

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 543.544.5.068.7;943.3; 615.074

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ КОФЕИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КАК МЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ**Я.Г. Новицкая<sup>1</sup>, А.А. Литвин<sup>1</sup>, В.П. Жердев<sup>1</sup>, Е.В. Блынская<sup>1\*</sup>, С.Э. Кондаков<sup>2</sup><sup>1</sup>Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН,  
<sup>2</sup>кафедра химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;  
e-mail: eaureus@mail.ru)

Разработана методика количественного определения кофеина и его метаболитов в биологических пробах (плазме крови крыс) с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Предел количественного обнаружения кофеина, параксантина, теобромина, теофиллина составил 10 нг/мл, 1,3,7-триметилмочевой кислоты – 25 нг/мл.

**Ключевые слова:** кофеин, теобромин, теофиллин, параксантин, 1,3,7-триметилмочевая кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография, количественное определение.

Кофеин (1,3,7-триметилксантин), часто называемый в фармацевтических публикациях теин, матеин, гуаранин, является алкалоидом пуринового ряда. При попадании кофеина в организм человека и животных в результате его биотрансформации образуется ряд метаболитов (теобромин, теофиллин, параксантин и 1,3,7-триметилмочевая кислота) [1]. Известно, что в организме кофеин метаболизируется в основном представителем суперсемейства цитохромов P450 изоферментом CYP1A2. Данный изофермент участвует также в метаболизме таких фармакологических агентов, как атипичные нейролептики (клозапин, оланзапин), фторхинолоны, циметидин, рифампицин, фенобарбитал и т.д. Все это делает кофеин и его метаболиты одним из наиболее широко используемых маркеров для изучения комбинированного действия лекарственных препаратов [2, 3].

Для анализа кофеина и его метаболитов в биожидкостях широко используются хроматографические методы, в частности высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). До настоящего времени исследователи оценивали содержание либо неизмененного кофеина, либо одного или двух его метаболитов [4–6].

Цель настоящей работы – разработка методики количественного определения кофеина и его четырех

метаболитов в плазме крови крыс на основе ВЭЖХ с УФ-детектированием; изучение активности CYP1A2 в комбинированной фармакотерапии селективного анксиолитика афобазола, разработанного в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, и другими препаратами; изучение возможных межлекарственных взаимодействий.

**Материалы и методы**

**Материалы.** Кофеин «Fluka» (Германия), теобромин «Sigma» (Германия), теофиллин «Sigma» (Германия), параксантин «Fluka» (Канада), 1,3,7 – триметилмочевая кислота «Sigma» (Германия), афобазола дигидрохлорид «Erregiere SpA.» (Италия), ацетонитрил для хроматографии (марка «УФ») «Merck» (Германия), эфир диэтиловый, химически чистый «МедХимПром» (Россия), метанол «Merck» (Германия), кислота муравьиная «Sigma» (Германия).

**Методы.** Для анализа проб плазмы крови крыс использовали метод ВЭЖХ. Разделение проводили на жидкостном хроматографе «Beckman Coulter» (США), состоящем из изократической помпы «System Gold 127», ультрафиолетового детектора «System Gold 166» и компьютера с соответствующим пакетом программ для обсчета хроматограмм («Мультихром», «Амперсэнд», Россия).

**Условия хроматографирования.** Аналитическая колонка – «Luna C<sub>18</sub>» («Phenomenex», США; 250×4,6 мм; 5 мкм), детектирование проводили при длине волны 273 нм.

Подвижная фаза (ПФ) – вода (значение pH доведено до 4,0 с помощью 1%-го раствора кислоты муравьиной), ацетонитрил и метанол (80:8:14). Скорость подвижной фазы 1,5 мл/мин.

Хроматографический анализ проводили при комнатной температуре (18–20°C). Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане в течение 5 мин. Объем пробы составил 100 мкл.

### Результаты и обсуждение

При условиях хроматографирования, приведенных выше, время удерживания кофеина составляет в среднем 6,7 мин, теобромину – 3 мин, параксантина – 4,5 мин, теофиллина – 5 мин, 1,3,7-триметилмочевой кислоты – 5,5 мин. Кокстрактивные вещества не мешали определению (рисунок).

Предел количественного обнаружения кофеина, теобромину, теофиллина, параксантина для разработанной методики составил 10 нг/мл, а для 1,3,7-триметилмочевой кислоты – 25 нг/мл.

Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» [4]. Линейность методики оценивалась по 8 калибровочным стандартам (25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 нг/мл).

Стандарты готовили последовательным разведением ПФ матричных растворов кофеина, теобромину, теофиллина, параксантина, 1,3,7-триметилмочевой кислоты (100 мкг/мл в воде). Количество кофеина и его метаболитов в хроматографических фракциях определяли методом абсолютной калибровки. В изучаемом диапазоне концентраций ( $C$ ) отмечена линейная зависимость между концентрациями анализируемых соединений и соответствующими площадями хроматографических пиков, усредненное значение которых описывается следующими уравнениями ( $n = 7$ ):

для кофеина

$$S = -0,24 + 0,21 \times C \quad (r = 0,9995);$$

для теобромину

$$S = -6,25 + 0,19 \times C \quad (r = 0,9991);$$

для теофиллина

$$S = -5,13 + 0,22 \times C \quad (r = 0,9993);$$

для параксантина

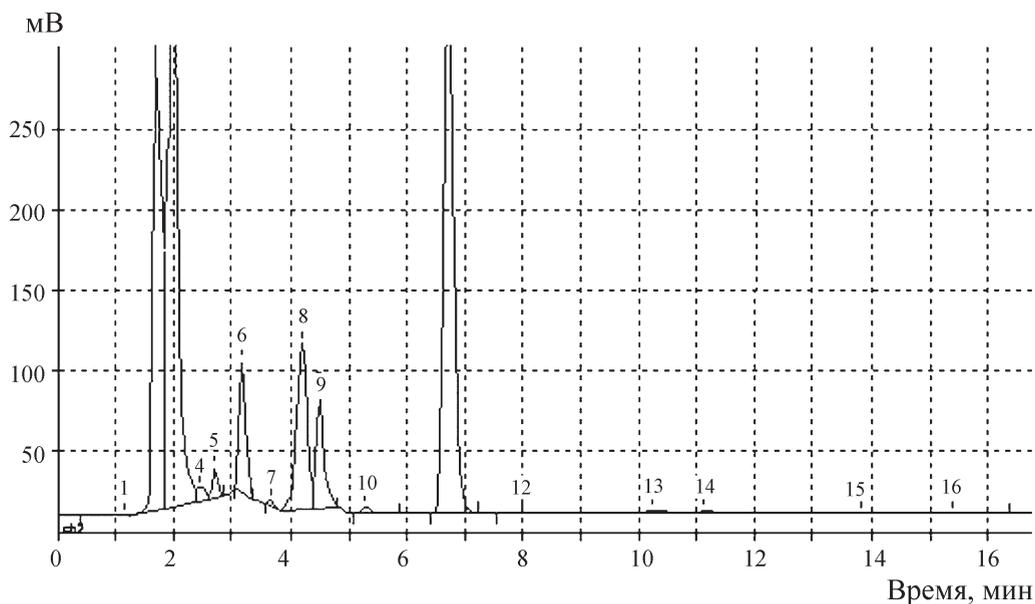
$$S = -4,11 + 0,17 \times C \quad (r = 0,9998);$$

для 1,3,7-триметилмочевой кислоты

$$S = -3,29 + 0,11 \times C \quad (r = 0,9993),$$

где  $S$  – площадь хроматографического пика вещества (в единицах интегрирования хроматографа),  $C$  – концентрация, нг/мл.

Разработанная методика метрологически оценена на растворах стандартного образца кофеина и его метаболитов после шести определений. Полученные результаты представлены в табл. 1. Относительная ошибка определения кофеина для



Хроматограмма плазмы крови крысы после перорального введения кофеина в дозе 50 мг/кг [№/№ пиков: 1-5, 7, 8, 10, 12-16 – пики коэкстрактивных веществ; 6 – теобромин ( $t_R = 3,1$  мин); 9 – параксантин ( $t_R = 4,5$  мин); 11 – кофеин ( $t_R = 6,7$  мин)].

Т а б л и ц а 1

Метрологические характеристики методики определения кофеина и его метаболитов ( $n = 6$ )

Анализируемое вещество	Взято (нг/мл)	Найдено (нг/мл), $\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\varepsilon\%$
Кофеин	25	25,05	2,12	0,87	2,23	8,90
теофиллин	25	25,43	1,84	0,75	1,93	7,59
параксантин	25	24,97	1,90	0,78	2,00	8,00
теобромин	25	25,85	1,52	0,62	1,60	6,18
1,3,7-триметилмочевая кислота	50	50,67	4,47	1,82	4,69	9,25

*Примечание.*  $\bar{x}$  – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение;  $S_{\bar{x}}$  – стандартное отклонение среднего результата;  $\Delta\bar{x}$  – 95%-й доверительный интервал результата отдельного определения;  $\varepsilon\%$  – относительная погрешность отдельного определения.

концентрации 25 нг/мл составила не более 8,9%, параксантина – не более 8,0%, теобромина – не более 6,2%, и 1,3,7-триметилмочевой кислоты (для концентрации 50 нг/мл) – не более 9,3%.

#### Определение процента извлечения кофеина и его метаболитов из биоматериала

В целях определения полноты экстракции кофеина, теобромина, теофиллина, параксантина готовили стандартные растворы в ПФ с концентрациями 500, 1000 и 5000 нг/мл. В центрифужную пробирку с 0,45 мл плазмы крови добавляли 0,05 мл стандартного раствора, содержащего все анализируемые вещества соответствующей концентрации (50,0; 100,0 и 500,0 нг/мл). Смесь тщательно перемешивали и инкубировали при температуре 37°C. Исследуемые вещества извлекали из плазмы крови, для чего осаждали белки с помощью 0,5 мл ацетонитрила, прибавляя его в центрифужную пробирку. Содержимое пробирки перемешивали на вихревом миксере в течение 30 с. Полученный раствор центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант переносили в выпарительную колбу и выпаривали досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в ПФ и аликвоту вводили в петлю инжектора хроматографа. Концентрации анализируемых веществ определяли по три раза в каждом растворе. С учетом того, что чувствительность методики для 1,3,7-триметилмочевой кислоты составила 25 нг/мл, для определения процента извлечения этого соединения из плазмы крови использовали стандартные растворы в ПФ с концентрациями 1000

и 2500 и 10000 нг/мл. Далее поступали так же, как в случае кофеина и его метаболитов. В табл. 2 представлены результаты определения извлечения (%) кофеина и его метаболитов из плазмы крови крыс. Результаты исследования показали, что степень экстракции кофеина составляет  $89,4 \pm 2,5\%$ , теофиллина –  $87,8 \pm 2,9\%$ , параксантина –  $85,9 \pm 4,4\%$ , теобромина –  $88,2 \pm 2,0\%$  и 1,3,7-триметилмочевой кислоты –  $80,1 \pm 2,6\%$ . Установлено, что в плазме крови крыс после введения кофеина в дозе 50 мг/кг содержится неизменный препарат и два его метаболита (теобромин и параксантин).

Разработанную методику использовали для определения метаболических отношений кофеина, после перорального введения крысам афобазола (беспородные крысы, масса тела  $200 \pm 20$  г, перорально вводили афобазол в дозе 25 мг/кг 3 раза в день в течение 4 сут). При применении афобазола в данной дозировке отмечены статистически значимые изменения метаболических отношений кофеина к его метаболитам (теобромин и параксантин). Это может свидетельствовать о наличии межлекарственных взаимодействий при совместном приеме афобазола и препаратов, метаболизируемых формой СУР1А2.

Разработанная методика ВЭЖХ может применяться для количественного определения кофеина и его метаболитов в биопробах. Метод обладает рядом достоинств: время определения каждой пробы составляет около 8 мин, простая пробоподготовка. Методику можно использовать для оценки активности изоформы СУР1А2 при изучении межлекарственных взаимодействий.

Т а б л и ц а 2

Степень извлечения (%) кофеина и его метаболитов из плазмы крови крыс ( $n = 3$ )

Анализируемое вещество	Взято (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Степень извлечения (%)
Кофеин	50	44,0±3,1	88,0
	100	87,8±4,5	87,8
	500	461,5±2,6	92,3
			$\bar{x} \pm SD = 89,4 \pm 2,5$
Теофиллин	50	39,6±4,3	88,8
	100	84,5±3,5	84,5
	500	449,8±2,7	90,0
			$\bar{x} \pm SD = 87,8 \pm 2,9$
Параксантин	50	41,1±6,4	82,2
	100	84,7±4,3	84,7
	500	453,7±3,8	90,7
			$\bar{x} \pm SD = 85,9 \pm 4,4$
Теобромин	50	44,5±5,3	89,0
	100	85,9±4,3	85,9
	500	448,5±3,1	89,7
			$\bar{x} \pm SD = 88,2 \pm 2,0$
1,3,7-Триметилмочевая кислота	100	77,7±5,8	77,7
	250	207,1±4,2	82,8
	1000	798,5±3,6	79,9
			$\bar{x} \pm SD = 80,1 \pm 2,6$

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Testa B., Kramer S.D.* The biochemistry of drug metabolism: Principles, redox reactions, hydrolyses. Zurich, 2008.
2. *Uney K, Tumer I, Traş B.* // Xenobiotica. 2011. **41**. N 7. P. 585.
3. *Жердев В.П., Виглинская А.О., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.* // Тез. 5-й междунар. конф. «Биологический основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». М., 2010. С. 15.
4. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. М., 2008.
5. *Oh K.S., et al.* // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2012. **895-896**. P. 56.
6. *Alvi SN, Hammami MM.* // J. Chromatogr. Sci. 2011. **49**. N 4. P. 292.

Поступила в редакцию 20.09.12

**THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF CAFFEINE AND ITS METABOLITES  
IN RAT BLOOD PLASMA WITH HPLC TECHNIQUE, AS A METHOD FOR  
DETERMINATION OF METABOLIC RELATIONS**

**J.G. Novitskaya, A.A. Litvin, V.P. Zherdev, E.V. Blynskaya, S.E. Kondakov**

*(Federal State Budgetary Institute «Research Zakusov Institute of Pharmacology» under the Russian Academy of Medical Sciences; Chemistry Dept., M.V.Lomonosov MSU, 119991, Moscow, Lenin Hills, bld 3)*

**The technique of quantitative determination of caffeine and its metabolites in biological fluids (rat blood plasma) with use of a high performance liquid chromatography with UV-detecting was developed. The limits of quantitative detection of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline were 10 ng/ml, 1,3,7 – three methyluric acid – 25 ng/ml respectively.**

**Key words:** *caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine, 1,3,7-trimethyluric acid, high performance liquid chromatography, quantified.*

**Сведения об авторах:** *Новицкая Янина Геннадьевна – аспирант лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН (yanina.kolyvanova@yandex.ru); Литвин Александр Алексеевич – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, докт. биол. наук (litbiopharm@yandex.ru); Жердев Владимир Павлович – профессор, зав. лабораторией фармакокинетики НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, докт. мед. наук (zherdevpharm@mail.ru); Блынская Евгения Викторовна – ст. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм, канд. фарм. наук (eareus@mail.ru); Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ, докт. фарм. наук (kse@excite.chem.msu.ru).*