимізувати методику ВЕРХ розділення та визначення кофеїну і продуктів його метаболізму.
3. застосувати запропоновану методику для визначення вмісту кофеїну та його первинних метаболітів в біологічних рідинах та енергетичних напоях.

1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Розділення сумішей методом рідинної хроматографії

Метод, за допомогою якого можна відокремити та ідентифікувати хімічні компоненти, присутні в складних сумішах, називається хроматографією. Ця методика аналізу речовин є доволі поширеною, як і спектроскопія, але водночас є зручним інструментом не тільки для аналітичних, але також і для препаративних методів. Тобто метод хроматографічного очищення речовин дозволяє проводити розділення сумішей ефективно та за відносно короткий проміжок часу.

У даний час хроматографічний метод продовжує розвиватися. У науковій літературі щороку публікуються сотні робіт, присвячених питанням хроматографії.

Хроматографія – один з найбільш ефективних та універсальних методів, який застосовуються для аналізу газів та рідин. Метод хроматографії використовується у біології, органічній та неорганічній хімії, технології. Так, вперше при застосуванні хроматографії були розділені лужноземельні елементи, виділені в чистому вигляді та ідентифіковані нові трансуранові елементи; метод дає змогу розділити навіть ізотопи одного елемента. Також метод застосовується для концентрування речовин, ідентифікації та кількісного визначення.

1.1.1 Високоєфективна рідинна хроматографія

Одним з поширених видів хроматографічного аналізу є рідинна хроматографія. Рідинна хроматографія (РХ) – метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухомою фазою є рідина. Рідинна хроматографія, як хроматографічний метод розділення сумішей, що використовує рідинну рухому фазу, історично виникла першою і дотепер є найбільш універсальним видом хроматографії.

Для кращого розділення часто застосовується *високоєфективна рідинна хроматографія*. Високоєфективна рідинна хроматографія – рідинна хроматографія високого тиску (швидкісна рідинна хроматографія).

ВЕРХ — це форма колонкової хроматографії, яка прокачує під високим тиском аналіт, розчинений у розчиннику, через колонку з нерухомою фазою.

Високоєфективна рідинна хроматографія була розроблена наприкінці 1960-х — на початку 1970-х років. Сьогодні метод широко поширений та використовується для розділення та очищення в різних областях включаючи фармацевтику, біотехнології, екологію, полімерну та харчову промисловість. ВЕРХ за останнє десятиліття стала методом для аналізу великої кількості сполук. Її основна перевага перед газовою хроматографією полягає в тому, що аналіти не обов'язково повинні бути леткими, тобто макромолекули також можуть підходити для аналізу ВЕРХ.

ВЕРХ виконується шляхом введення невеликої кількості рідкого зразка в рухомий потік рідини (рухома фаза), який проходить через колонку наповнену частинками нерухомої фази. Розділення суміші на компоненти залежить від різних ступенів утримання кожного компонента в колонці.

У ВЕРХ сила утримання змінюється відносно взаємодії між розчиненою/нерухомою фазою та розчиненою/рухомою фазою.

ВЕРХ досягла своєї якості розділення насамперед завдяки своїй надійності (проведення аналізу під заданим тиском) та гнучкості (можливість регулювання складу кожної рухомої та нерухомої фази). Утримання та механізм поділу залежить від кінцевих взаємозв'язків між нерухомою фазою, рухомою фазою та додатково аналітом.

Обернено-фазова ВЕРХ є найпоширенішим типом ВЕРХ. Обернена фаза означає, що рухома фаза відносно полярна, а нерухома фаза відносно неполярна. Таким чином, неполярні сполуки будуть більше утримуватись (тобто матимуть довший час утримання), ніж полярні сполуки. У нормальній фазі ВЕРХ рухома фаза відносно більш неполярна, а нерухома фаза відносно полярна.

Оскільки сполуки мають різну рухливість, вони виходять з колонки в різний час; тобто вони мають різне утримання. Час утримування - це час між введенням

аналіту і його виявлення. ВЕРХ найчастіше використовується, коли є виконання аналізу цільової сполуки, де є чітке уявлення про структуру сполуки, присутні домішки в суміші [1].

Властивості зразка та розчинника, а також природа нерухомої фази визначають час утримування аналітів або те, наскільки швидко вони проходять через колонку. Коли зразок проходить крізь колонку, аналіти, які мають найсильнішу взаємодію зі стаціонарною фазою, виходять із колонки найповільніше, тобто вони демонструють найдовший час утримання. Навпаки, зразки, що демонструють незначну взаємодію з матеріалом колонки, швидко елюються і, таким чином, характеризуються коротким часом утримання.

Розділення сполук у зразку можна здійснити за допомогою ізократичного елюювання, коли склад рухомої фази залишається постійним, або за допомогою градієнтного елюювання, де склад рухомої фази змінюється протягом поділу до умов, що сприяють дисоціації аналіту. Після виходу з колонки рухома фаза проходить через модуль детектування, такий як флуориметр або детектор УФ-поглинання. Вибір відповідного детектора та довжин хвиль моніторингу є важливими для оптимізації чутливості виявлення ВЕРХ. Детектор генерує сигнал, що корелює з кількістю аналіту, що виходить із колонки, який потім передається в контрольну комп'ютерну програму ВЕРХ і реєструється за допомогою даних, доступних для подальшого аналізу [2].

У високоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) завдяки використанню сорбентів з малим розміром – зерен 10–30 мкм, нагнітальних насосів і чутливих детекторів процес проходить швидко та ефективно.

Високоефективна рідинна хроматографія отримала дуже широке застосування для розділення та виявлення молекул (адсорбційна та розподільна хроматографія), для розділення та виявлення іонів в іонній хроматографії, для розділення макромолекул (ексклюзійна хроматографія).

Методами рідинної хроматографії можна аналізувати відносно великі проби незалежно від леткості та термічної стабільності. До недоліків рідинної хроматографії можна віднести обмежене коло детектуючих систем.

Для проведення хроматографічного аналізу використовують наступну послідовність дій: вибирають необхідні рухомі і нерухомі фази в залежності від властивостей речовин, що аналізують, встановлюють потрібний режим хроматографа (температуру, швидкість подачі рухомої фази, детектор), потім приводять хроматографічне розділення і реєструють сигнал, визначають вміст кожного компонента в рухомій фазі після її виходу з колонки. Запис, зроблений на діаграмній стрічці, називається хроматограмою [3].

Вміст рухомої фази міститься в скляному резервуарі. Рухома фаза або розчинник у ВЕРХ зазвичай є сумішшю полярних і неполярних компонентів рідини. Концентрації варіюються в залежності від природи зразків. Тип і склад рухомої фази впливають на поділ компонентів. Для різних речовин використовуються різні розчинники.

1.1.2 Рухома фаза

Вміст рухомої фази (елюента) міститься в скляному резервуарі. Рухома фаза або розчинник у ВЕРХ зазвичай є сумішшю полярних і неполярних компонентів рідини, концентрації яких варіюються в залежності від складу зразка. Тип і склад рухомої фази впливають на поділ компонентів.

Для ВЕРХ з нормальною фазою зазвичай використовується розчинник неполярний, а в обернено-фазовій ВЕРХ розчинник є, як правило, сумішшю води і полярного органічного розчинника. [3].

Елюювання одним розчинником або сумішшю розчинників постійного складу називається ізократичним режимом. У градієнтному елююванні використовуються системи розчинників, що суттєво відрізняються за полярністю і змінюються за складом під час розділення.

1.1.3 Колонки

Специфічною частиною обладнання є хроматографічна колонка відповідних розмірів, заповнена матеріалом, що забезпечує розподіл речовин. Якщо необхідно,

колонку термостатують. Через колонку з постійною швидкістю пропускають елюент. До одного кінця колонки приєднують пристрій введення проби, інжектор з припиненням потоку, шприцевий інжектор з мембраною для введення проби без припинення потоку або петльовий інжектор з клапаном, що перемикає потік. До цього кінця колонки також може бути приєднаний відповідний насос для подавання елюенту з контрольованою швидкістю. Інший кінець колонки приєднують до відповідного детектора з пристроєм, що реєструє й забезпечує контроль відносних концентрацій розподілених компонентів проби. Як наповнювач може використовуватися або м'який матеріал (набухлий гель), або жорсткий (пористе скло, силікагель), або поперечноштитий органічний полімер, який підходить для цього розчинника.

Селективність адсорбції на поверхні рухомої фази залежить від природи сил взаємодії між речовиною, що адсорбується, і адсорбентом. Ефективність хроматографічної колонки залежить, головним чином, від процесів дифузії та масопередачі в обох фазах і визначається, як і в газовій хроматографії, висотою H , еквівалентною теоретичній тарілці. Чим більша глибина пор у адсорбенті, тим більша H , отже, менша ефективність колонки. Велика глибина пор у адсорбентів класичної рідинної адсорбційної хроматографії була однією з основних причин її низької ефективності [7].

Нерухомою (стаціонарною) фазою є тверда пориста речовина (часто її називають сорбентом) або плівка рідини, нанесена на тверду речовину.

В НФХ використовують полярний адсорбент (силікагель, Al_2O_3 , оксиди металів) і неполярні рухомі фази (органічні розчинники: бензен, толуен, тетрахлорометан або суміші розчинників). Активними центрами на поверхні адсорбенту силікагелю є гідроксильні групи (рис. 1.1). Активні центри силікагелю взаємодіють з полярними розчиненими речовинами головним чином за рахунок водневих зв'язків.

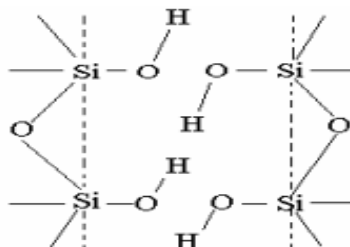


Рисунок 1.1. Активні групи -ОН на поверхні силікагелю

На поверхні Al_2O_3 ароматичні сполуки адсорбуються внаслідок перенесення електронів до позитивно заряджених Al^{3+} -центрів. Кислотні розчинені речовини адсорбуються за рахунок утворення зв'язків донорно-акцепторного типу між протонами і основними центрами (O^{2-} -іонами) на поверхні Al_2O_3 [8].

В ОФХ використовують неполярний адсорбент (графітована сажа, кизельгур, гідрофобізований силікагель) та полярні рухомі фази (вода, метанол, ацетонітрил). Екранувати силанольні Si-OH групи силікагелю вдається аліфатичними вуглеводнями, що містять три або чотири атоми Карбону, але дістати більше утримування вдається при введенні більш довгих алкільних ланцюжків, переважно C_{18} . Довгі вуглеводневі групи розташовуються паралельно один одному і перпендикулярно поверхні частинок, утворюючи щіткову поверхню (рис. 1.2). Такі сорбенти з успіхом застосовують при визначенні багатьох сполук.

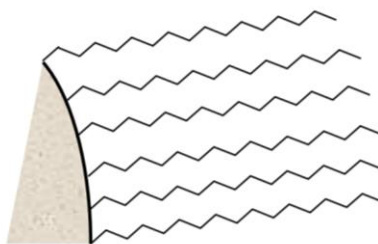


Рисунок 1.2. Ділянка поверхні щіткового сорбенту силікагелю C_{18} .

Окрім зазначених сорбентів використовують поверхнево-пористі носії. Це можуть бути жорсткі непористі носії (наприклад, скляні кульки), покриті тонким пористим шаром активного полярного або неполярного сорбенту. Такі сорбенти чинять малий опір потоку, за рахунок чого збільшується швидкість аналізу [9, 10].

Колонки використовуються набивні, виготовляються з полірованої нержавіючої сталі, довжиною від 50 до 300 мм і внутрішнім діаметром від 2 до 5 мм.

Вони зазвичай наповнені нерухомою фазою з розміром частинок 3–10 мкм. В ідеалі температура рухомої фази і колонки повинні підтримуватися постійними протягом аналізу. Колонка вважається «серцем хроматографа». Так як нерухома фаза колонки розділяє компоненти зразка з використанням різних фізико-хімічних параметрів. [7].

Це життєво важливий компонент, і його слід належним чином обслуговувати відповідно до інструкцій постачальника для отримання відтворюваності та ефективності розділення прогон за прогоном.

Обернено-фазова ВЕРХ (RP-HPLC) має неполярну стаціонарну фазу та помірно полярну рухому фазу. Однією з найпоширеніших нерухомих фаз є діоксид кремнію, поверхнево-модифікований алкільною групою з прямим ланцюгом, наприклад, $C_{18}H_{37}$ або C_8H_{17} . При таких стаціонарних фазах час утримання стає довше для молекул, які менш полярні, тоді як полярні молекули будуть легше елюювати (на початку аналізу) [14].

1.2 Розділення сумішей методом ВЕРХ

Розділення сумішей за допомогою ВЕРХ кожної хімічної речовини базується на її чіткій спорідненості з адсорбуючим матеріалом у колонці або рухомій фазі, що змушує різні складові рухатися з різними швидкостями та розділятися.

Розділення та виділення суміші за допомогою ВЕРХ переважно залежить від деяких властивих налаштованих параметрів рухомої фази, таких як полярність, швидкість потоку, рН, склад і деякі властивості зразка; вид і природа нерухомої фази; фактори навколишнього середовища, такі як температура, тип і налаштування детектора [15].

Десятиліттями розробка методів ВЕРХ йшла шляхом методу проб і помилок, доповненого досвідом та новими знаннями. Використання такої традиційної системи під час оптимізації методу передбачає зміну одного фактора за раз, зберігаючи інші постійними, що, безумовно, може досягти бажаного розділення, але справжні оптимальні умови ніколи не можуть бути обіцяні. Було доведено, що цей звичайний підхід до розробки методу ВЕРХ є не лише перебільшеним з точки зору часу, грошей

і праці, але також критичним для виправлення помилок, непередбачуваним і навіть невдалим. Одна хроматографічна умова не може надати достатньо інформації щодо всіх факторів, що впливають на процес ВЕРХ. Для подолання цих труднощів необхідно ретельно визначити, дослідити та контролювати певну кількість змінних у ході експерименту. Для цього необхідно аналізувати та експериментально визначати можливості розділення та виділення речовин із суміші за допомогою широкого спектру можливостей ВЕРХ.

1.2.1 Нормально-фазова хроматографія

Нормально-фазова хроматографія була одним із перших видів ВЕРХ, розроблена хіміками. Також відома як ВЕРХ з нормальною фазою (NPHPLC). Цей метод розділяє аналіти на основі їх спорідненості до полярної нерухомої поверхні, такої як кремнезем; отже, він базується на здатності аналіту брати участь у полярних взаємодіях (наприклад, як водневий або диполь-дипольний тип взаємодії) із поверхнею сорбенту.

NP-HPLC використовує неполярну, неводну рухому фазу (наприклад, хлороформ, октан) і працює ефективно для розділення аналітів, легко розчинних у неполярних розчинниках. Аналіт асоціюється і утримується на полярній нерухомій фазі [13].

Нормально-фазова рідинна хроматографія є важливим доповненням до частіше використовуваної рідинної хроматографії з оберненою фазою. Її можна виконувати в повністю органічних рухомих фазах (адсорбційна рідинна хроматографія), де цей метод має переваги для розділення низькомолекулярних помірно полярних зразків на основі відмінностей у кількості та положенні функціональних груп. Це забезпечує велику варіативність селективності шляхом вибору відповідної рухомої фази. Водна нормально-фазова хроматографія — це метод розділення, який швидко розвивається, придатний для розділення як помірно, так і сильно полярних (навіть іонних) сполук, яке важко здійснити в інших системах. Велика кількість полярних стаціонарних фаз доступна для розділення у водно-органічних рухомих фазах, деякі з яких забезпечують подвійний механізм утримування та можуть використовуватися або в

режимі нормальної фази у збагачених органічними рухомими фазами, або в режимі оберненої фази у високоякісних водних рухомих фазах.

1.2.2 Хроматографія гідрофільної взаємодії

Хроматографія гідрофільної взаємодії: хроматографія гідрофільної взаємодії (HILIC) може бути описана як обернено-фазова хроматографія з використанням полярної нерухомої фази (наприклад, немодифікованого кремнезему, аміно- або діол-зв'язані фази). Використовується як рухома фаза органічна за своєю природою (> 70% розчинник, як правило, ацетонітрил), при цьому міститься також невеликий відсоток водного розчинника/буфера або інший полярний розчинник. Вода/полярний розчинник утворює насичений водою шар, адсорбований на полярній поверхні стаціонарної фази, на якій розподіляються аналіти.

Механізми утримання в HILIC складні, але вони вважаються поєднанням гідрофільного поділу та взаємодії вторинних електростатичних та водневих зв'язків.

Хоча співвідношення органічний модифікатор/вода є переважаючим фактором у забезпеченні необхідної селективності поділу в HILIC, вибір стаціонарної фази також важливий для узгодження хімічної природи колонки до функціональних груп аналіту.

Нормально-фазова хроматографія іноді може забезпечити задовільну роздільну здатність гідрофільних і навіть іонних зразків. Дуже гідрофільні зразки можуть занадто слабо утримуватися в системах RPLC, щоб забезпечити їх розділення. Вони добре утримуються в системах нормальної фази, але зазвичай недостатньо розчинні в неводних рухомих фазах. Цю проблему часто можна вирішити у водному NPLC, ANP LC (Aqueous Normal Phase), використовуючи полярну стаціонарну фазу в поєднанні з водно-органічною рухомою фазою (зазвичай більше 50% ацетонітрилу), яка часто забезпечує достатнє утримання сильно полярних, слабкокислих або слабкоосновних аналітів, що зберігається в обернено-фазовій (RP)LC, для якої є трохи інша селективність порівняно з традиційною RP хроматографією. Цей метод також часто називають «гідрофільною рідинною хроматографією», HILIC LC. Термін «гідрофільний» відноситься до спорідненості з водою.

Розділення HILIC кількісно різко збільшилося за останні роки через зростаючі вимоги до розділення зразків, що містять або низькомолекулярні, або високомолекулярні полярні сполуки, яких важко досягти в інших режимах ВЕРХ, таких як пептиди, білки, олігосахариди, ліки, метаболіти та різні природні сполуки.

У режимі ANP можна використовувати різні колонки, включаючи звичайний кремнезем, нейтральну, полярну, хімічно зв'язану, іонообмінну та цвітеріонну нерухомі фази. Звичайний кремнезем, мабуть, був найбільш часто використовуваною стаціонарною фазою в розділенні HILIC, однак багато полярних стаціонарних фаз на основі кремнезему, наприклад, гідросильованого кремнезему, органічних полімерів, матеріалів з гібридною підтримкою або стаціонарних фаз із змішаною функціональністю виявилися більш корисними в різних застосуваннях HILIC. Полярні функціональні групи в нерухомих фазах включають амін-, амід-, ціано-, карбамат-, діол-, поліол-, сульфобетайн, полі(2-сульфоетиласпартамід) полісукцинімід- або змішані фрагменти WAX-HILIC. Повністю пористі або поверхнево-пористі частинки розміром менше 2 мкм для швидкого розділення HILIC і монолітних колон є нещодавніми доповненнями до можливих нерухомих фаз [16].

Стаціонарні фази на основі гідриду кремнезему є дуже цікавими матеріалами для застосування ANP. Процес гідросильовання змінює фундаментальні властивості силікагелю шляхом заміни до 95% початкових груп Si–O–H неполярними групами Si–H гідриду кремнію, таким чином поверхня адсорбенту є менш полярною, отже, так покращується відтворюваність утримання.

На неприщепленому силікагелі та, меншою мірою, на інших полярних матеріалах вода переважно адсорбується з водно-органічної речовини. Таким чином, механізм утримування HILIC пояснюється розподілом рідини-рідини між рухомою фазою та збагаченим водою шаром розчинника на поверхні полярної нерухомої фази.

Однак адсорбція внаслідок утворення водневих зв'язків при дуже низьких концентраціях води та електростатичних (іонний обмін або відштовхування іонів) взаємодіях можуть сприяти утриманню залежно від зразка та характеристик нерухомої фази. Гідросильовані кремнеземні матеріали адсорбують відносно невелику кількість шару води, і механізм ANP пояснюється радше адсорбцією, ніж розподілом. Однак для розробки практичного методу не дуже важливо, чи

відбувається механізм утримування за рахунок адсорбції, розподілу чи комбінації двох ефектів.

Утримання в режимі HILIC збільшується пропорційно полярності розчиненої речовини і є вищим на полярних стаціонарних фазах і в менш полярних рухомих фазах, тобто воно зменшується зі збільшенням відсотка води в рухомій фазі. При зміні складу рухомої фази можуть відбуватися зміни селективності поділу і навіть порядку елюювання.

На утримування в ANP часто впливають іонообмінні або іоновідштовхувальні ефекти та ефекти гідрофобної взаємодії. Багато слабо або помірно полярних НФ демонструють подвійний механізм розділення ANP/RP, при цьому гідрофобні (RP) взаємодії переважають у висоководних рухомих фазах, тоді як полярні (ANP) взаємодії контролюють утримання в рухомих фазах, багатих органічними розчинниками, і можуть працювати або в HILIC, або в режимі RP. НФ з гідридом кремнезему, модифікованими холестеринном, бідентатом C₁₈ або іншими неполярними фрагментами, демонструють посилене утримування оберненої фази.

За наявності комбінованого механізму утримування ANP/RP утримування сильно або помірно полярних сполук на багатьох полярних колонках спочатку зменшується при зростанні концентрації органічного розчинника, доки не буде досягнуто мінімального утримання; потім процес утримання знову зростає при подальшому збільшенні концентрації органічного розчинника, оскільки полярні взаємодії стають сильнішими, ніж сольвофобні у високоорганічних рухливих фазах.

Ацетонітрил є зазвичай використовуваним органічним компонентом рухомих фаз ANP, ймовірно тому, що він демонструє інші селективні полярні взаємодії, ніж вода, через відсутність протонодонорних властивостей. Повна або часткова заміна ацетонітрилу полярним протонним розчинником (метанол, етанол тощо) може розширити застосування HILIC до менш полярних зразків, які надто слабо утримуються навіть при низьких концентраціях води.

Іонообмінна здатність кремнезему та оксиду алюмінію може бути використана для його динамічної модифікації шляхом взаємодії з іонами в рухомих фазах, що складаються з водного буфера, змішаного з органічним розчинником. Ці системи

можна використовувати для розділення основних лікарських речовин та інших слабоосновних сполук. Тут механізм утримання складний і включає іонообмінні взаємодії. Органічні кислоти можна розділити за допомогою хроматографії з іонними парами нормальної фази з неводними рухомими фазами, такими як органічні розчини гідроксиду тетраалкіламонію, який адсорбується на поверхні кремнезему.

У водно-органічних рухомих фазах, що містять бромід цетилтриетиламонію, реагент, що утворює іони, адсорбується на поверхні силікагелю таким чином, що гексадецильні групи спрямовані від поверхні, утворюючи, таким чином, неполярний шар, подібний до хімічно зв'язаних алкілсилоксанових фаз, за винятком того, що адсорбований шар знаходиться в динамічній рівновазі з іонами алкіламонію в рухомій фазі [17].

1.2.3 Обернено-фазова хроматографія (RPC)

Обернено-фазова ВЕРХ (RP-HPLC) має неполярну стаціонарну фазу та помірно полярну рухому фазу. Однією з найпоширеніших нерухомих фаз є діоксид кремнію, поверхнево-модифікований алкільною групою з прямим ланцюгом, наприклад, $C_{18}H_{37}$ або C_8H_{17} . При таких стаціонарних фазах час утримання стає довше для молекул, які менш полярні, тоді як полярні молекули будуть легше елюювати (на початку аналізу) [14].

Обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія (RP-HPLC) є найпопулярнішим хроматографічним режимом, на який припадає понад 90% усіх розділень. Своєю величезною популярністю ВЕРХ завдячує тому, що цей метод відносно простий і недорогий, а обладнання надійне і просте в експлуатації. Завдяки широкій автоматизації він може працювати практично без нагляду з кількома зразками в різних умовах розділення.

У даний час для використання доступно >600 колонок RP-HPLC, деякі з яких демонструють дуже великі відмінності в селективності та якості виробництва. Часто дві схожі колонки ОФ-ВЕРХ не однаково підходять для необхідного розділення, і на сьогоднішній день не існує універсальної колонки ОФ-ВЕРХ, яка б охоплювала різні

аналіти. Це змушує аналітичні лабораторії зберігати безліч різноманітних колонок. Таким чином, вибір колонки є вирішальним етапом розробки методу ОФ-ВЕРХ, тим більше, що складність зразків постійно зростає. Раціонально підібрати відповідну колонку складно. На додаток до відмінностей у первинних міжмолекулярних взаємодіях з аналітами дисперсійного типу, окремі колонки можуть також демонструвати унікальний характер завдяки специфічним полярним, водневим зв'язкам і донорно-акцепторним взаємодіям електронних пар. Вони також можуть змінюватися залежно від типу упаковки, кількості та типу залишкових силанолів, щільності зв'язування лігандів і розміру пор тощо.

Отже, хроматографічні характеристики систем RP-HPLC часто значно змінюються залежно від обраної колонки. Незважаючи на наявність широкого спектру знань щодо цього важливого питання, все ще бракує всебічного огляду для об'єктивного порівняння та/або вибору хроматографічних колонок [18].

Обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія (RP-HPLC) передбачає розділення молекул на основі гідрофобності. Поділ залежить від гідрофобного зв'язку молекули розчиненої речовини з рухомої фази з іммобілізованими гідрофобними лігандами, приєднаними до нерухомої фази, тобто сорбенту.

Суміш розчинених речовин спочатку наносять на сорбент у присутності водних буферів, і розчинені речовини елююють з додаванням органічного розчинника до рухомої фази. Елюювання може відбуватися або за ізократичних умов, коли концентрація органічного розчинника є постійною, або за допомогою градієнтного елюювання, за допомогою якого кількість органічного розчинника збільшується протягом певного періоду часу.

Таким чином, розчинені речовини елюються в порядку збільшення молекулярної гідрофобності. RP-HPLC є дуже потужним методом для аналізу пептидів і білків через низку факторів, які включають:

- 1) відмінну роздільну здатність, яку можна досягти в широкому діапазоні хроматографічних умов для дуже тісно пов'язаних молекул, а також структурно досить відмінних молекул;

2) експериментальну легкість, з якою можна маніпулювати хроматографічною селективністю шляхом змін у характеристиках рухомої фази;

3) загалом високим виходом і, отже, високою продуктивністю;

4) відмінною відтворюваністю повторюваних розділень, що здійснюються протягом тривалого періоду часу, що частково спричинено стабільністю матеріалів сорбенту в широкому діапазоні умов рухомої фази.

1.3 Загальні відомості про кофеїн

Кофеїн — це природний алкалоїд, який у різних кількостях міститься в бобах, листі та плодах. Перша історична згадка про кофеїн відбулася в Ефіопії племенем Галла приблизно 1000 років тому. Проте Фрідріх Фердинанд Рунге (1795–1867) був першим, хто виділив алкалоїд із кавових зерен у 1819 році, тоді як його перший хімічний синтез здійснив у 1895 році Еміль Фішер.

У звичайних умовах чистий кофеїн білий, кристалічний порошок без запаху, гіркий на смак. На рис. 1.3 зображено кристали кофеїну, екстраговані з кави.

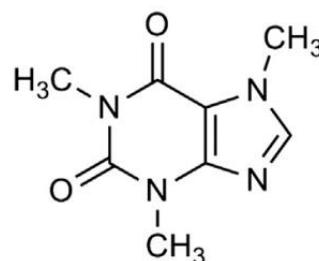


Рисунок 1.3 Кристали кофеїну та хімічна структура кофеїну.

Кристали кофеїну також часто можна знайти у вигляді осаду на фабриках з переробки кави, особливо навколо машин для смаження. Це пов'язано з ефектом сублімації: при підвищеній температурі кофеїн може переходити з твердого стану в пароподібний безпосередньо без розрідження. Назва кофеїн не дає жодної інформації

про хімічну природу речовини. Належить кофеїн до групи метилксантинів і носить назву 1,3,7-триметилпурин-2,6-діон.

Хімічна структура показує високий вміст азоту в молекулі кофеїну. Фізіологічні ефекти кофеїну досліджувалися протягом тривалого часу та тривають досі [19, 20].

1.3.1 Поширення кофеїну

Кофеїн є найбільш поширеним психостимулятором у всьому світі. Кофеїн природним чином присутній у різних кількостях у зернах, листі та фруктах близько 60 рослин. Смажені кавові зерна і чайне листя – це основні джерела дієтичного кофеїну. Також кофеїн міститься в горіхах, какао, квасолі, та ягодах гуарани. Кофеїн найчастіше споживається з такими напоями, як кава (71%), безалкогольні напої (16%) та чай (12%) [21].

Крім того, кофеїн також міститься в шоколаді та ліках, таких як протибільові препарати та дієтичні добавки.

Управління з харчових продуктів і медикаментів США встановлено, що кофеїн загальноновизнаний безпечним при вживанні в напої до концентрації 0,02%. Середнє споживання кофеїну з усіх джерел становить приблизно 70 мг/людину на день.

1.3.2 Метаболіти кофеїну

Через свою хімічну структуру кофеїн (1,3,7-триметилксантин; 1,3,7-триметил-1Н-пурин-2,6(3Н,7Н)-діон; 3,7-дигідро-1,3,7-триметил-1Н-пурин-2,6-діон (рис. 1.4) належить до метилксантинів. Його похідні, що є продуктами метаболізму в організмі: теофілін (1,3-диметилксантин; 1,3-диметил-7Н-пурин-2,6-діон) і теобромін (3,7-диметилксантин; 3,7-диметил-1Н-пурин-2,6-діон). Як правило, у більшості продуктів, останні дві речовини знаходяться в нижчих концентраціях, тоді як четверта природна речовина пов'язана з ксантином – сполуку параксантин (1,7-диметил-3Н-пурин-2,6-

діон; 1,7-диметилксантин) виявлено лише у ссавців як метаболіт кофеїну та теоброміну, оскільки в рослинах вона не синтезується [22,23].

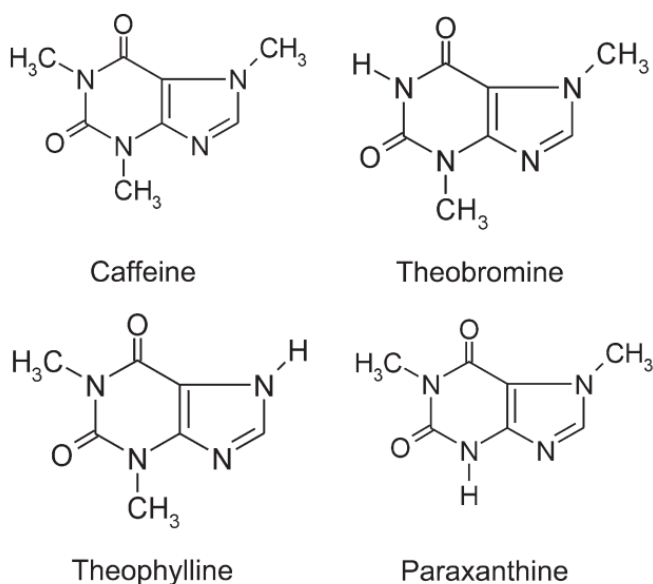


Рисунок 1.4. Хімічна структура кофеїну та його метаболітів

Кофеїн (1,3,7-триметилксантин), теобромін (3,7-диметилксантин) і теофілін (1,3-диметилксантин) є одними з найважливіших метилксантинів. Вони є природними алкалоїдами і здійснюють різні фізіологічні ефекти [24] на різних частинах організму, включаючи центральну нервову, серцево-судинну, шлунково-кишкову та дихальну системи. Кофеїн входить до складу кави та інших напоїв. Теобромін і теофілін присутні в какао, чаї та шоколадних виробах. Теофілін також широко використовується як бронхолітичний засіб з вузьким терапевтичним діапазон. Параксантин не знайдений в харчових продуктах, але є основним метаболітом кофеїну [25].

1.3.2.1 Параксантин

Параксантин, основний метаболіт кофеїну, має молекулярну структуру та період напіврозпаду, подібні до кофеїну [26], і легко вимірюється в сечі та сироватці крові. Приблизно 60% параксантину, прийнятого перорально, виводиться в незміненому вигляді [27]. Швидкість розпаду параксантину приблизно дорівнює швидкості його утворення, а рівні сироватки є більш надійними та менш змінними протягом дня порівняно з кофеїном, хоча вони відображають лише нещодавнє споживання. Концентрації параксантину в плазмі знижуються менш швидко, ніж

кофеїну, навіть з урахуванням міжіндивідуальних відмінностей у метаболізмі, і концентрації параксантину стають вищими, ніж концентрації кофеїну, протягом 8-10 годин після прийому. Параксантин далі метаболізується за допомогою двох паралельних, але незалежних реакцій. Одна реакція виробляє 8-гідроксипараксантин, а інша реакція є 7-деметилуванням параксантину, що призводить до трьох метаболітів: 1-метилксантину, 1-метилурату та 5-ацетиламіно-6-форміламіно-3-метилурацилу (AFMU). На AFMU припадає 67% метаболізму параксантину. AFMU перетворюється на 5-ацетил-6-аміно-3-метилурацил (AAMU), який можна легко та надійно виміряти в сечі. Ці метаболіти параксантину з'являються в сечі майже так само швидко, як вони утворюються завдяки активній нирковій канальцевій секреції [28].

1.3.2.2. Теобромін

Теобромін становить найбільший відсоток біологічно активних метаболітів кофеїну [29]. Він швидко всмоктується і приблизно 50% виводиться із сечею протягом 8-12 годин. Його фармакологічні ефекти включають діурез, стимуляцію серцево-судинної системи, розслаблення гладкої мускулатури та посилення секреції залоз. Метаболічний кліренс теоброміну опосередковується головним чином ферментом CYP1A2, на який, за оцінками, припадає 86% його деметилювання, і меншою мірою CYP2E1. Період напіввиведення коливається від 7,2 до 11,5 годин, а плазмовий і нирковий кліренс становить 46% і 67% відповідно. Повідомляється, що плазмовий кліренс на 33% вищий у курців, ніж у некурців [28].

1.3.3.3. Теофілін

Теофілін структурно подібний до кофеїну, не має лише однієї додаткової N-метильної групи. Його фармакологічні властивості також дуже схожі, але теофілін має більш сильний токсикологічний ефект, ніж кофеїн і теобромін. Період напіввиведення довший, ніж у кофеїну (3-9 годин), але досить різноманітний. Теофілін виводиться з організму шляхом ниркового та метаболічного кліренсу. Метаболічний кліренс опосередковується переважно CYP1A2 з N-деметилюванням до монометилксантинів і 8-гідроксилюванням до 1,3-диметилсечової кислоти. Швидкість виділення із сечею значною мірою залежить від потоку сечі та дози. Вищі концентрації теофіліну в плазмі призводять до зниження метаболічного кліренсу та

збільшення ниркового кліренсу. Подібно до кофеїну, кліренс, метаболізм і елімінація теофіліну відрізняються між індивідуумами. Кілька екзогенних факторів впливають на швидкість метаболізму та виведення, включаючи куріння сигарет, вірусні інфекції, захворювання печінки та серця, вагітність, продукти харчування та супутнє вживання наркотиків. Куріння збільшує кліренс, а ліки, включаючи циметидин, ранітидин, еритроміцин, рифаміцин і тролеандоміцин, сповільнюють метаболізм. Вагітність знижує кліренс і виведення, тому теофілін (як і кофеїн) може накопичуватися в організмі. У плодів і новонароджених не вистачає ферментів, необхідних для метаболізму теофіліну, тому виведення майже повністю залежить від виведення нирками [28].

1.4 Процес метаболізму кофеїну

Після всмоктування кофеїн швидко розподіляється в більшості тканин (середній об'ємний розподіл 0,6–1,0 л/кг) і рідинах організму (тобто в жовчі, молоці, слині, спермі, поті та сечі) [30], хоча він надходить із організм як ксенобіотична речовина. Характер розподілу кофеїну зазвичай не змінюється протягом усього життя людини, і він може бути значно вищим у жінок порівняно з чоловіками [31].

Кофеїн швидко і інтенсивно метаболізується в клітинах печінки з утворенням диметил- і монометилксантинів, диметил- і монометилсечової кислот і похідних урацилу [30]. Більша частина метаболізму кофеїну та інших метилксантинів здійснюється ферментами фази I (цитохром P450 CYP), головним чином CYP1A2, основним ферментом серед ферментів P450 у печінці людини, на який припадає приблизно 13% загального вмісту цієї групи ферментів. На активність ізоформи CYP1A2 припадає майже 90% метаболізму кофеїну. Решта шляхів пов'язані з активністю CYP1A1, CYP2E1, CYP2A6, а також монооксигеназою та N-ацетилтрансферазою [32].

Параксантин є основним метаболітом кофеїну в плазмі, тоді як метильовані ксантини та метилурова кислота є основними метаболітами, що виділяються з сечею [31,32]. Метаболічний шлях кофеїну в організмі людини показаний на рисунку 1.3. 3

Рисунок 1.5. Метаболічні шляхи кофеїну та метаболітів у людини. Сірі стрілки вказують на нижчу продукцію метаболіту. ХО: ксантиноксидаза, NAT 2: N-ацетилтрансфераза 2.

26

Параксантин, основний первинний метаболіт кофеїну, може бути деметильований CYP1A2 з утворенням основного метаболіту, 1-метилксантину (~70%), який може бути окислений до 1-метилурової кислоти за допомогою ксантиноксидази. Вторинні метаболіти, такі як 7-метилксантин (~20%), також можуть бути окислені до 7-метилсечової кислоти, а параксантин також може бути гідроксильований CYP2A6 з утворенням 1,7-диметилсечової кислоти або ацетильований N-ацетилтрансферазою 2, з утворенням 5-ацетиламіно-6-форміламіно-3-метилурацилу, нестабільної сполуки, яка може піддаватися неферментативному деформілюванню з утворенням 5-ацетиламіно-6-аміно-3-метилурацилу (рис. 1.5) [32].

Фармакологічні та біохімічні властивості кофеїну роблять його модельним субстратом, здатним виявляти активність інших ферментів, що метаболізують ліки, у тварин і людей [34]. Кофеїн широко використовувався як дослідник для оцінки метаболічної активності та фенотипування активності ферментів CYP1A2, CYP2A6, N-ацетилтрансферази 2 і ксантиноксидази, надаючи цінну інформацію про сприйнятливості до раку, лікарські взаємодії та токсичність у популяційних дослідженнях здорових суб'єктів, враховуючи, що це важливі детоксикаційні ферменти [35]. Наприклад, співвідношення параксантину до кофеїну або співвідношення параксантину плюс 1,7-диметилсечової кислоти до кофеїну в плазмі використовували як показник активності CYP1A2 [36].

Період напіврозпаду кофеїну в плазмі коливається в середньому від 2,5 до 5 годин у дорослих [32], хоча повідомлялося про більші варіації від 2,3 до 12 годин [37], що вказує на значну міжсуб'єктну варіабельність часу виведення кофеїну [37]. .

1.5 Розділення суміші метилксантинів методом ВЕРХ

На основі аналізу масиву літературних даних є закономірним застосовувати для розділення суміші кофеїну, параксантину, теофіліну та теоброміну методом обернено-фазової ВЕРХ. Більшість авторів пропанують використовувати як нерухому фазу – прищеплений силікагель з октадецильною групою C18. У той час як рухому фазу

досить часто використовують суміш ацетонітрил/вода чи метанол/вода з певним модифікатором.

Так, автори [38] пропанують використовувати процес хроматографічного розділення на колонці Waters Symmetry C18 3,5 мкм: 75 мм × 4,6 мм ID. (Вотерс, Мілфорд, Массачусетс, США) при 35°C. Рухома фаза при цьому складалася з води для фази А та метанолу для фази В, обидві містили 25 ммоль НСООН. Розділення було оптимізовано за допомогою методу швидкого градієнта з рухомою фазою А/В, встановленою на 95%/5% від 0,00 до 0,10 хв і 60%/40% від 0,11 до 2,50 хв, а потім назад до 95%/5% від 2,51 до 6,00 хв. Таке градієнтне хроматографування було успішним та привело до повного розділення вихідної суміші.

Або у роботі [39] сполуки розділяли на колонці 100 x 1 мм X-Terra C18 з використанням 10 мМ ацетату амонію (елюент А) і ацетонітрилу (елюент В) за такою градієнтною програмою: початковий стан 98% елюенту А, потім 10-хвилинний лінійний градієнт до 100% елюенту В, 4-хвилинне ізократичне елюювання та 1-хвилинний лінійний градієнт назад до 98% елюенту А, який витримували протягом 13 хвилин для врівноваження колонки.

У випадку [40] аналіти були розділені за допомогою оберненої фази Zorbax Eclipse XDB-C18 колонка Agilent (розмір 150 мм × 2,1 мм) (Санта-Клара, Каліфорнія, США), з частинками 5 мкм. Рухома фаза складалася з розчинника А (0,1% мурашиної кислоти у воді) і розчинника Б (ацетонітрилу). Градієнт був наступний: $t = 0$ хв, 10% В; $t = 7$ хв, 15% В; $t = 26$ хв, 20% В; $t = 29$ хв, 25% В; $t = 30$ хв, 25% В; $t = 31$ хв, 10% В; $t = 35$ хв, 10% В.

1.6 Пробопідготовка зразків

Перед проведенням розділення та кількісного виділення кофеїну та його метаболітів постає актуальне питання пробопідготовки біологічних рідин. Досліджуючи зразки, такі як кров, сеча та слина, необхідно провести таку обробку цих рідин, що буде відповідати таким критеріям к повнота виділення, швидкість та

можливість проведення хроматографічного аналізу. Розглянемо запропоновані способи проведення підготовки проб деякими авторами.

1. Аліквоту молока додавали до 20% розчину трихлороцтової кислоти (ТСА) і центрифугували при 5000g протягом 15 хв. Аналіт переносили в чисту скляну пробірку і доводять рН до 5 за допомогою аміачного буфера [41].
2. Сироватку крові або слину, внутрішній стандарт і 5 мл хлороформу та ізопропанолу (85:15) перемішували протягом 30 секунд, а потім центрифугують протягом 5 хвилин при 2000 об/хв. 4 мл аліквоти органічної фази випарювали насухо струменем повітря на водяній бані при 4°C. Залишок розчиняли в 100 мкл ацетонітрилу/тетрагідрофурану/50 мМ ацетатному буфері [42].
3. Плазму отримували з крові центрифугуванням при 3000g протягом 30 хв при 4–8 °C. Змішували 500 мкл плазми, сечі або слини з 2,0 мл етанолу в пробірці на 5,0 мл шляхом перемішування на вортексі з наступною інкубацією при 4–8 °C протягом 1 години до забезпечення осадження білка/солі. Суміш далі центрифугують при 3000×g протягом 15 хв при 4–8 °C і 1,0 мл супернатанту було відібрано шприцом на 2,0 мл і пропускають через 13 мм шприцевий фільтр [43].
4. До 40 мкл сечі вносили 50 мкл розчину внутрішнього стандарту в скляну пробірку. Потім додавали 5 мл етилацетат-2-пропанолу (93:7, w/w). Суміш струшували протягом 10 хв, а після центрифугували 10 хв при 1000g. Потім переносили органічну фазу в конічну скляну пробірку і випарювали насухо при 55°C під парую азоту. Залишок розчиняли у 300 мкл рухомої фази [44].
5. Зразки крові центрифугували протягом 10 хв при 3500 об/хв при контрольованій температурі 10 °C. Сто мікролітрів робочого розчину додавали до 150 мкл зразків плазми. До цього розчину додають 350 мкл 10% розчину оцтової кислоти та 400 мкл води. Пробірку перемішували протягом 20 с, а потім центрифугували при 12000 об/хв протягом 10 хв при 4°C. Прозорий надосадовий шар збирали та попередньо обробляли в системі твердофазної екстракції (SPE) [45].
6. 100 мкл сечі додавали до 10 мл 0,1% оцтової кислоти. Потім 1 мл розведеної суміші пропускали через попередньо активовані картриджі Sep-Pak C18.

Картридж промивали 1 мл 0,1% мурашиної кислоти двічі, а потім елюювали 1 мл метанолу. Елюат сушили під газоподібним азотом. Залишок розчиняли в 0,1% оцтової кислоти/ацетонітрилу (90:10, 100 мкл) і аліквоту об'ємом 5 мкл вводили в колонку ВЕРХ для аналізу РХ-МС/МС. Суміш аналітів розчиняли в MeOH у концентрації 1 мг/мл і розбавляли до серії робочих стандартних розчинів. Аліквоту 5 мкл кожного робочого стандартного розчину додавали до 95 мкл порожньої сечі людини [46].

7. Білок осаджували додаванням 40 мкл 20% хлорної кислоти до 100 мкл плазми. Зразки змішували та центрифугували (10 хв, 10500 об/хв, 4 °C). Зразки сечі безпосередньо центрифугують (10 хв, 12 500 об/хв, 4 °C) і фільтрували за допомогою пор 0,45 мкм мембранні фільтри з ацетату целюлози [47].
8. Зразки плазми перемішували протягом 1 хв для гомогенізації плазми. Аліквоту 100 мкл плазми додавали до ацетонітрилу (200 мкл), що містить дейтеровані внутрішні стандарти (IS) при 50 нг/мл. Після 30 с вихрового перемішування зразки центрифугують при $6000 \times g$ протягом 5 хв. Супернатант (200 мкл) збирають і упарюють в атмосфері азоту насухо. Нарешті, сухий екстракт розчиняють у 100 мкл деіонізованої води [48].
9. Сполуки екстрагували з плазми або слини з використанням 5 і 4 мл етилацетату відповідно. Зразки змішували на вортексі (5 хв) з наступним центрифугуванням (4000 g, 10 хв). Потім органічний шар переносили в окрему пробірку і сушили в струмі азоту при 45°C. Залишок розчиняли у рухомій фазі [49].

В табл. 1.1.наведено зведені дані щодо підготовки зразків.

Таблиця 1.1. Пробопідготовка зразків біологічних рідин

№	Зразок	Спосіб	Розчинник	Посилання
1	Грудне молоко	Центрифугування	ТСА 20% розчину	25
2	Сироватка крові або слина	Центрифугування	Ацетонітрил, тетрагідрофуран або 50 мМ ацетатний буфер	41
3	Плазма, сеча або слина	Центрифугування з подальшим фільтруванням	Рухома фаза	42
4	Сеча	Центрифугування з подальшим упарюванням	Рухома фаза	43
5	Кров	Центрифугування з подальшою обробкою в системі твердофазної екстракції	10% розчин оцтової кислоти та вода.	44
6	Сеча	Екстрагування і сушіння	Метанол	45
7	Сеча та кров	Центрифугування з подальшим фільтруванням	Зразки сечі та крові безпосередньо	46
8	Плазма	Центрифугування з подальшим упарюванням	Деіонізована вода	47
9	Слина та плазма	Центрифугування з подальшим перенесенням органічного шару і сушіння	Рухома фаза	48

Виходячи з цих даних, можна підсумувати, що найбільш актуальними розчинниками виступають ті речовини, які використовуються як елюенти. А також спираючись на проаналізовані дані приготування робочих розчинів кофеїну та його метаболітів [44,48] доцільним є приготування градувальних розчинів і контрольної суміші з використанням води як розчинника.

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Обладнання та реактиви

Реактиви:

- Метанол LC-MS grade, Sigma-Aldrich;
- Мурашина кислота LC-MS grade, Agilent Technologies;
- Дихлорметан, х.ч.;
- Кофеїн, х.ч.;
- Теофелін, х.ч.;
- Теобромін, х.ч.;
- Параксантин, х.ч.;
- Парцетамол, х.ч.;
- Вода дистильована LC-MS grade, Honeywell;

Обладнання:

- Хроматограф аналітичний Agilent 1200 (автосамплер для планшета з мікрогніздами, діодно-матричний СФ детектор, насос двухканальний, насос ізократичний, мікродегазатор, термостат колонок, колонка Zorbax Eclipse Plus C18 4,6×100 мм, 3,5мкм;
- Ультразвукова баня WUC-A03H Daihan Scientific, потужність 296 Вт, частота 60 Гц;
- Роторний випарювач ІКА RV 3 есо;
- Стакан хімічний термостійкий 50 мл;
- Колби мірні місткістю 25 мл;
- Піпетки місткістю 1, 2, 5, 10 мл;
- Мірний циліндр 25 мл;
- Політетрафлуороетиленові фільтри Chromafil O-20/15 MS;
- Шприц ін'єкційний 5 мл, двокомпонентний з голкою, Hemoplast;

2.2 Методики експерименту

2.2.1 Методика приготування вихідних розчинів

Для приготування вихідного розчину кофеїну (С) концентрацією 0,194 мг/мл наважку кофеїну масою 0,00485 г необхідно перенести у колбу місткістю 25 мл та довести до мітки дистильованою водою, ретельно перемішати.

Для приготування вихідних розчинів теофіліну (ТФ), теоброміну (ТВ) та параксантину (Р) концентрацією 0,180 мг/мл методика приготування наступна: наважку 0,00470 г відповідної речовини необхідно перенести у колбу місткістю 25 мл та довести до мітки дистильованою водою, ретельно перемішати.

Для приготування вихідного розчину парацетамолу (Ра) концентрацією 0,278 мг/мл наважку парацетамолу масою 0,00696 г необхідно перенести у колбу місткістю 25 мл та довести до мітки дистильованою водою, ретельно перемішати.

2.2.2 Методика приготування суміші метилксантинів

Для приготування розчину суміші кофеїну, параксантину, теофіліну та теоброміну, в якому концентрація кожного з компонентів буде становити 25 мкг/мл, необхідно перенести 3,22 мл вихідного розчину кофеїну та по 3,48 мл вихідних розчинів параксантину, теофіліну та теоброміну у колбу місткістю 25 мл та довести дистильованою водою до мітки.

2.2.3 Методика приготування градуювальних розчинів

Розчини готуються в колбі ємністю 25 мл із вихідного розчину, де вміст кожного з компонентів суміші становить 25 мкг/мл.

Таблиця 2.1. Схема приготування градувальних розчинів

Концентрація градувального розчину, мкг/мл	Концентрація вихідного розчину, мкг/мл	Об'єм вихідного розчину, мл
0,063	1	1,56
0,125	2	1,56
0,25	4	1,56
0,50	25	0,5
1,0	25	1,0
2,0	25	2,0
4,0	25	4,0
8,0	25	8,0

2.2.4 Методика приготування модельної суміші

Модель суміші містить: 80% - параксантин, 12% - теобромін, 4% - теофілін, 4% - кофеїн; за даними авторів [32] такий склад має зразок сечі.

Таблиця 2.2. Схема приготування вихідного розчину модельної суміші

Речовина	Концентрація, мкг/мл	Вміст у суміші, %	Об'єм аліквоти, мл
С	3,9	4	0,5
Р	72,0	80	10,0
ТF	3,6	4	0,5
ТВ	10,8	12	1,5
Ра	5,0	-	2,3

Далі з приготованого вихідного розчину модельної суміші готуються градувальні розчини. У колбу ємністю 25 мл необхідно перенести задану кількість вихідного розчину (таблиця 2.3) та довести до мітки дистильованою водою, ретельно перемішати.

Таблиця 2.3. Схема приготування модельної суміші

Суміш	Вих. розчин	Кількість внесеної проби, мл	Концентрація компонентів, мкг/мл				
			P	TB	TF	C	Pa
1	–	–	72,00	10,80	3,60	3,88	25,00
2	1	5,0	14,40	2,16	0,72	0,78	5,00
3	1	2,5	7,20	1,08	0,36	0,39	2,5
4	2	6,25	3,60	0,54	0,18	0,195	1,25
5	2	4,0	2,31	0,35	0,115	0,125	0,80

2.2.5 Методика приготування проби зразка сечі

Виходячи з літературного огляду, проби сечі, на відміну від плазми крові, не потребують особливої підготовки. Адже до зразку достатньо додати розчинник, центрифугувати при низькій температурі (4°C) та відфільтрувати. Як розчинник використано воду та етанол.

Перша група: необхідно відібрати 3 мл проби, перенести у колбу місткістю 25 мл та довести до мітки дистильованою водою, ретельно перемішати.

Друга група: необхідно відібрати 3 мл проби, додати 5 мл суміші кофеїну, метаболітів та внутрішнього стандарту концентрацією 25 мкг/мл, перенести у колбу місткістю 25 мл та довести до мітки дистильованою водою, ретельно перемішати.

Третя група: необхідно відібрати 3 мл проби, додати 5 мл внутрішнього стандарту концентрацією 25 мкг/мл, перенести у колбу місткістю 25 мл та довести до мітки дистильованою водою, ретельно перемішати.

Було використано дві проби сечі, відібрані у різний час після вживання кофеїновмісних продуктів. Перша проба – відібрано через 2 години після вживання кофеїновмісних продуктів, а другу – через 12 годин.

2.2.6 Методика хроматографічного розділення

Об'єм інжекції: 20 мкл

Нерухома фаза: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6×100 мм, 3,5мкм

Рухома фаза: H₂O/MeOH/0.1%FA

Довжини хвилі детектування: $\lambda=280$ нм.

Таблиця 2.4. Метод хроматографічного розділення 15-60% MeOH/0.1%FA

Час, хв	(H ₂ O+0,1%FA), %	(MeOH+0,1%FA), %	Потік, мл/хв
0,00	85,0	15,0	1,0
1,50	85,0	15,0	1,0
5,00	60,0	40,0	1,0
5,30	50,0	50,0	1,0
6,00	40,0	60,0	1,0
7,00	40,0	60,0	1,0
8,00	0,0	100,0	2,0
8,30	85,0	15,0	2,0

2.2.7 Методика приготування проби енергетичного напою

Перш за все, необхідно провести пробопідготовку даного зразка, так як напій є багатокомпонентним, окрім того великий вміст цукру може вплинути на роботу колонки. За зазначенням виробника вміст кофеїну в напої 38,4 мг/100 мл.

З огляду на роботи авторів [49, 50, 51], екстракцію з метою відділення водорозчинних компонентів (особливо цукру) проведено за допомогою дихлорметану (ДХМ) таким чином:

За допомогою піпетки ємністю 1 мл відбирають зразок об'ємом 0,25 мл та переносять в колбу ємністю 25 мл та доводять дистильованою водою до мітки, ретельно перемішують. Далі відбирають 10 мл отриманого розчину за допомогою піпетки місткістю 10 мл та переносять у ділильну воронку, також додаючи такий самий об'єм ДХМ. Далі воронку щільно закривають та забезпечують найбільш інтенсивне перемішування. Вміст ділильної воронки обережно збовтують, потім повертають краном вгору і, обережно відкриваючи кран, випускають пари розчинника. Тільки після взаємного насичення фаз і вирівнювання тиску можна енергійно струшувати вміст ділильної лійки протягом декількох хвилин.

Закінчивши перемішування, ділильну лійку поміщають в спеціальну підставку закріплюючи ділильну воронку в лапці на штативі. Після розширювання системи на два прозорих шару їх розділяють, попередньо відкривши пробку. Один з шарів являє собою розчин речовини в органічному розчиннику, а другий - розчин цієї речовини в вихідному розчиннику, тобто у воді.

Потім нижній шар повільно зливають через край в посудину, а верхній шар завжди виливають через верхній отвір ділильної лійки. У даному випадку був цільовим нижній органічний розчин, що далі був випарений за допомогою ротора. Після закінчення процесу випарювання ДХМ, отриманий осад розчиняється у 10 мл дистильованої води. Після цього необхідно додати за допомогою піпетки до цільового розчину 0,4 мл розчину внутрішнього стандарту парацетамолу концентрацією 25 мкг/мл.

2.3 Результати та обговорення

2.3.1 Підбір методу хроматографічного розділення

Довжину хвилі 280 нм для детектування метилксантинів з використанням діодно-матричного детектора було обрано на основі аналізу спектрів поглинання (рис. 2.1, 2.2) кофеїну, його метаболітів та внутрішнього стандарту (парацетамол), а їх ідентифікацію проведено шляхом порівняння часу утримування та УФ спектри зі стандартами, а також додатково методом добавок.

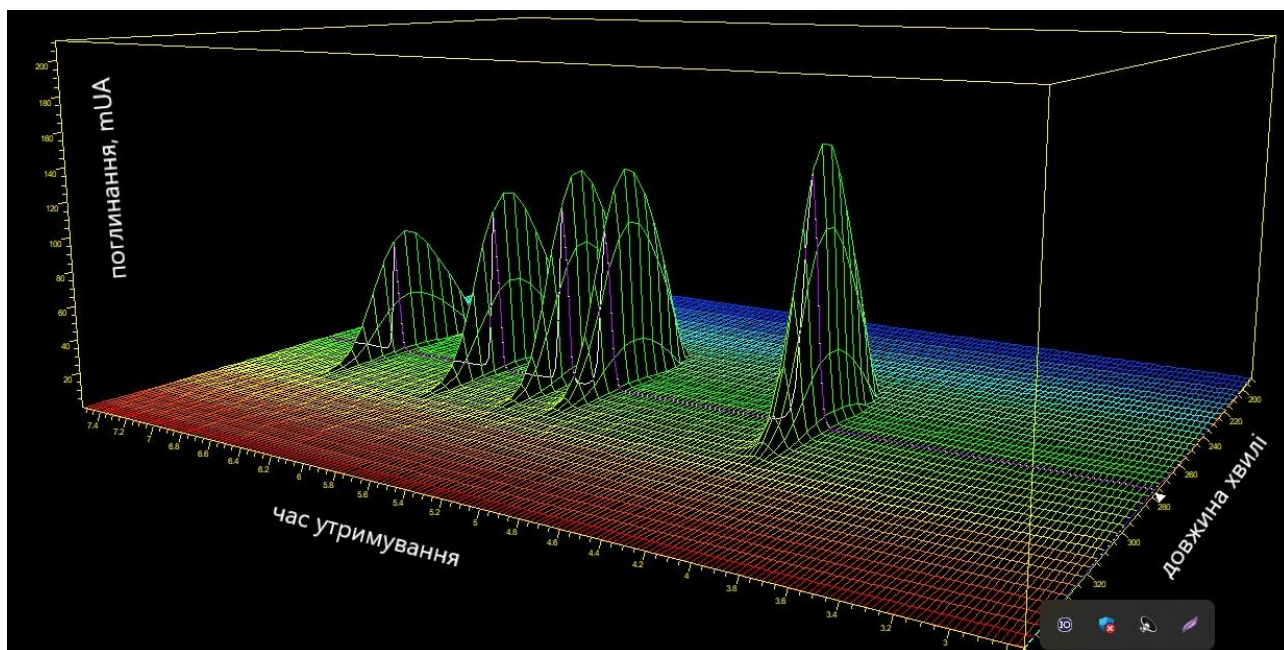


Рисунок 2.1. 3-D графік профілю сполук, що детектуються

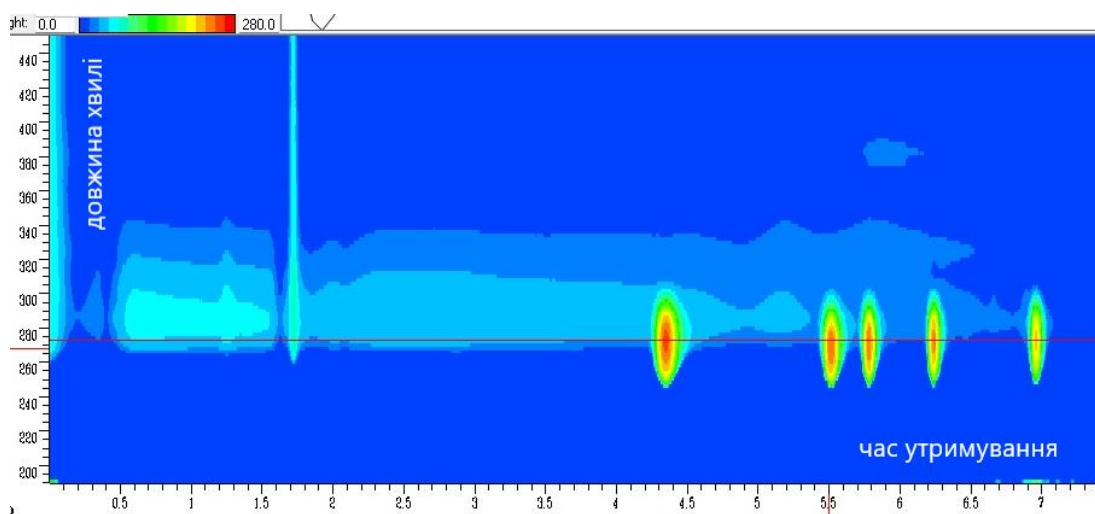


Рисунок 2.2. 2-D графік профілю сполук, що детектуються

Послідовність виходу сполук відповідає особливостям будови представлених ксантинів, а також даним теоретичного аналізу [52]: 1. теобромін; 2. параксантин; 3. теофілін; 4. кофеїн.

Було поставлено завдання підбору оптимального методу хроматографічного розділення суміші кофеїну, теоброміну, теофіліну та параксантину. Для цього було використано суміш цих речовин, в якій кожен компонент присутній у рівній концентрації 25 мкг/мл.

Первинний метод хроматографування було обрано на основі раніше розглянутих літературних даних [38], так розділення кофеїну та його метаболітів спочатку проведено на розповсюджені методі з РФ метанол-вода з модифікатором мурашиною кислотою з градієнтом 10-50, наведеному в таблиці 2.5. Результати розділення наведено на рис. 2.3.

Об'єм інжекції: 1 мкл

Нерухома фаза: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6×100 мм, 3,5мкм

Рухома фаза: H₂O/MeOH/0.1%FA

Довжина хвилі детектування: $\lambda=280$ нм.

Таблиця 2.5. Метод хроматографічного розділення 10-50% MeOH/0.1%FA

Час, хв	(H ₂ O+0,1%FA), %	(MeOH+0,1%FA), %	Потік, мл/хв
0,00	90,0	10,0	1,0
1,50	90,0	10,0	1,0
6,00	50,0	50,0	1,0
7,00	0,0	100,0	1,0
8,00	0,0	100,0	1,0

Отримані результати хроматографічного розділення є задовільними, але бажано отримати результати з вищою селективністю щодо розділення параксантину та

теофеліну та скоротити час аналізу. Для цього було вирішено посилити метод, збільшивши долю органічного розчинника на початку градієнта до 30 % (табл. 2.6, рис. 2.4).

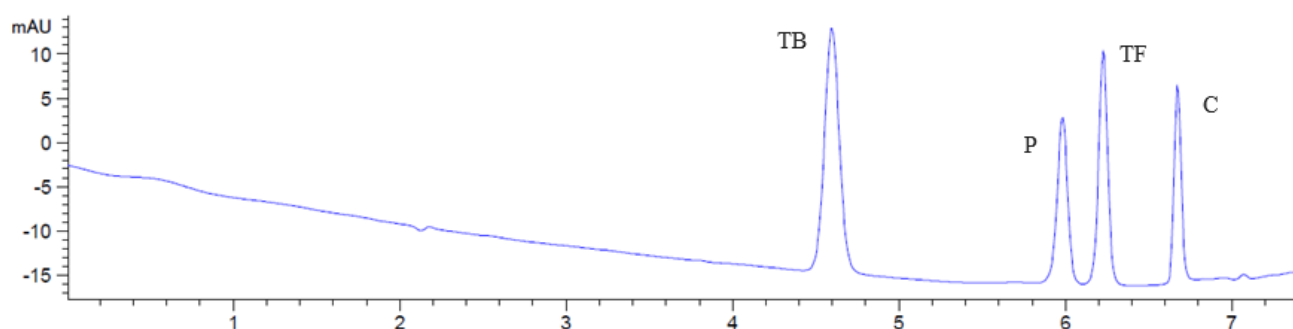


Рисунок 2.3. Хроматографічний аналіз суміші з концентрацією кофеїну, параксантину, теоброміну, теофіліну 25 мкг/мл; метод хроматографічного розділення 10-50% MeOH/0.1%FA

Таблиця 2.6. Метод хроматографічного розділення 30-70% MeOH/0.1%FA

Час, хв	(H ₂ O+0,1%FA), %	(MeOH+0,1%FA), %	Потік, мл/хв
0,00	70,0	30,0	1,0
1,50	70,0	30,0	1,0
6,00	30,0	70,0	1,0
7,00	0,0	100,0	2,0
8,00	0,0	100,0	2,0

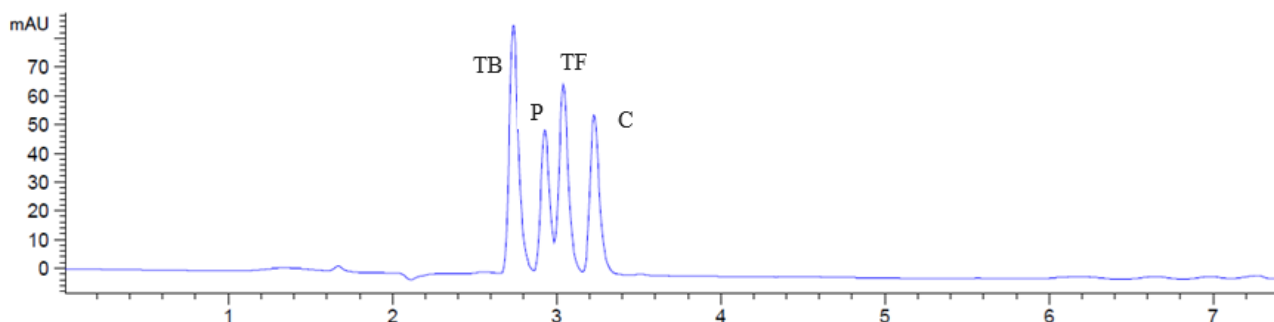


Рисунок 2.4. Хроматографічний аналіз суміші з концентрацією кофеїну, параксантину, теоброміну, теофіліну 25 мкг/мл; метод хроматографічного розділення 30-70% MeOH/0.1%FA

В результаті застосування методу хроматографічного розділення методом 30-70% MeOH/0.1%FA (рис. 2.4) вдалось скоротити час аналізу, але селективність для параксантину та теофіліну не є задовільною, параметр R_s становить 1,1.

Отримані результати хроматографування (рис. 2.4) демонструють, що для кращого результату необхідно звужити градієнт для повного розділення піків. Таким методом можливо використати градієнт 25-60 для попередньої рухомої фази (табл. 2.7).

Таблиця 2.7. Метод хроматографічного розділення 25-60% MeOH/0.1%FA

Час, хв	(H ₂ O+0,1%FA), %	(MeOH+0,1%FA), %	Потік, мл/хв
0,00	75,0	25,0	1,0
1,50	75,0	25,0	1,0
6,00	40,0	60,0	1,0
7,00	0,0	100,0	2,0
8,00	0,0	100,0	2,0

Результати розділення модельного розчину суміші метилксантинів наведено на рис. 2.5. Застосування даного методу призвело до погіршення селективності.

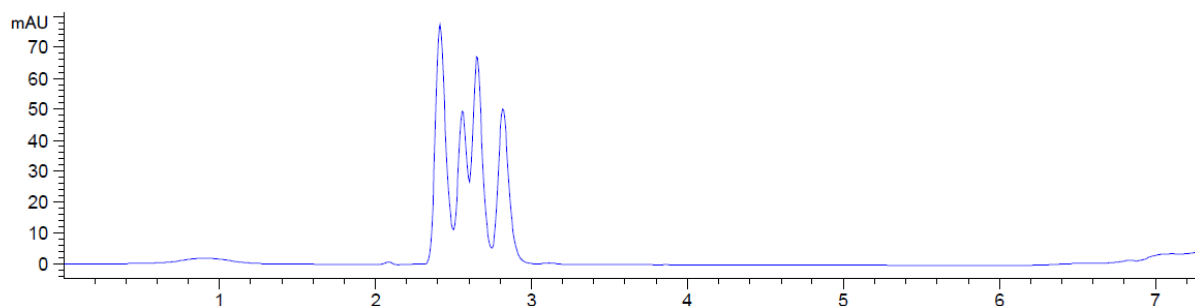


Рисунок 2.5. Хроматографічний аналіз суміші з концентрацією кофеїну, параксантину, теоброміну, теофіліну 25 мкг/мл; метод хроматографічного розділення 25-60% MeOH/0.1%FA

Для покращення селективності розділення усіх чотирьох речовин було вирішено застосувати змішаний режим хроматографування, а саме: зміна концентрації органічного розчинника у градієнтному режимі 15-60% MeOH/0.1%FA із застосуванням ізократичного режиму елюювання з 5,00 хв до 5,30 хв та з 6,00 хв до 7,00 хв методу (табл. 2.8). Результати розділення наведено на рис. 2.6.

Таблиця 2.8. Метод хроматографічного розділення 15-60% MeOH/0.1%FA

Час, хв	(H ₂ O+0,1%FA), %	(MeOH+0,1%FA), %	Потік, мл/хв
0,00	85,0	15,0	1,0
1,50	85,0	15,0	1,0
5,00	60,0	40,0	1,0
5,30	50,0	50,0	1,0
6,00	40,0	60,0	1,0
7,00	40,0	60,0	1,0
8,00	0,0	100,0	2,0
8,30	85,0	15,0	2,0

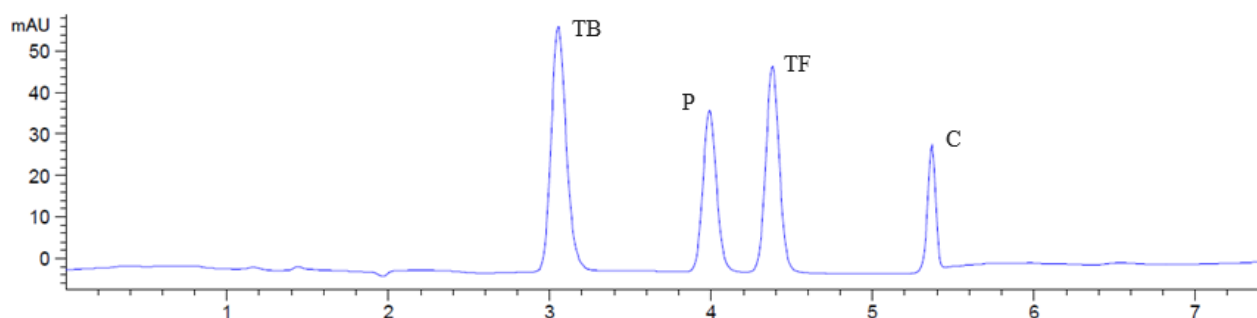


Рисунок 2.6. Хроматографічний аналіз суміші з концентрацією кофеїну, параксантину, теоброміну, теофіліну 25 мкг/мл; метод хроматографічного розділення 15-60% MeOH/0.1%FA

Порівнюючи запропонований метод хроматографічного розділення 15-60% MeOH/0.1%FA (таблиця 2.7) можна зазначити, що даний метод має ряд переваг у порівнянні з запропонованими авторами [40,41]: використання менш токсичного та дешевшого елюенту, гарна селективність та суттєве зниження часу хроматографічного аналізу, у порівнянні з зазначеними роботами щонайменше у 2 рази. Типову хроматограму наведено на рис. 2.8.

2.3.2 Результати визначення діапазону лінійності градуовальної залежності

У результаті хроматографічного аналізу стандартних розчинів за методом 15-60% MeOH/0.1%FA (табл. 2.8.) було отримано лінійні залежності для кожного компоненту суміші та внутрішнього стандарту - парацетамолу, що занесено у табл. 2.9 та наведено на рис. 2.7. Визначення проведено за даними 5 паралельних серій вимірювань. Залежності лінійні в широкому діапазоні концентрацій від 0,063 мкг/мл до 8 мкг/мл.

Таблиця 2.9. Значення аналітичного сигналу в залежності від концентрації кофеїну, його метаболітів та парацетамолу.

с, мкг/мл	S (TB), μAU·с	S (P), μAU·с	S (TF), μAU·с	S (C), μAU·с	S (Pa), μAU·с
0,063	10,1±0,4	6,2±0,2	6,7±0,4	6,2±0,3	3,3±0,4
0,125	21,2±0,5	11,9±0,5	14,9±0,4	12,4±0,4	6,9±0,4
0,25	41,9±0,3	23,2±0,4	29,2±0,4	24,0±0,5	13,0±0,5
0,50	85,3±0,4	48,8±0,7	61,1±0,7	50,3±0,5	25,0±0,4
1,0	159±2	92,6±1,3	115,2±1,3	97±2	50,2±0,7
2,0	325±3	188±2	229,3±1,6	197±2	101,6±1,1
4,0	632±4	389,6±1,2	461±4	390±4	199,5±1,3
8,0	1275±8	776±6	914±7	770±6	397±4

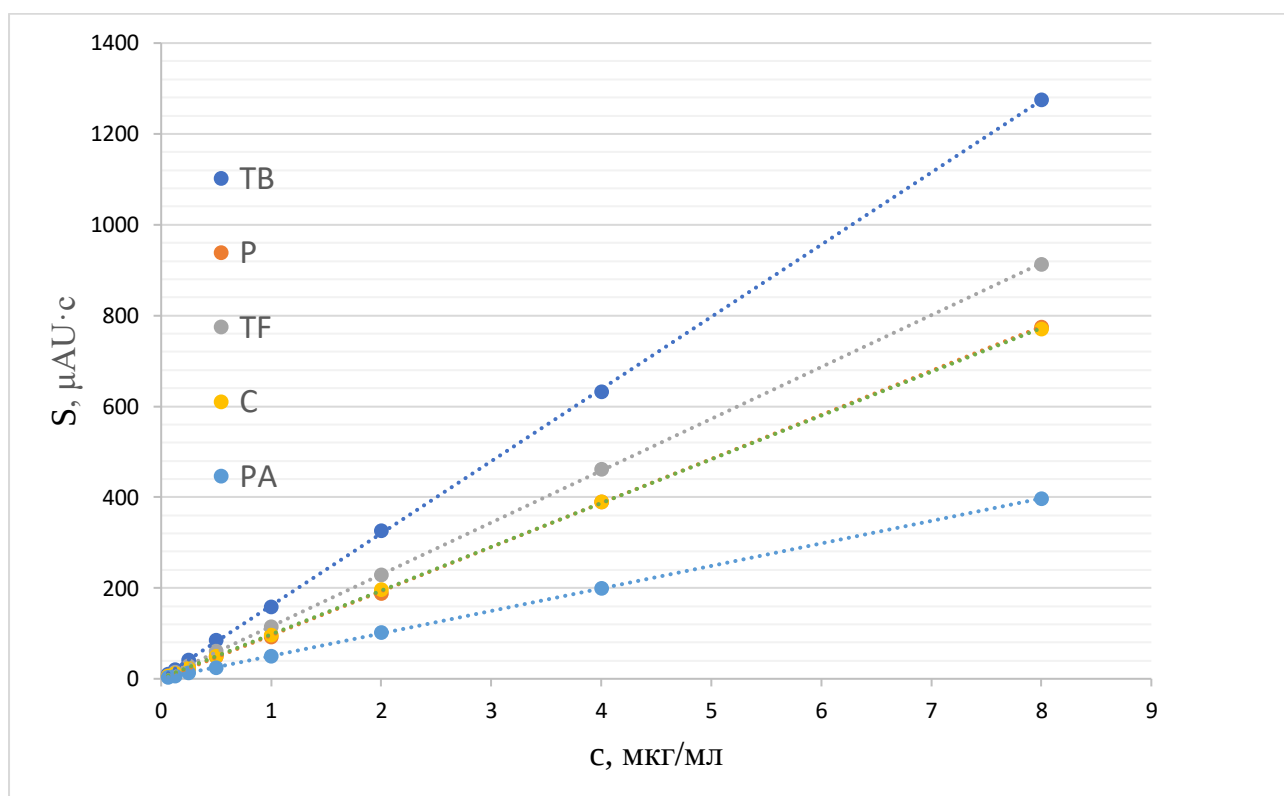


Рисунок 2.7. Градувальні залежності для визначення кофеїну, його метаболітів та парацетамолу.

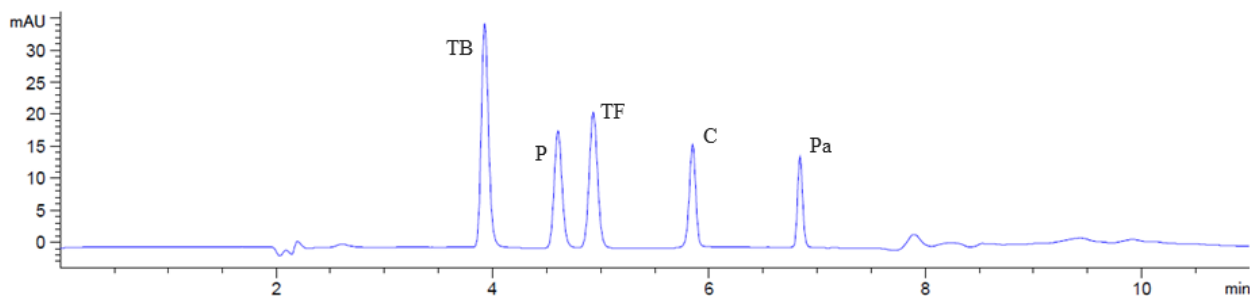


Рисунок 2.8. Типова хроматограма розділення градуювальної суміші

Межу кількісного визначення аналізованих речовин оцінено за статистичними характеристиками даних градуювального графіка [53]. Розрахунки проведено у програмному забезпеченні Microsoft Excel.

Нормувальний коефіцієнт k розраховано за формулою:

$$k = \frac{c_i \cdot S_{CT}}{c_{CT} \cdot S_i}, \quad (2.1)$$

де c_i – вміст компонента суміші; c_{CT} – вміст внутрішнього стандарту; S_i – площа піка компонента суміші; S_{CT} – площа піка внутрішнього стандарту.

Таблиця 2.10. Параметри градувальної залежності та LOQ кофеїну та його метаболітів.

Речовина	Рівняння градувальної залежності $S, \mu\text{AU} = a \cdot c,$ мкг/мл	Коефіцієнт детермінації, R^2	Межа кількісного визначення LOQ, мкг/мл	Нормувальний коефіцієнт k
C	$S = (96 \pm 3)c$	0,9999	0,023	$0,524 \pm 0,013$
P	$S = (114 \pm 3)c$	1	0,026	$0,536 \pm 0,016$
TF	$S = (97 \pm 3)c$	0,9999	0,017	$0,445 \pm 0,017$
TB	$S = (158 \pm 3)c$	0,9999	0,024	$0,314 \pm 0,007$
Pa	$S = (49 \pm 3)c$	1	-	-

Порівнюючи отриманий результат межі кількісного визначення аналізованих речовин із авторами [42,43,25] варто зазначити, що LOQ у статтях не становить нижче значення 0,02 мкг/мл, що є співставно із межою кількісного визначення за запропонованою методикою.

2.3.3 Результати аналізу модельної суміші за методом «введено» - «знайдено»

Для приготованих 5 зразків модельних сумішей, в яких співвідношення компонентів імітує склад метаболітів в організмі людини, було проведено хроматографічний аналіз за запропонованою методикою. Після обробки отриманих результатів хроматографічного аналізу за допомогою методу внутрішнього стандарту, представлено такі результати (табл. 2.11). Використовуючи розрахований за допомогою внутрішнього стандарту нормувальний коефіцієнт (табл. 2.10), визначаємо вміст кожного з компонентів модельної суміші.

Відносна похибка приготування розчинів із заданою концентрацією не перевищує 0,007 мкг/мл.

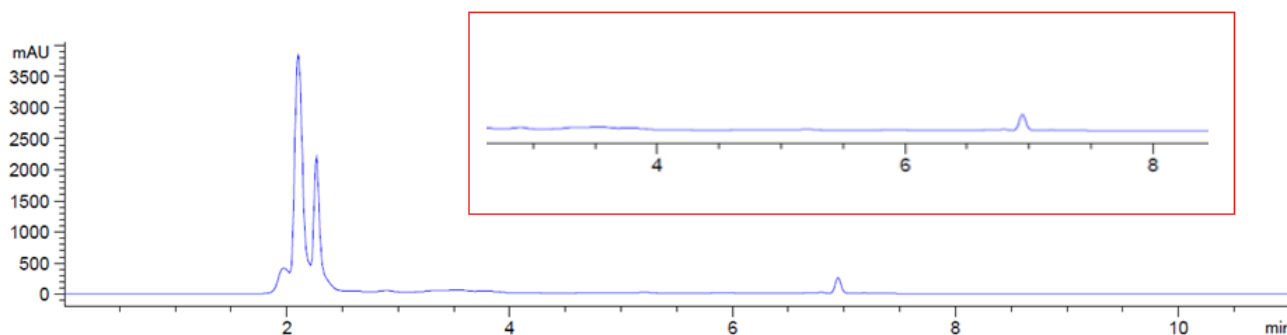
Таблиця 2.11. Результати хроматографічного аналізу модельної суміші за методом «введено» - «знайдено»

	2		3		4		5	
	Введено	Знайдено	Введено	Знайдено	Введено	Знайдено	Введено	Знайдено
с, мкг/мл								
P	14,40	14,34±0,13	7,20	7,18±0,06	3,60	3,57±0,05	2,31	2,27±0,05
TV	2,16	2,13±0,03	1,08	1,04±0,05	0,54	0,51±0,03	0,35	0,34±0,01
TF	0,72	0,71±0,05	0,36	0,35±0,02	0,180	0,18±0,02	0,115	0,112±0,014
C	0,78	0,75±0,03	0,39	0,36±0,02	0,195	0,17±0,03	0,125	0,119±0,007

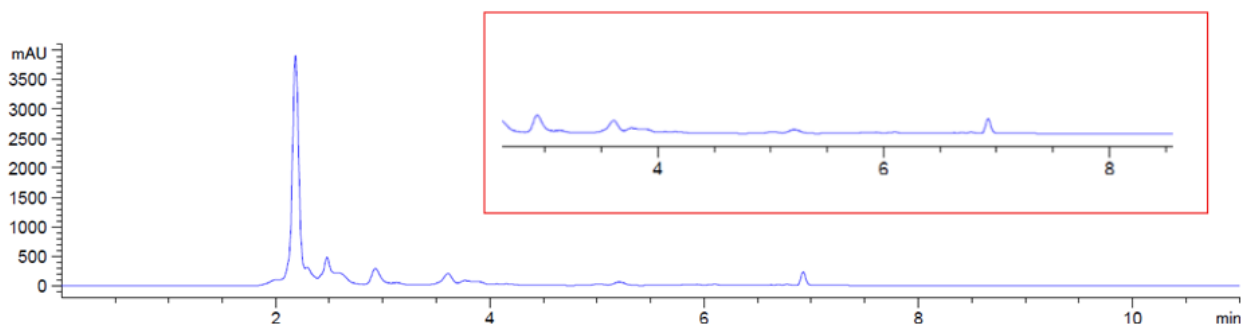
Як видно із даних, наведених в табл. 2.11, результати узгоджуються між собою, далі запропоновану методику було застосовано для аналізу реальних зразків.

2.3.4 Визначення вмісту кофеїну та метаболітів у зразку сечі

Для приготованих проб за методикою 2.2.5 було проведено хроматографічний аналіз. Шляхом порівняння хроматограм, отриманих в результаті аналізу проб сечі приготованих з використанням води та етанолу (рис. 2.9-2.10), можна зробити висновок, що у випадку використання води, як розчинника, на хроматограмі зареєстровано більше відгуків та інтенсивність сигналів є більшою. Тому у подальших дослідженнях використовували воду у якості розчинника.



2.9. Хроматографічний аналіз проби сечі при використанні етанолу в якості розчинника



2.10. Хроматографічний аналіз проби сечі при використанні води в якості розчинника

Також за результатами хроматографування проб сечі із почерговими введеними добавками метилксантинів, встановили час утримування кожного з компонентів, який становить:

теобромін – 3,174 хв;

параксантин – 3,903 хв;

теофілін – 4,342 хв;

кофеїн – 5,467 хв;

внутрішній стандарт (парацетамол) – 6,825 хв.

Час виходу цільових компонентів суміші відрізняється від часу їх виходу у модельній суміші через вплив матриці суміші проби сечі.

Наступним кроком було проведення аналізу проб 1 та 2. Результати наведено в табл. 2.12 та 2.13.

Таблиця 2.12. Результати хроматографічного аналізу проби 1 з додаванням внутрішнього стандарту, s – результат вмісту в розведеній пробі, s_x – результат вмісту в пробі сечі, що була надана для аналізу.

Речовина	Проба з додаванням внутрішнього стандарту		
	$S, \mu\text{AU} \cdot \text{с}$	$s, \text{мкг/мл}$	$s_x, \text{мкг/мл}$
P	323,8	$3,02 \pm 0,05$	$25,19 \pm 0,12$
TV	417,5	$2,43 \pm 0,03$	$20,28 \pm 0,16$
TF	256,9	$2,12 \pm 0,03$	$17,67 \pm 0,09$
C	53,1	$0,51 \pm 0,03$	$4,25 \pm 0,05$
Pa	269,3	-	-

На рис. 2.11 наведено хроматограму зразку сечі номер 1 з внутрішнім стандартом

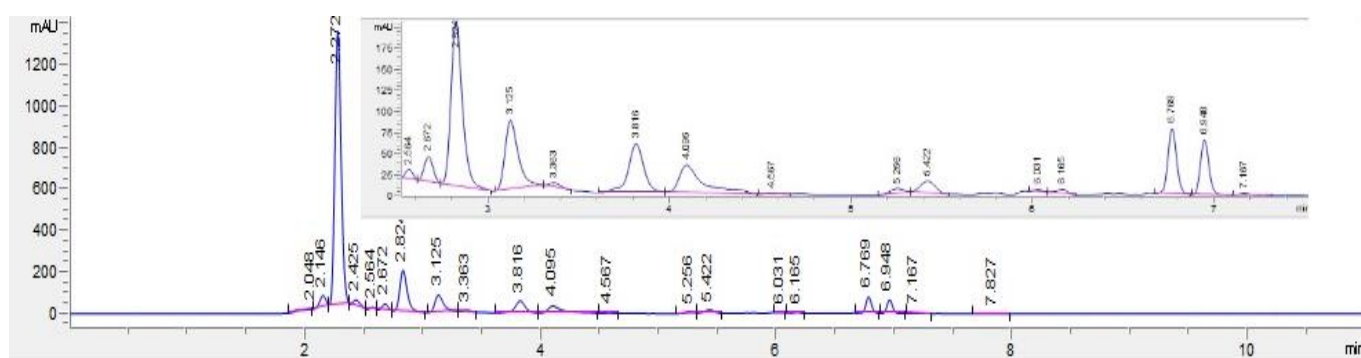


Рисунок 2.11 Хроматограма зразку сечі номер 1 з внутрішнім стандартом

Таблиця 2.13. Результати хроматографічного аналізу проби 2 з додаванням внутрішнього стандарту, s – результат вмісту в розведеній пробі, s_x - результат вмісту в пробі сечі, що була надана для аналізу.

Речовина	Проба з додаванням внутрішнього стандарту		
	$S, \mu AU \cdot c$	$s, \text{мкг/мл}$	$s_x, \text{мкг/мл}$
P	159,8	$1,73 \pm 0,04$	$14,41 \pm 0,16$
TB	163,2	$1,04 \pm 0,05$	$8,67 \pm 0,03$
TF	128,8	$1,16 \pm 0,03$	$9,67 \pm 0,04$
C	37,9	$0,40 \pm 0,03$	$3,33 \pm 0,06$
Pa	246,4	-	-

Результати аналізу розраховані з використанням градувальних залежностей узгоджуються із отриманими за методом внутрішнього стандарту.

Зведені розраховані результати хроматографічного аналізу проб сечі на вміст кофеїну, параксантину, теофіліну та теоброміну методом внутрішнього стандарту наведено у табл. 2.14 та рис. 2.13.

Таблиця 2.14. Результати хроматографічного аналізу проб сечі

Речовина	Перша проба відібрана через 2 години, $s, \text{мкг/мл}$	Друга проба відібрана через 12 годин, $s, \text{мкг/мл}$
P	$25,5 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,5$
TB	$20,1 \pm 0,5$	$9,1 \pm 0,6$
TF	$18,4 \pm 0,7$	$10,0 \pm 0,6$
C	$4,5 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,4$

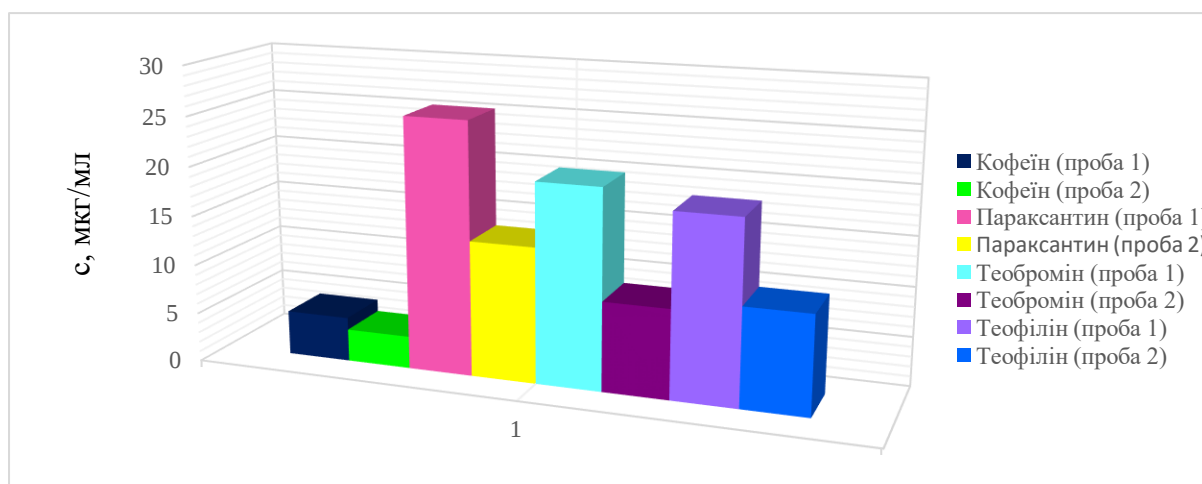


Рисунок 2.12. Результати хроматографічного аналізу проб сечі

Як видно з отриманих даних (табл. 2.14) проба, отримана через 2 години містить у два рази більше цільових компонентів, ніж проба, отримана через 12 годин, що відповідає очікуваному результату процесу метаболізму в організмі.

2.3.5. Результати перевірки правильності

Перевірку правильності отриманих результатів аналізу зроблено за методом добавок. Проведено дослідження проб при внесенні добавки кофеїну, параксантину, теофіліну та теоброміну з внутрішнім стандартом. Результати наведено в табл. 2.15 та 2.16.

Таблиця 2.15. Результати хроматографічного аналізу проби 1 з додаванням добавки та внутрішнього стандарту

Речовина	Знайдено, мкг/мл	Добавка, мкг/мл	Очікуване значення, мкг/мл	Знайдено з добавкою, мкг/мл
P	3,02±0,03	5,0	8,02	8,03±0,07
TB	2,43±0,05	3,0	5,43	5,37±0,06
TF	2,12±0,03	3,0	5,12	5,21±0,04
C	0,51±0,02	1,0	1,51	1,50±0,03

Таблиця 2.16. Результати хроматографічного аналізу проби 2 з додаванням добавки та внутрішнього стандарту.

Речовина	Знайдено, мкг/мл	Добавка, мкг/мл	Очікуване значення, мкг/мл	Знайдено з добавкою, мкг/мл
Р	1,73±0,04	2,0	3,73	3,69±0,05
ТВ	1,04±0,03	1,0	2,04	2,10±0,04
ТФ	1,16±0,04	1,0	2,16	2,20±0,04
С	0,40±0,03	1,0	1,40	1,37±0,03

2.3.5 Результати визначення вмісту кофеїну та метаболітів у енергетичному напою

2.3.5.1. Результати визначення ступеню вилучення кофеїну та парацетамолу ДХМ

Було перевірено ступінь вилучення кофеїну та парацетамолу в результаті екстракції з використанням ДХМ.

Для цього необхідно у колбу ємністю 25 мл перенести 4 мл вихідного розчину кофеїну та 2,88 мл вихідного розчину парацетамолу, довести до мітки дистильованою водою. Отримано розчин, що містить 31,04 мкг/мл кофеїну та 32 мкг/мл парацетамолу. З приготованого розчину відбираються аліквоти, об'ємом 1,28 мл, 2,56 мл та 5,12 мл по-червого переносяться у колби ємністю 25 мл та доводяться до мітки дистильованою водою. З даними розчинами проводяться усі етапи методики екстракції кофеїну за допомогою ДХМ, що описані вище.

Результати наведено у табл. 2.17. Як видно з результатів, парацетамол вилучається на 99 %, тому вводити його у пробу можна як на етапі екстракції, так і на етапі розведення розчину водою після проведення екстракції.

Таблиця 2.17. Результати визначення ступеню екстракції.

Розчин	Парацетамол		Кофеїн	
	с, мкг/мл	Ступінь екстракції, %	с, мкг/мл	Ступінь екстракції, %
I	1,59	99	1,64	73
II	3,17	99	3,28	72
III	6,35	99	6,55	73

2.3.5.2. Результати аналізу енергетичного напою

Виходячи з попередньо аналізованих літературних даних, відомо, що у продуктах рослинного походження може міститися окрім кофеїну ще й два його метаболіти, такі як теофілін та теобромін. Для перевірки цього припущення, а також, в першу чергу, можливостей запропонованої методики хроматографічного розділення метилксантинів у складній реальній суміші було проаналізовано напій енергетичний Hell Strong Watermelon.

Склад цього напою є таким: вода, цукор, лимонна кислота, вуглекислий газ (мін. 0.3%), регулятор кислотності (цитрати натрію), екстракт рослинного барвника (концентрат чорної моркви), смакоароматичні добавки, кофеїн (0.04%), барвник (карамель аміаку), вітаміни (вітамін B3 (ніацин), вітамін B5 (пантотенова кислота), вітамін B6 (піридоксин), вітамін B2 (рибофлавін), вітамін B12 (кобаламін)), глюкуронолактон, інозитол.

Отриману типову хроматограму наведено нижче (рис. 2.13). За часом виходу можна зробити висновок, що пік з часом виходу 4,825 хв є піком саме кофеїну, що відповідає визначеному раніше його часу виходу.

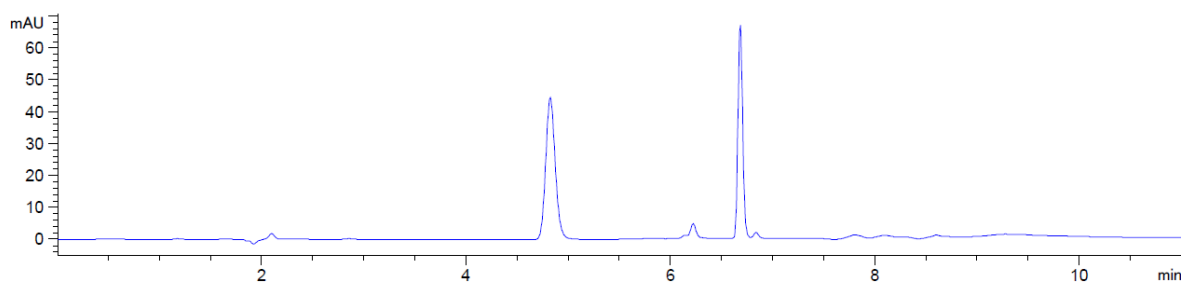


Рисунок 2.13. Хроматографічний аналіз проби енергетичного напою з внутрішнім стандартом

Отримані дані аналізу дозволяють кількісно оцінити вміст кофеїну у енергетичному напої Hell Strong Watermelon. Так, розрахований вміст кофеїну з урахуванням розбавлення у напої становить $0,39 \pm 0,02$ мг/мл, що відповідає кількості кофеїну у напої, заявленій виробником.

2.4 Техніка безпеки

Загальні правила:

1. Під час виконання роботи необхідно керуватися інструкціями, методиками, методичними вказівками, розробленими і затвердженими у встановленому порядку з метою забезпечення безпечного виконання ним робіт.
2. Усі види робіт мають виконуватись у захисному спецодязі та захисних окулярах; заборонено знаходитись у лабораторії менше двох осіб.
3. Усі реагенти мають зберігатися у щільно закритому посуді та під витяжною шафою.

Правила роботи з роторним випарювачем:

1. Спочатку необхідно відкрити кран для подачі води у холодильник роторного випаровувача, впевнитися, що вода подається по системі водопостачання.
2. Якщо води немає, вмикати роторний випаровувач не можна. Якщо воду вимкнули впродовж дня, обов'язково вимкнути роторний випаровувач.
3. Роторну баню заповнювати водою на 2/3. Необхідно завжди слідкувати, щоб вода з бані залишалася на такому рівні. Не перегрівати баню більш ніж потрібно. Перевірити чистоту паровідвідної трубки. Перед кожною роботою ротора вона повинна бути чиста.
4. Заборонено виконувати роботи на роторному випаровувачі без захисних окулярів.
5. Заборонено переганяти на роторному випаровувачі будь-які реакційні суміші, які містять пероксиди та аліфатичні азиди.
6. Прибрати робоче місце, вимкнути електроприлади; закрити водяні крани, вимкнути нагрівальні прилади, герметично закрити посуд з реактивами. Відключити вентиляцію (через 15-20 хв. після закінчення роботи). Зняти та прибрати у відведене для цього місце спецодяг і інші засоби індивідуального захисту. Вмити лице і руки теплою водою з милом або прийняти душ.

Правила роботи з метанолом:

Метанол - сильна отрута, що діє переважно на нервову і судинну системи. В організм людини може проникнути через дихальні шляхи і навіть через не

пошкоджену шкіру. Прийом 5 - 10 г метанолу всередину може викликати важке отруєння, а 20 г є смертельною дозою. Метанол використовується тільки на виробництві і у вільний продаж не надходить. Метанол широко використовується на хімічному, фармацевтичному, лісохімічному та інших виробництвах. В органічному синтезі використовується для отримання різних хімічних речовин.

Метанол (CH_3OH) - пожежонебезпечна легкозаймиста речовина. Пари CH_3OH утворюють з повітрям вибухонебезпечні суміші (в тому числі в порожніх ємностях). Ємності можуть вибухати при нагріванні. З повітрям утворює вибухонебезпечні суміші (температура спалаху $15,6^\circ\text{C}$).

Несумісний з речовинами, що викликають займання (Br_2 , KMnO_4 , HNO_3 , H_2SO_4 тощо), гідридами, а також утворюють вибухові суміші: нітрати, пероксиди, пірофорні порошки; лужні і лужноземельні метали.

Застосування метанолу може допускатися лише в тих виробничих процесах, де він не може бути замінений іншими менш токсичними речовинами.

Виробничі процеси із застосуванням метанолу або речовин, що містять метанол, повинні бути повністю герметизовані і виключати можливість контакту працюючих з метанолом.

Виробничі приміщення, в яких використовується метанол, повинні мати:

1. підлогу, яка легко миється водою, з непроникного для метанолу матеріалу, з ухилом і стоками;
2. гідранти для води;
3. можливість природного провітрювання;
4. припливно-витяжну вентиляцію.

Робота з метанолом, коли припливно-витяжна вентиляція не працює не допускається.

Роботи в лабораторії із застосуванням метанолу проводяться тільки в витяжній шафі при працюючій припливно-витяжній вентиляції.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику хроматографічного розділення кофеїну та його метаболітів, а також їх кількісного визначення у зразках біологічних рідин у різний проміжок часу, що дозволяє визначати метилксантини з мінімальним вмістом в пробі без попереднього концентрування. Розділення проводилося з використанням рухомої фази 15-60% $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/0.1\%\text{FA}$ і колонки Chromatorex C18 19×100 мм, 3,5 мкм. Для детектування використовували діодно-матричний детектор з $\lambda=280$ нм.
2. Значення межі кількісного визначення становить 0,023 мкг/мл для кофеїну, 0,026 мкг/мл для параксантину, 0,017 мкг/мл для теофіліну та 0,024 мкг/мл для теоброміну. Правильність методики перевірено методом «введено» - «знайдено» та методом добавок.
3. Проведено аналіз реальних зразків:
 - 3.1. вміст метаболітів майже у 2 рази більший в пробі, що відібрана через 2 години після вживання кофеїнвмісних продуктів, ніж в пробі, що відібрана через 12 годин, імовірно через утворення вторинних метаболітів.
 - 3.2. вміст кофеїну у енергетичному напої Hell Strong Watermelon становить $0,39 \pm 0,02$ мг/мл.

Результати роботи було представлено на XXV Міжнародній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні проблеми хімії», м. Київ.



ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Gerber F., Krummen M., Potgeter H., Roth A., Siffrin C., Spoendlin C. Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 microm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *J Chromatogr A*. **2004**, 21(2), pp.127-133
2. Petrova O., Sauer K. High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. *Methods Mol Biol*. **2017**, 1657, pp. 33–43
3. Xiang Y., Liu Y., Lee ML. Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *J Chromatogr A*. **2006**, 104(1-2), pp. 198-202
4. Haginaka J., Yasuda H., Uno T., Nkagawa T. Alkaline degradation and determination by high-performance by high-performance liquid chromatography. *Chemical Pharmacy. Bullet*. **1984**, 32, pp. 2752-2758
5. Fredj G., Paillet M., Aussel F., Brouard A., Barreteau H., Divine C., Micaud M. Determination of sulbactam in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. **1986**, 28 (1), pp. 218-222
6. Ayrton J. Assay of ceftazidime in biological fluids using high-pressure liquid chromatography. *J Antimicrob Chemother*. **1981**, 8, pp. 227-231
7. Polite L. Liquid chromatography: basic overview. In: Miller J., Crowther JB. *Analytical chemistry in a GMP environment: a practical guide*. John wiley & sons, New York: 2000, 512 pp.
8. Horvath C. *High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*. Academic press. New Haven, Connecticut: 1980, 2, 333 pp.
9. Sarker S., Nahar L. Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. **2015**, 1, pp. 405-425

10. Scott R.P.W. Silica gel surface and its interactions with solvent and solute in liquid chromatography. *J.Chromatogr. Sci.* **1980**, 18 (7), pp. 297-306
11. Rodenas V., Garcia MS., Sanchez-Pedreno C., Albero MI. Flow-injection spectrophotometric determination of frusemide or sulphathiazole in pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy and Biomedical Analyst.* **1997**, 15, pp. 1687-1693
12. Conlon R. Liquid Chromatography Detectors. *Anal. Chem.* **2008**, 41(4), pp. 107-114
13. The European Pharmacopoeia. fourth ed., Council of Europe, Strasbourg: 2002, 293 pp.
14. Tsai IL., Weng TI., Tseng YJ., Tan HK., Sun HJ., Kuo CH. Screening and confirmation of 62 drugs of abuse and metabolites in urine by ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal Toxicol.* **2013**, 37(9), pp. 642-651
15. Rozet E. Design Spaces for analytical methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, 42, pp. 157-167
16. Erkmén C., Gebrehiwot W. H., Uslu B. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC): Latest Applications in the Pharmaceutical Researches. *Current Pharmaceutical Anal.* **2021**, 17(3), pp. 316-345
17. Jandera P. Liquid chromatography. Normal Phase. *Encyclopedia of Analytical Science.* **2005**, 3, pp. 142-152
18. Zuvela P., Skoczylas M., Liu J., Baczek T., Kaliszan R., Wong MW., Buszewski B. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (6), pp. 3674–3729
19. Portillo O., Arevalo A. Caffeine. A critical review of contemporary scientific literature. *Bionatura.* **2022**, 3, pp. 1-15
20. Pietsch A. Decaffeination. Process and Quality. In *The Craft and Science of Coffee*. Folmer B. Eds.; Elsevier Inc. **2017**, 10, pp. 225-243
21. Heckman M. A., Weil J., Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *J. of food science.* **2010**, 75 (3), pp. 77-87
22. Burdan F. Caffeine in coffee. In *Coffee in health and disease prevention*. Preedy V. Eds.; Elsevier Inc. **2015**, 22, pp. 201–207

23. Cornelis M., Kacprowski T., Menni C., Gustafsson S., Pivin E., Adamski J., Artati A., Eap C., Ehret G., Friedrich N., Ganna A., Guessous I., Homuth G., Lind L., Magnusson P., Mangino M., Pedersen N., Pietzner M., Suhre K., Völzke H., Kidney S., Bochud M., Spector T., Grabe H., Ingelsson E. Genome-wide association study of caffeine metabolites provides new insights to caffeine metabolism and dietary caffeine-consumption behavior. *Human Molecular Genetics*. **2016**, 25 (24), pp. 5472–5482
24. Eteng M. U., Eyong E. U., Akapanyung E. O., Agiang M. A., Aremu, C. Y. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*. **1997**, 51, pp. 231–243
25. Aresta A., Palmisano F., Zambonin C. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine and nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection. *Food Chem*. **2005**, 93, pp. 177–181
26. Lelo A., Miners J., Robson R., Birkett D. Assessment of caffeine exposure: Caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentrations of methylxanthines. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1986**, 36, pp. 54–59
27. Arnaud M., Welsch C. Caffeine metabolism in human subjects. In *Proceedings of the ninth international colloquium on science and technology of coffee*. ASIC, London. **1980**, pp. 385–395
28. Grosso L., Bracken M. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Annals of Epidemiology*. **2005**, 15 (6), pp. 460–466
29. Eteng M., Eyong E., Akpanyung E., Agiang M., Aremu C. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*. **1997**, 51 pp. 231–243
30. Arnaud M.J. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, 200, pp. 33–91
31. Caraco Y., Zylber-Katz E., Berry E.M., Levy M. Caffeine pharmacokinetics in obesity and following significant weight reduction. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **1995**, 19, pp. 234–239

32. De Paula J., Farah A. Caffeine Consumption through Coffee: Content in the Beverage, Metabolism, Health Benefits and Risks. *Beverages*. **2019**, 5 (37), pp. 2-50
33. Osz B.E., Jitca G., Stefanescu R. E., Puscas A., Tero-Vescan A., Vari C. E. Caffeine and Its Antioxidant Properties. It Is All about Dose and Source. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (21)
34. Jodynis-Liebert J., Matuszewska A. Effect of toluidines and dinitrotoluenes on caffeine metabolic ratio in rat. *Toxicol Lett.* **1999**, 104, pp. 159–165
35. Hakooz N.M. Caffeine metabolic ratios for the in vivo evaluation of CYP1A2, N-acetyltransferase 2, xanthine oxidase and CYP2A6 enzymatic activities. *Curr. Drug. Metab.* **2009**, 10, pp. 329–338
36. Bozikas V.P., Papakosta M., Niopas I., Karavatos A., Mirtsou-Fidani V. Smoking impact on CYP1A2 activity in a group of patients with schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2004**, 14, pp. 39–44
37. Perera V., Grossa A.S., Xu H., McLachlan A.J. Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, 63, pp. 1161–1168
38. Chen F., Hu Z.-Y., Parker R. B., Laizure S. C. Measurement of caffeine and its three primary metabolites in human plasma by HPLC-ESIMS/MS and clinical application. *Biomed. Chromatogr.* **2017**, 31(6)
39. Senta I., Gracia-Lor E., Borsotti A., Zuccato E., Castiglioni S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Res.* **2015**, 74, pp. 23-33
40. Paulia E. D., Scarminio I. S., Tauler R. Analytical investigation of secondary metabolites extracted from *Camellia sinensis* L. leaves using a HPLC-DAD-ESI/MS data fusion strategy and chemometric methods. *J. Chemometrics.* **2016**, 30, pp. 75–85
41. Scott N.R., Chakraborty J., Marks V. Determination of caffeine, theophylline and theobromine in serum and saliva using high-performance liquid chromatography. *Ann Clin Biochem.* **1984**, 21 (2), pp. 120-124
42. Rybak M.E., Pao C.I., Pfeiffer C.M. Determination of urine caffeine and its metabolites by use of high-performance liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry: estimating dietary caffeine exposure and metabolic phenotyping in population studies, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, pp. 771–784.
43. Rasmussen B.B., Brosen K. Determination of theophylline and its metabolites in human urine and plasma by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr. B*, **1996**, 676, pp. 169-174
 44. Lopez-Sanchez R., Lara-Diaz V., Aranda-Gutierrez A., Martinez-Cardona J., Hernandez J. HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure. *J. of Anal. Methods in Chem.* **2018**, 18, pp. 1-11
 45. Kim H. K., Choi M. S., Rehman S. U., Ji Y. J., Yu J. S., Nakamura K., Yoo H. H. Determination of Urinary Caffeine Metabolites as Biomarkers for Drug Metabolic Enzyme Activities. *Nutrients*, **2019**, 11 (1947), pp. 1-15
 46. Martinez-Lopez S., Sarria B., Baeza G., Mateos R., Bravo-Clemente L. Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. *Food Research International*. **2014**, 64, pp. 125–133
 47. Gassner A. L., Schappler J., Feinberg M., Rudaza S. Derivation of uncertainty functions from validation studies in biological fluids: Application to the analysis of caffeine and its major metabolites in human plasma samples. *J. Chromatogr. A*. **2014**, 6 (14), pp. 1-10
 48. Perera V., Grossa A. S., McLachlan A. J. Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomed. Chromatogr.* **2010**, 24, pp. 1136–1144
 49. Ingle P. Extraction of Caffeine. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*. 2019, 6 (9), pp. 11-19
 50. Dichloromethane (or Methylene chloride). Decaffeination method. <https://www.demus.it/en/pagina/utilizzo-del-diclorometano.htm> (accessed Apr. 7, 2024)
 51. Hagos M., Redi-Abshire M., Chandravanshi B. S., Ele E., Mohammed A. M., Mamo H. Correlation between caffeine contents of green coffee beans and altitudes of the

coffee plants grown in southwest Ethiopia. Bull. Chem. Soc. Ethiop. **2018**, 32(1), pp. 13-25

52. Pobudkowska A., Domanska U., Krysa U.A. The physicochemical properties and solubility of pharmaceuticals – Methyl xanthines. J. of Chem. Thermodynamics. **2014**, 79, pp. 41-48
53. Uhrovic J. Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects. Talanta. **2014**, 119, pp. 178-180