

# Opracowanie i walidacja metody służącej do oznaczania kofeiny w ślinie

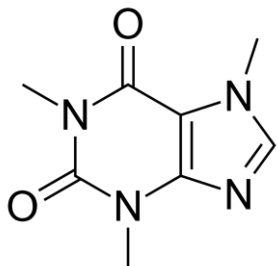
Suhail Alghanem<sup>1</sup>, Małgorzata Sznitowska<sup>1</sup>, Ewelina Dziurkowska<sup>2\*</sup>



<sup>1</sup>Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

<sup>2</sup>Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Chemii Analitycznej, al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

\*Autor korespondujący e-mail: ewelina.dziurkowska@gumed.edu.pl



Kofeina (1,3,7-trimethylxanthine), pochodna metyloksantyny, jest naturalnym alkaloidem i najbardziej znanym bioaktywnym składnikiem kawy. Występuje również w herbacie, kakao, a często można ją znaleźć także w napojach energetycznych, żywności i farmaceutykach dostępnych zarówno na receptę jak i bez niej.

W ramach projektu opracowano metodę oznaczania kofeiny w niewielkiej objętości śliny ludzkiej. W celu izolacji związku z matrycy biologicznej zastosowano SPE. Szczególną zaletą ekstrakcji do fazy stałej jest duża różnorodność dostępnych sorbentów. Podczas optymalizacji procesu ekstrakcji modyfikowano zarówno roztwory użyte do rozcieńczania próbki, jak i poszczególne etapy procedury. Badano również wpływ złoża na wydajność procesu. Ostatecznie, ekstrakcję przeprowadzono używając kolumniek EVOLUTE® EXPRESS ABN, a analizę ilościową prowadzono z użyciem UHPLC z detekcją DAD w gradiencie.

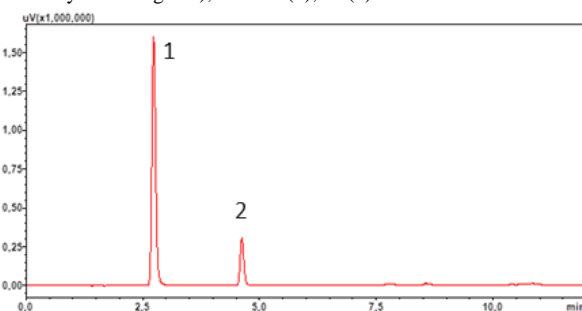
Następnie opracowaną metodę zwalidowano, wyznaczając jej liniowość, a także precyzję w obrębie i pomiędzy dniami. Zbadano wydajność ekstrakcji i trwałość analitu w trakcie przechowywania ekstraktów w autosamplerze oraz przeprowadzając test zamrażania-rozmrzania obciążonych próbek śliny. **Otrzymane wyniki świadczą, iż opracowana metoda jest precyzyjna i dokładna. Dodatkowo metodę zastosowano do określenia stężenia kofeiny w ślinie po spożyciu napoju zawierającego z kofeinę.**

Tabela 2. Parametry walidacyjne. Trwałość kofeiny w temperaturze 8°C i -21°C

QC (ng/mL)	Precyzja jednego dnia (CV %)	Precyzja pomiędzy dniami (CV %)	Wydajność ekstrakcji (%)	Trwałość (różnica %)	
				8°C	-21°C
30	1,52	8,63	93,86	-3,03	-1,24
4000	3,01	9,79	97,37	-1,99	-0,69
8000	2,83	12,11	90,53	-1,03	-1,09

Rysunek 1. Chromatogramy:

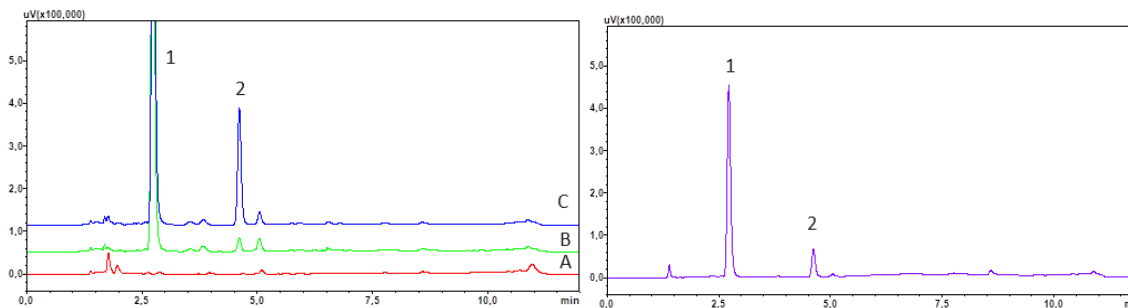
A - wzorców: kofeiny i wzorca wewnętrznego; B - ekstrakt próbki śliny z użyciem kolumniek ABN (stężenie kofeiny - 8000 ng/mL); C - ekstraktu próbki śliny z użyciem kolumniek Strata X (stężenie kofeiny - 8000 ng/mL); kofeina (2); IS (1)



Rysunek 2. Rozdział roztworów wzorcowych; kofeina (2); IS (1)

Tabela 1. Parametry krzywej kalibracyjnej

Krzywa kalibracji $y = ax + b$ (n = 4)	
Zakres (ng/mL)	10–10000
Współczynnik determinacji ( $R^2$ )	$0.995 \pm 0.0051$
$a \pm \Delta a$	$0.00006 \pm 0.000004$
$b \pm \Delta b$	$-0.006625 \pm 0.0067$
LOQ (ng/mL)	10,0



Rysunek 3. Chromatogramy ekstraktów śliny: A – próbka ślepa; B – obciążonej kofeiną (2) (stężenie - 800 ng/mL) i IS (1); C - obciążonej kofeiną (2) (stężenie - 6000 ng/mL) i IS (1);

Rysunek 4. Chromatogramy ekstraktu osoby po spożyciu kawy (oznaczone stężenie kofeiny - 2683 ng/mL) (1) IS (2) kofeina