

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2002

Е. А. Мамина, В. Ф. Першин

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ С ДРУГИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПУРИНА

Национальная фармацевтическая академия Украины, Харьков;  
НПО "Аналитика", Харьков

Кофеин и другие производные пурина (алкалоиды теofilлин, теобромин, а также синтетические препараты — трентал, теоникол и др.) оказывают стимулирующее действие на центральную нервную систему, на деятельность сердца, усиливают мозговое кровообращение, расширяют сосуды, являются диуретиками [1]. Исследуемые препараты при передозировке, сочетании с алкоголем, наркотиками и другими лекарственными препаратами оказывают токсическое действие или вызывают смертельный исход [2].

При проведении скрининговых исследований биологических объектов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в судебно-химической и химико-токсикологической практике необходимо наличие унифицированных условий, позволяющих получить надежные результаты при анализе "лекарственных коктейлей", включающих в состав наряду с производными пурина различные "лекарственные" яды, в том числе наркотические и одурманивающие препараты.

Предложенные ранее методики анализа производных пурина с использованием метода ВЭЖХ характеризуются разнообразием условий хроматографирования и сложны при воспроизведении [3 – 5].

Целью работы является разработка унифицированных условий идентификации и количественного определения кофеина и других производных пурина методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

### Экспериментальная часть

Анализ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе "Милихром А-02" (Новосибирск, АО "ЭкоНова") с использованием унифицированных условий хроматографирования азотсодержащих лекарственных препаратов: колонка  $2 \times 75$  мм, заполнена сорбентом с обращенной фазой Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 мкм [6].

Подвижная фаза — ацетонитрил, профильтрованный через мембрану "Владипор" МФА-МА-N-2 (ТУ 6-05-1909-81) с размером пор 0,15 – 0,25 мкм, дегазированный вакуумированием, и буферный раствор — 4 М раствор перхлората лития в 0,2 М растворе ортофосфорной кислоты, который перед использованием разбавляли в 20 раз бидистиллированной водой с потенциометрической установкой значения рН среды 2,8.

Скорость подачи растворителя — 100 мкл/мин; градиентная подача подвижной полярной фазы от элюента А (10 % ацетонитрила и 90 % буферного раствора) до элюента Б (100 % ацетонитрила) в течение 25 мин.

На конечной стадии градиента получается фаза с высоким содержанием ацетонитрила, в которой обычные соли нерастворимы. Литиевые соли допускают возможность такого градиента.

Давление насоса — 2,6 – 2,8 МПа; температура колонки — 35 °С.

При анализе лекарственных веществ, производных пурина (кофеина, теofilлина, теобромина и трентала), с использованием УФ-детектора учитывали, что для них характерны максимумы поглощения в УФ-области спектра — 272 – 275 нм, но для создания унифици-

Таблица 1

### Параметры удерживания и спектральные характеристики препаратов, производных пурина

Препарат	Параметры удерживания препаратов			Оптические плотности, отн. ед. (за 1 принята оптическая плотность при длине волны 210 нм)					
	$t_{абс}$ , мин	$t_{отн}$	$V_{абс}$ , мкл	при 230 нм	при 240 нм	при 260 нм	при 280 нм	при 300 нм	при 330 нм
Кофеин	7,85 ± 0,02	0,774	785,3	0,23707	0,14223	0,28112	0,38004	0,01385	0,00188
Теofilлин	6,84 ± 0,03	0,676	684,1	0,23614	0,14564	0,38149	0,44352	0,00862	0,00086
Теобромин	6,50 ± 0,03	0,641	650,8	0,24092	0,14527	0,34570	0,46839	0,01688	0,00159
Трентал	10,14 ± 0,02	1	1014,4	0,24064	0,14388	0,25821	0,38310	0,01704	0,00092

Таблица 2  
Основные хроматографические параметры разделения пиков веществ, производных пурина

Вещества	Коэффициент емкости, $k'$	Селективность, $\alpha$			Коэффициент разделения пиков, $R_s$
Теобромин-1	3,33	—	—	—	—
Теofilлин-2	3,56	$1,07 - \alpha_{2,1}$	—	—	$1,33 - R_{s, 2,1}$
Кофеин-3	4,23	$1,27 - \alpha_{3,1}$	$1,19 - \alpha_{3,2}$	—	$2,41 - R_{s, 3,2}$
Трентал-4	5,76	$1,73 - \alpha_{4,1}$	$1,62 - \alpha_{4,2}$	$1,36 - \alpha_{4,3}$	$3,76 - R_{s, 4,3}$

цированных условий анализа азотсодержащих лекарственных веществ детектирование производных пурина проводили по 7 длинам волн — 210, 230, 240, 260, 280, 300 и 330 нм, охватывающим весь УФ-спектр. Для исследования готовили растворы веществ с содержанием 50 – 100 мкг/мл, а также их смеси. Объем вводимой пробы — 1 мкл.

### Результаты и их обсуждение

Вещества идентифицировали по параметрам удерживания — абсолютным ( $t_{абс}$ ) и относительным ( $t_{отн}$ ) временам удерживания (в качестве внутреннего стандарта использовали синтетический препарат — трентал) и объемам удерживания ( $V_{абс}$ ), а также по спектральным характеристикам, полученным в результате деления значений оптических плотностей при 6 длинах волн — от 230 до 330 нм — на значения оптических плотностей при 210 нм (табл. 1).

Унифицированные условия хроматографирования позволили получить острые, симметричные пики веществ без взаимного наложения, что дало возможность применить разработанную методику для разделения многокомпонентной смеси производных пурина и облегчало обработку результатов анализа (рис. 1). Основные критерии оценки хроматографического разделения веществ — коэффициент разделения пиков ( $R_s$ ); селективность ( $\alpha$ ); коэффициент емкости ( $k'$ ) были вычислены по стандартным формулам и представлены в табл. 2 [7].

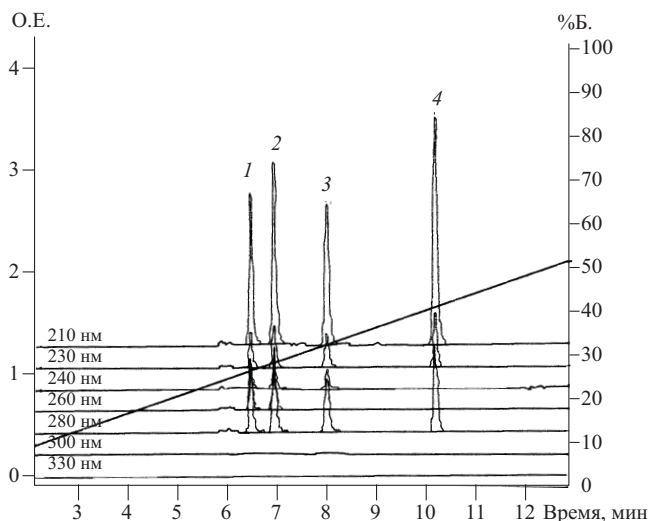


Рис. 1. Хроматограмма смеси препаратов, производных пурина: 1 — теобромин; 2 — теofilлин; 3 — кофеин; 4 — трентал.

Хроматографические параметры разделения пиков производных пурина свидетельствовали о достаточно хорошем разделении веществ [7].

Для проведения анализа кофеина в растворах и биологических жидкостях с использованием унифицированных условий хроматографирования вещество детектировали при максимуме поглощения в УФ-области спектра —  $\lambda_{max}$  274 нм. Для изучения интервала линейности градуировочного графика, построенного в зависимости отношения площади пика кофеина к площади пика внутреннего стандарта — трентала ( $S_1/S_2$ ) от концентрации кофеина ( $C_1$ , мкг/мл) были приготовлены стандартные растворы с различным содержанием кофеина и постоянной концентрацией трентала — 25 мкг/мл.

Линейность построенной кривой в координатах ( $S_1/S_2$ ) – ( $C_1$ ) наблюдалась в интервале концентраций 5 – 50 мкг/мл. Методом наименьших квадратов рассчитывали уравнение градуировочного графика —  $(S_1/S_2) = 0,036S_1 + 0,041$ . При проверке значимости свободного члена уравнения градуировочного графика было установлено, что он мало отличался от нуля, поэтому для определения содержания кофеина в объектах исследования было использовано уравнение вида  $(S_1/S_2) = 0,037C_1$ .

Таблица 3  
Результаты количественного анализа кофеина в растворах методом ВЭЖХ (среднее пяти определений)

Взято кофеина, мкг/мл	Найдено кофеина		Метрологические характеристики
	мкг	%	
10,0	10,0	100,3	$\bar{X} = 100,2$
20,0	19,6	97,9	$S^2 = 5,4, S = 2,3$
30,0	30,4	101,2	$S_x = 1,0, \Delta X = 2,9$
40,0	41,4	103,5	$\varepsilon = \pm 2,9 \%$
50,0	49,1	98,1	$\bar{X} \pm \Delta X = 100,2 \pm 2,9 \%$

Таблица 4  
Количественное определение кофеина в моче методом ВЭЖХ (среднее пяти измерений)

Взято кофеина, мкг	Найдено кофеина		Метрологические характеристики
	мкг	%	
1000,0	783,1	78,3	$\bar{X} = 83,4$
1000,0	836,8	83,7	$S^2 = 23,5, S = 4,8$
1000,0	792,2	79,2	$S_x = 2,2; \Delta X = 6,0$
1000,0	857,1	85,7	$\varepsilon = \pm 7,2 \%$
1000,0	901,3	90,1	$\bar{X} \pm \Delta X = 83,4 \pm 6,0 \%$

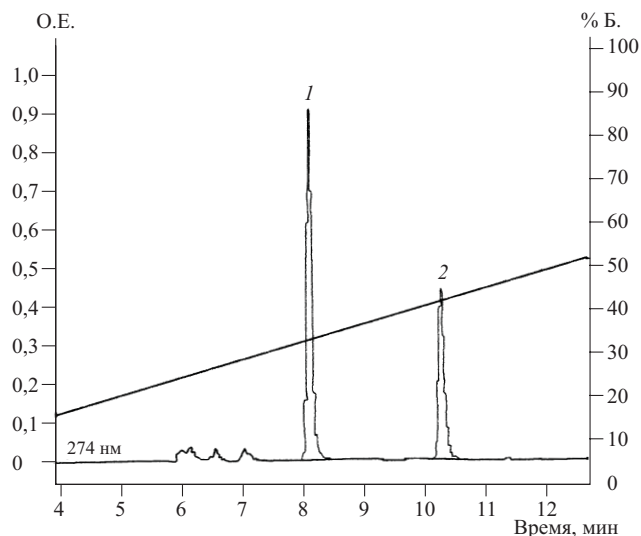


Рис. 2. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащего кофеин (1) и трентал (2).

Используя растворы с содержанием вещества 10 – 50 мкг/мл, проверяли воспроизводимость и надежность результатов, полученных по разработанной методике. Относительная ошибка определения не превышала  $\pm 2,9\%$  (табл. 3).

Для экспрессного обнаружения и определения «лекарственных» ядов наиболее распространенным биологическим объектом является моча, так как большинство лекарственных препаратов и их метаболитов выводятся из организма с мочой. Моча характеризуется низким содержанием белковых компонентов [7].

Экстракцию кофеина и других производных пурина проводили по методике [7]: 20 мл мочи, содержащей 1,0 мг кофеина (или производных пурина), подкисляли хлористоводородной концентрированной кислотой до pH 2 и экстрагировали вещество хлороформом дважды по 15 мл. После разделения фаз водный слой подщелачивали 25 % раствором аммиака до pH 9 – 10

и вновь экстрагировали хлороформом дважды по 15 мл.

Хлороформные экстракты объединяли и высушивали безводным натрием сульфатом, фильтровали и упаривали. Остаток промывали гексаном (трижды по 10 мл) для удаления соэкстрактивных веществ, высушивали и растворяли в 20 мл ацетонитрила, которые переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки растворителем. 1 мкл использовали для исследования методом ВЭЖХ.

Установлено, что параметры удерживания исследованных производных пурина, выделенных из мочи, сопоставимы с данными, полученными при анализе растворов.

Результаты анализа содержания кофеина в моче (рис. 2) представлены в табл. 4, из которой видно, что из мочи по предложенной схеме исследования экстрагируется и анализируется методом ВЭЖХ до 83 % кофеина с относительной ошибкой определения —  $\pm 7,2\%$ .

Разработанная методика может быть рекомендована для судебно-химического анализа исследуемых веществ в биологических жидкостях, для экспресс-анализа острых интоксикаций, а также для фармакокинетических исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 1, Торсинг, Харьков (1997).
2. Е. А. Лужников, *Клиническая токсикология*, Медицина, Москва (1994).
3. Ю. А. Эльтеков, В кн.: *Всерос. симп. по теории и практ. хроматогр. и электрофореза*, Москва (1998), с. 90.
4. E. Flig, T. W. Hermann, J. Gadzinowski, et al., *Chem. Anal.*, **42**(3), 451 – 458 (1997).
5. R. Frye, D. Stiff, and R. Branch, *J. Liq. Chromatogr.*, **21**(8), 1161 – 1171 (1998).
6. G. I. Varam, *J. Chromatogr.*, **728**, 387 – 399 (1996).
7. С. К. Еремин, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская, *Анализ наркотических средств*, Мысль, Москва (1993).

Поступила 03.09.01