مجلة جامعة دمشق للعلوم الطبية
المجلد 39 العدد 3 (2023): 93- 104

Damascus University Journal of Medical Sciences
Vol. 39 No. 3 (2023): 93 - 104

استخلاص الكافئين ومستقلبه الباراكزانيتن من البول ومقايستهما بواسطة جهاز الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء

د. سمر الزير[1،2]

[1] مدرس في قسم علم تأثير الأدوية والسموم _ كلية الصيدلة _ جامعة دمشق.
[2] مدرس في قسم علم تأثير الأدوية والسموم _ كلية الصيدلة _ جامعة القلمون الخاصة.

الملخص:

خلفية البحث وهدفه: الكافئين هو قلويد موجود في المشروبات الشائعة مثل القهوة والشاي والمشروبات الغازية، حيث يتمتع بتأثير منشط للجملة العصبية المركزية ولذلك يتم مراقبة استهلاكه في الفعاليات الرياضية. يستقلب الكافئين بواسطة أنزيم السيتوكروم CYP1A2 إلى مستقلبه الأساسي الباراكزانيتن. هدف هذا البحث إلى دراسة مصدوقية طريقة استخلاص وتحليل الكافئين والباراكزانتين معاً في البول بواسطة جهاز الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC كونه جهاز متوافر. مواد البحث وطرائقه استخلص الكافئين والباراكزانتين من البول بواسطة الاستخلاص على الطور الصلب، ثم تم التحليل بواسطة HPLC وبوجود الأنتي بيرين كعياري داخلي.

النتائج: أظهرت النتائج أن الطريقة كانت نوعية للكافئين والباراكزانتين، حيث ظهرت قمم واضحة لهما بدون تداخل من المواد الموجودة في عينة البول. كان الطريقة خطية بين تركيزي 10-160 µg/ml للكافئين و10-80 µg/ml للباراكزانتين. كان مردود الاستخلاص أكثر من 96 % لكلا المادتين. حُسب معامل السعة وعدد الطبقات النظرية ومعامل التذييل والدقة والمضبوطية والتي أظهرت ملائمة النظام. كان حد الكشف للكافئين هو 0.25 µg/ml، وللباراكزانتين هو 0.27 µg/ml ، بينما كان حد القياس الكمي للكافئين 0.77 µg/ml وللباراكزانيتن 0.84 µg/ml

الاستنتاجات: يمكن اعتماد هذه الطريقة للتحري عن الكافئين والباراكزانتين في البول بجهاز متوسط التكلفة ومتوافر، سواء عند الهيئات الرياضية التي تهتم بمعايرة مستويات الكافئين في البول أو في دراسة فعالية الأنزيم CYP1A2

الكلمات المفتاحية :الكافئين، الباراكزانيتن، البول، الاستخلاص على الطور الصلب، جهاز الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

تاريخ الايداع: 2022/7/28
تاريخ القبول: 2022/9/8

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب CC BY-NC-SA

ISSN:2789-6889(online)
https://journal.damascusuniversity.edu.sy/

Extraction of caffeine and its metabolite paraxanthine from urine and measuring both of them by high-performance liquid chromatography.

Dr. samar Al-zeer[1,2]

[1]Lecturer in the Department of Pharmacology and Toxicology - Faculty of Pharmacy - Damascus University.

[2] Lecturer in the Department of Pharmacology and Toxicology - Faculty of Pharmacy - Kalamoon Private University.

Abstract:

Background & Aim: Caffeine is an alkaloid found in common drinks such as coffee and tea and carbonated drinks. Since it has a stimulant effect on the nervous system، its consumption is monitored in sporting events. Caffeine is metabolized by the cytochrome CYP1A2 enzyme to its primary metabolite، paraxanthine. The aim of this research is to study the validity of the method of extracting and analyzing caffeine and paraxanthine together in urine by high performance liquid chromatography (HPLC)، as it is an available device.

Materials and methods: Caffeine and paraxanthine were extracted from urine by solid phase extraction، then analyzed by HPLC with the presence of antipyrine as an internal standard.

Results: The results showed that the method was specific for caffeine and paraxanthine، as clear peaks appeared for them without interference from endogenous substances in urine. The method was linear between concentrations of 10-160 µg/ml for caffeine and 10-80 µg/ml for paraxanthine. The extraction yield was more than 96% for both substances. The capacity factor، the number of theoretical layers، the appendix factor، the accuracy and the accuracy were calculated and showed the suitability of the system. The limit of detection (LOD) was 0.25 µg/ml for caffeine، and 0.27 µg/ml for paraxanthine، while the limit of quantification (LOQ) was 0.77 µg/ml for caffeine and 0.84 µg/ml for paraxanthine.

Conclusions: This method can be adopted to measure caffeine and paraxanthine in urine with a cost-effective and available device، whether in sports organizations that are interested in determining caffeine levels in urine or in studying the activity of the enzyme CYP1A2.

Key words: Caffeine, Paraxanthine، Urine, Solid-Phase Extraction, High-Performance Liquid Chromatography.

Received: 28/7/2022
Accepted: 8/9/2022

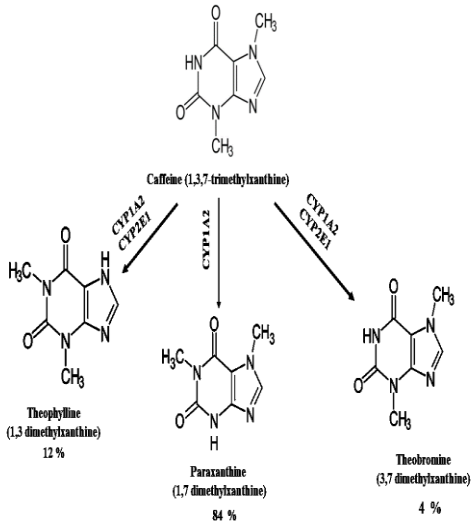
Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a **CC BY- NC-SA**

المقدمة:

يعتبر الكافئين من أكثر المنبهات المستهلكة على مستوى العالم، حيث يتناوله معظم الناس باستمرار خلال ممارسة حياتهم اليومية. يتواجد الكافئين بشكل طبيعي في أوراق وثمار وبذور العديد من النباتات، مثل حبوب البن والكاكاو وأوراق الشاي، حيث تحتوي القهوة على التركيز الأعلى من الكافئين (71 %)، تليها المشروبات الغازية (16 %) ثم الشاي (12 %). يُنصح عادة بتناول كميات معتدلة من الشاي والقهوة، بحيث لاتتجاوز الكمية المستهلكة من الكافئين 400 ملغ يومياً (Heckman et al.,2010).

يمتص الكافئين بسرعة وبشكل كامل في الجهاز الهضمي خلال 45 دقيقة، ويتوزع في جميع سوائل الجسم، مثل الدم والبلازما والسائل النخاعي الشوكي واللعاب، وجميع الأعضاء، كما يعتبر محباً للدسم بشكل كاف للسماح بعبوره الحاجز الدموي الدماغي The blood brain barrier (BBB)) والمشيمة وحليب الثدي. لا يوجد تأثير لبروتينات البلازما على توزع الكافئين (Nehlig,2018).

يُعرف الكافئين كيميائياً بأنه 1،3،7−trimethylxanthine، ويستقلب بشكل أساسي عبر نزع الميتيل بوساطة أنزيم 2CYP1A الذي يعد مسؤولاً عن 90 بالمئة من استقلاب الكافئين عبر نزع الميتيل من عدة مواقع. يتشكل المستقلب الرئيسي الباراكزانتين Paraxanthine عبر الأنزيم CYP1A2، بينما يساهم الأنزيم CYP1A2 بشكل أكبر في تشكل المستقلبين التيوفيللين والتيوبرومين (الشكل1). بالجرعات العادية، يتراوح العمر النصفي للإطراح من 2.5 إلى 10 ساعات، بينما تبطئ التراكيز العالية أو شرب الكافئين المتكرر من الإطراح (Magkos & Kavouras,2005).



الشكل (1): استقلاب الكافئين إلى الباراكزانيتن عبر أنزيم السيتوكروم CYP1A2، وإلى التيوفيللين والتيوبرومين عبر أنزيمي CYP1A2 و CYP2E1.

يظهر التأثير المنشط للكافئين عبر حصر مستقبلات الأدينوزين ***A***1 و***A***2. يعد الأدينوزين من البورينات الموجودة طبيعياً في الجسم والذي يؤثر على مستويات أحادي فوسفات الأدينوزين الحلقي ***cyclic adenosine monophosphate (cAMP)***. مع تراكم الأدينوزين في الدماغ، يرتبط بمستقبلاته ويؤدي إلى النعاس والنوم. يقوم الكافئين والباراكزانتين بحصر مستقبلات الأدينوزين فيسببان الانتباه واليقظة (***Nawrot et al.,2003***)، حيث يزيدان بشكل غير مباشر من تحرر النورايبنفرين والدوبامين والسيروتونين. يقوم الكافئين أيضاً بزيادة مستويات ***cAMP*** داخل الخلايا عبر تثبيط إنزيمات الفوسفوديستراز ***phosphodiesterase enzymes*** في العضلات والهيكل العظمي والأنسجة الدهنية، كما ذكرت له آليات أخرى، مثل تحرير الكالسيوم داخل الخلوي وتثبيط مستقبلات البنزوديازبينات (***Johnson DA,1999،Myers JP***) بسبب تأثيره المنشط، يلجأ ممارسي الرياضة بشكل عام إلى تناول

المشروبات الحاوية على الكافئين قبل وخلال تمارينهم الرياضية. حتى عام 2004، كان الكافئين مادة ممنوعة في البطولات الرياضية حيث صنف كمادة تحسن الأداء الرياضي، ثم سمحت الوكالة العالمية لمكافحة المنشطات (***world anti-doping agency (WADA*** بتناوله مع وضعه ضمن جدول المراقبة ***Monitoring list (Aguilar-Navarro et al***.، 2019)، لذلك يتم التحري عنه في عينة البول باستخدام جهاز الكروموتوغرافيا السائلة أو الغازية المرتبطة بمقياس الكتلة ***LC/MS*** أو ***GC/MS*** ***(Mendes et al., 2019).*** ،***(Aguilar-Navarro et al.,2019)***. تتطلب هذه الأجهزة خبرة عالية ووقت للتحضير (في حالة الكروموتوغرافيا الغازية)، كما أن التكلفة المادية للتحليل عالية جداً، لذلك هدف هذا البحث إلى دراسة مصدوقية طريقة لاستخلاص الكافئين ومستقلبه الباراكزانتين من عينة البول،ثم تحليله بواسطة جهاز الكروموتوغرافيا السائلة المرتبطة بكاشف الأشعة فوق البنفسجية (***HPLC-UV***) المتوافر والأرخص ثمناً، من أجل الاستفادة من هذه الطريقة في التحاليل الروتينية للكافئين.

مواد البحث وطرائقه:

المواد:

تم الحصول على عياري الكافئين وعياري الباراكزانتين وعياري الأنتي بيرين (المستخدم كعياري داخلي) من شركة فلوكا البريطانية بنقاوة 99.98 %. أُحضر الميتانول والماء المخصص لجهاز HPLC (HPLC grade) من شركة فينوميكس Phenomenex الأمريكية. أحضرت مصائد (أعمدة) الاستخلاص (C18 cartridges) من شركة ستراتا فينومكسStrata Phenomenex الأمريكية.

استخلاص الكافئين والباركزانتين من عينة البول:

استخدمت طريقة الاستخلاص بالطور الصلب (SPE solid-phase extraction) لاستخلاص الكافئين والباراكزانتين من البول. تم تهيئة مصائد الاستخلاص cartridges C18عبر تمرير 5 مل ميتانول بمعدل 0.5ml/min، ثم 5 مل من الماء ثنائي التقطير بمعدل 0.5ml/min. في المرحلة الثانية مُرر 10مل من عينة البول مضافاً لها الأنتي بيرين بتركيز 50 µg/ml، ثم غسلت المصيدة ب 3 مل من الماء ثنائي التقطير، قبل أن يتم الاستخلاص ب 3 مل ميتانول.

قياس تراكيز الكافئين والباراكزانتين في البول بواسطة جهاز HPLC-UV/VIS

أُجري العمل باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء Smartline HPLC من إنتاج شركة KNAUER® الألمانية مؤلف من مضخة رباعية المأخذ، طارد غازات، مازج فرن للعمود التحليلي وكاشف UV/VIS.

أُستخدم عمود فصل C 18 Column من إنتاج شركة KNAUER® الألمانية بقطر داخلي 4.6mm وأبعاد جزيئات 5 ميكرون وبطول 250mm وبدرجة حرارة مساوية لـ30°م طول فترة العمل وبوجود كاشف الأشعة فوق البنفسجية نموذج Smartline UV- Detector 2500 والذي تم ضبط طول موجته على 280 نانومتر. كان حجم العينة المحقونة 100 ميكرولتر ووقت التحليل عشر دقائق. تألف الطور المتحرك من (50%ماء + 50%ميتانول) بمعدل تدفق 0.9 مل/دقيقة.

دراسة مصدوقية طريقة استخلاص وتحليل الكافئين والباراكزانتين من البول باستخدام جهاز HPLC-UV/VIS

دُرست خطية الطريقة عبر تحليل سلسلة عيارية للكافئين بتراكيز 10، 20، 40 ،120، 160 µg/ml ، كما حُللت سلسلة عيارية

للباراكزانتين بتراكيز 10، 20، 40،60 ،80 µg/ml. قُسمت مساحات قمم الكافئين أو الباراكزانتين على العياري الداخلي (الأنتي بيرين) للحصول على التراكيز. أُستخدم العياري الداخلي الأنتي بيرين لحساب مردود الاستخلاص.

من أجل فحص استقرارية النظام (System Suitability test)، حُسب كلاً من معامل السعة والدقة والمضبوطية وعدد الطبقات النظرية وعامل التذييل. حُسب معامل السعة (Capacity Factor) عبر حقن محلول عياري من الكافئين ومن الباراكزانتين تركيز كل منهما 2. µg/ml لتحديد دقة الحقن قمنا بإعادة حقن نفس العياري من الكافئين (5 µg/ml) سبع مرات وحسبنا الانحراف المعياري النسبي RSD%

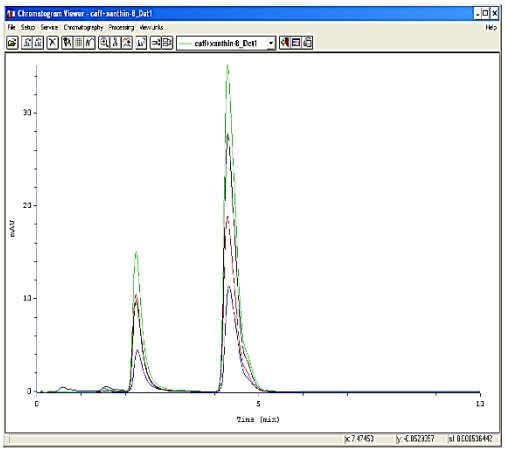
لتعيين حد الكشف (Limit of detection (LOD حُضرت سلسلة من التراكيز المتغيرة بالتناقص لحساب حد الكشف (بناءً على دراسة أولية) وتعاد معايرة أقل تركيز يعطي استجابة واضحة سبع مرات ويحسب الانحراف المعياري النسبي RSD ويكون حد الكشف = Slope / (3.3 XSD).

لتعيين حد القياس الكميLimit of quantification (LOQ)حُضرت سلسلة من العياري بتراكيز متناقصة ضمن دراسة مبدئية لتحديد حد القياس الكمي، ويعاد تكرار المحلول الذي يعطي أقل استجابة سبع مرات ويحسب الانحراف المعياري النسبي RSD. يكون حد القياس الكمي = 10 X (SD) / Slope..

النتائج :

1- النوعية **specificity** وتحديد زمن الاحتباس للكافئين والباراكزانتين والأنتي بيرين:

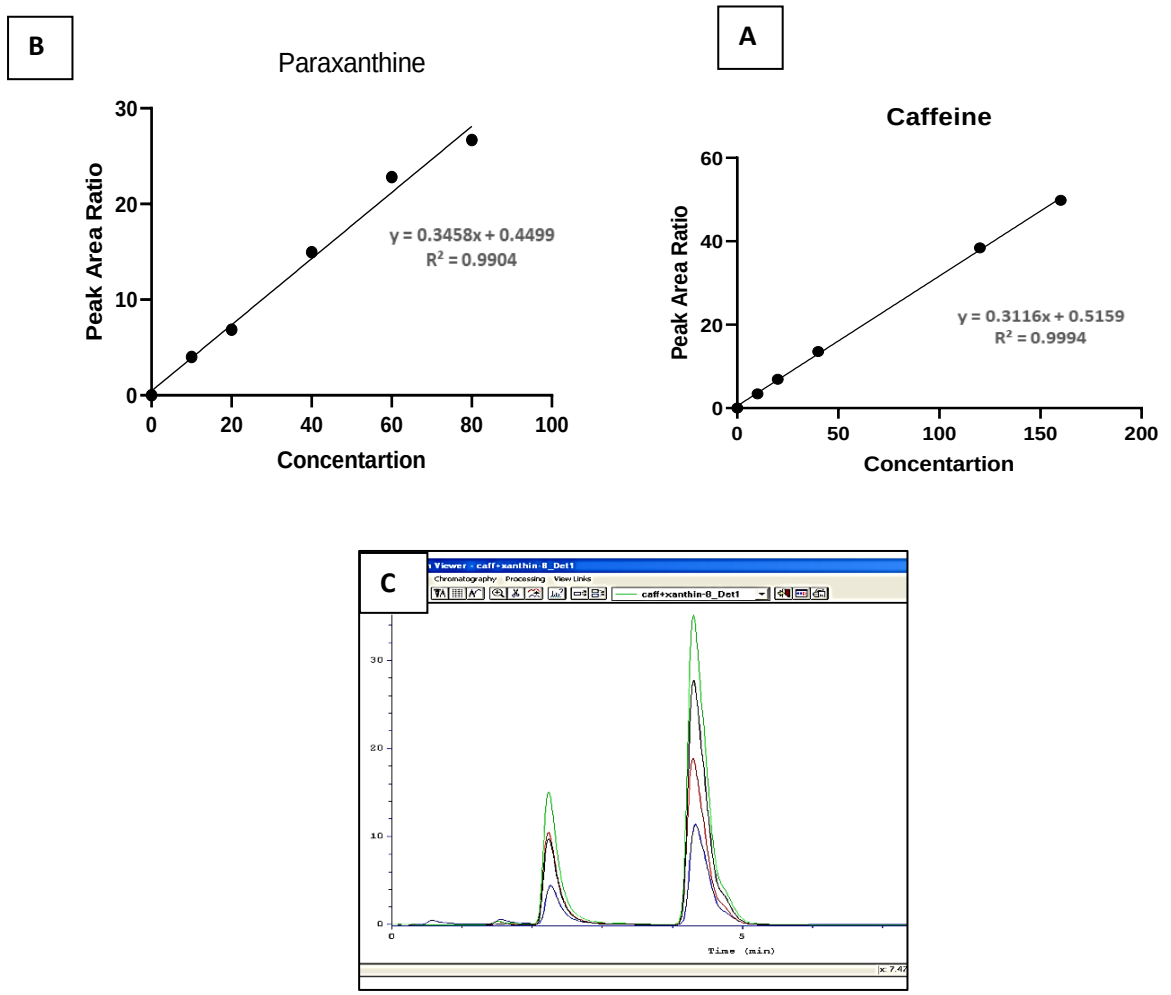
تعرف النوعية بأنها القدرة على تمييز وقياس المادة المراد تحليلها في ظل وجود مواد أخرى مرافقة في العينة. تضم عينة البول العديد من المواد الداخلية التي يمكن أن تتداخل مع الكافئين والباركزانتين والأنتي بيرين، لذلك استخدمت طريقة الاستخلاص على الطور الصلب المعروفة بقدرتها على الفصل الجيد والنوعي لمادة معينة عبر ارتباطها بمادة صلبة موضوعة ضمن عمود استخلاص. عند حقن العينة المستخلصة وبشروط التجربة في جهاز HPLC، ظهرت ثلاث قمم واضحة لكل من الباراكزانتين بزمن وقدره 2.6 دقيقة، والكافئين 4.56 دقيقة وللأنتي بيرين بزمن 6.70 دقيقة (الشكل 2). إن استخدام الطور المتحرك المكون من الميتانول والماء أظهر فعالية جيدة في فصل الباراكزانتين والكافئين والأنتي بيرين على شكل قمم متناظرة، أما محاولة زيادة معدل الجريان بهدف تخفيض زمن الاحتفاظ لم تكن ناجحة بسبب ازدياد معامل التذييل وارتفاع واضح في ضجيج خط القاعدة



الشكل (2): قمم وزمن احتباس الكافئين والباراكزانتين على جهاز HPLC-UV **بعد الاستخلاص من البول.**

2- الخطية:Linearity

من أهم المعايير التي يتم عبرها اختبار جودة الطريقة التحليلية هي الخطية. تمت عملية الحساب الكمي للعينات بإضافة كميات معلومة من عياري الكافئين والباركزانتين (External Standard) وبوجود تركيز محدد من الأنتي بيرين، حيث دُرست خطية الطريقة (Linearity) ضمن مجال بين µg/mL160–10 للكافئين و µg/mL 80– 10 للباراكزانتين ورُسم الخط البياني التابع لتغير مساحة القمة بتغير التركيز كما يوضح الشكل (3). كان معامل بيرسون للارتباط أكثر من 0.99 أي أن الطريقة ذات خطية ممتازة.



الشكل (3): خطية طريقة استخلاص وتحليل الكافئين (A) والباركزانتين (B) في البول، بالإضافة إلى قمم المادتين (C) على جهاز HPLC-UV

3- مردود الاستخلاص : **Recovery**

أظهرت عملية تحضير واستخلاص العينات كفاءة عالية وتمت دراسة تكراريتها بإعادة استخلاص نفس العينة خمس مرات فكان الانحراف المعياري النسبي أقل من 2%، أما مردود الاستخلاص فقد دُرس بإضافة العياري الداخلي الأنتي بيرين إلى جميع العينات، ثم إضافة الكافئيين العياري أو الباراكزانتين (spike) إلى العينة بثلاثة تراكيز مختلفة وفي جميع الحالات كان مردود الطريقة يتراوح بين 98.4 –99.5 % للكافئين (الجدول1) و98 –96%. للباراكزانتين (الجدول2).

الجدول (2): مردود استخلاص الباراكزانتين من البول

كمية Paraxanthine العياري المضافة (µg) إلى 5ml من العينة	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً **(µg)**في 5 ml من العينة	الكمية الكلية المكتشفة عملياً في العينة **µg ± SD**	**المردود Recovery ± SD**
10	10	9.6 ± 0.38	96.14 ± 1.6
15	15	14.7 ± 0.43	98.3 ± 1.0
20	20	19.5 ± 0.32	97.5 ± 1.4

الجدول (1): مردود استخلاص الكافئين من البول

كمية **Caffeine** العياري المضافة (µg) إلى 5ml من العينة	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً **(µg)**في 5 ml من العينة	الكمية الكلية المكتشفة عملياً في العينة **µg ± SD**	**المردود Recovery ± SD**
10	10	9.8 ± 0.36	98.4 ± 1.6
15	15	14.9 ± 0.48	99.3 ± 1.0
20	20	19.9 ± 0.29	99.5 ± 1.4

4- فحص ملائمة النظام (**System Suitability test):** يعد اختبار ملاءمة النظام ضرورياً لتأكيد جودة أداء تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء. تقوم هذه الاختبارات على مفهوم واحد هو أن الجهاز والعمليات الالكترونية والتحليلية وكذلك العينات المراد تحليلها تشكل نظاماً متكاملاً يجب تقويمه كجملة واحدة. يعبر عن ملاءمة النظام بمجموعة من الثوابت هي:

أولاً معامل السعة **(Capacity Factor):** بحقن محلول عياري من الكافئين ومن الباراكزانتين تركيز كل منهما 2 ppm كان معامل السعة K=2.83 للكافئين وK=2.69 للباراكزانتين وحسب التوصيات فإن معامل السعة ذو قيمة جيدة لكلا المادتين (الجدول3).

الجدول (3): معامل سعة الكافئين والباركزانتين

Compound	**tR (n= 9)**	**Area (n= 9)**	**K'**	**T**
Paraxanthine	2.63	1.539	2.69	1.15
Caffeine	4.56	2.484	’2.83	1.22

ثانياً :الدقة**(Precision/Injection repeatability):** لتحديد دقة الحقن قمنا بإعادة حقن نفس العياري من الكافئين (ppm5) سبع مرات وحسبنا الانحراف المعياري النسبي RSD% وكانت النتيجة أن الانحراف المعياري مساو لـ0.20%. كذلك قمنا بإعادة حقن نفس العياري من البارا كزانتين (ppm2) سبع مرات وحسبنا الانحراف المعياري النسبي RSD% وكانت النتيجة أن الانحراف المعياري مساو لـ0.10% (الجدول4)

الجدول (4): حساب RSD **للكافئين والباركزانتين بتركيز 5** ppm

	معايرة 1	معايرة 2	معايرة 3	معايرة 4	معايرة 5	معايرة 6	معايرة7	$\overline{X}$	**RSD**
Caffeine	5.21	5.43	4.99	4.87	5.11	5.17	4.87	5.1	0.20
Paraxanthine	2.11	1.98	1.96	2.2	2.14	1.96	2.12	2.1	0.10

أيضا أجريت دراسة الدقة على تركيز عالي من عينة الكافئين والباراكزانتين حيث حُضرت بتركيز µg/mL50 وحُللت سبع مرات n=7 (الجدول 5) فالنظام يتمتع بالدقة ومطابق لمواصفات الجودة

الجدول (5): حساب RSD للكافئين والباركزانتين بتركيز 50 ppm

Compound	**Spiked Concentration 50 µg/mL**	**Measured Concentration 50 µg/mL Mean ± SD**	**RSD %**	**Deviation %**
paraxanthine	50	49.34± 0.249	0.503	1.32
Caffeine	50	49.57±0.23	0.49	0.86

% Deviation = (Spiked Concentration - Mean Measured Concentration)/ Spiked Concentration * 100

ثالثاً: عدد الطبقات النظرية (**Theoretical plate number):** بحساب عدد الطبقات النظرية في حال المحلول العياري 5 ppm من الكافئين يكون عدد الطبقات النظرية (=7989N). وفي حال نفس التركيز للباراكزانتين كان عدد الطبقات النظرية (N=7875) وبالتالي تعد قدرة العمود على الفصل جيدة.

رابعاً: معامل التذييل **(Tailing Factor):** بحساب معامل التذييل للقمة التابعة لمحلول عياري من الكافئين تركيزه 5 ppm كان معامل التذييل مساوياً لـ (1.22) ولمحلول عياري من الباراكزانتين تركيزه 2 ppm كان معامل التذييل مساوياً لـ (1.15) وبالتالي تناظر القمة جيد ويمكن مكاملتها وإعطاء نتائج كمية صحيحة.

5- تعيين حد الكشف **Limit of detection (LOQ)** :

يُعرف حد الكشف (Limit of Detection) بأنه الكمية أو التركيز الأقل التي يمكن كشفها من المادة المراد تحليلها. تُحضر سلسلة من التراكيز المتغيرة بالتناقص لحساب حد الكشف (بناءً على دراسة أولية) وتُعاد معايرة أقل تركيز يعطي استجابة واضحة سبع مرات ويحسب الانحراف المعياري النسبي ويكون

حد الكشف LOD = (3.3 XSD) / Slope. بالحساب يظهر أن حد الكشف للكافئين مساو لـ 0.25 مكغ/مل وللباراكزانتين مساو ل 0.27 مكغ/مل.

6- تعيين الحد الكمي **Limit of Quantification (LOQ)):**

يُعرف حد القياس الكمي (Limit of Quantification) بأنه الكمية أو التركيز الأقل من المادة المراد تحليلها والتي يمكن قياسها بدقة ومضبوطية مقبولتين. لتعيين حد القياس الكمي تحضر سلسلة من العياري بتراكيز متناقصة ضمن دراسة مبدئية لتحديد حد القياس الكمي، ويعاد تكرار المحلول الذي يعطي أقل استجابة سبع مرات ويحسب الانحراف المعياري النسبي RSD، يجب ألاّ تزيد قيمة الانحراف المعياري النسبي عن 20% ويكون حد القياس الكمي LOQ = 10 (XSD) / Slope). بالحساب كان حد القياس الكمي للكافئين مساو 0.77 مكغ/مل و وللباراكزانتين 0.84 مكغ/مل.

المناقشة:

في هذا البحث، دُرست مصدوقية طريقة لاستخلاص وتحليل الكافئين ومستقلبه الرئيسي الباراكزانتين بواسطة الاستخلاص على طور صلب، ثم المقايسة بواسطة HPLC-UV.

إن استخلاص العينة هي مرحلة مهمة جداً خلال تحليل أي عينة بيولوجية، فعلى الطريقة المختارة أن تزيل المركبات التي قد تتداخل مع المركب المطلوب تحليله، وفي الوقت نفسه أن توفر مردود عالي للاستخلاص. من أهم طرق الاستخلاص الأساسية: الاستخلاص بين سائلين والاستخلاص على الطور الصلب، حيث يتميز الاستخلاص على الطور الصلب بأنه أكثر حساسية ونوعية ويستخدم كميات أقل من المحلات مص، مما يجعله مفضلاً لتحليل العينات البيولوجية خاصة عندما يكون تركيز المادة المراد التحري عنها قليلاً (Buszewski،.B،Szultka,2012 &). في هذا البحث، استخدمت مصائد استخلاص cartridges من نوع C 18 أي Octadecyl-Functionalized Silica Gel، وهو من نوع Reversed phase. طُبقت هذه الطريقة في الاستخلاص سابقاً من أجل استخلاص الكافئين من المنتجات الغذائية (Rodrigues et al.، Salinas-Vargas & 2007; Cañizares-Macías,2014) ولكن ليس على عينة البول. أظهرت طريقة الاستخلاص فعالية عالية في تنظيف العينة من المواد الموجودة طبيعياً في البول وفي الاحتفاظ بالكافئين والباراكزانتين والأنتي بيرين حسب ما أظهر التحليل لاحقاً ب HPLC. من أجل حساب المردود استخدم الأنتي بيرين كعياري داخلي لضبط جودة الطريقة، حيث أضيف بكمية معلومة إلى العينة وحسبت كمية الاسترداد. جاء استخدام الأنتي بيرين كعياري داخلي بناء على أبحاث سابقة (Alvi & Hammami, 2011)

هناك العديد من الطرق المنشورة التي استخدمت HPLC-UV/VIS في المقايسة (Stavricc & Klassen، Lajin 1983; Perera et al.,2010، et al. 2021; .،)، لكونه متوافر ورخيص الثمن مقارنة بالمتحريات الحديثة مثل مقياس الكتلة HPLC-MS. كان الطور المتحرك من نوع Isocratic mode ، حيث بقي مزيج الماء والميتانول ثابتاً طوال فترة التجربة. يفضل استخدام isocratic mode عندما يكون عمود الفصل الخاص ب HPLC من نوع Reversed phase، كما هو الحال في هذا البحث، حيث كان عمود الفصل من نوع C 18. طبق ذلك سابقاً للتحري عن الكافئين في المشروبات الحاوية عليه مع أنواع مختلفة من أعمدة الفصل من نوع Reversed phase (Notebook,2009) ولكن ليس على عينة البول.

بناء على ما أظهرته الأبحاث السابقة عن تراكيز الكافئين والباراكزانتين في البول بعد تناول مشروبات تحتوي على الكافئين (Furge & Fletke,2007) (Whalley et al., 2021)، حُدد المجال من 10 وحتى 160 مكغ/مل للكافئين ومن 10 حتى 80 مكغ/مل للباراكزانتين من أجل دراسة الخطية، حيث يتوقع أن تصل التراكيز في البول بعد تناول مشروبات حاوية على الكافئين

(Aguilar-Navarro et al.، 2019). كانت حساسية الطريقة التي تم تطويرها في هذا البحث عالية بحد كشف 0.25مكغ/مل للكافئين و0.27 مكغ/مل للباراكزانتين.

الخلاصة :

تستخدم عينة البول للتحري الروتيني عن الكافئين والباراكزانتين. في هذا البحث اختبرنا طريقة استخلاص وتحليل الكافئين والباراكزانتين في البول بواسطة جهاز HPLC-UV/VIS بوجود العياري الداخلي الأنتي بيرين. أظهرت النتائج فصل واضح للمادتين وخطية ممتازة بين التراكيز المختارة التي يتوقع تواجدها في عينة البول، كما كان مردود الاستخلاص للمادتين أعلى من 96%. أظهرت باقي المعايير التي تمت دراستها أن الطريقة نوعية وحساسة بتراكيز ضئيلة وبحد قياس كمي يعادل 0.77 مكغ/مل للكافئين وفوق 0.84 مكغ/مل للباراكزانتين.

للكشف الكيفي والكمي عن الكافئين ومستقلبه الباراكزانتين. يمكن تطبيق هذه الطريقة كونها رخيصة الثمن للتحري عن تراكيز الكافئين في البول، سواء في التحاليل الرياضية لمراقبة تناول الكافئين، أو من أجل التحري عن فعالية الأنزيم CYP1A2

Referencse:

1. Aguilar-Navarro، M.، Muñoz، G.، Salinero، J. J.، Muñoz-Guerra، J.، Fernández-álvarez، M.، Plata، M. D. M.، & Del Coso، J. (2019). Urine caffeine concentration in doping control samples from 2004 to 2015. *Nutrients*، *11*(2)، 1–11. https://doi.org/10.3390/nu11020286
2. Alvi ،S. N. ،& Hammami ،M. M. (2011). Validated HPLC method for determination of caffeine level in human plasma using synthetic plasma: Application to bioavailability studies. *Journal of Chromatographic Science* ،*49*(4) ،292–296. https://doi.org/10.1093/chrsci/49.4.292
3. Buszewski ،B. ،& Szultka ،M. (2012). Past ،Present ،and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* ،*42*(3) ،198–213.
4. Furge ،L. L. ،& Fletke ،K. J. (2007). HPLC determination of caffeine and paraxanthine in urine: An assay for cytochrome P450 1A2 activity. *Biochemistry and Molecular Biology Education*، *35*(2) ،138–144. https://doi.org/10.1002/bmb.28
5. Heckman ،M. A. ،Weil ،J. ،& de Mejia ،E. G. (2010). Caffeine (1 ،3 ،7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption ،functionality ،safety ،and regulatory matters. *Journal of Food Science* ،*75*(3) ،77–87. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x
6. Klassen ،R. ،& Stavricc ،B. (1983). HPLC separation of theophylline ،paraxanthine ، theobromine ،caffeine and other caffeine metabolites in biological fluids. *Journal of Liquid Chromatography* ،*6*(5) ،895–906. https://doi.org/10.1080/01483918308067011
7. Lajin ،B. ،Schweighofer ،N. ،Goessler ،W. ،& Obermayer-Pietsch ،B. (2021). The determination of the Paraxanthine/Caffeine ratio as a metabolic biomarker for CYP1A2 activity in various human matrices by UHPLC-ESIMS/MS. *Talanta* ،*234*(March) ،122658. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122658
8. Magkos ،F. ،& Kavouras ،S. A. (2005). Caffeine use in sports ،pharmacokinetics in man ،and cellular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* ،*45*(7–8) ،535–562. https://doi.org/10.1080/1040-830491379245
9. Mendes ،V. M. ،Coelho ،M. ،Tomé ،A. R. ،Cunha ،R. A. ،& Manadas ،B. (2019). Validation of an LC-MS/MS Method for the quantification of caffeine and theobromine using non-matched matrix calibration curve. *Molecules* ،*24*(16). https://doi.org/10.3390/molecules24162863
10. Myers JP ،Johnson DA ،M. DE. (1999). Caffeine and the modulation of brain function. In editor. Gupta BS ،editor; ،Gupta U (Ed.) ،*Caffeine and Behavior: Current Views and Research Trends* (pp. 17–30). CRC press.
11. Nawrot ،P. ،Jordan ،S. ،Eastwood ،J. ،Rotstein ،J. ،Hugenholtz ،A. ،& Feeley ،M. (2003).

Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants* ،*20*(1) ،1–30. https://doi.org/10.1080/02652030210000078 40

12. Nehlig ،A. (2018). Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological Reviews* ،*70*(2) ،384–411. https://doi.org/10.1124/pr.117.014407
13. Notebook ،T. A. (2009). *High Throughput Reversed Phase HPLC Analysis of Caffeine Using TSK-GEL ODS-140HTP and ODS-100V Columns*. https://www.chromatographyonline.com/view/high-throughput-reversed-phase-hplc-analysis-caffeine-using-tsk-gel-ods-140htp-and-ods-100v-column-1
14. Perera ،V. ،Gross ،A. S. ،& McLachlan ،A. J. (2010). Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomedical Chromatography* ، *24*(10) ،1136–1144. https://doi.org/10.1002/bmc.1419
15. Rodrigues ،C. I. ،Marta ،L. ،Maia ،R. ،Miranda ،M. ،Ribeirinho ،M. ،& Máguas ،C. (2007). Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* ،*20*(5) ،440–448. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.005
16. Salinas-Vargas ،M. E. ،& Cañizares-Macías ،M. P. (2014). On-line solid-phase extraction using a C18 minicolumn coupled to a flow injection system for determination of caffeine in green and roasted coffee beans. *Food Chemistry* ،*147* ،182–188. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.134
17. Whalley ،P. ،Paton ،C. ،& Dearing ،C. G. (2021). Caffeine metabolites are associated with different forms of caffeine supplementation and with perceived exertion during endurance exercise. *Biology of Sport* ،*38*(2) ،261–267. https://doi.org/10.5114/BIOLSPORT.2020.98455