

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Metabolismus kofeinu v lidském organismu, stanovení  
vybraných metabolitů metodou HPLC**

Bakalářská práce

**Kateřina Lávičková**

Školitelka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2021

Lávičková, K., 2021: Metabolismus kofeinu v lidském organismu, stanovení vybraných metabolitů metodou HPLC. [Caffeine metabolism in human body, determination of selected metabolites using HPLC. Bc. Thesis, in Czech.] – 51 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This bachelor thesis deals with description of caffeine metabolism in human body and the development, optimization and validation of the analytical method for the determination of selected caffeine metabolites in urine using HPLC. The first part was devoted to the description of caffeine metabolism, sources of caffeine and its influence on human body. Experimental part was focused on the development, optimization and validation of the analytical method to determine four caffeine metabolites and caffeine itself. This method was designed to be used by grammar student's laboratory. The work includes laboratory manual.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

**Klíčová slova**

Kofein, 1-methylmočová kyselina, teobromin, paraxantin, teofylin, biotransformace, kapalinová chromatografie, optimalizace, validace

**Key words**

Caffeine, 1-methyluric acid, theobromine, paraxanthine, theophylline, biotransformation, liquid chromatography, optimization, validation

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté rady a zkušenosti, které jsem díky této práci získala. Velice jsem ocenila přátelský přístup, ochotu vždy pomoci a velkou míru trpělivosti.

Dále bych ráda poděkovala rodině a přátelům, kteří mě během dosavadního studia podporovali.

# OBSAH

1 CÍLE PRÁCE .....	1
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1 Úvod .....	2
2.2 Kofein .....	2
2.2.1 Historie konzumace .....	2
2.2.2 Zdroje a příjem .....	3
2.2.3 Osud kofeinu v lidském organismu .....	4
2.2.4 Faktory ovlivňující biotransformaci kofeinu .....	7
2.2.5 Vliv kofeinu na lidský organismus .....	9
2.2.6 Fyzikální a chemické vlastnosti analytů a vnitřního standardu .....	10
2.3 Analytické metody pro stanovení analytů v moči .....	12
2.3.1 Kapalinová chromatografie .....	13
2.3.2 Kvantitativní analýza kofeinu a jeho metabolitů .....	15
3 MATERIÁLY A METODY .....	17
3.1 Použité chemikálie .....	17
3.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál .....	18
3.3 Příprava roztoků .....	19
3.3.1 Příprava roztoků mobilní fáze .....	19
3.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů .....	20
3.3.3 Příprava směšného pracovního roztoku pro kalibraci .....	21
3.3.4 Příprava kalibračních roztoků .....	21
3.3.5 Příprava směšného roztoku standardů pro měření stability .....	22
3.4 Úprava reálných vzorků .....	23
3.4.1 Příprava pracovního roztoku standardů pro obohacený vzorek .....	23
3.4.2 Příprava obohacených vzorků .....	23
4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	24
4.1 Optimalizace chromatografické separace .....	24
4.2 Souhrn optimalizovaných podmínek chromatografické separace .....	27
4.3 Volba podmínek spektrofotometrické detekce .....	28
4.4 Rozpustnost a stabilita standardu 1-methylmočové kyseliny .....	29
4.5 Stabilita směšného zásobního roztoku .....	30
4.6 Validace metody .....	31
4.6.1 Linearita .....	31
4.6.2 Správnost a přesnost .....	31
4.6.3 Rozsah metody .....	32

4.6.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	32
4.7 Optimalizace objemu nástřiku .....	33
5 ZÁVĚR.....	34
6 CITOVANÁ LITERATURA .....	36
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	42
8 PŘÍLOHY .....	43

## 1 CÍLE PRÁCE

- Zhodnocení zdrojů kofeinu, popis osudu kofeinu v lidském organismu s důrazem na shrnutí současných poznatků o biotransformaci kofeinu
- Teoretické a praktické seznámení se s analýzou vzorků pomocí kapalinové chromatografie
- Popis možností stanovení kofeinu a jeho metabolitů v biologickém materiálu metodou HPLC
- Zavedení a validace analytické metody pro kofein a vybrané metabolity kofeinu
- Příprava návodu pro laboratorní úlohu s tématem: Stanovení kofeinu a jeho metabolitů v moči pomocí HPLC

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Úvod

Kofein je celosvětově nejvíce konzumovaný psychoaktivní stimulant, který lze najít ve více než 60 druzích rostlin. Nejčastějším zdrojem kofeinu jsou káva a čaj. Pokud není překročena doporučená denní dávka, kofein pozitivně ovlivňuje celkový fyzický stav organismu, bdělost a soustředění a také potlačuje únavu. Potenciálně negativní vliv má kofein u těhotných žen a dětí.

### 2.2 Kofein

#### 2.2.1 Historie konzumace

Kofein svůj název získal spojením německého slova *Kaffee* a francouzského slova *café*, přičemž obě slova znamenají káva (Heckman et al. 2010). Kofein je lidmi konzumován už po tisíce let. Čínská legenda uvádí rok 2737 př. n. l., kdy tehdejší čínský císař pil horkou vodu s lístky keře, což se považuje za první vypitý šálek čaje (Blumberg 2013). Konzumace kávových plodů přišla až v 9. stol. n. l., kdy si arabský chovatel koz všiml, že kozy mají více energie po konzumaci plodů kávovníku. Následně sám okusil jejich účinky na tělo (Coffee Research Institute 2006). Ve 14. století došlo k prvnímu pražení kávy, které se brzy rozšířilo v celém Arabském světě. O dvě století později začaly v Konstantinopoli vznikat první kavárny. V Evropě se prokazatelně káva poprvé podávala v roce 1615 ve Vídni, a s končícím 17. stoletím se už pití kávy stalo běžnou součástí lidského života (Fredholm 2011).

První izolaci kofeinu provedl v roce 1819 německý chemik Friedlieb Ferdinand Runge (Tilling 2001). Na konci 19. století pak, opět německý chemik, Emil Fischer syntetizoval kofein z kyseliny močové, za což následně v roce 1912 získal Nobelovu cenu (González-Calderón et al. 2015).

V roce 1885 v Texasu byl na trh uveden první kolový nápoj – Dr. Pepper. Své jméno získal po příteli lékárníka, který jako první tento nápoj prodával (Dr. Pepper Snapple Group 2021). O rok později v Atlantě vznikl další kolový nápoj – Coca-Cola. Nejprve byl prodáván jako sirup, následně byl ředěn vodou a sycený oxidem uhličitým (The Coca-Cola Company 2021). V roce 1898 chtěl lékárník ze Severní Karolíny napodobit úspěch Coca-Coly a přišel se syceným nápojem Pepsi (Heckman et al. 2010). Na přelomu 20. a 21. století vstoupily na trh tzv. energetické nápoje, jejichž popularita stále stoupá (Willson 2018).



Dnes je kofein světově nejvíce konzumovaný psychoaktivní stimulant a podle odhadů ho každý den konzumuje až 80 % lidské populace (Heckman et al. 2010).

### 2.2.2 Zdroje a příjem

Kofein se, jakožto alkaloid rostlin, vyskytuje zejména v bobech, listech a plodech více než 60 druhů rostlin. Nejčastěji je člověkem konzumován skrze praženou kávu nebo čajové listy (Nehlig 2018; Barone a Roberts 1996). Dále lze kofein nalézt v kolových ořechích, kakaových bobech, v listech cesmíny paraguayské (*Ilex paraguariensis*), komerčně známé jako yerba maté nebo v plodech guarany. Kofein je také obsažen ve slazených a energetických nápojích či čokoládě. Uměle se přidává do léků tlumících bolest, doplňků stravy určených ke snížení tělesné hmotnosti, podporujících fyzickou aktivitu a do kosmetických přípravků (Nehlig 2018; Sosková 2017).

Tab. 1: Množství kofeinu ve vybraných nápojích (Caffeine informer 2021).

Nápoje – zdroje kofeinu		Množství kofeinu [mg/ml]	Velikost porce [ml]	Množství kofeinu na porci [mg]
<b>Káva</b>	bezkofeinová	0,02	236	4,7
	instantní	0,24	236	56
	překapávaná	0,73	354	258
	espresso	1,75	44	77
<b>Čaj</b>	zelený	0,11	236	26
	černý	0,18	236	43
	yerba maté	0,17	236	40
<b>Nealkoholické nápoje</b>	Coca-Cola Classic	0,10	354	35
	Pepsi-Cola	0,08	354	28
<b>Energetické nápoje</b>	Red-Bull	0,32	250	80
	Monster Energy Drink	0,34	473	161
	Rockstar Energy Drink	0,34	473	161

Doporučená jednorázová dávka kofeinu u dospělého člověka by neměla překročit 200 mg (Willson 2018). Úroveň příjmu kofeinu, která je považována za bezpečnou, respektive bez významných rizik vážných nežádoucích účinků, u zdravých dospělých činí dle doporučení Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) 400 mg. Maximální doporučená dávka u dětí a dospívajících je dle EFSA 3 mg/kg/den (EFSA 2015). Průměrný celosvětový denní příjem kofeinu dospělého člověka činí 70 mg. Dospělý člověk přijímá kofein nejčastěji v kávě (70 %), v kolových nápojích (16 %) a čaji (12 %), u dětí a dospívajících naopak dominují slazené nápoje a čaje (Frary et al. 2005). Energetické nápoje zaujímají asi 10 % z celkového příjmu kofeinu všech věkových skupin (Heckman et al. 2010). V Tab. 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty obsahu kofeinu pro různé nápoje, obvyklá velikost porce a množství kofeinu v této porci. V případě kávy se množství kofeinu liší podle použitých zrn i způsobu

přípravy kávy. Největšími konzumenty kofeinu jsou obyvatelé Dánska, kde se průměrný denní příjem dospělého člověka blíží 390 mg/den (Heckman et al. 2010). U nejnižší věkové skupiny dětí (6-11 let) činí obvyklá denní dávka kofeinu okolo 32 mg, u starších dětí (12-16 let) 68 mg a u adolescentů (17-18 let) se denní přísun pohybuje okolo 110 mg. Nejvíce děti a adolescenti přijímají kofein v čajích a sycených nápojích (Branum et al. 2014).

### 2.2.3 Osud kofeinu v lidském organismu

Biochemické procesy i enzymatické reakce lze obvykle matematicky popsat kinetickými rovnicemi pro reakce nultého nebo prvního řádu. Reakce prvního řádu je dána rovnicí:  $dc/dt = -kc$ , kde  $dc/dt$  je změna koncentrace látky v čase  $t$  a  $k$  je tzv. rychlostní konstanta. Této situaci odpovídá tzv. jednokompartmentový model. Tento model říká, že organismus tvoří jeden systém, do kterého přitéká veškerý kofein určitou rychlostí, rychle a rovnoměrně se distribuuje po těle a rychlostí přímo úměrnou koncentraci v plazmě se vylučuje z těla ven. (Nehlig 2018; Linhart 2014).

Aby cizorodá látka mohla působit na lidský organismus, musí se dostat k cílovému orgánu. Osud cizorodých látek v organismu se tradičně dělí do čtyř stádií – vstřebávání, distribuce, biotransformace a vylučování (Linhart 2014).

#### *Vstřebávání*

Biologická dostupnost (*bioavailability*) je dána poměrem mezi absorbovanou a celkovou dávkou pro daný způsob podání. Míra biologické dostupnosti při perorálním podání, neboli podáním ústy, je závislá na mnoha faktorech, mezi nejdůležitější z nich patří: fyzikální a chemické vlastnosti dané podané látky, aktuální stav organismu, přijímaná potrava, pitný režim a genetické rozdíly v populaci (Vraníková a Gajdziok 2015). Vstřebávání a biologická dostupnost kofeinu se příliš neliší napříč živočišnými druhy, včetně člověka (Dorne et al. 2001). Nejvyšší koncentrace kofeinu v plazmě po jednorázovém požití dávky 4 mg/kg, bylo dosaženo po 1-2 hodinách (Nehlig 2018).

#### *Distribuce*

Kofein je ke tkáním, a následně k samotným orgánům, distribuován pomocí tělních tekutin, kterými jsou krevní plasma, pupečnicková krev, mozkomíšní mok, sliny, žluč, sperma nebo mateřské mléko. Kofein má i dostatečně velké lipofilní vlastnosti, aby mohl překonat buněčné membrány, včetně hematoencefalické a hematoplacentární bariéry, díky čemuž se může dostat z krve matky do krve plodu (Tomaszewski et al. 2016).

## *Biotransformace*

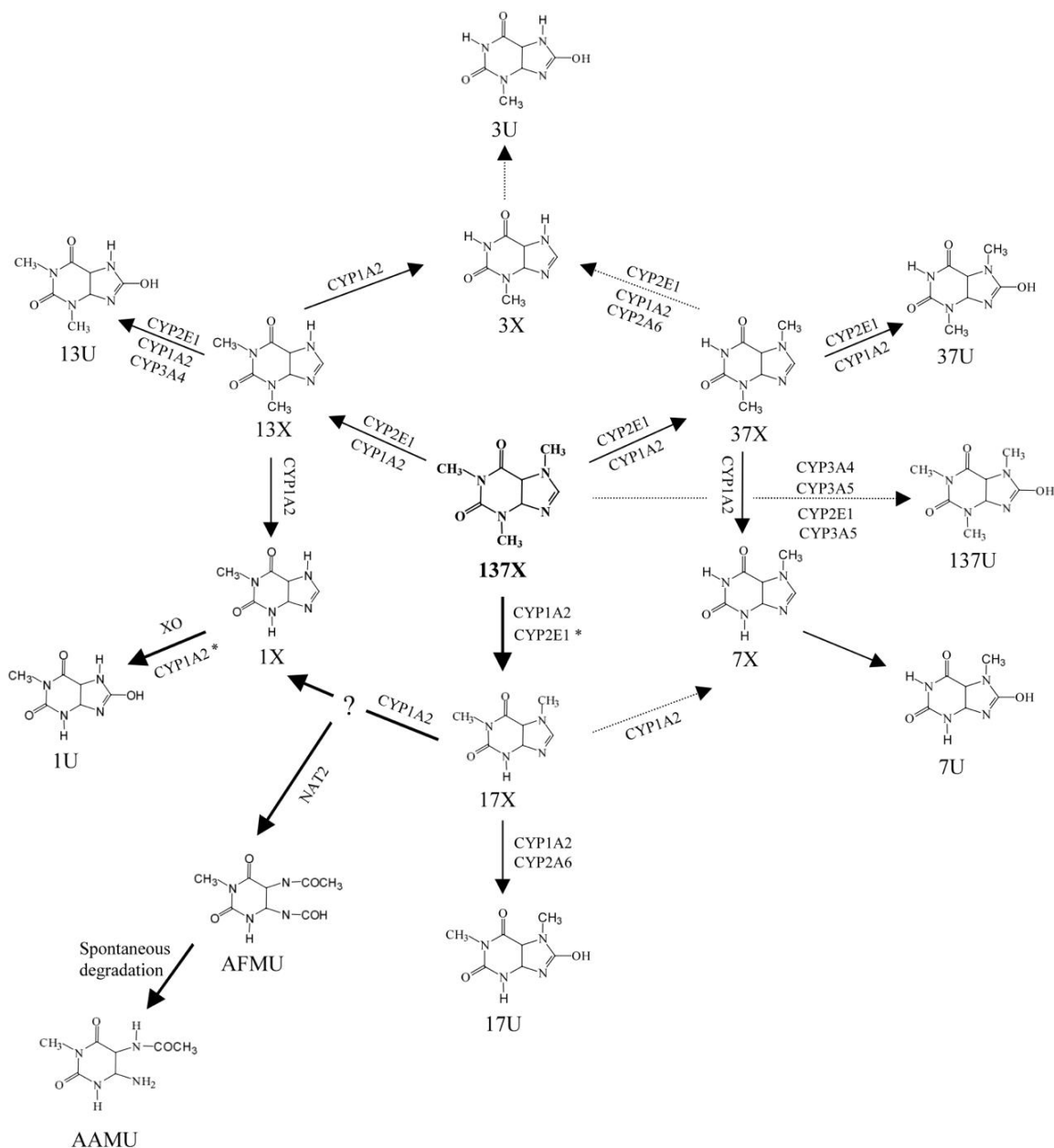
Pojmem biotransformace označujeme chemické přeměny cizorodých látek v živém organismu. Zpravidla se jedná o enzymaticky katalyzované reakce. Kofein je primárně metabolizován v játrech. Celý proces lze v případě nepříliš vysokého množství absorbované látky popsat jednokompartmentovým modelem a kinetickou rovnicí 1. řádu (Nehlig 2018).

Metabolismus kofeinu je komplexní proces, v jehož průběhu vzniká více než dvě desítky metabolitů. Je znázorněn na Obr. 1 a zjednodušeně ho lze popsat následovně. V játrech je kofein primárně (cca z 80 %) metabolizován na 1,7-dimethylxantin (paraxantin; 17X) za katalýzy CYP1A2. Kromě polohy 3- může demethylace molekuly kofeinu také probíhat v poloze 1- a 7- za vzniku 3,7-dimethylxantinu (teobrominu; 37X) a 1,3-dimethylxantinu (teofylinu; 13X), které tvoří 11, respektive 5 % metabolitů kofeinu. Katalyzátory těchto reakcí jsou CYP1A2 a CYP2E1. Vzniklé xantiny mohou dále reagovat na monomethylxantiny demethylační reakcí za katalýzy CYP1A2, jak je vidět na Obr. 1. Z 1-methylxantinu (1X) vzniká další reakcí 1-methylmočová kyselina (1U). Tato reakce je katalyzována enzymy CYP1A2 a xantinoxidázou (XO). Dalšími z probíhajících reakcí jsou acetylace za katalýzy enzymu N-acetyltransferázy (NAT2), hydroxylace a oxidace (komplex enzymů cytochromu P450). Vznikají tak další příslušné močové kyseliny, které jsou z těla vylučovány močí. Přímo z kofeinu pak vzniká 1,3,7-trimethylmočová kyselina (137U). Tato reakce je opět katalyzována komplexem enzymů cytochromu P450 (Caubet et al. 2002).

Vzhledem k rychlé absorpci, nízké vazbě kofeinu na proteiny krevní plazmy, kvantitativní biotransformaci kofeinu v játrech a zanedbatelnému množství kofeinu, které je vylučováno močí, je kofein vhodnou látkou k měření aktivity enzymu CYP1A2. Tato aktivita se stanovuje na základě molárních poměrů různých metabolitů kofeinu v moči (Caubet et al. 2002; Furge a Fletke 2007; Nehlig 2018; Willson 2018).

## *Vylučování*

Člověk většinu přijatého kofeinu vyloučí močí (70 %), ale pouze 0,5 – 2 % z celkového množství se vyloučí v nezměněné podobě. Takto nízké množství kofeinu je způsobeno jednak zpětnou reabsorpcí z nefronu, a jednak metabolickou úpravou kofeinu v játrech. Kofein, respektive zejména jeho metabolity, jsou vylučovány i stolicí. Samotný kofein se i tady vylučuje pouze v malém množství, konkrétně ve 2 % z původně podané dávky (Nehlig 2018).



Obr. 1: Schéma biotransformace kofeinu.

NAT2 = N-acetyltransferáza; XO = xantinoxidáza. 137X = 1,3,7-trimethylxantin (kofein), 13X = 1,3-dimethylxantin (teofylin), 17X = 1,7-dimethylxantin (paraxantin), 37X = 3,7-dimethylxantin (teobromin), 1X = 1-methylxantin, 3X = 3-methylxantin, 7X = 7-methylxantin, 137U = 1,3,7-trimethylmočová kyselina, 13U = 1,3-dimethylmočová kyselina, 17U = 1,7-dimethylmočová kyselina, 37U = 3,7-dimethylmočová kyselina, 1U = 1-methylmočová kyselina, 3U = 3-methylmočová kyselina, 7U = 7-methylmočová kyselina, AFMU = 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil, AAMU = 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil. Převzato a upraveno z (Caubet et al. 2002).

## 2.2.4 Faktory ovlivňující biotransformaci kofeinu

### *Věk*

Novorozenci odbourávají kofein značně pomaleji díky nevyzrálosti jejich jaterních enzymů. V průběhu prenatálního vývoje plodu lineárně klesá poločas rozpadu kofeinu, po narození klesá hodnota exponenciálně (Pons et al. 1988). U dospělých už k výrazným rozdílům v biotransformaci kofeinu daných věkem nedochází. Například farmakokinetika a biologická dostupnost je srovnatelná mezi 20letým a 70letým mužem (Blanchard a Sawers 1983).

### *Pohlaví a hormony*

Na základě stanovování metabolitů kofeinu v moči bylo zjištěno, že mezi pohlavími nejsou rozdíly, a to i přesto, že u mužů je aktivita enzymu CYP1A2 větší než u žen (Arnaud 2011). Během těhotenství roste produkce 1-methylxantinu a kyseliny 1-methylmočové, což je dáno rostoucím podílem hydroxylace (Scott et al. 1986). Poločas rozpadu kofeinu je nejvíce zvýšen během třetího trimestru těhotenství, a to až na dobu 11,5-18 hodin, přičemž obvykle dosahuje 2,5-5 hodin. Častá konzumace kofeinu v těhotenství vede k jeho akumulaci v placentě a v těle plodu. K akumulaci dochází z důvodu propustnosti hematoplacentární bariéry pro kofein, plod ani placenta nedokáže kofein efektivně transformovat (Grosso a Bracken 2005). Perorálně podávaná antikoncepce prodlužuje u žen během druhé poloviny cyklu poločas rozpadu kofeinu až na 10,7 hodin (Bruguerolle et al. 1990).

### *Nemoci jater*

Onemocnění jater, jako je cirhóza nebo žloutenka typu B nebo C, vede ke značné redukci hodnoty clearance pro kofein (Park et al. 2003). U alkoholiků s cirhózou jater se poločas rozpadu kofeinu v plazmě významně zvyšuje (Scott et al. 1988). Hodnota clearance udává pomyslný objem krevní plazmy, který se za jednotku času „vyčistí“ od kofeinu (Linhart 2014).

### *Kouření*

Kouření stimuluje clearance kofeinu, a to až dvojnásobně. Je to výsledkem přítomnosti polycyklických aromatických uhlovodíků v cigaretovém kouři, které zvyšují aktivitu jaterních enzymů (Arnaud 2011).

### *Strava, alkohol, energetické nápoje*

Dalším faktorem ovlivňujícím metabolismus kofeinu je složení stravy. U obyvatel jižní Asie je v porovnání s ostatní populací nižší aktivita CYP1A2. Je to dané zejména složením stravy, ve které je bohatě zastoupena kurkuma a zázvor, které snižují aktivitu CYP1A2 (Chen et al. 2010).

Rovněž konzumace alkoholu a energetických nápojů ovlivňuje farmakokinetiku, respektive toxikokinetiku kofeinu. Už podání 50 g alkoholu/den výrazně zvyšuje poločas rozpadu kofeinu (až o 72 %) a snižuje clearance o 36 % (George et al. 1986). Konzumace alkoholu ve spojení s energetickými nápoji je velký fenomén mezi mladými lidmi. Na rozdíl od alkoholu, jehož požití vyvolává u člověka únavu, společná konzumace alkoholu a energetických nápojů vzbuzuje u člověka pocit, jako by vůbec opilý nebyl. V angličtině se pro tento stav vžilo označení „wide drunk awake“ (Fritz et al. 2014).

### *Užívání léků*

Farmakokinetika kofeinu může být ovlivněna léky, které ovlivňují aktivitu enzymu CYP1A2. Naopak kofein může ovlivňovat farmakokinetiku podaného léku. Některá léčiva kofein už sami o sobě obsahují, což také může vést k interakci s CYP1A2 (Nehlig 2018).

Až o 50 % mohou snížit odbourávání kofeinu léky užívané při léčbě poruch srdečního rytmu a léky blokující kalciový kanál, které se používají k léčbě anginy pectoris a hypertenze (Joeres et al. 1987; Špác a Vyskočilová 2018). Fluvoxamin, látka inhibující zpětné vychytávání serotoninu, se vyskytuje v lécích používaných proti depresi a panické úzkosti (Kim et al. 2017). Ve spojení s kofeinem dochází ke snížení clearance kofeinu ze 107 na 21 ml/min a zároveň se zvyšuje i jeho poločas rozpadu z 5 na 31 hodin (Jeppesen et al. 1996). Stimulanty jako methylfenidát a dextroamfetamin, používané k léčbě ADHD a narkolepsie, bývají zneužívány studenty k podpoře soustředění. Studenti tyto léky často kombinují s kávou, což může mít negativní vliv na kardiovaskulární systém a centrální nervovou soustavu (Entringer 2020; Cerner Multum 2020; Vanattou-Saïfoudine et al. 2012). Pacientům léčícím se s epilepsií se nedoporučuje nadměrné užívání kofeinu z důvodu možného vyvolání záchvatu. Zároveň může kofein snižovat účinnost léků předcházejícím vzniku epileptického záchvatu, tzv. antikonalzia (Chrościńska-Krawczyk et al. 2011).

Mezi léky, jejichž farmakokinetiku kofein ovlivňuje, patří například antipsychotika obsahující fenothiazin, která se využívají k léčbě halucinací a klamů vyskytujících se při

psychóze. Spojení s kofeinem snižuje jejich hydrofobní vlastnosti, čímž se také snižuje jejich absorpce ve střevech (Drugs.com 2021; Khalil et al. 1983).

### 2.2.5 Vliv kofeinu na lidský organismus

Kofein je považován za světově nejméně konzumovanou drogu. Účinky kofeinu jsou závislé na dávce a interindividuální rozdíly jsou značné. Pokud je konzumován pravidelně během dne, tělo si na něj vytvoří toleranci v průměru během 13 dnů. Míra adaptace záleží na konzumovaném objemu, četnosti konzumace a na individuálním vylučování kofeinu z těla (Benowitz 1990). Pokud nedojde k překročení doporučené denní dávky kofeinu (400 mg), má jeho konzumace víceméně neutrální nebo mírně pozitivní vliv na lidské tělo.

Mezi pozitivní účinky kofeinu na lidský organismus patří zvýšení bdělosti a pozornosti, zlepšení nálady a soustředění, menší potřeba spánku. Dále snižuje riziko vzniku Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby, má pozitivní vliv na funkci ledvin a možný vliv na hubnutí, protože zvyšuje rychlost metabolismu, výdej energie a oxidaci lipidů. Snižuje také riziko vzniku rakoviny dělohy, prostaty, tlustého střeva, konečníku a jater (Cano-Marquina et al. 2013; O'Keefe et al. 2013).

Mezi negativní vlivy kofeinu patří řídnutí kostí, zvýšení krevní tlaku, u těhotných žen může dojít k potratu při překročení denní dávky 300 mg/kg. Při konzumaci ve velkých dávkách může způsobit bolest hlavy, úzkost, vysoký krevní tlak a roztěkanost. Nadměrné konzumaci kofeinu by se měly vyhnout ženy, které chtějí otěhotnět. Denní dávka kofeinu u těchto žen by neměla překročit 300 mg/den. Přílišné konzumaci by se také měly vyvarovat osoby s vysokým krevním tlakem nebo nepravidelným srdečním rytmem. Pití překapávané a filtrované kávy by se měli vyhnout lidé trpící dyslipidemií, onemocněním, při kterém dochází ke zvýšení množství cholesterolu v krvi, zejména tzv. špatného, LDL-cholesterolu. Takto připravené kávy obsahují cafestol a kahweol, což jsou látky zvyšující množství cholesterolu v krvi (de Mejia a Ramirez-Mares 2014; Soška 2015). Lidé, kteří trpí srdečními chorobami, by si měli dát pozor na společnou konzumaci kávy a alkoholu, protože oba tyto nápoje zvyšují tepovou frekvenci.

Negativní vlivy na dětský organismus nejsou tak podrobně prostudovány jako u dospělých, ale předpokládá se, že budou obdobné. U novorozenců se kofein využívá při dýchacích problémech, stimuluje dýchací centrum v prodloužené míše, zvyšuje citlivost na oxid uhličitý a způsobuje dilataci dýchacích svalů, zejména bránice (Natarajan et al. 2007).

U adolescentů stoupá konzumace kofeinu z důvodu příjmu energetických nápojů, které často kombinují s alkoholem. Riziko spočívá v tom, že energetické nápoje maskují únavu

způsobenou alkoholem, což vede k jeho většímu příjmu (de Mejia a Ramirez-Mares 2014). Ve Velké Británii některé supermarkety zakázaly prodej energetických nápojů obsahujících více než 150 mg kofeinu dětem mladším 16 let. Obdobné restrikce zavedlo například Dánsko, Turecko, Norsko, Uruguay, Island nebo Francie. Úplný zákaz prodeje energetických nápojů osobám mladším 18 let platí v Lotyšsku a Litvě. V České republice žádné podobné restrikce neplatí (Heller 2018).

## 2.2.6 Fyzikální a chemické vlastnosti analytů a vnitřního standardu

### *1-methylmočová kyselina (MUA)*

1-methylmočová kyselina je hlavním metabolitem kofeinu a teofylinu. Má antioxidační účinky, čímž chrání lipoproteiny před oxidativními změnami (Merck 2021a).

### *Teobromin (THBM)*

Teobromin je produktem katabolismu kofeinu, má antioxidační účinky, je inhibítorem fosfodiesterázy a antagonistou adenosinu. Jsou prokázány jeho účinky proti suchému a dráždivému kašli (Merck 2021f).

### *Paraxantin, 1,7-dimethylxantin (DMX)*

Paraxantin je hlavní metabolit kofeinu, který má, stejně jako kofein, ergogenní účinky na lidský organismus (Merck 2021b).

### *Teofylin (THEO)*

Teofylin je alkaloid v čaji, který uvolňuje křeče průdušek u astmatiků. Stejně jako teobromin je inhibítorem enzymu fosfodiesterázy (Merck 2021g).

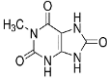
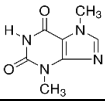
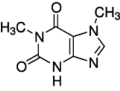
### *Etofylin (ETF)*


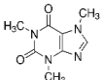
Etofylin není metabolitem kofeinu, byl zvolen jako vnitřní standard (Caubet et al. 2002).

V Tab. 2 a Tab. 3 jsou shrnuty nejdůležitější fyzikální a chemické vlastnosti analytů a vnitřního standardu.

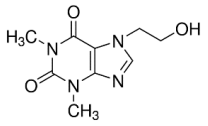


Tab. 2: Fyzikální a chemické vlastnosti stanovovaných analytů.

Analyt	MUA	THBM	DMX
Sumární vzorec	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Systematický název	1-methyl-2,6,8-trihydroxypurin	2,6-dihydroxy-3,7-dimethylpurin	2,6-dihydroxy-1,7-dimethylpurin
M [g/mol]	182,14	180,16	180,16
Vzhled	světle žlutý prášek	pevná bílá látka	pevná bílá látka
Rozpustnost v H <sub>2</sub> O	1,585 g/l	0,5 g/l	1 g/l
Stabilita (skladování)	laboratorní teplota	5 °C	-18 °C
pK <sub>a</sub>	5,6	7,89	8,5
Strukturní vzorec			
Citace	(Chemical Book 2017a; Merck 2021a)	(Chemical Book 2017e; Merck 2021f)	(Chemical Book 2017b; Merck 2021b)

Analyt	THEO	CAFF
Sumární vzorec	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Systematický název	2,6-dihydroxy-1,3-dimethylpurin	1,3,7-trimethylxantin
M [g/mol]	180,16	194,19
Vzhled	bílý prášek	bílý prášek
Rozpustnost v H <sub>2</sub> O	8,3 g/l	18,7 g/l
Stabilita (skladování)	5 °C	laboratorní teplota
pK <sub>a</sub>	8,77	14
Strukturní vzorec		
Citace	(Chemical Book 2017f; Merck 2021g)	(Chemical Book 2017c; Merck 2021c)

Tab. 3: Fyzikální a chemické vlastnosti vnitřního standardu.

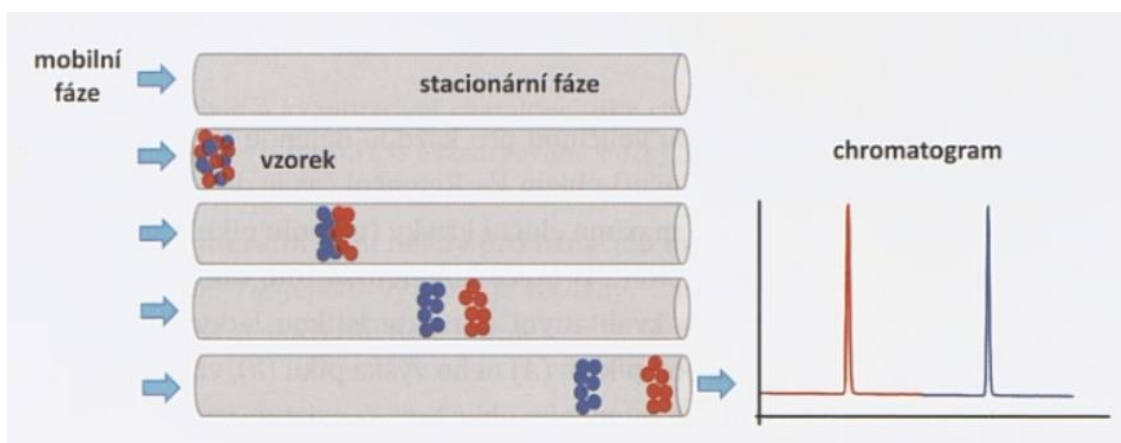
Vnitřní standard	ETF
Sumární vzorec	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
Systematický název	1,3-dimethyl-7-(2-hydroxyethyl)xantin
M [g/mol]	224,22
Vzhled	pevná bílá látka
Rozpustnost v H <sub>2</sub> O	2,991 g/l
Stabilita (skladování)	5 °C
pK <sub>a</sub>	14,48
Strukturní vzorec	
Citace	(Chemical Book 2017d; Merck 2021d)

### 2.3 Analytické metody pro stanovení analytů v moči

Podle vlastností zkoumané látky je zvolena vhodná analytická metoda (Záruba 2013). Pro stanovení koncentrace metabolitů kofeinu v biologickém vzorku se nejčastěji volí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) či vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Kim et al. 2019).

Chromatografie je separační analytická metoda založená na rozdělení analytů mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fázi. Stacionární fáze může být pevná nebo kapalná a mobilní fáze je kapalina nebo plyn. Termín chromatografie byl poprvé použit na počátku 20. století v souvislosti s rozdělením rostlinných barviv (Klouda 2016).

Složky zkoumaného vzorku jsou unášeny mobilní fází přes stacionární fázi, se kterou různou měrou interagují. Při interakci složky se stacionární fází dojde k adsorpci nebo rozpuštění složky ve stacionární fázi. Interakce jsou založeny na mezimolekulárních ne vazebných interakcích. Během separace dochází k neustálému přesunu složek mezi stacionární a mobilní fází. Systém se neustále blíží rovnováze, ve které by se rovnal počet částic nově navázaných a počtu částic uvolněných do mobilní fáze. Této rovnováhy však systém nikdy nedosáhne. Na Obr. 2 je schematicky naznačen průběh chromatografické separace vzorku obsahujícího dva analyty (Nováková a Douša 2013a).

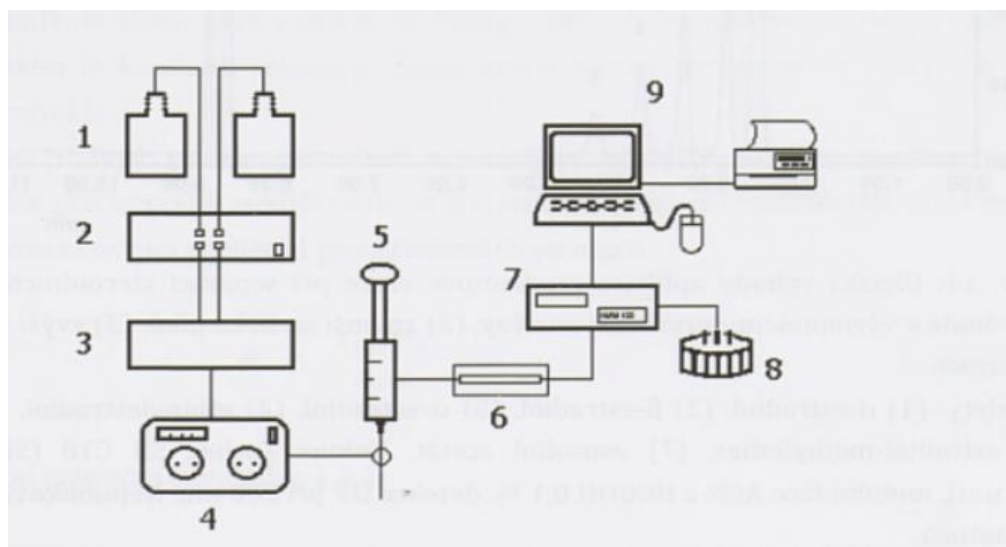


Obr. 2: Chromatografická separace vzorku s dvěma analyty (Nováková a Douša 2013a).

### 2.3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, u které je mobilní fáze vždy kapalná a stacionární fáze může být pevná látka nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči (Nováková a Douša 2013a). Analyzovaný vzorek je kapalným roztokem. Mobilní fázi tvoří čisté rozpouštědlo či směs mísitelných rozpouštědel. Směs rozpouštědel se volí tak, aby každé z rozpouštědel mělo jinou polaritu např.: methanol + voda. Stacionární fáze je silně polární a obvykle je tvořena silikagelem (Záruba 2013). Výslednou separaci a eluci složek směsi (analytů) ovlivňují jak vlastnosti stacionární fáze, tak složení mobilní fáze. Nejčastějším typem kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*HPLC, High Performance Liquid Chromatography*). V tomto typu kapalinové chromatografie je mobilní fáze přiváděna do systému pod vysokým tlakem. V poslední době se nejvíce používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC), kde mobilní fáze je tvořena polárními rozpouštědly (např. voda, acetonitril, methanol) a stacionární fáze je nepolární (Nováková a Douša 2013a).

Na Obr. 3 je upravené schéma kapalinového chromatografu. Jeho základní části jsou: zásobníky mobilní fáze, čerpadlo, stříkačka či autosampler, kolona, detektor, počítač a nádoba na odpad.



Obr. 3: Schéma kapalinového chromatografu. (1) zásobníky mobilní fáze, (2) odplyňovač, (3) směšovač, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona, (7) detektor, (8) sběrač frakcí, (9) počítač. Obrázek byl převzat z (Nováková a Douša 2013a).

*Čerpadlo mobilní fáze* čerpá kapalinu mobilní fáze směrem na kolonu. Čerpadlo může být pístové nebo membránové. Nesmí nijak interagovat s mobilní fází a nejčastěji se vyrábí z nerezové oceli, keramiky nebo plastu (Klouda 2016).

*Směšovací zařízení* umožňuje pomocí zásobníků připravit přesně danou směs mobilních fází. Pokud zůstává složení mobilní fáze během separace stejné, nazývá se taková eluce jako izokratická, pokud dochází ke změnám ve složení mobilní fáze během analýzy, tak se nazývá gradientová (Klouda 2016).

*Dávkovací zařízení (manuální stříkačka nebo autosampler)* přidává vzorek, před vstupem na kolonu, do mobilní fáze. Od dávkování manuální stříkačkou se dnes již upouští. Nevýhodami manuálního dávkování jsou nedostatečná těsnost, stálost tlaku a přenos materiálu ze stříkačky do vzorku. Používané stříkačky musí být tedy vyrobeny z inertního materiálu, např. z nerezové oceli (Klouda 2016). V současné době se nejvíce využívají autosamplery, automatické smyčkové dávkovače. Velkou výhodou je automatizace tohoto procesu, zejména v laboratořích zpracovávajících velké množství vzorků. Autosampler je spojen se zásobníkem vzorku, kde jsou umístěné skleněné nebo plastové vialky. Hrdlo vialky je překryto pryžovým septem, skrz které nabere jehla vzorek (Nováková a Douša 2013a).

*Kolona* je místo, kde probíhá separace. Plášť chromatografické kolony se vyrábí z nerezové oceli, vnitřek kolony musí být schopen odolat vysokým tlakům, musí být inertní vůči složení mobilní fáze a vnitřní povrch by měl být zcela hladký (Nováková a Douša 2013a). Kolony jsou rovné o délce nejčastěji 10-20 cm, s vnitřním průměrem 0,2-2 cm. Možné je i řazení více kolon za sebou, a to zejména v případě dlouhých a složitých separacích. V případě separace přírodních vzorků, které obsahují velké množství látek, se před samotnou kolonou používá předkolonka, která chrání kolonu před znehodnocením. Sorbent uvnitř kolony má velikost zrn obvykle mezi 5-10  $\mu\text{m}$  (Křížek a Šíma 2015). Nejvíce používaným sorbentem je silikagel. Oceňuje se především jeho vlastnost odolávat vysokým tlakům a odolnost vůči organickým rozpouštědlům. Dále se jako stacionární fáze mohou používat sorbenty s kovovými oxidy. Kovové oxidy jsou využívány pro jejich větší chemickou odolnost, než kterou má silikagel. Pro HPLC se nejvíce používá oxid zirkoničitý a oxid hlinitý. Výhodou použití kolon s kovovými oxidy je možnost práce v celém rozsahu pH a při teplotách dosahujících až 200 °C (Nováková a Douša 2013a). Jako sorbenty se využívají i nepolární látky, navázané uhlovodíkové řetězce na stacionární fázi, nejčastěji jde o oktyl (C-8) nebo oktadecyl (C-18) (Opekar 2002).

*Termostat* umožňuje udržovat stálou teplotu při separaci. Většina separací sice probíhá při laboratorní teplotě, ale pokud se teplota zvýší, může to výrazně zlepšit kvalitu prováděné separace (Klouda 2016).

*Detektor* by měl být citlivý pro analyty a zároveň málo citlivý vůči mobilní fázi. Fotometrický detektor je nejvíce používaný detektor v kapalinové chromatografii. Principem je měření absorbance eluátu vycházejícího z chromatografické kolony. Jednodušší detektory jsou schopny měřit pouze při jedné vlnové délce, složitější pak umožňují nastavení vlnových délek nebo měření celého absorpčního spektra. Hojně využívaný je i refraktometrický detektor, který pracuje na principu měření indexu lomu čisté mobilní fáze a eluátu. Dalším používaným detektorem je fluorescenční detektor, který pracuje na principu fluorescence, neboli schopnosti absorbovat ultrafialové záření a následně vysílat záření o vyšší vlnové délce. Hlavní výhodou je jeho vysoká selektivita a možnost měření až do koncentrace  $10^{-12}$  mg/l. Pokud jsou detekovány ionty, lze použít elektrochemické detektory (Klouda 2016). Na základě identifikace poměru náboje a hmotnosti částic funguje hmotnostně spektrometrický detektor (Nováková a Douša 2013a).

*Chromatogram* je časový záznam signálu detektoru. Chromatogram má tvar chromatografických píků (eluční křivky), přičemž ideální pík by měl být symetrický a mělo by být možné jej popsat Gaussovou křivkou normálního rozdělení (Kahoun 2020).

### 2.3.2 Kvantitativní analýza kofeinu a jeho metabolitů

Pro vývoj metody bylo potřeba shrnout dosud používané metody stanovení. V publikacích byl brán zřetel zejména na parametry chromatografické separace, přípravu roztoků standardů a úpravu reálného vzorku.

Publikace od Caubeta uvádí metodu pro stanovení kofeinu a jeho více než deseti metabolitů včetně MUA, THBM, DMX a THEO v moči. Pro chromatografickou separaci byla zvolena kolona Eclipse XDB C18 s délkou 250 mm, vnitřním průměrem 4,6 mm a velikostí částic 5  $\mu$ m. Mobilní fáze A (MFA) byla tvořena 0,1 obj.% kyselinou octovou ve vodě s přídavkem tetrahydrofuranu (0,25 obj.%) a mobilní fáze B (MFB) byla tvořena acetonitrilem (ACN), byla použita gradientová eluce, délka analýzy byla 35 min při průtoku MF 1 ml/min a teplotě v kolonovém prostoru 23 °C. Velikost nástřiku byla 5  $\mu$ m. Detekce s diodovým polem (DAD) probíhala při vlnových délkách 270 nm a 290 nm. Zásobní roztoky standardů byly připravovány o koncentraci 1 mg/ml v roztoku voda/methanol v poměru 70/30. Při přípravě roztoku MUA byla provedena úprava pH pomocí 1M roztoku hydroxidu sodného a následně zpětná úprava na neutrální pH pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové. Reálné vzorky

byly nejprve přefiltrovány, obohaceny o vnitřní standard ETF, následně okyseleny 1M kyselinou chlorovodíkovou (Caubet et al. 2002).

Chromatografická separace DMX a CAFF probíhala s použitím kolony Symmetry C18, délky 150 mm, vnitřním průměrem 3,9 mm a velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ . MF byla tvořena vodným roztokem octanu amonného (0,01M, 2,5 obj.% ledové kyseliny octové) a ACN v poměru 90/10. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a velikost nástřiku 20  $\mu\text{l}$ . Roztoky standardů byly připravovány do 5ml odměrných baněk, rozpuštěním 2,5 mg DMX a dvojnásobného množství CAFF v roztoku voda/ethanol (1/1). Reálné vzorky moči byly pomocí ledové kyseliny octové upraveny na pH 3,1, centrifugovány (3 800 otáček/min; 10 min) a filtrovány (0,45 $\mu\text{m}$  filtr.) (Furge a Fletke 2007).

Pro chromatografickou separaci CAFF a jeho hlavních třech metabolitů – THBM, DMX a THEO v krevní plasmě byla použita kolona Zorbax® C18, délky 100 mm, vnitřní průměr 2,1 mm a velikost částic 3,5  $\mu\text{m}$ . MFA byla tvořena 10mM fosfátovým pufrům a MFB byla 100% ACN. Byla použita gradientová eluce při 40 °C, průtoku MF 0,7 ml/min. Délka analýzy byla 15 min a velikost nástřiku vzorku 5  $\mu\text{l}$ . Zásobní vodné roztoky standardů DMX, THEO a CAFF byly připravovány o koncentraci 0,4 mg/l, roztok THBM byl připraven, kvůli jeho horší rozpustnosti ve vodě, v poloviční koncentraci (Lopez-Sanchez et al. 2018).

LC-MS/MS analýza CAFF a jeho třinácti vybraných metabolitů v moči byla prováděna za použití kolony Kinetex C18 délky 100 mm s vnitřním průměrem 3 mm a velikostí částic 2,6  $\mu\text{m}$ . Chromatografická separace probíhala 7 min při gradientové eluci mobilní fáze tvořené vodou, respektive ACN s obsahem 0,1 obj.% kyseliny octové při průtoku MF 0,2 ml/min, nástřiku vzorku 5  $\mu\text{l}$  a teplotě v kolonovém prostoru 40 °C. Zásobní roztoky standardů (1 mg/ml) byly připraveny rozpuštěním v methanolu (Kim et al. 2019).

Metoda pro separaci osmi metabolitů kofeinu, včetně MUA, THBM, DMX a THEO byla vyvinuta s použitím kolony Discovery C18 o délce 150 mm, vnitřním průměrem 4,6 mm a velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ . MFA byla tvořena 1 obj.% kyselinou octovou ve vodě a MFB methanolem v poměru 92/8 (MFA/MFB). Průtok MF byl 1 ml/min a teplota v kolonovém prostoru 35 °C (Merck 2021e).

## 3 MATERIÁLY A METODY

### 3.1 Použité chemikálie

- Standard: 1-methylmočová kyselina – neuvedeno (Sigma Aldrich)
- Standard: Teobromin – čistota pro HPLC ~ 99 % (Sigma Aldrich)
- Standard: 1,7-dimethylxantin – čistota pro HPLC ~ 98% (Sigma Aldrich)
- Standard: Teofylin – čistota pro HPLC ~ 100% (Sigma Aldrich)
- Standard: Kofein – čistota: ~ 100 % (Sigma Aldrich)
- Standard: Etofylin – čistota: 100 % (Sigma Aldrich)
- Octan amonný pro HPLC – čistota pro LC-MS  $\geq 99$  % (Sigma Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan sodný MS  $\geq 99$  % (Sigma Aldrich)
- Kyselina octová - 100 % (Merck)
- Methanol pro HPLC (Merck)
- Hydroxid amonný – vodný roztok 28-30 % (Merck)
- Kyselina fosforečná – 85 % (Merck)
- Acetonitril – čistota pro HPLC  $\geq 99$  % (Merck)
- Deionizovaná voda generována přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo)

### 3.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo) složený ze zásobníku mobilní fáze SR-3000, čerpadla mobilní fáze LPG-3400SD, nástřikového modulu s chlazeným zásobníkem vialek WPS-3000TSL, vyhřívaným kolonovým prostorem TCC-3000SD, fluorescenčním detektorem FLD-3400RS spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem DAD-3000RS a elektrochemickým detektorem ECD-3000RS. Ovládání přístroje a vyhodnocení dat bylo prováděno pomocí programu Chromelon 7.2.
- Chromatografická kolona: KinetexEvo C18; délka 30 mm; vnitřní průměr 2,1 mm; velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$  (Kinetex)
- Chromatografická kolona: KinetexEvo C18; délka 50 mm; vnitřní průměr 3,0 mm; velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Kinetex)
- Chromatografická předkolonka: SecurityGuard™; C18; délka 4 mm; vnitřní průměr 3,0 mm (Phenomenex)
- Výrobník deionizované vody: Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo)
- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo™)
- Automatická dávkovací pipeta: Eppendorf Research Plus o objemu 2-20  $\mu\text{l}$  (Eppendorf®)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPettePLUS o objemu 10-100  $\mu\text{l}$  (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPettePLUS o objemu 100-1000  $\mu\text{l}$  (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta: Transferette® o objemu 1-10 ml (Brand)
- Odměrné sklo: třída přesnosti A (FischerBrand)
- Skleněné dávkovací stříkačka o objemu: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{l}$  (Hamilton)
- Spotřební materiál: plastové špičky, krimpovací vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem s pryžovým septem, centrifugační zkumavky
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2008 (Microsoft).



### 3.3 Příprava roztoků

#### 3.3.1 Příprava roztoků mobilní fáze

##### *Mobilní fáze 1*

MFA byla připravena přesným navážením 0,1927 g octanu amonného a odpipetováním 6,25 ml, respektive 7,5 ml 100% kyseliny octové pomocí automatickou pipetou (1-10 ml). Octan amonný byl kvantitativně převeden do 250ml odměrné baňky a roztok spolu s kyselinou octovou byl doplněn deionizovanou vodou po rysku. Jako MFB byl použit čistý ACN.

##### *Mobilní fáze 2*

MFA byla připravena navážením 0,3548 g hydrogenfosforečnanu sodného, který byl kvantitativně převeden do 250ml odměrné baňky. Automatickou pipetou (10-100  $\mu$ l) bylo přidáno 65  $\mu$ l 85% kyseliny fosforečné a roztok byl doplněn deionizovanou vodou po rysku. Následně byla změřena hodnota pH a v případě potřeby upravena na požadovanou hodnotu pH 6,8. Během testovacích analýz byla rovněž připravena MFA s pH 6,0 a 4,1. MFB byla připravena odměřením 90 ml ACN v odměrném válci, převedením do 100ml odměrné baňky a doplněním objemu deionizovanou vodou po rysku.

##### *Mobilní fáze 3*

MFA byla připravena odpipetováním 250  $\mu$ l 100% kyseliny octové pomocí automatické pipety (100-1000  $\mu$ l) do 250ml odměrné baňky částečně naplněné deionizovanou vodou, následně byl objem doplněn po rysku. MFB byla připravena odpipetováním 100  $\mu$ l 100% kyseliny octové do 100ml odměrné baňky částečně naplněné ACN, následně byl objem doplněn po rysku.

##### *Mobilní fáze 4*

MFA byla připravena odpipetováním 1 ml 100% kyseliny octové pomocí automatické pipety (100-1000  $\mu$ l) do 100ml odměrné baňky a roztok byl doplněn deionizovanou vodou po rysku. MFB byla tvořena methanolem.

### 3.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů

*Zásobní roztok kyseliny MUA* byl připraven navážením přesně asi 1 mg. Po kvantitativním převedení naváženého množství látky do 5ml odměrné baňky za použití asi 4 ml deionizované vody bylo do roztoku pomocí automatické pipety (10-100  $\mu$ l) odpipetováno 25  $\mu$ l 28-30% hydroxidu amonného. Po dokonalém rozpuštění bylo do roztoku pomocí automatické pipety (2-20  $\mu$ l) odpipetováno 10  $\mu$ l 100% kyseliny octové. Následně byl roztok doplněn deionizovanou vodou po rysku. *Zásobní roztok THBM* byl připraven navážením přesně asi 2 mg, kvantitativním převedením do 10ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním deionizovanou vodou po rysku. *Zásobní roztok DMX* byl připraven navážením přesně asi 5 mg, kvantitativním převedením do 5ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. *Zásobní roztok THEO* byl připraven navážením přesně asi 5 mg, kvantitativním převedením do 5ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. *Zásobní roztok CAFF* byl připraven navážením přesně asi 5 mg, kvantitativním převedením do 5ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. *Zásobní roztok vnitřního standardu ETF* byl připraven navážením přesně asi 1 mg, kvantitativním převedením do 5ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. Příprava všech standardů je shrnuta v Tab. 4. Připravené roztoky standardů byly s výjimkou roztoku MUA rozpipetovány do vialek a uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -85 °C. Zásobní roztok MUA byl z důvodu nestability roztoku látky připravován vždy čerstvý (viz. Kap. 4.4).

Tab. 4: Příprava roztoků standardů.

Analyt	M [g/mol]	Čistota [%]	m [mg]	V [ml]	Rozpouštědlo	c [mg/l]
MUA	182,14	neuvedena	1,18	5	H <sub>2</sub> O (25 $\mu$ l NH <sub>4</sub> OH + 10 $\mu$ l CH <sub>3</sub> COOH)	236,0
THBM	180,16	99	2,03	10	H <sub>2</sub> O	201,0
DMX	180,16	98	6,00	5	H <sub>2</sub> O	1176
THEO	180,16	100	5,80	5	H <sub>2</sub> O	1160
CAFF	194,19	100	5,89	5	H <sub>2</sub> O	1178
ETF	224,22	100	1,03	5	H <sub>2</sub> O	206,0

### 3.3.3 Příprava směšného pracovního roztoku pro kalibraci

Pro kalibraci byl připraven směšný pracovní roztok standardů o koncentraci 80 mg/l. Do 10ml odměrné baňky byly odpipetovány vypočítané objemy roztoků jednotlivých standardů uvedené v Tab. 5 a roztok byl doplněn deionizovanou vodou po rysku. Pro pipetování byly používány automatické pipety (100-1000  $\mu$ l a 1-10 ml).

Tab. 5: Příprava směšného pracovního roztoku pro kalibraci.

Analyt	V [ $\mu$ l]/10 ml	c [mg/l]
<b>MUA</b>	3390	80
<b>THBM</b>	3981	80
<b>DMX</b>	680	80
<b>THEO</b>	690	80
<b>CAFF</b>	679	80

### 3.3.4 Příprava kalibračních roztoků

Příprava kalibračních roztoků je shrnuta v Tab. 6. Celkem bylo připraveno osm kalibračních úrovní ve třech na sobě nezávislých opakováních. Kalibrační roztoky byly o celkovém objemu 1 ml připraveny do 1,8ml čirých vialek. Nejprve byl do vialek podle kalibračního stupně napipetován automatickou pipetou (100-1000  $\mu$ l) objem deionizované vody ( $V_{H_2O}$ ), do které byl následně přidáván směšný kalibrační roztok pomocí stříkačky Hamilton (5, 10, 20, 50, 100, 250 a 500  $\mu$ l) ( $V_{RK}$ ).

Tab. 6: Příprava kalibračních roztoků.

Koncentrační úroveň	Označení	c [mg/l]	V <sub>H2O</sub> [μl]	V <sub>RK</sub> [μl]	Celkový objem [ml]
1	K1a	0,2	997,5	2,5	1000
	K1b				
	K1c				
2	K2a	0,4	995	5	
	K2b				
	K2c				
3	K3a	0,8	990	10	
	K3b				
	K3c				
4	K4a	2	975	25	
	K4b				
	K4c				
5	K5a	8	900	100	
	K5b				
	K5c				
6	K6a	20	750	250	
	K6b				
	K6c				
7	K7a	40	500	500	
	K7b				
	K7c				
8	K8a	80	0	1000	
	K8b				
	K8c				

### 3.3.5 Příprava směšného roztoku standardů pro měření stability

Pro měření stability roztoku standardů byl připraven směšný roztok o koncentraci jednotlivých standardů v rozmezí 34-45 mg/l. V Tab. 7 je shrnuta jeho příprava. Celkový objem roztoku byl 10 ml, k přípravě byly použity zásobní roztoky individuálních standardů (Tab. 4).

Tab. 7: Příprava směšného roztoku standardů pro měření stability.

Analyt	MUA	THBM	DMX	THEO	CAFF
c [mg/l]	42	34	45	40	41
V [μl]	1780	1692	383	345	348

### 3.4 Úprava reálných vzorků

Vzorek moči byl odebrán přibližně po 2-3 hodinách od vypití kávy, vždy den před analýzou. Vzorek byl do druhého dne uchovávan v lednici při 5 °C. V den analýzy bylo pomocí automatické pipety (1-10 ml) odebráno 20 ml vzorku do odstřed'ovacích zkumavek, okyseleno 700 µl 100% kyseliny octové. Po pečlivém promíchání byl vzorek odstřed'ován při 10 000 otáčkách/min po dobu 10 min. Pomocí automatické pipety byl odebrán supernatant, který byl následně používán k analýzám.

#### 3.4.1 Příprava pracovního roztoku standardů pro obohacený vzorek

Pracovní roztok standardů (STD) pro obohacený vzorek (spike) byl připraven pomocí zásobních roztoků jednotlivých standardů. Roztok byl připraven odpipetováním vypočítaných objemů jednotlivých roztoků standardů na základě předběžné analýzy reálného vzorku do 5ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Příprava je shrnuta v Tab. 8.

Tab. 8: Příprava pracovního roztoku standardů pro obohacený vzorek.

Analyt	V [µl]/ 5 ml	c [mg/l]
MUA	254	12,00
THBM	17	0,683
DMX	32	7,530
THEO	2	0,464
CAFF	35	8,250

#### 3.4.2 Příprava obohacených vzorků

Byly připraveny 2 sady roztoků v osmi opakováních. Neobohacené vzorky byly připraveny smícháním 500 µl upraveného reálného vzorku (VZ) a 500 µl rozpouštědla (vody), obohacené vzorky vznikly smícháním 500 µl upraveného reálného vzorku a 500 µl pracovního roztoku standardů pro obohacený vzorek (STD). Příprava je shrnuta v Tab. 9.

Tab. 9: Příprava obohacených vzorků.

V [µl]	Neobohacený		Obohacený	
	H <sub>2</sub> O	500	STD	500
	VZ	500	VZ	500

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Následující část předložené bakalářské práce obsahuje popis a zhodnocení průběhu vývoje analytické metody ke stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC/DAD. Cílem bylo nalezení takových podmínek, které umožní dostatečné rozdělení separovaných složek v přijatelném čase.

První část kapitoly Výsledky a diskuze je věnována optimalizaci chromatografické separace pro kofeinu, jeho čtyři metabolity a zvolený vnitřní standardu. Pozornost byla zaměřena na výběr chromatografické kolony, na volbu a optimalizaci složení mobilní fáze a určení optimální teploty kolonového prostoru. Rovněž byla pro každý analyt optimalizována vlnová délka spektrofotometrické detekce. Bylo nutné věnovat zvýšenou pozornost přípravě a stabilitě roztoku standardu MUA (Kap. 4.3) a směsného roztoku standardů. Následně byla provedena validace analytické metody. Základními validačními parametry byly linearita, správnost, přesnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Vzhledem k výsledkům analýzy reálného vzorku byla dodatečně optimalizována i velikost nástřiku vzorku.

Celá experimentální část byla vedena s ohledem na budoucí využití zaváděné metody studenty středních škol případně studenty naší fakulty v průběhu volitelného praktika k předmětu Základy toxikologie.

### 4.1. Optimalizace chromatografické separace

Na základě literární rešerše byla k vývoji analytické metody pro analýzu roztoku standardů kofeinu (CAFF), některých produktů jeho metabolismu (MUA, THBM, DMX, THEO) a zvoleného vnitřního standardu (ETF), vybrána kolona KinetexEvo C18 s rozměry 150x3 mm a průměrem částic 2,6  $\mu\text{m}$ , respektive 5  $\mu\text{m}$  (Kim et al. 2019; Martínez-López et al. 2014a; Coso et al. 2020). Zkušební analýzy byly prováděny celkem se čtyřmi různými mobilními fázemi označenými *Mobilní fáze 1 – 4* s použitím kolony s 2,6 $\mu\text{m}$  částicemi a následně s *Mobilní fází 4* s použitím kolony s 5 $\mu\text{m}$  částicemi.

První použité složení mobilní fáze (*Mobilní fáze 1*) byl 0,01M roztok octanu amonného ve vodě s obsahem 2,5 obj.%, respektive 3,0 obj.% ledové kyseliny octové (MFA) a čistý acetonitril (MFB). Obdobné složení mobilní fáze s poměrem 90/10 (MFA/MFB) bylo dříve použito k analýze CAFF a DMX ve vzorcích moči (Furge a Fletke 2007). Postupně byly prováděny analýzy roztoků jednotlivých standardů za použití izokratické i gradientové eluce s obsahem MFB v rozsahu 0-90 % při teplotě kolonového prostoru 30 °C a průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Změnou poměru MFA a MFB nebylo dosaženo dostatečného kapacitního poměru (poměr redukovaného retenčního času k mrtvému retenčnímu času, kde redukovaný retenční čas je rozdíl retenčního času analytu a mrtvého retenčního času) analytu MUA, rovněž rozlišení pík jednotlivých analytů nebylo uspokojující (DMX, THEO, ETF). Snížení pH MFA vedlo ke zlepšení kapacitního poměru pro MUA. Problémem byla špatná separace analytů DMX a THEO a vysoký faktor asymetrie pík (definován v (Kahoun 2020)), který u všech analytů přesahoval hodnotu 1,5.

*Mobilní fáze 2* byla zvolena na základě publikovaných výsledků analýz obsahu CAFF, DMX, THEO a THBM v krevní plazmě byla 10mM hydrogenufosforečnanový pufr ve vodě (pH 6,8, resp. 6,0, resp. 4,1) (MFA) a 90 obj.% roztok acetonitrilu ve vodě (MFB) (Lopez-Sanchez et al. 2018). Byly prováděny analýzy roztoků jednotlivých standardů a směsného standardu za použití izokratické i gradientové eluce s obsahem MFB v rozsahu 1,5-8 % při teplotě kolonového prostoru 30 °C a průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Nejlepší separace pík jednotlivých analytů byla dosažena při pH MFA 6,0, ale kapacitní poměr byl pro MUA pouze 0,4, doporučená hodnota pro jednoduché separace je v rozmezí 1-5 (Kahoun 2020). Faktor asymetrie pík nepřesahoval doporučenou hodnotu 1,5, ale separace jednotlivých analytů byla relativně dlouhá, nejvyšší retenční čas byl 17,6 min pro CAFF. Vzhledem ke kyselým vlastnostem analytu MUA byla použita i MFA s hodnotou pH 4,1. Snížením pH MFA na hodnotu 4,1 byl docílen přijatelný kapacitní poměr pro MUA 1,25. Změna pH MFA vedla k chvostování pík ostatních analytů (DMX, THEO a CAFF) a ke zhoršení separace DMX a THEO. Největším problémem byla špatná reprodukovatelnost výsledků. I přesto, že po každé přípravě nové MFA, byla pečlivě upravena hodnota pH mobilní fáze na požadovanou hodnotu, reprodukovatelnost analýz nebyla dosažena. Při některých analýzách následně docházelo ke koeluci pík nebo výrazné asymetrii a chvostování. Vzhledem k tomu, že metoda je vyvíjena pro použití studenty středních škol, nezdá se být vhodné zvolit metodu obtížně reprodukovatelnou a snadno ovlivnitelnou lidským faktorem.

*Mobilní fáze 3* byla tvořena roztokem 0,1 obj. % ledové kyseliny octové ve vodě (MFA) a 0,1 obj.% ledové kyseliny octové v acetonitrilu (MFB), dříve použita k analýze kofeinu a jeho třinácti metabolitů ve vzorcích moči metodou LC-MS/MS (Kim et al. 2019). Byly prováděny analýzy roztoku směšného standardu za použití izokratické i gradientové eluce s obsahem MFB v rozsahu 0-12 % při teplotě kolonového prostoru 30-40 °C a průtoku mobilní fáze 0,3-0,5 ml/min. V průběhu optimalizace se při použití této mobilní fáze nepodařilo dosáhnout dobré separace DMX a THEO, píky analytů byly nesymetrické s chvosty a hodnota retenčního času CAFF, coby nejvíce zadržovaného analytu na stacionární fázi, byla vysoká. Délka separace se výrazně nezlepšila ani zvýšením teploty na 35 a na 40 °C, ani zvýšením průtoku MF na 0,5 ml/min.

*Mobilní fáze 4* byla tvořena roztokem 1 obj.% ledové kyseliny octové ve vodě (MFA) a methanolem (MFB), publikována firmou MERCK k analýze osmi metabolitů kofeinu (Merck 2021e). Nejprve byla provedena separace analytů směšného roztoku standardů ( $c = 20 \text{ mg/l}$ ) s použitím kolony KinetexEvo C18 s rozměry 150x3 mm a průměrem částic 2,6  $\mu\text{m}$ , kde bylo dosaženo dobrého retenčního času MUA vzhledem k mrtvému objemu, separace nebyla dlouhá, poslední analyt CAFF měl retenční čas 11,9 min. Problémem bylo chvostování píků. Separace probíhala při 35 °C, průtok MF byl 0,5 ml/min a poměr MFA/MFB roven 92/8. Při změně kolony na kolonu s menším povrchem sorbentu KinetexEvo C18 s rozměry 150x3 mm a průměrem částic 5  $\mu\text{m}$  a při obsahu MFB 8 % byla separace analytů vyhovující. Symetrie píků jednotlivých analytů se při nástřiku 10  $\mu\text{l}$  pohybovala v rozmezí 0,87-0,96 a tedy splňovala požadovaná kritéria. Nejnižší retenční čas byl pro MUA (2,6 min) a nejvyšší pro CAFF (12,8 min). S rostoucím retenčním časem rostla šířka píků a snižovala se výška píků. Při zvýšení průtoku MF na 1 ml/min došlo pouze ke zkrácení separace, ale nedošlo k úpravě tvaru píku CAFF, který byl stále široký. Při následném použití gradientu a jeho postupné úpravě bylo dosaženo optimálních podmínek separace. Průběh gradientu je uveden v Tab. 10. Nejprve první tři minuty analýzy postupně rostl obsah MFB z 6 % na 15 %, následně 2 min byl obsah MFB 15 %, poté byl obsah MFB snížen zpět na 6 % a po dobu 5,5 min byla kolona stabilizována, čímž se připravovala na další analýzu. Teplota separace činila 35 °C, průtok MF byl 1 ml/min a nástřik vzorku na kolonu byl 10  $\mu\text{l}$ . Za uvedených podmínek se retenční časy jednotlivých analytů pohybují v rozmezí 1,6-5,1 min. Hodnoty rozlišení jednotlivých píků i míra symetrie splňují podmínky optimální separace. Typický chromatogram analýzy roztoku standardů o koncentraci 20 mg/l, za výše zmíněných podmínek, je uveden v příloze.



Povedlo se vyvinout a optimalizovat analytickou metodu pro analýzu kofeinu a jeho metabolitů s krátkou dobou analýzy. Vývoj a optimalizace metody byly provedeny pro kofein, čtyři z jeho metabolitů a pro etofylin, vybraný na základě literatury jako vhodný vnitřní standard (Caubet et al. 2002). Další část této práce byla zpracovávána bez vnitřního standardu s ohledem na zjednodušení vzhledem k plánovanému využití optimalizované a validované metody studenty středních škol. Vnitřní standard byl zahrnut do vývoje metody pro případ pozdějšího využití. Pokud by byla vyžadována složitější úprava vzorku před vlastní analýzou, bylo by vhodné zpracovávat vzorek s vnitřním standardem. Výsledné optimalizované parametry jsou shrnuty v následující kapitole.

#### 4.2 Souhrn optimalizovaných podmínek chromatografické separace

- Chromatografická kolona: KinetexEvo C18  
(délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 5  $\mu\text{m}$ )
- Předkolonka: SecurityGuard™; C18; délka 4 mm; vnitřní průměr 3,0 mm  
(Phenomenex)
- Objem nástřiku: 10  $\mu\text{l}$
- Teplota v kolonovém prostoru: 35 °C
- Použitá mobilní fáze: MFA – deionizovaná voda + 1 obj. %  $\text{CH}_3\text{COOH}$   
MFB – methanol
- Složení mobilní fáze: gradient (Tab. 10)
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- Celková doba analýzy: 11 min

Tab. 10: Časový průběh gradientové eluce v použité metodě.

Čas [min]	Průtok MF [ml/min]	% MFB
0	1	6
3		15
5		15
5,5		6
11		6

### 4.3 Volba podmínek spektrofotometrické detekce

Vhodná vlnová délka pro stanovení jednotlivých analytů byla zvolena na základě analýzy směsného roztoku standardů o koncentraci každého standardu 0,2 mg/l při čtyřech různých vlnových délkách. Měření bylo prováděno ve třech na sobě nezávislých opakováních. Rovněž bylo zaznamenáváno celé absorpční spektrum. Na základě měření absorpčních spekter jednotlivých analytů a hodnot S/N (poměr velikosti signálu a šumu) v rozmezí 270-285 nm byla pro analýzu MUA zvolena vlnová délka 285 nm a pro ostatní analyty 270 nm. Hodnoty S/N při jednotlivých vlnových délkách jsou uvedeny v Tab. 11. Tmavě vyznačené hodnoty byly vyhodnoceny jako nejlepší pro detekci, protože pro tyto vlnové délky byl poměr S/N nejvyšší.

Tab. 11: Hodnoty poměru velikosti signálu ku velikosti šumu (S/N) analytů v rozmezí vlnových délek 270-285 nm (koncentrace 0,2 mg/l) .

Analyt	Vlnová délka [nm]	S/N (opak. 1)	S/N (opak. 2)	S/N (opak.3)	S/N (průměr)
MUA	270	11	7,9	12	10
	275	16	11	17	15
	280	18	11	19	16
	285	23	15	26	21
THBM	270	17	11	18	15
	275	14	8,3	14	12
	280	12	9,4	12	11
	285	11	6,6	11	9,5
DMX	270	15	9,1	16	13
	275	11	8,8	11	10
	280	8,5	5,0	8,9	7,5
	285	7,0	5,0	6,6	6,2
THEO	270	15	10	16	14
	275	13	8,2	14	12
	280	9,8	6,4	9,9	8,7
	285	7,2	4,0	7,2	6,1
CAFF	270	7,7	4,9	8,4	7,0
	275	7,1	4,2	7,6	6,3
	280	4,9	3,8	6,7	5,1
	285	4,1	3,5	4,7	4,1

#### 4.4 Rozpustnost a stabilita standardu 1-methylmočové kyseliny

Při přípravě roztoku analytu MUA bylo zjištěno, že se nerozpouští ve vodě ani v roztoku methanolu. Nalezené informace o rozpustnosti a následné stabilitě MUA v roztoku se poměrně liší. Někteří autoři uvádí, že je látka rozpustná ve vodě, a následně takto vzniklý roztok uchovávají při teplotě 4 °C po dobu 1 měsíce (Bendriss et al. 2000). Martínez-López uvádí, že k rozpuštění MUA je vhodné použít 10% roztok methanolu ve vodě (Martínez-López et al. 2014b). Dle Weimanna lze při rozpuštění MUA ve vodě přidat malé množství hydroxidu amonného, který pomůže rozpuštění. Vzniklý roztok lze následně uchovávat v hlubokomrazícím boxu při -80 °C (Martínez-López et al. 2014a). Caubet uvádí, že k rozpuštění standardu MUA ve vodě je třeba upravit pH pomocí roztoku hydroxidu sodného (1 mol/l) a následně upravit pH zpět na neutrální pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové (1 mol/l), v zásaditém prostředí není MUA stabilní (Caubet et al. 2002).

Na základě předcházejících informací a vlastních experimentů byl roztok MUA připravován ve vodě. K rozpuštění došlo při změně pH pomocí hydroxidu amonného (25 µl/5 ml roztoku). Z důvodu stability roztoku MUA bylo pH ihned po rozpuštění zpětně upraveno na přibližně neutrální pomocí ledové kyseliny octové (10 µl/5 ml roztoku). Stabilita zásobního roztoku MUA byla sledována při laboratorní teplotě ( $t_{lab}$ ), teplotě v lednici (5 °C), teplotě v mrazáku (-18 °C) a v hlubokomrazícím boxu (-85 °C) po dobu 60 min. Při následné analýze roztoku uchovávaném při laboratorní teplotě byl zjištěn úbytek rozpuštěné stanovované látky MUA, zřejmě docházelo k rozkladu. Při uchovávání v lednici či mrazáku se pokaždé vytvořil bílý zákal. Následně bylo možné opětovnou úpravou pH získat čirý roztok, ale koncentrace MUA byla opět nižší než v původním roztoku před vložením do lednice, respektive mrazáku. Zásobní roztok standardu MUA je třeba připravovat vždy čerstvý, jinak dochází pravděpodobně k jejímu rozkladu. MUA se nerozkládala pouze při uchovávání ve směsném roztoku standardů, tedy při celkově nižší koncentraci v roztoku (Kap. 4.5).

#### 4.5 Stabilita směsného zásobního roztoku

Nejen pro účely použití metody při studentských praktikách je výhodné, aby bylo možno připravit zásobní roztok standardů dopředu a mohl být po určitou dobu uchováván. Stabilita byla měřena pro směsný roztok standardů o koncentraci jednotlivých standardů v rozmezí 30-45 mg/l. Roztok byl uchováván v temnu při  $t_{lab}$  po dobu 168 hod (Tab. 12) a po dobu třech měsíců v hlubokomrazícím boxu (-85 °C) (Tab. 13). Na základě získaných dat lze konstatovat, že standardy THBM, DMX, THEO a CAFF jsou v roztoku stabilní, je možné je uchovávat po dobu 168 hod při  $t_{lab}$  nebo 3 měsíců při teplotě dosahujících -85 °C. Delší časový interval nebyl prověřován. V případě standardu MUA došlo k určitému poklesu v koncentraci této látky v roztoku směsného standardu, při  $t_{lab}$  o 4,5 % za 168 hod a v případě zmrazení o 4,7 % po třech měsících. Na základě získaných výsledků analýzy roztoku standardů během prvních 15 hod lze konstatovat, že při měření v průběhu jednoho dne se koncentrace žádného z analytů v roztoku nemění.

Tab. 12: Změna koncentrace analytů v roztoku v průběhu času při laboratorní teplotě ( $t_{lab}$ ).

Analyt	MUA	THBM	DMX	THEO	CAFF
<b>c (0 hod; <math>t_{lab}</math>) [mg/l]</b>	41,67	33,64	45,33	40,57	41,89
<b>c (3 hod; <math>t_{lab}</math>) [mg/l]</b>	41,38	33,69	45,38	40,61	41,69
<b>c (11 hod; <math>t_{lab}</math>) [mg/l]</b>	41,44	33,34	45,26	45,39	41,77
<b>c (15 hod; <math>t_{lab}</math>) [mg/l]</b>	41,43	33,45	45,32	40,43	41,72
<b>c (168 hod; <math>t_{lab}</math>) [mg/l]</b>	39,80	33,57	45,32	40,59	41,83
<b>% rozdíl po 168 hod</b>	4,5	0,21	0,02	-0,05	0,14

Tab. 13: Změna koncentrace analytů v roztoku při uchovávání při teplotě -85 °C.

Analyt	MUA	THBM	DMX	THEO	CAFF
<b>c (0 hod; <math>t_{lab}</math>) [mg/l]</b>	41,67	33,64	45,33	40,57	41,89
<b>c (3 měsíce, -85 °C) [mg/l]</b>	39,72	33,69	45,31	40,63	41,98
<b>% rozdíl</b>	4,7	-0,2	0	-0,2	-0,2

## 4.6 Validace metody

Po optimalizaci chromatografické separace, objasnění rozpustnosti a stability analytů byla provedena validace vyvinuté analytické metody, aby se na základě validačních parametrů prokázala její vhodnost pro využití k analýze reálného vzorku. Základními validačními parametry byly: linearita, správnost, přesnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti.

### 4.6.1 Linearita

Nejprve byla hodnocena linearita analytické metody. Cílem bylo prokázat, že odezva detektoru je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Hodnocení linearity bylo provedeno na základě kritérií přijatelnosti korelační koeficient  $R \geq 0,9900$  a QC koeficient  $\leq 5,00$  % (Nováková a Douša 2013b). V Tab. 14 jsou shrnuty parametry linearity pro jednotlivé analyty v koncentračním rozsahu 0,2 mg/l-80 mg/l. Rovnice kalibračních křivek pro všech 5 analytů byla ve tvaru:  $y = k \cdot c + q$ , kde  $k$  je směrnice kalibrační křivky,  $q$  úsek na ose  $y$  (intercept),  $c$  je koncentrace analytu a  $y$  je odezva detektoru. Pro sestavení kalibrační křivky bylo použito osm koncentračních úrovní, každá koncentrační úroveň byla proměřena ve třech na sobě nezávislých opakováních. U všech analytů korelační koeficient i míra těsnosti závislosti mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu (QC koeficient) splňovali požadovaná kritéria přijatelnosti.

Tab. 14: Validační parametry - linearita.

Parametr	Kritérium přijatelnosti	MUA	THBM	DMX	THEO	CAFF
Směrnice [l/mg]	-	0,4533	0,3551	0,3473	0,3527	0,3141
Intercept [1]	-	0,001093	0,02849	0,01997	0,02764	0,02297
Korelační koeficient [1]	$\geq 0,9900$	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
QC koeficient [%]	$\leq 5,00$	0,742	1,22	1,08	1,23	1,27

### 4.6.2 Správnost a přesnost

Správnost metody, vyjádřená jako výtěžnost, je těsnost shody mezi experimentálně zjištěnou hodnotou koncentrace analytu a referenční hodnotou. Přesnost, vyjádřená jako opakovatelnost, představuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky analýz referenčního vzorku, které byly provedeny za podmínek opakovatelnosti (Kahoun 2020). K zjištění správnosti metody byly analyzovány dvě sady vzorků – neobohacené vzorky (VZ + H<sub>2</sub>O) a obohacené referenční vzorky (VZ + STD), každá sada prováděná v osmi

opakování (viz Tab. 9). Z průměru koncentračních hodnot těchto roztoků byla následně vypočtena výtěžnost, respektive správnost měření. Přesnost byla zjištěna pomocí relativní směrodatné odchylky stanovených koncentrací, jak obohacených, tak neobohacených vzorků. Primární data pro výpočet správnosti a přesnosti jsou k nahlédnutí v přílohách, stejně tak jako typický chromatogram analýzy reálného vzorku.

Hodnocení správnosti a přesnosti bylo provedeno pro každý analyt pouze na jedné z koncentračních úrovní. Vypočtené hodnoty správnosti (Re) a přesnosti (RSD), včetně koncentračních úrovní a kritérií přijatelnosti dle (Association of Analytical Communities. Official Methods of Analysis. 2016), jsou uvedeny v Tab. 15. V případě RSD je u každého analytu uvedena vypočítaná hodnota pro neobohacený vzorek a hodnota pro obohacený vzorek. Pro všechny analyty byla splněna kritéria přijatelnosti. Vzhledem k nízké koncentraci THEO u použitého reálného vzorku moči byla jedna ze stanovovaných hodnot koncentrací (neobohacený vzorek) pod úrovní koncentračního rozsahu kalibrace. Z toho důvodu byla dodatečně optimalizována velikost nástřiku (Kap. 4.7). Možnost většího nástřiku vzorku by umožňovala analýzu vzorku i v případě nižších koncentrací jednotlivých metabolitů.

Tab. 15: Validační parametry – správnost Re a přesnost RSD.

Správnost Re						
Koncentrační úroveň	Kritérium přijatelnosti [%]	MUA	THBM	DMX	THEO	CAFF
10 <sup>-6</sup>	80-110	86		108		101
10 <sup>-7</sup>	80-110		89		88	
Přesnost RSD						
Koncentrační úroveň	Kritérium přijatelnosti [%]	MUA	THBM	DMX	THEO	CAFF
10 <sup>-6</sup>	≤ 11	2,5*   1,7**		2,5   1,2		4,3   0,86
10 <sup>-7</sup>	≤ 15		15   8,2		8,3   5,5	

\* neobohacený vzorek

\*\* obohacený vzorek

#### 4.6.3 Rozsah metody

Na základě splnění kritérií linearit, přesnosti a správnosti, byl pro všechny analyty stanoven rozsah měření 0,2-80 mg/l.

#### 4.6.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Posledními hodnocenými validačními parametry byly mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Kritéria pro hodnocení byla převzata z (Nováková a Douša 2013b) pro LOD hodnota  $S/N \geq 3$  a pro LOQ hodnota  $S/N \geq 10$ . Potřebné hodnoty  $S/N$  k výpočtu těchto parametrů byly získány postupným snižováním koncentrační úrovně (0,2; 0,1 a 0,05 mg/l) a

jsou uvedeny v příloze. Hodnota LOD pro CAFF vyšla 0,24 mg/l, tedy vyšší než je zvolená nejnižší koncentrační úroveň v kalibrační řadě. Vzhledem k tomu, že ostatní validační parametry splňovaly pro CAFF kritéria přijatelnosti, byla nejnižší koncentrační úroveň ponechána na hodnotě 0,2 mg/l.

Tab. 16: Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé analyty.

Analyt	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
<b>MUA</b>	0,022	0,072
<b>THBM</b>	0,025	0,071
<b>DMX</b>	0,027	0,077
<b>THEO</b>	0,027	0,077
<b>CAFF</b>	0,060	0,24

#### 4.7 Optimalizace objemu nástřiku

Vzhledem k výsledku analýzy reálného vzorku, kde byla koncentrace THEO pod hodnotou LOQ, byla dodatečně provedena optimalizace objemu nástřiku pro získání co nejnižších hodnot LOD a LOQ analytu. Současně je nutné, aby píky analytů v chromatogramu byly symetrické. Jako hodnotící kritérium byl použit faktor asymetrie ( $A_s$ ). Hodnota  $A_s$  by se měla pohybovat v rozmezí 0,8 až 1,5 (Nováková a Douša 2013b), k analýze byl použit směsný roztok standardů používaný při sledování stability standardů (Kap. 4.5). Velikost nástřiku byla optimalizována v rozsahu objemů 10-100  $\mu$ l. Na základě výsledků (Tab. 17) hodnot  $A_s$  pro jednotlivé analyty byl určen jako vhodný objem nástřiku 25  $\mu$ l. Případně lze zvážit možnost provádět analýzu vzorku při nástřiku 25  $\mu$ l pro stanovení koncentrace MUA a 100  $\mu$ l pro stanovení koncentrace ostatních analytů.

Tab. 17: Optimalizace objemu nástřiku vzorku

Objem nástřiku [ $\mu$ l]	Faktor asymetrie ( $A_s$ ) [1]				
	MUA	THBM	DMX	THEO	CAFF
<b>10</b>	1,23	0,93	0,92	0,89	0,9
<b>25</b>	1,48	0,96	0,94	0,94	0,96
<b>50</b>	1,91	1,04	1,01	1,03	1,06
<b>75</b>	2,24	1,11	1,07	1,1	1,18
<b>100</b>	2,51	1,16	1,14	1,16	1,3

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části práce byly shrnuty základní informace o kofeinu. Důraz byl kladen na biotransformaci kofeinu v lidském organismu a na faktory, které tento proces ovlivňují. Součástí teoretické části je přehled fyzikálních a chemických vlastností kofeinu a jeho čtyř metabolitů, pro něž byla metoda vyvíjena. Pozornost byla rovněž věnována popisu kapalinové chromatografie a rešerši HPLC/DAD metod pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů v biologických vzorcích.

Praktická část byla věnována vývoji HPLC/DAD metody pro stanovení kofeinu a čtyř vybraných metabolitů (MUA, THMBM, DMX, THEO) s použitím vnitřního standardu (ETF). Nejprve proběhla optimalizace metody, která zahrnovala výběr vhodné stacionární a mobilní fáze, zvolení vhodného průtoku mobilní fáze a teploty v kolonovém prostoru. Jako vhodná kombinace mobilních fází se ukázala 1 obj.% kyselina octová ve vodě (MFA) s methanolem (MFB). Nejlepší separace bylo dosaženo při použití gradientové eluce. Optimalizací se podařilo zkrátit dobu analýzy na 11 minut, což je pro použití ve studentských praktikách ideální. Dále se podařilo vyřešit rozpustnost a zhodnotit stabilita roztoků standardu kyseliny 1-methylmočové (MUA). Navzdory odborným článkům se jako nejlepší jevílo rozpouštění s úpravou pH pomocí hydroxidu amonného a následným zpětným vrácením na neutrální pH pomocí kyseliny octové. Byla úspěšně provedena validace vyvinuté analytické metody a na základě validačních parametrů prokázána její vhodnost pro využití k analýze reálného vzorku. Základními validačními parametry byly: linearita, správnost, přesnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Metoda je vhodná k analýze reálného vzorku v koncentračním rozsahu 0,2-80 mg/l. Rovněž bylo ukázáno, že je možné dosáhnout nižší hodnoty meze stanovitelnosti zvýšením nástřiku z 10  $\mu$ l, pro které byla metoda validována na 25  $\mu$ l. Před vlastním průběhem laboratorních cvičení se studenty je plánováno provést analýzu kalibračních roztoků v rozsahu 0,02-80 mg/l při nástřiku 25  $\mu$ l a 100  $\mu$ l, provést analýzu většího množství reálných vzorků, vyhodnotit základní validační parametry a vhodně upřesnit podmínky analýzy reálných vzorků (velikost nástřiku, ředění nápojů – zdrojů kofeinu atd.).

Jelikož bylo cílem vyvinout metodu pro účely laboratorního praktika pro studenty středních škol a studenty nižších ročníků naší fakulty, je součástí práce příloha s návodem pro laboratorní cvičení. Studenti budou sami měřit obsah kofeinu v moči a porovnávat stanovený obsah s obsahem kofeinu v nápoji, který vypili. Primárním cílem dané úlohy je, prakticky si vyzkoušet práci s reálným vzorkem a srovnání teoretických a praktických poznatků o



biotransformaci kofeinu. Spíše okrajově jde o seznámení s kapalinovou chromatografií jako analytickou metodou.

## 6 CITOVANÁ LITERATURA

ARNAUD, M. J., 2011. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of Experimental Pharmacology* [online]. **200**, 33–91. ISSN 01712004. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-13443-2\_3

ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS., 2016. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* [online]. Dostupné z: [http://www.eoma.aoc.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf)

BARONE, J. J. a H. R. ROBERTS, 1996. Caffeine consumption. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **34**(1), 119–129. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/0278-6915(95)00093-3

BENDRISS, E. K., N. MARKOGLU a I. W. WAINER, 2000. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. **746**(2), 331–338. ISSN 13872273. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(00)00325-X

BENOWITZ, N. L., 1990. Clinical pharmacology of caffeine. *Annual Review of Medicine* [online]. **41**(150), 277–288. ISSN 00664219. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.me.41.020190.001425

BLANCHARD, J. a S. J.A. SAWERS, 1983. The absolute bioavailability of caffeine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* [online]. **24**(1), 93–98. ISSN 00316970. Dostupné z: doi:10.1007/BF00613933

BLUMBERG, J. B., 2013. Introduction to the proceedings of the fifth international scientific symposium on tea and human health1-4. *American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **98**(6), 1526–1528. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.113.060186

BRANUM, A. M., L. M. ROSSEN a K. C. SCHOENDORF, 2014. Trends in caffeine intake among US children and adolescents. *Pediatrics* [online]. **133**(3), 386–393. ISSN 10984275. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2013-2877

BRUGUEROLLE, B., M. TOUMI, E. FARAJ, D. VERVLOET a H. RAZZOUKA, 1990. Influence of the menstrual cycle on theophylline pharmacokinetics in asthmatics. *European Journal of Clinical Pharmacology* [online]. **39**(1), 59–61. ISSN 00316970. Dostupné z: doi:10.1007/BF02657059

CAFFEINE INFORMER, 2021. *Caffeine content of drinks* [online]. [vid. 2021-04-04]. Dostupné z: <https://www.caffeineinformer.com/the-caffeine-database>

CANO-MARQUINA, A., J. J. TARÍN a A. CANO, 2013. The impact of coffee on health. *Maturitas* [online]. **75**(1), 7–21. ISSN 03785122. Dostupné z: doi:10.1016/j.maturitas.2013.02.002

CAUBET, M. S., W. ELBAST, M. C. DUBUC a J. L. BRAZIER, 2002. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: The use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **27**(1–2), 261–270. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(01)00546-5

CERNER MULTUM, 2020. *Dextroamphetamine* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/mtm/dextroamphetamine.html>

CHEMICAL BOOK, 2017a. *1-methyluric acid* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6107257.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6107257.htm)

- CHEMICAL BOOK, 2017b. *1,7-dimethylxanthin* [online]. [vid. 2021-04-05].  
Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_cb6674070.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb6674070.htm)
- CHEMICAL BOOK, 2017c. *Caffeine* [online]. [vid. 2021-04-05].  
Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7202768.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7202768.htm)
- CHEMICAL BOOK, 2017d. *Etofylline* [online]. [vid. 2021-04-05].  
Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2333122.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2333122.htm)
- CHEMICAL BOOK, 2017e. *Theobromine* [online]. [vid. 2021-04-05].  
Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_cb7753381.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb7753381.htm)
- CHEMICAL BOOK, 2017f. *Theophylline* [online]. [vid. 2021-04-05].  
Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB4285388.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4285388.htm)
- CHEN, Y., W. H. LIU, B. L. CHEN, L. FAN, Y. HAN, G. WANG, D. L. HU, Z. R. TAN, G. ZHOU, S. CAO a H. H. ZHOU, 2010. Plant polyphenol curcumin significantly affects CYP1a2 and CYP2a6 activity in healthy, male Chinese volunteers. *Annals of Pharmacotherapy* [online]. **44**(6), 1038–1045. ISSN 10600280. Dostupné z: doi:10.1345/aph.1M533
- CHROŚCIŃSKA-KRAWCZYK, M., M. JARGIEŁŁO-BASZAK, M. WAŁEK, B. TYLUS a S. J. CZUCZWAR, 2011. Caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs: Experimental and clinical data. *Pharmacological Reports* [online]. **63**(1), 12–18. ISSN 17341140.  
Dostupné z: doi:10.1016/S1734-1140(11)70394-2
- COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2006. *Coffee history* [online]. [vid. 2021-04-05].  
Dostupné z: <http://www.coffeeresearch.org/coffee/history.htm>
- COSO, J. D., J. J. SALINERO, B. LARA, S. STUDIES a R. JUAN, 2020. Effects of Caffeine and Coffee on Human Functioning. *Nutrients*. 1–5.
- DE MEJIA, Elvira Gonzalez a Marco Vinicio RAMIREZ-MARES, 2014. Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends in Endocrinology and Metabolism* [online]. **25**(10), 489–492. ISSN 18793061. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2014.07.003
- DORNE, J. L.C.M., K. WALTON a A. G. RENWICK, 2001. Uncertainty factors for chemical risk assessment: Human variability in the pharmacokinetics of CYP1A2 probe substrates. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **39**(7), 681–696. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/S0278-6915(01)00005-9
- DR. PEPPER SNAPPLE GROUP, 2021. *From the invention of the first soft drink more than 200 years ago to some of the industry's most beloved beverage brands, dr pepper snapple group (dps) has a proud legacy of innovation, bold and distinct flavors, and entrepreneurial spirit.* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.drpeppersnapplegroup.com/company/history>
- DRUGS.COM, 2021. *Phenothiazine antipsychotics What are Phenothiazine antipsychotics?* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/drug-class/phenothiazine-antipsychotics.html>
- EFSA, 2015. Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal* [online]. **13**(5). ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2015.4102
- ENTRINGER, S., 2020. *Methylphenidate* [online]. [vid. 2021-04-05].  
Dostupné z: <https://www.drugs.com/methylphenidate.html>

- FRARY, C. D., R. K. JOHNSON a M. Q. WANG, 2005. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *Journal of the American Dietetic Association* [online]. **105**(1), 110–113. ISSN 00028223. Dostupné z: doi:10.1016/j.jada.2004.10.027
- FREDHOLM, B. B., 2011. Notes on the history of caffeine use. *Handbook of Experimental Pharmacology* [online]. **200**, 1–9. ISSN 01712004. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-13443-2\_1
- FRITZ, B. M., M. COMPANION a S. L. BOEHM, 2014. „Wired," Yet Intoxicated: Modeling Binge Caffeine and Alcohol Co-Consumption in the Mouse. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* [online]. **38**(8), 2269–2278. ISSN 15300277. Dostupné z: doi:10.1111/acer.12472
- FURGE, L. L. a K. J. FLETKE, 2007. HPLC determination of caffeine and paraxanthine in urine: An assay for cytochrome P450 1A2 activity. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. **35**(2), 138–144. ISSN 14708175. Dostupné z: doi:10.1002/bmb.28
- GEORGE, J., T. MURPHY, R. ROBERTS, W. G. E. COOKSLEY, J. W. HALLIDAY a L. W. POWELL, 1986. Influence of alcohol and caffeine consumption on caffeine elimination. *Digestive Diseases*. 731–739.
- GONZÁLEZ-CALDERÓN, D., C. A. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A. FUENTES-BENÍTES a C. GONZÁLEZ-ROMERO, 2015. Síntesis de la cafeína a partir de la teobromina: Retomando un experimento remoto bajo una nueva perspectiva. *Educacion Quimica* [online]. **26**(1), 9–12. ISSN 18708404. Dostupné z: doi:10.1016/S0187-893X(15)72092-6
- GROSSO, L. M. a M. B. BRACKEN, 2005. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: A review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Annals of Epidemiology* [online]. **15**(6), 460–466. ISSN 10472797. Dostupné z: doi:10.1016/j.annepidem.2004.12.011
- HECKMAN, M. A., J. WEIL a E. GONZALES DE MEJIA, 2010. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of Food Science* [online]. **75**(3), 77–87. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x
- HELLER, Charlie, 2018. *U.K. Supermarkets Ban Energy Drinks for Shoppers Under 16* [online] [vid. 2021-02-06]. Dostupné z: <https://www.foodandwine.com/news/uk-supermarket-energy-drink-ban>
- JEPPESEN, U., S. LOFT, H. E. POULSEN a K. BRØSEN, 1996. *A fluvoxamine-caffeine interaction study* [online]. 1996. ISSN 0960314X. Dostupné z: doi:10.1097/00008571-199606000-00003
- JOERES, R., H. KLINKER, H. HEUSLER, J. EPPING a E. RICHTER, 1987. Influence of mexiletine. *Pharmacology therapeutics*. **33**, 163–169.
- KAHOUN, D., 2020. Úloha č.5: Stanovení fenolu a  $\alpha$  - naftolu ve vodě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na obrácených fázích se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti (RP-HPLC-UV ). **5**, 1–19.
- KHALIL, S. A., L. K. EL-KHORDAGUI a A. M. SALEH, 1983. Interaction of caffeine with phenothiazine derivatives. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **16**(3), 271–283. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(83)90146-1
- KIM, H. J., M. S. CHOI, S. UR REHMAN, Y. S. JI, J. S. YU, K. NAKAMURA a H. H. YOO, 2019. Determination of urinary caffeine metabolites as biomarkers for drug metabolic enzyme activities. *Nutrients* [online]. **11**(8), 1–15. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11081947

KIM, H. S., H. LI, H. W. KIM, S. E. SHIN, W. K. JUNG, K. S. HA, E. T. HAN, S. H. HONG, A. L. FIRTH, I. W. CHOI a W. S. PARK, 2017. The selective serotonin reuptake inhibitor dapoxetine inhibits voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [online]. **44**(4), 480–487. ISSN 14401681. Dostupné z: doi:10.1111/1440-1681.12723

KLOUDA, Pavel., 2016. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavko. ISBN 978-80-86369-22-8.

KŘÍŽEK, Martin. a Jan. ŠÍMA, 2015. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-486-5.

LINHART, Igor, 2014. *Toxikologie: interakce škodlivých látek živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Praha: VŠCHT (2. vydání, 2014). ISBN 978-80-7080-877-1.

LOPEZ-SANCHEZ, R. del C., V. J. LARA-DIAZ, A. ARANDA-GUTIERREZ, J. A. MARTINEZ-CARDONA a J. A. HERNANDEZ, 2018. HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. **2018**. ISSN 20908873. Dostupné z: doi:10.1155/2018/2085059

MARTÍNEZ-LÓPEZ, S., B. SARRIÁ, G. BAEZA, R. MATEOS a L. BRAVO-CLEMENTE, 2014a. Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. *Food Research International* [online]. **64**, 125–133. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2014.05.043

MARTÍNEZ-LÓPEZ, S., B. SARRIÁ, M. GÓMEZ-JUARISTI, L. GOYA, R. MATEOS a L. BRAVO-CLEMENTE, 2014b. Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *FRIN* [online]. **63**, 446–455. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2014.03.009

MERCK, 2021a. *1-Methyluric acid* [online] [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6885?lang=en&region=CZ>

MERCK, 2021b. *1,7-dimethylxanthine* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d5385?lang=en&region=CZ>

MERCK, 2021c. *Caffeine* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c53?lang=en&region=CZ>

MERCK, 2021d. *Etofylline* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/e2500000?lang=en&region=CZ>

MERCK, 2021e. *HPLC Analysis of Caffeine Metabolites and Analogs on Discovery® C18* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical-applications/hplc/hplc-analysis-of-caffeine-metabolites-and-analogs-g005684.html>

MERCK, 2021f. *Theobromine* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/theobromine180168367011?lang=en&region=CZ>

MERCK, 2021g. *Theophylline* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1633?lang=en&region=CZ>

NATARAJAN, G., M. LULIC-BOTICA a J.V. ARANDA, 2007. Pharmacology Review: Clinical Pharmacology of Caffeine in the Newborn. *NeoReviews* [online]. **8**(5), e214–e221. ISSN 1526-9906. Dostupné z: doi:10.1542/neo.8-5-e214

NEHLIG, A., 2018. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological Reviews* [online]. **70**(2), 384–411. ISSN 15210081. Dostupné z: doi:10.1124/pr.117.014407

NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, 2013a. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. ISBN 978-80-260-4243-3.

NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, 2013b. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. ISBN 9788026042440.

O'KEEFE, J. H., S. K. BHATTI, H. R. PATIL, J. J. DINICOLANTONIO, S. C. LUCAN a Carl J. LAVIE, 2013. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **62**(12), 1043–1051. ISSN 15583597. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2013.06.035

OPEKAR, František, 2002. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem* [online]. Praha: Korolínium.

PARK, G. J. H., P. H. KATELARI, D. B. JONES, F. SEOW, D. G. LE COUTEUR a M. C. NGU, 2003. Validity of the <sup>13</sup>C-Caffeine Breath Test as a Noninvasive, Quantitative Test of Liver Function. *Hepatology* [online]. **38**(5), 1227–1236. ISSN 02709139. Dostupné z: doi:10.1053/jhep.2003.50475

PONS, G., J. C. BLAIS, E. REY, M. PLISSONNIER, M. O. RICHARD, Odile CARRIER, P. D'ATHIS, C. MORAN, J. BADOUAL a G. OLIVE, 1988. Maturation of caffeine N-demethylation in infancy: A study using the <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> breath test. *Pediatric Research* [online]. **23**(6), 632–636. ISSN 15300447. Dostupné z: doi:10.1203/00006450-198806000-00021

SCOTT, N. R., D. STAMBUK, J. CHAKRABORTY, V. MARKS a M. Y. MORGAN, 1988. Caffeine clearance and biotransformation in patients with chronic liver disease. *Clinical Science* [online]. **74**(4), 377–384. ISSN 01435221. Dostupné z: doi:10.1042/cs0740377

SCOTT, NR, J. CHAKRABORTY a V. MARKS, 1986. Urinary metabolites of caffeine in pregnant women. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. **22**(4), 475–478. ISSN 13652125. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2125.1986.tb02920.x

SOŠKA, V., 2015. Léčba dyslipidemie u pacientů s metabolickým syndromem. *Interní Medicina pro Praxi*. **17**(2), 70–72. ISSN 18035256.

SOSKOVÁ, S., 2017. *Možnosti Přípravy nonočástic a nanovláken s antimikrobiální složkou*. B.m. Vysoké učení technické v Brně.

ŠPÁČ, J. a M. VYSKOČILOVÁ, 2018. Blokátory kalciového kanálu po 50 letech. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. **32**(1), 22–26. ISSN 12127973. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/bmc18022893>

THE COCA-COLA COMPANY, 2021. *The Birth of a Refreshing Idea Coca-Cola History* [online]. Dostupné z: <https://www.coca-colacompany.com/company/history/the-birth-of-a-refreshing-idea>

TILLING, S., 2001. *The Discovery and Isolation of Caffeine* [online]. [vid. 2021-04-05]. Dostupné z: <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/tilling/isolation.htm>

TOMASZEWSKI, M., F. BURDAN, G. OLCHOWIK a M. TOMASZEWSKA, 2016. The effects of caffeine administered at different temperatures on foetal development. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* [online]. **23**(1), 148–152. ISSN 18982263. Dostupné z: doi:10.5604/12321966.1196871

VANATTOU-SAIĀFOUDINE, N., R. MCNAMARA a A. HARKIN, 2012. Caffeine provokes adverse interactions with 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and related psychostimulants: Mechanisms and mediators. *British Journal of Pharmacology* [online]. **167**(5), 946–959. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02065.x

VRANÍKOVÁ, B. a J. GAJDZIOK, 2015. Biologická dostupnost léčiva a možnosti jejího ovlivňování Bioavailability and factors influencing its rate. 7–13.

WILLSON, C., 2018. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports* [online]. **5**, 1140–1152. ISSN 22147500. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxrep.2018.11.002

ZÁRUBA, Kamil, 2013. *Analytická chemie 1. díl*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-950-1.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1U	1-methylmočová kyselina
1X	1-methylxantin
13U	1,3-dimethylmočová kyselina
13X	1,3-dimethylxantin
17U	1,7-dimethylmočová kyselina
17X	1,7-dimethylxantin
137U	1,3,7-trimethylmočová kyselina
137X	1,3,7-trimethylxantin
3U	3-methylmočová kyselina
3X	3-methylxantin
37U	3,7-dimethylmočová kyselina
37X	3,7-dimethylxantin
7U	7-methylmočová kyselina
7X	7-methylxantin
A <sub>s</sub>	faktor asymetrie
AAMU	5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil
AFMU	5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil
CAFF	kofein
CYP1A2	člen nadrodiny enzymů cytochrom P450
CYP2A6	člen nadrodiny enzymů cytochrom P451
CYP2E1	člen nadrodiny enzymů cytochrom P452
CYP3A4	člen nadrodiny enzymů cytochrom P453
CYP3A5	člen nadrodiny enzymů cytochrom P450
DMX	1,7-dimethylxantin
ETF	etofylin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s diodovým polem
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
MUA	1-methylmočová kyselina
NAT2	N-acetyltransferáza
QC koeficient	koeficient kvality lineární regrese
R <sub>E</sub>	správnost
R <sub>K</sub>	kalibrační roztok
RSD	přesnost
SD	směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu a šumu
STD	pracovní roztok standardů
t <sub>lab</sub>	laboratorní teplota
THBM	teobromin
THEO	teofylin
VZ	vzorek
XO	xantinoxidáza



## 8 PŘÍLOHY

Primární data pro výpočet SD, RSD a Re - MUA

Neobohacený (unspiked)				Re
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
5,7296	5,756	0,1454	2,5	86
6,0043				
5,6864				
5,5477				
5,6942				
5,8417				
5,8842				
5,6574				
Obohacený (spiked)				
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
11,3607	10,93	0,1838	1,7	
10,8142				
10,8679				
10,8967				
10,9373				
10,8027				
10,9419				
10,8026				

Primární data pro výpočet SD, RSD a Re – THBM

Neobohacený (unspiked)				Re
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
0,9892	1,208	0,1824	15	89
1,1198				
0,9626				
1,2213				
1,2034				
1,2785				
1,4261				
1,4614				
Obohacený (spiked)				
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
1,6448	1,514	0,1247	8,2	
1,5464				
1,4856				
1,6398				
1,3257				
1,3329				
1,5555				
1,5777				

Primární data pro výpočet SD, RSD a Re – DMX

Neobohacený (unspiked)				Re
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
3,7732	3,841	0,09444	2,5	108
3,7898				
3,8796				
3,7076				
3,8960				
3,7967				
4,0148				
3,8682				
Obohacený (spiked)				
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
7,7565	7,909	0,09798	1,2	
7,9442				
7,7907				
7,9958				
7,9304				
8,0296				
7,9665				
7,8555				

Primární data pro výpočet SD, RSD a Re – THEO

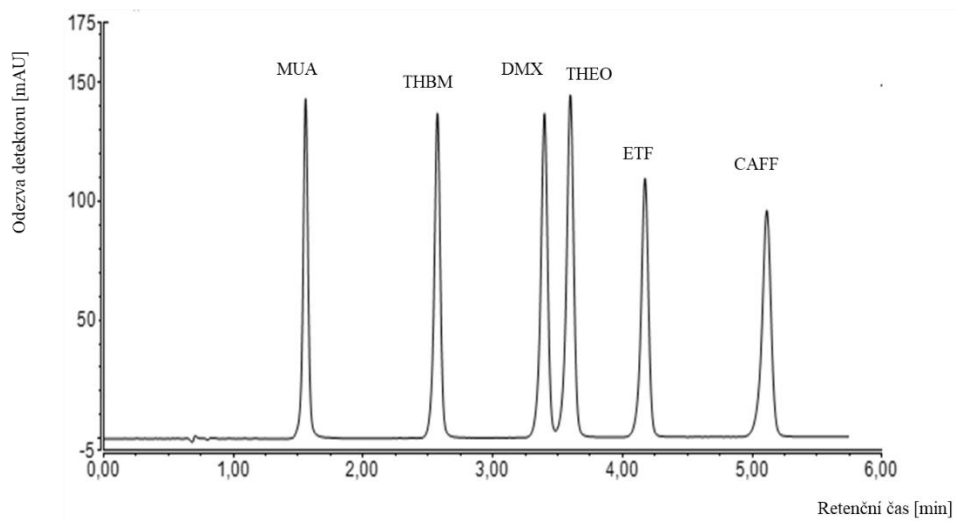
Neobohacený (unspiked)				Re
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
0,0526	0,05418	0,004519	8	88
0,0599				
0,0568				
0,0449				
0,0554				
0,0567				
0,0518				
0,0553				
Obohacený (spiked)				
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
0,2412	0,2587	0,01422	5,5	
0,2684				
0,2481				
0,2842				
0,2606				
0,2659				
0,245				
0,2558				

Primární data pro výpočet SD, RSD a Re - CAFF

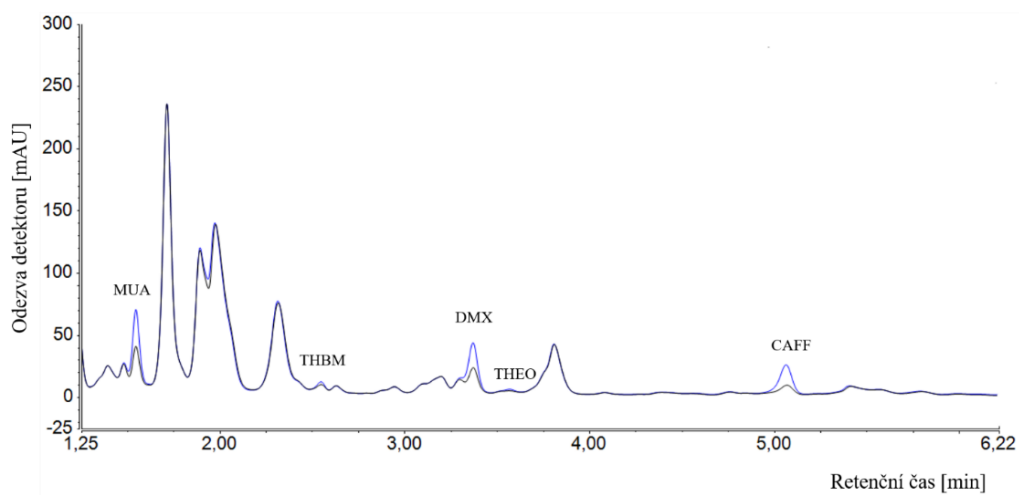
Neobohacený (unspiked)				Re
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
2,0547	2,235	0,09506	4,3	101
2,2549				
2,3409				
2,2135				
2,1854				
2,2694				
2,3538				
2,2046				
Obohacený (spiked)				
c [mg/l]	Průměr c [mg/l]	SD	RSD	
6,4335	6,405	0,05517	0,86	
6,3602				
6,3849				
6,3151				
6,3698				
6,4539				
6,4550				
6,4672				

Data pro zjištění LOD a LOQ.

Analyt	MUA		
Koncentrační úroveň [mg/l]	0,2	0,1	0,05
S/N [1]	26	16	6,9
Analyt	THBM		
Koncentrační úroveň [mg/l]	0,2	0,1	0,05
S/N [1]	18	14	5,9
Analyt	DMX		
Koncentrační úroveň [mg/l]	0,2	0,1	0,05
S/N [1]	16	13	5,6
Analyt	THEO		
Koncentrační úroveň [mg/l]	0,2	0,1	0,05
S/N [1]	16	13	5,6
Analyt	CAFF		
Koncentrační úroveň [mg/l]	0,2	0,1	0,05
S/N [1]	8,4	6,5	2,5



Chromatogram analýzy směsného standardu včetně vnitřního standardu o  $c = 20 \text{ mg/l}$ .



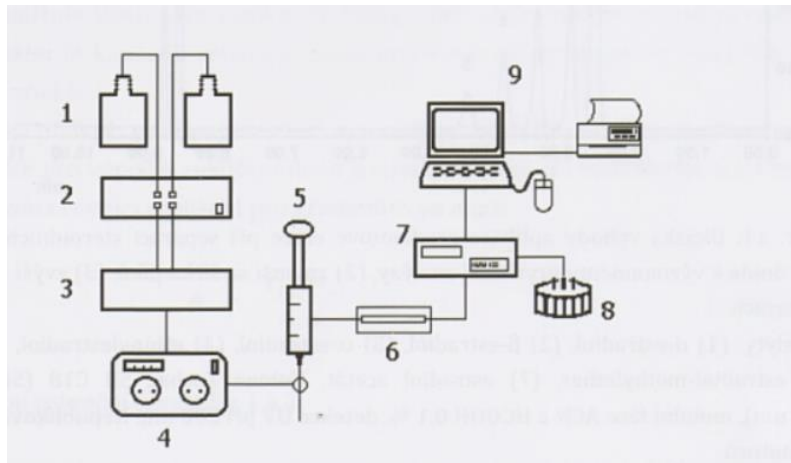
Chromatogram analýza reálného vzorku (černá - neobohacený, modrá - obohacený).

## Laboratorní úloha pro studenty středních škol

### Stanovení kofeinu a jeho metabolitů v moči metodou HPLC

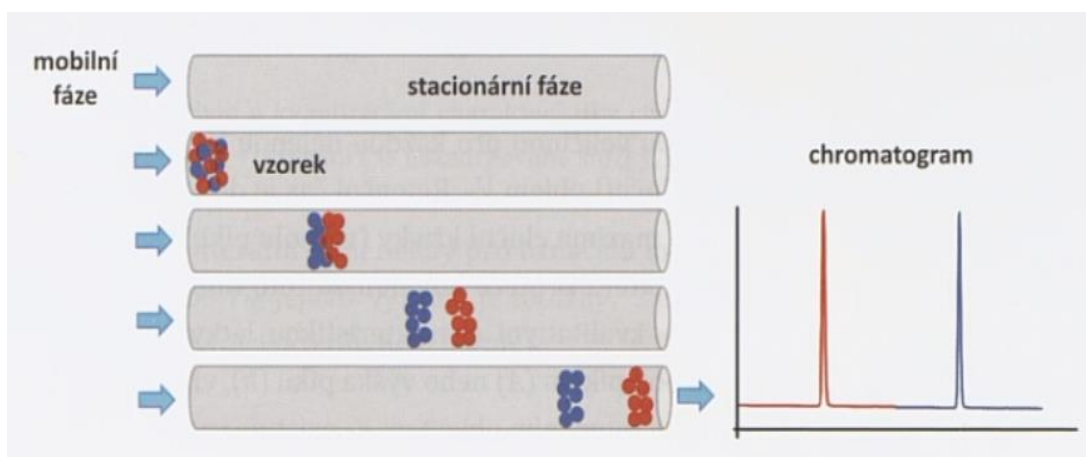
#### Teorie:

Analytická chemie je vědní obor, jehož cílem je získat informace o složení a podstatě hmoty. Za tímto účelem se vyvíjí a aplikují různé metody, přístroje a strategie. *Kapalinová chromatografie* je analytická separační metoda, kterou lze využít k získání informací o složení kapalného vzorku, např. vody z řeky, moči, krve či extraktu z nějaké rostliny. Analyzovaný vzorek je tedy kapalným roztokem. Jednotlivé složky analyzovaného vzorku jsou při analýze od sebe odděleny pomocí mobilní a stacionární fáze. Mobilní (pohyblivá) fáze je vždy kapalná a stacionární (nepohyblivá) fáze je v tzv. koloně a může to být pevná látka nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči (Nováková a Douša 2013a). Mobilní fázi tvoří čisté rozpouštědlo či směs mísitelných rozpouštědel. Nejčastějším typem kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*HPLC, High Performance Liquid Chromatography*). Na Obr. 1 je znázorněno schéma zapojení kapalinového chromatografu.



Obr. 1: Schéma zapojení kapalinového chromatografu. (1) zásobníky mobilní fáze, (2) odplyňovač, (3) směšovač, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona, (7) detektor, (8) sběrač frakcí, (9) datová jednotka. Obrázek byl převzat z (Nováková a Douša 2013a).

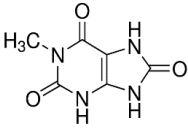
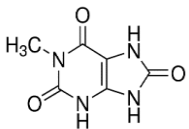
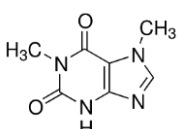
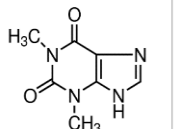
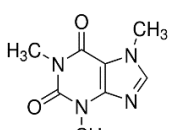
Mobilní fáze je čerpána ze zásobníku pod vysokým tlakem. Do proudu mobilní fáze je nastříknut malý objem (v řádu mikrolitrů) vzorku, který je poté společně s mobilní fází unášen na kolonu. Kolona je umístěna v termostatu. Složky vzorku jsou unášeny tokem mobilní fáze a interagují se stacionární fází. Na koloně dochází k zadržení a postupnému rozdělení stanovovaných složek vzorku (analytů). Každý analyt interaguje se stacionární fází „jinak intenzivně“, proto se složky vzorku rozdělí. Doba, za kterou jsou eluovány („vymyty“) z kolony, se nazývá retenční čas. Na základě retenčních časů následně určujeme, o jakou látku se jedná. Za kolonou je umístěn detektor. Detektor (v našem případě UV/VIS) vysílá signál do počítače. Časový záznam signálu detektoru se nazývá chromatogram. Ten následně vyhodnocujeme na PC. Spektrofotometrický detektor pracuje na principu měření absorbance eluátu. Pokud pracujeme s detektorem s diodovým polem (jako my), můžeme měřit v celém spektru vlnových délek (190 až 780 nm) v jeden okamžik. Ukázka chromatogramu a princip retenčních časů je vidět na Obr. 2. Způsob vyhodnocení naměřených dat a získání informací o složení analyzovaných vzorků bude názorně vysvětlen v průběhu laboratorního cvičení.



Obr. č. 2: Princip chromatografické separace, převzato z [1]

*Kofein (1,3,7-trimethylxantin)* je celosvětově nejvíce konzumovanou drogou, kterou lze najít jako alkaloid v plodech kávovníku, v plodech kakaovníku, listech čajovníku či guarany. Biotransformace v lidském organismu je komplexní a složitý proces, jehož výsledkem je téměř 25 metabolitů. Biotransformační reakce probíhají převážně v játrech a jsou katalyzovány skupinou enzymů cytochromu P450. Většina přijatého kofeinu je pomocí těchto reakcí přeměněna na xantiny a následně na močové kyseliny, pouze méně než 5 % kofeinu zůstane v moči v nezměněné podobě. Strukturální vzorce stanovovaných metabolitů a kofeinu jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Strukturní vzorce stanovovaných analytů. Vzorce převzaty z [2-6].

1-methylmočová kyselina	Teobromin	Paraxantin	Teofylin	Kofein
				

### Úkol:

1. Upravte vzorky moči a nápoje a připravte je k analýze.
2. Proved'te analýzu vzorků pomocí HPLC.
3. Proved'te identifikaci píků všech pěti analytů (1-methylmočová kyselina - MUA, teobromin – THBM, 1,7-dimethylxantin – DMX, teofylin – THEO a kofein – CAFF) na základě hodnot jejich retenčních časů.
4. Určete a porovnejte množství kofeinu a jeho metabolitů v moči.
5. Proved'te stanovení množství kofeinu ve vámi vypitém nápoji a porovnejte jeho množství s množstvím v moči.

### Přístroje, pomůcky, laboratorní sklo:

- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf se spektrofotometrickou detekcí
- Automatická pipety (1-100  $\mu$ l) a (100-1000  $\mu$ l)
- Odstředivka
- Zkumavky, vialky, hliníková víčka, krympovací kleště
- Plastové špičky

### **Chemikálie a roztoky:**

- Směsný standard o koncentraci 80 mg/l. (1-methylmočová kyselina, teobromin, teofylin, 1,7-dimethylxantin a kofein)
- Mobilní fáze A (MFA) – deionizovaná voda + 1 obj.% kyseliny octové  
Mobilní fáze B (MFB) - methanol
- Kyselina octová (čistota pro HPLC, 100 %)
- Vzorky moči odebrané v čase 0 hod, 2 hod a 4 hod po vypití nápoje obsahujícího kofein (odebrané do plastových zkumavek)
- Vzorek vypitého nápoje obsahujícího kofein (odebraný do eppendorfky)
- Destilovaná voda

### **Postup:**

*V průběhu práce každý student pracuje pouze se svými vzorky. Je třeba mít na zřeteli, že se jedná o analýzu biologických vzorků. Veškeré vzorky a použité zkumavky následně zlikvidujte dle pokynů.*

#### 1. Úprava reálného vzorku:

- Do stojánku si připravte odstředivací zkumavky (eppendorfky) a označte si je vaším přiděleným číslem a časovým údajem (např. 1/0 hod, 1/2 hod a 1/4 hod)
- Pomocí automatické pipety (100-1000  $\mu$ l) odeberte 1 ml moči do řádně označené odstředivací zkumavky (eppendorfky) a pomocí automatické pipety (1-100  $\mu$ l) přidejte 35  $\mu$ l kyseliny octové. Promíchejte pomocí vortexu. Proveďte pro všechny vzorky moči. Pro každý vzorek použijte novou špičku.
- Okyselené vzorky moči a vzorek nápoje odstřed'ujte při 10 000 otáčkách/min po dobu 10 min (dodržte pravidla správného odstřed'ování).
- Připravte si vialky do stojánku, označte (např. pro vzorky moči 1/0 hod, 1/2 hod a 1/4 hod a pro vzorek nápoje 1/vz)
- Z odstřed'ovacích zkumavek odeberte automatickou pipetou 0,7 ml supernatantu (tekutiny nad sedimentem) vždy do shodně označené skleněné vialky a zakrympujte. Pro každý vzorek použijte novou špičku.

#### 2. Měření pomocí kapalinového chromatografu

- Proveďte kontrolu nastavených parametrů chromatografické analýzy porovnáním s údaji v Tab. 2 a v Tab. 3.
- Do zásobníku vzorků vložte připravené vialky se vzorky a proveďte měření (analýzu).



Tab. 2: Parametry chromatografické separace

<b>Chromatografická kolona</b>		KinetexEvo C18; 150x3 mm; 5 µm
<b>Mobilní fáze</b>	<b>MFA</b>	voda + 1 obj.% kyseliny octové
	<b>MFB</b>	methanol
<b>Průtok MF [ml/min]</b>		1
<b>Teplota [°C]</b>		30
<b>Objem nástřiku vzorku [µl]</b>		10

Tab. 3: Časový průběh gradientové eluce.

Čas [min]	Průtok MF [ml/min]	% MFB
0	1	6
3		15
5		15
5,5		6
11		6

3. Proveďte integraci píků v chromatogramech, kvantitativně a kvalitativně zhodnoťte analýzy, včetně porovnání množství (koncentrací) kofeinu v nápoji a v moči.
4. Výsledky měření zpracujte v protokol.

### **Citovaná literatura:**

[1] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. ISBN 978-80-260-4243-3.

[2] MERCK, 2021a. *1-Methyluric acid* [online] [vid. 2021-02-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6885?lang=en&region=CZ>

[3] MERCK, 2021f. *Theobromine* [online]. [vid. 2021-02-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/theobromine180168367011?lang=en&region=CZ>

[4] MERCK, 2021b. *1,7-dimethyxanthine* [online]. [vid. 2021-02-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d5385?lang=en&region=CZ>

[5] MERCK, 2021g. *Theophylline* [online]. [vid. 2021-02-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1633?lang=en&region=CZ>

[6] MERCK, 2021c. *Caffeine* [online]. [vid. 2021-02-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c53?lang=en&region=CZ>