

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí
HPLC/MS**

Bakalářská práce

Kateřina Tesařiková

Školitelka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2022

Tesaříková, K., Stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC/MS. [Determination of caffeine and its metabolites by HPLC/MS. Bc. Thesis, in Czech] – 46p , Fakulty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Caffeine is probably the most frequently ingested drug in the world. A lot of people consume caffeine every day in beverages like coffee, tea and soft drinks. In human body caffeine is enzymatically transformed to a lot of metabolites and the first metabolic reactions lead to theophylline, theobromine and 1,7-dimethylxanthine. Consequently, caffeine and its metabolites can be found in human urine or plasma.

This thesis deals with the development, optimization and validation of an analytical method for the determination of caffeine and its metabolites by HPLC/MS. The composition of the mobile phase and settings of mass spectrometry detector were optimized. These steps led to the separation of analytes and to the achievement of stable and intense signal of the detector. An appropriate concentration range for each analyte according to the FDA rules was found. The method was used for the quantification of urinary content of caffeine, and its three metabolites.

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

V Českých Budějovicích 12.4. 2022

Kateřina Tesaříková

Klíčová slova

Kofein, theobromin, theophylin, 1,7-dimethylxantin, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometr, optimalizace, validace

Key words

Caffeine, theobromin, theophylline, 1,7-dimethylxantine, liquid chromatography, mass spectrometry, optimization, validation

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté rady a zkušenosti. Obzvláště bych ocenila vstřícný přístup a ochotu. Dále bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu během dosavadního studia.

Obsah

1	Cíle práce	1
2	Teoretická část	2
2.1	Kofein a jeho metabolity	2
2.1.1	Metabolismus kofeinu v lidském organismu	2
2.1.2	Přehled stanovovaných látek a vnitřního standardu	5
2.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	6
2.2.1	Schéma kapalinového chromatografu	7
2.3	Hmotnostní spektrometrie	10
2.3.1	Schéma hmotnostního spektrometru	11
2.4	Stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC	13
3	Experimentální část	18
3.1	Použité chemikálie	18
3.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál	18
3.3	Příprava roztoků	19
3.3.1	Mobilní fáze	19
3.3.2	Zásobní roztoky standardů	20
3.3.3	Směsné roztoky standardů	21
3.3.4	Příprava kalibračních roztoků	21
3.4	Úprava reálných vzorků	22
4	Výsledky a diskuze	24
4.1	Přímá infuze jednotlivých stanovovaných látek	24
4.2	Infuze do proudu mobilní fáze	25
4.3	Optimalizace chromatografické separace	25
4.3.1	Optimalizace složení mobilní fáze	25
4.4	Optimalizace hmotnostní detekce	26
4.4.1	Optimalizace podmínek elektrospreje	26

4.4.2	Optimalizace parametrů iontové optiky	27
4.4.3	Optimalizace kolizní energie	28
4.5	Výsledná analytická metoda	29
4.6	Validace metody	30
4.6.1	Mez detekce a mez stanovitelnosti	31
4.6.2	Optimalizace koncentrace vnitřního standardu	32
4.6.3	Linearita a rozsah metody	32
4.6.4	Přesnost a správnost.....	34
5	Závěr	35
6	Citovaná literatura.....	37
7	Přílohy	40
7.1	Příloha A	40
7.2	Příloha B	41
7.3	Příloha C	42
7.4	Příloha D	43
7.5	Příloha E.....	44
7.6	Příloha F	45
7.7	Příloha G	46

Seznam 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
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-dimetylxantin
ETF	etofylin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
MS	hmotnostní detekce
NAT2	N-acetyltransferáza
SR	směsný roztok
S/N	poměr signálu a šumu
ST - A	pracovní roztok standardů A
ST - B	pracovní roztok standardů B
ST - C	pracovní roztok standardů C
THBM	theobromin
THEO	theophylin
VZ	vzorek

1 Cíle práce

- Rešerše možností kvantitativního stanovení kofeinu a jeho metabolitů v biologickém vzorku pomocí kapalinové chromatografie
- Vývoj a optimalizace metody stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

2 Teoretická část

2.1 Kofein a jeho metabolity

Kofein patří mezi alkaloidy stimulující centrální nervovou soustavu a srdeční činnost, konkrétně jde o purinový, methylovaný derivát xantinu. Jedná se o jeden z nejrozšířenějších stimulantů a může být označován za drogu. V čisté formě je kofein bílá krystalická látka s hořkou chutí (Barone & Roberts, 1996; Cappelletti et al., 2015; Nawrot et al., 2003; de Mejia & Ramirez-Mares, 2014).

V přírodě se kofein nachází v listech a plodech některých rostlin, kde slouží jako přirozený pesticid. Mezi tyto rostliny patří například Kávovník arabský, Kakaovník pravý, Čajovník čínský, Koka lesklá nebo Cesmína paraguayská (Barone & Roberts, 1996; Nehlig, 2018). U hmyzu, který požije část rostliny obsahující kofein, se dostaví paralýza celého těla a následně dochází ke smrti (Nathanson, 1984).

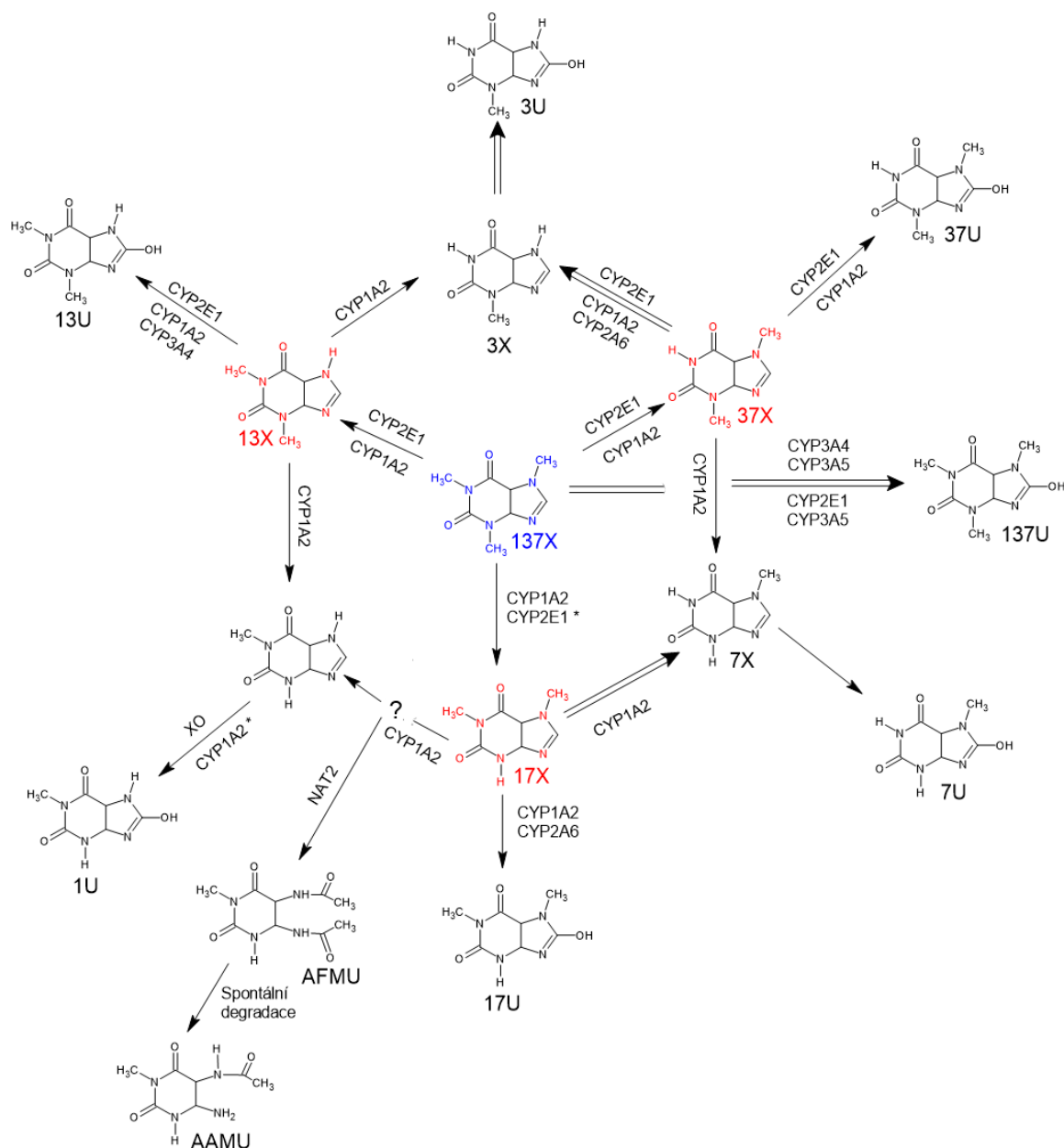
Kofein se vyskytuje se v řadě farmaceutických přípravků a léčiv díky svým účinkům na lidský organismus. Hlavní účinkem kofeinu na lidský organismus je stimulace centrálního nervového systému, což vede ke zmírnění únavy, zbystření myšlení a zlepšení koncentrace. Dále kofein indukuje sekreci žaludečních šťáv a zrychluje srdeční tep (McGachy, 2021; Nawrot et al., 2003).

2.1.1 Metabolismus kofeinu v lidském organismu

Kofein se v lidském organismu velmi rychle vstřebává skrz trávicí a vylučovací trakt, a to přibližně po 45 minutách od požití. Následná biotransformace kofeinu probíhá téměř úplně a k rozkladu dochází během 1,5 – 9,5 hodiny po požití. Lidé kofein nejčastěji přijímají v podobě kávy, čaje nebo sycených nápojů (Committee on Military Nutrition Research., 2001).

Metabolismus kofeinu v lidském organismu považujeme za komplexní proces, během kterého vzniká velké množství metabolitů. Biotransformace kofeinu začíná v játrech, kde je kofein primárně metabolizován na 1,7-dimethylxantin (17X) za katalýzy Cytochromu P450 1A2 (CYP1A2). Demethylace molekuly kofeinu probíhá také v polohách 1- což vede ke vzniku 3,7-dimethylxantinu (37X), jinak známého jako theobromin. V poloze 7- vzniká 1,3-dimethylxantin (13X), který se nazývá theophylin. Každý ze vzniklých xantinů může nadále reagovat demethylační reakcí na monomethylxaniny za katalýzy

CYP1A2. Touto reakcí vznikají 1-methylxantin (1X), 3-methylxantin (3X) a 7- methylxantin (7X). Následně dochází k hydroxylaci kofeinu a xantinů za vzniku příslušných močových kyselin, konkrétně se jedná o 1,3,7-trimethylmočovou kyselinu (137U), 1,3-dimethylmočovou kyselinu (13U), 1,7-dimethylmočvou kyselinu (17U), 3,7- dimethylmočonou kyselinu (37U), 1- methylmočonou kyselinu (1U), 3- methylmočovou kyselinu (3U) a 7- methylmočovou kyselinu (7U). Vznikající močové kyseliny jsou z organismu odváděny močí. *N*-acetyltransferáza (NAT2) katalyzuje acetylaci 1,7-dimethylxantinu za vzniku 5- acetylamino-6-formylamino-3-methyluracilu (AFMU), který se následně samovolně mění na 5- acetylamino-6-lamino-3-methyluracil (AAMU). Xantinoxidáza (XO) zodpovídá za přeměnu 1-methyxantinu (1X) na 1- methylmočovou kyselinu (1U) (Caubet et al., 2002). Celý proces biotransformace kofeinu v lidském organismu je zobrazen na Obr.1.



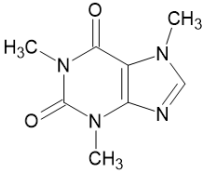
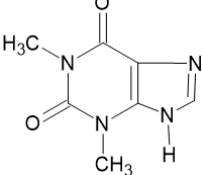
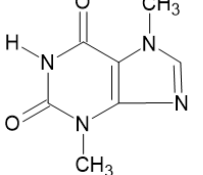
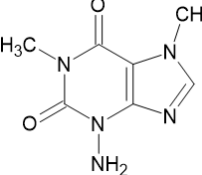
Obr. 1 Schéma biotransformace kofeinu

137X = 1,3,7-trimethylxantin (kofein), 13X = 1,3- dimethylxantin (theophylin), 17X = 1,7-dimethylxantin, 37X = 3,7-dimethylxantin (theobromin), 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, CYP1A2 = člen nadrodiny enzymů cytochrom P450, CYP2A6 = člen nadrodiny enzymů cytochrom P45, CYP2E1 = člen nadrodiny enzymů cytochrom P452, CYP3A4 = člen nadrodiny enzymů cytochrom P453, CYP3A5 = člen nadrodiny enzymů cytochrom P450, NAT2 = N-acetyltransferáza; XO = xantinoxidáza. Převzato a upraveno z (Caubet et al., 2002).

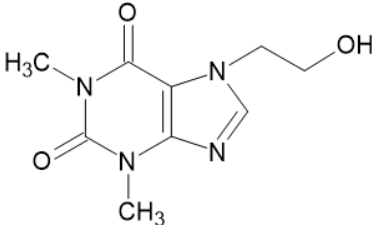
2.1.2 Přehled stanovovaných látek a vnitřního standardu

Souhrnný přehled stanovovaných látek včetně strukturních vzorců a chemických vlastností shrnuje Tab.1. Stanovovanými látkami jsou kofein, theophylin, theobromin a 1,7-dimethylxantin. Jako vnitřní standard byl dle publikací (Caubet et al., 2002) zvolen etofylin, jehož vzorec a chemické vlastnosti jsou uvedeny v Tab.2. Strukturní vzorce v Tab. 1 a Tab. 2 byly převzaty a upraveny z (PubChem, 2022).

Tab.1: Přehled chemických vlastností stanovovaných látek

Analyt	Kofein	Theophylin	Theobromin	1,7-dimethylxantin
Sumární vzorec	$C_8H_{10}N_4O_2$	$C_7H_8N_4O_2$	$C_7H_8N_4O_2$	$C_7H_8N_4O_2$
Zkratka	CAFF	THEO	THBM	DMX
Systematický název	1,3,7-trimethylxantin	1,3-dimethylxantin	3,7-dimethylxantin	1,7-dimethylxantin
M [g/mol]	194,19	180,16	180,16	180,16
Strukturní vzorec				

Tab.2: Chemické vlastnosti vnitřního standardu

Vnitřní standard	Etfylin
Sumární vzorec	$C_9H_{12}N_4O_3$
Zkratka	ETF
Systematický název	1,3 -dimethyl-7-(2-hydroxyethyl)xantin
M [g/mol]	224,22
Strukturní vzorec	

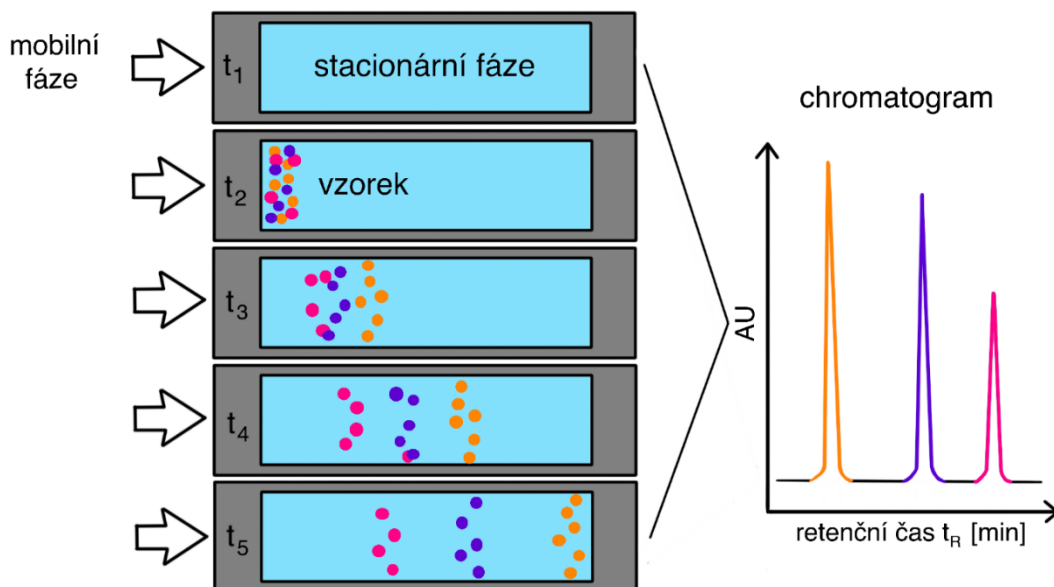
2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, ve které je mobilní fáze v kapalném skupenství a stacionární fáze může být pevná látka nebo případně kapalina ukotvená na pevném nosiči. Vysokoučinnou kapalinovou chromatografií můžeme zařadit mezi nejčastější uspořádání kapalinové chromatografie (Nováková & Douša, 2021a; Záruba, 2016)

Mobilní fáze je tvořena čistým rozpouštědlem nebo směsí mísitelných rozpouštědel. K separaci se využívá směs polárnějšího a méně polárního rozpouštědla (např. metanol a voda). Rovnováha mezi analytem a stacionární fází a také retenční vlastnosti analytu jsou ovlivněny polaritou mobilní fáze (Záruba, 2016).

Kapalná mobilní fáze je přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Separace probíhá na chromatografické koloně, která obsahuje sférické částice o malé velikosti. Separaci i eluci jednotlivých složek ovlivňuje povaha stacionární i mobilní fáze. Eluce je prováděna dvěma způsoby, buď mobilní fází s konstantní eluční silou nebo mobilní fází se zvyšující se eluční silou. V prvním případě dochází k isokratické eluci, která je vhodná, pokud mají stanovované látky podobné fyzikální a chemické vlastnosti. V druhém případě se jedná o eluci gradientovou. Během gradientové eluce se zvyšuje eluční síla. Tento druh eluce se uplatňuje, pokud mají složky ve směsi různé fyzikální a chemické vlastnosti. Dále se používá při analýze složitých směsí, které obsahují velké množství komponentů (Nováková & Douša, 2021a).

Z kolony vycházejí separované zóny analytů, které jsou zaznamenány detektorem a signál je převeden na chromatogram. Jde o časovou závislost intenzity veličiny, kterou sleduje detektor (např. intenzita absorbance, intenzita fluorescence nebo intenzita iontů). Pro chromatogram jsou typické křivky ve tvaru Gaussovy křivky, které se nazývají píky nebo eluční zóny (Nováková & Douša, 2021a).

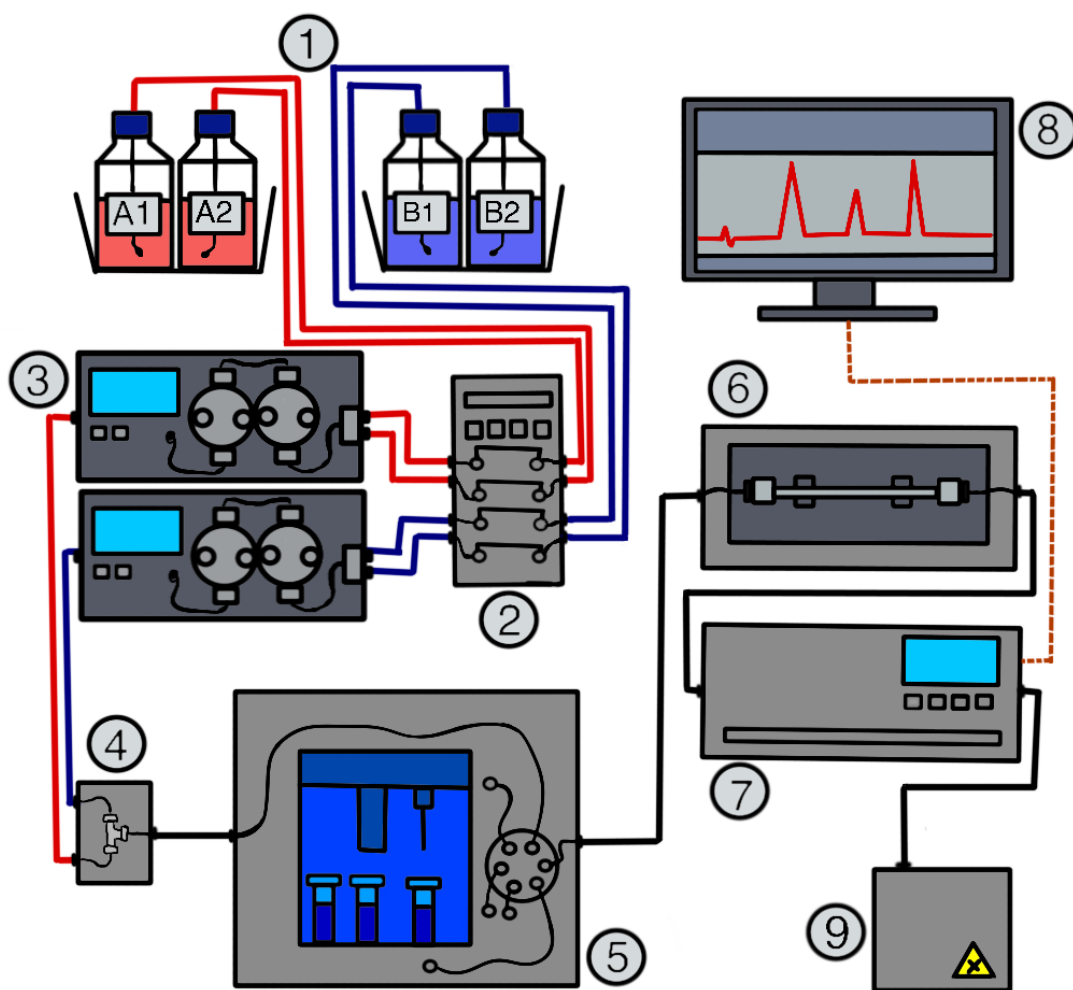


Obr. 2: Schéma separace směsi tří látek v chromatografickém systému se znázorněním průběhu separačního děje. Převzato a upraveno z (Nováková & Douša, 2021a).

2.2.1 Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z pěti základních celků, z nichž každý má svou specifickou funkci:

- Zásobníky mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo – uchovávání a transport mobilní fáze
- Automatický dávkovač / manuální dávkovací ventil – dávkování vzorku
- Chromatografická kolona a termostat kolony – separace látek
- Detektor
- Počítač a software – záznam dat pro následné vyhodnocení



Obr. 3: Schéma HPLC

(1) zásobníky mobilních fází, (2) degaser, (3) vysokotlaké čerpadlo, (4) směšovač, (5) automatický dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona v termostatu, (7) detektor, (8) datová stanice, (9) nádoba na sběr odpadu. Převzato a upraveno z (Nováková & Douša, 2021a)

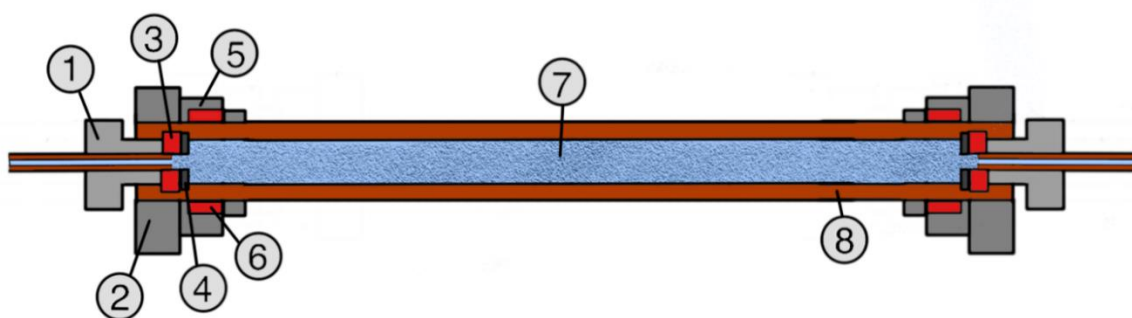
Jako zásobníky mobilní fáze slouží skleněné lahve, které je nutné udržovat v čistotě režimu pro HPLC. Díky tomu se zamezí kontaminaci zásobních lahví a tím pádem také kontaminaci celého systému. Na začátku každé fluidické cesty je umístěna speciální fritra s porozitou 10–20 μm (Nováková & Douša, 2021a).

Odplynovač mobilní fáze slouží k odstranění plynů z mobilní fáze, čímž se předchází zavzdušnění čerpadla. K odplynění mobilní fáze se používá prakticky výhradně vakuový degaser (Nováková & Douša, 2021a).

Vysokotlaké čerpadlo zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze v chromatografickém systému. Rozlišujeme dva typy čerpadel, čerpadla pracující při konstantním tlaku a pracující při konstantním objemovém průtoku. Pro HPLC se využívají čerpadla s konstantním objemovým průtokem. Mobilní fáze je vytlačována pístem nebo membránou. (Nováková & Douša, 2021a; Záruba, 2016).

Hlavním úkolem dávkovače vzorku je vpravení malého množství kapalného vzorku z prostoru s atmosférickým tlakem do prostoru s vysokým tlakem (Nováková & Douša, 2021a). Vzorek musí být rozpustný v mobilní fázi a nesmí se nevratně vázat na fázi stacionární (Záruba, 2016). Vzorky je možné dávkovat dvěma způsoby, pomocí vícecestného přepínacího ventilu nebo pomocí automatického dávkovače (Nováková & Douša, 2021a).

Chromatografická kolona je složena ze dvou částí, z těla kolony a koncovky kolony. Tělo kolony je rovná trubice s hladkým vnitřním povrchem naplněná stacionární fází. Koncovka kolony zajišťuje těsnost systému, distribuuje mobilní fázi a analyt rovnoměrně celým průřezem kolony a zadržuje náplň kolony uvnitř (Záruba, 2016). Kolony se liší druhem sorbentu, velikostí částic a délkou a průměrem kolony. Plášť kolony je nejčastěji vytvořen z nerezové oceli, méně často ze skla. (Nováková & Douša, 2021a; Záruba, 2016).



Obr. 4: Konstrukce chromatografické kolony

(1) vstup pro kapiláru se šroubem, (2) kovová hlavice, (3) těsnění vstupního šroubu, (4) frit, (5) ochranný kroužek, (6) těsnění koncové hlavice, (7) náplň kolony = stacionární fáze, (8) plášť kolony. Převzato a upraveno z (Nováková & Douša, 2021a)

V systému HPLC je detektor umístěn za chromatografickou kolonou a zaznamenává rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analytem. Mezi nejčastěji používané způsoby detekce patří UV detekce, fluorimetrická detekce a hmotnostní detekce (Nováková & Douša, 2021a).

Spojení HPLC a hmotnostním spektrometrem (LC-MS)

Tento systém se využívá pro analýzu složitějších vzorků jako například stanovení látek z biologické tkáně a tekutiny nebo environmentální matrice. Využití LC-MS je výhodné využít k analýze komplexních vzorků a vzorků, které jsou tvořeny velkým množstvím komponentů. Hmotnostní spektrometr jako jediný umožňuje identifikaci analytu na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů (Nováková & Douša, 2021a).

Mobilní fáze se přímo účastní ionizačního procesu, proto je vhodné použít těkavá rozpouštědla (např. metanol a acetonitril) nebo je možné použít přídavek těkavého aditiva (např. kys. mravenčí, kys. octová a pufr octanu a mravenčanu amonného). Koncentrace aditiva musí být velmi nízká ($< 1\%$ nebo $< 10\text{ mmol/l}$) (Nováková & Douša, 2021a).

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Principem hmotnostní spektrometrie je rozdělení iontů v plynné fázi podle poměru m/z (poměr hmotnosti a náboje) a rovněž je analyzována četnost iontů. Tento druh detekce poskytuje informace o analytu pro kvantitativní i kvalitativní analýzu, a to i pro analyty, které jsou zastoupeny ve stopovém a ultrastopovém množství (Záruba, 2016). V prvním kroku jsou molekuly analytů dodáním energie převedeny na ionty. Následně se ionty rozdělí podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Dalším krokem je detekce iontů a zesílení signálu v detektoru (Záruba, 2016).

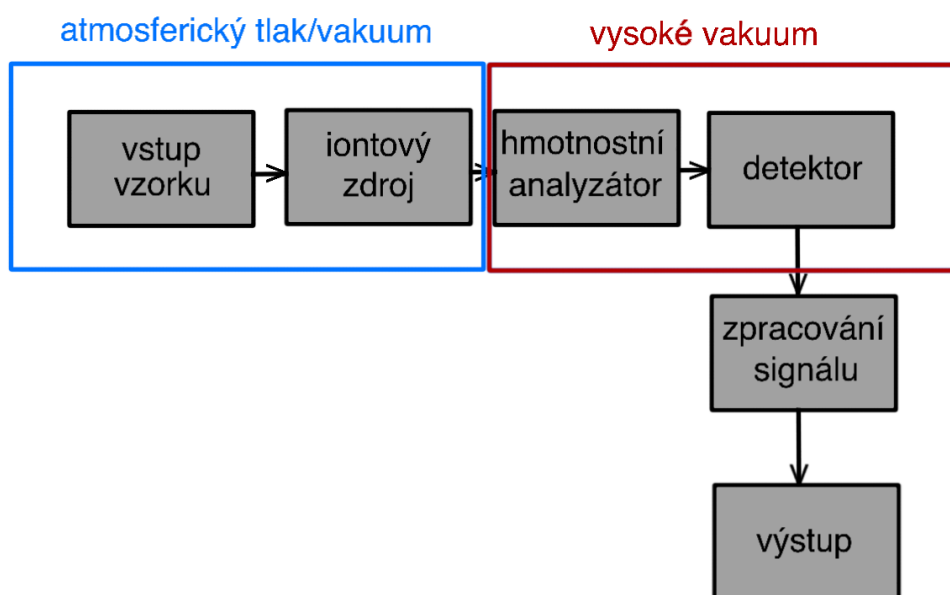
Iont prekurzoru je iont, který umožňuje vznik konkrétních produktových iontů. Produktový iont vzniká při reakci jednotlivých iontů prekurzoru. Disociací prekurzorového iontu vzniká ion fragmentový. V tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS) je vybraný iont podroben excitaci a následně je měřeno hmotnostní spektrum fragmentových iontů (Holčapek, 2022).

2.3.1 Schéma hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr je zařízení, které měří m/z hodnoty a zaznamenává jejich intenzitu. Skládá ze tří základních částí:

- Iontový zdroj
- Hmotnostní analyzátor
- Detektor

Vzorky jsou vpravovány do hmotnostního spektrometru pomocí dávkovacího systému, dávkovány mohou být pevné, kapalné nebo plynné látky. Dávkovací systém dopraví malé množství vzorku do iontového zdroje. V této fázi je vzorek ionizován a převeden do plynného stavu. Poté jsou ionty urychleny a vedeny do hmotnostního analyzátoru, kde jsou rozděleny podle m/z . Spektrometr je ovládán počítačem, který shromažďuje data a následně je vyhodnocuje (Záruba, 2016).



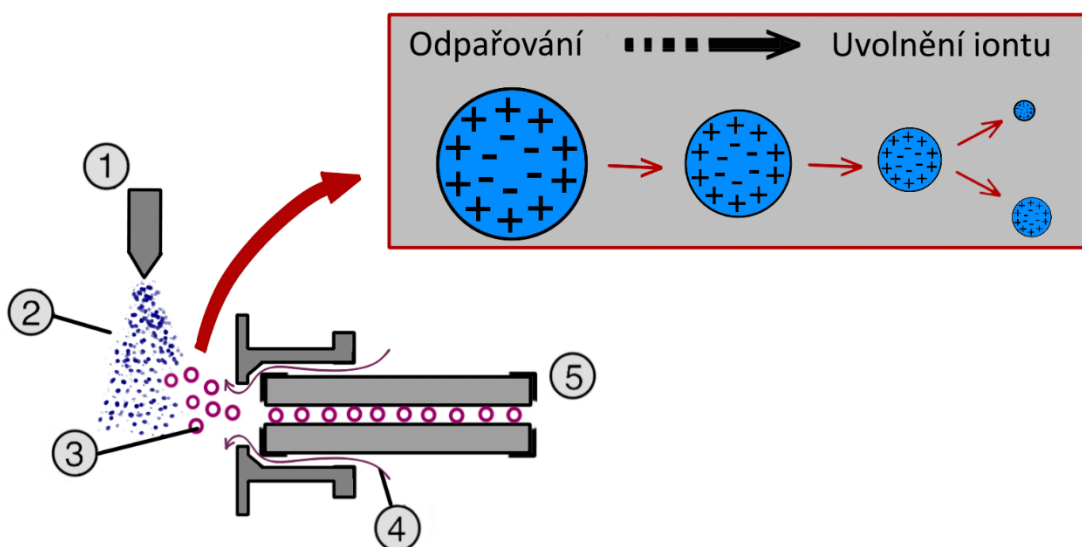
Obr. 5: Schéma hmotnostního spektrometru. Převzato a upraveno z (Holčapek, 2022)

2.3.1.1 Iontový zdroj

Pomocí iontového zdroje dochází k převedení neutrálních molekul analytu na ionty. K ionizaci může docházet za sníženého nebo atmosférického tlaku. Při spojení se systémem HPLC se nejčastěji využívá ionizace elektrosprejem (Holčapek, 2022).

Ionizace elektrosprejem se uplatňuje při analýze středně polárních až iontových látek. Vznikají vícenásobně nabitě ionty, čehož se využívá při ionizaci biomakromolekul a při

proteomické analýze. Analyt je v proudu mobilní fáze přiváděn kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Na výstupu z kapiláry vznikají za pomoci zmlžujícího plynu kapičky, které nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Postupně dochází k odpařování rozpouštědla (mobilní fáze) a tím se zvyšuje hustota povrchového náboje. Tento proces probíhá až do dosažení kritické hodnoty, kdy dojde k rozpadu na menší nabité kapičky. Celý proces se opakuje, dokud nedojde k uvolnění iontů (Holčapek, 2022).



Obr. 6: Průběh ionizace elektrosprejem

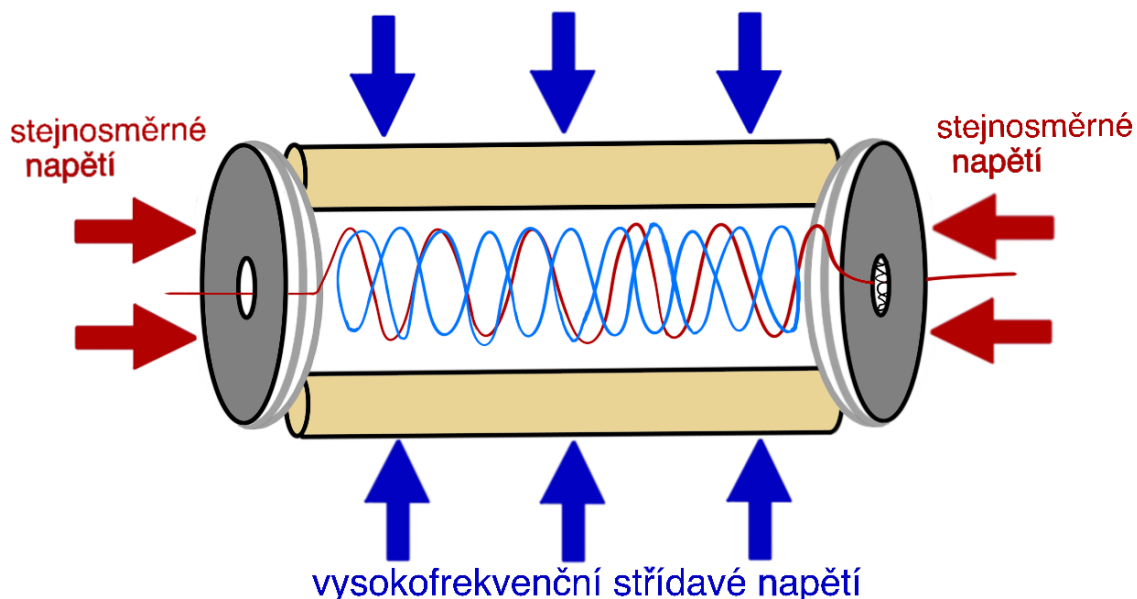
(1) zmlžující plyn, (2) aerosol, (3) ionty, (4) sušící plyn, (5) kapilára. Převzato a upraveno z (Holčapek, 2022)

2.3.1.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů v plynné fázi ve vakuu podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Ideálně by měl rozlišit malé rozdíly v hmotnosti iontů a současně by měl propouštět velké množství těchto iontů, aby byl na detektoru vyvolán dostatečně velký měřitelný signál. Analyzátor je umístěn mezi iontovým zdrojem a detektorem. Analyzátoři rozdělujeme podle způsobu dělení iontů na skenující, průletový a iontovou past (Holčapek, 2022).

Lineární iontová past je analyzátor podobný kvadrupólovému analyzátoru. Liší se tím, že na koncích iontové pasti jsou umístěny elektrody. Na tyto elektrody je vložen potenciál, který umožňuje uchování iontů. Pro lineární iontovou past je typická vysoká kapacita, díky které je analyzátor méně náchylný ke vzniku prostorového náboje a má vyšší dynamický

rozsah. Mezi další výhody lineární iontové pasti patří vyšší účinnost plnění a detekce iontů. Vypuzování iontů je možné v radiálním i axiálním směru (Holčapek, 2022).



Obr. 7: Schéma lineární iontové pasti. Převzato a upraveno z (Holčapek, 2022)

2.3.1.3 Detektor iontů

V detektoru iontů dochází k přeměně energie iontů na elektrický signál, který je digitalizován a poté zpracováván počítačem. Nejčastěji se používá elektronový násobič, Faradayův detektor nebo scintilační detektor.

Elektronový násobič se skládá ze série elektrod, mezi elektrodami postupně narůstá elektrostatický potenciál. Po dopadu iontu na první elektrodu dojde k emisi elektronu, počet elektronů odpovídá energii dopadajících iontů. Elektrony jsou poté urychleny elektrostatickým polem a dopadají na druhou elektrodu a dochází ke vzniku dalších elektronů. Tento jev vede ke vzniku dostatečně velkého množství elektronů a je možné měřit elektrický proud (Záruba, 2016).

2.4 Stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC

Před vlastním vývojem metody byla provedena literární rešerše metod stanovení kofeinu a jeho metabolitů v biologických vzorcích se zaměřením na kapalinovou chromatografii. Pozornost byla směřována zejména na základní parametry chromatografické separace, způsob přípravy roztoků standardů a úpravy reálného vzorku, na parametry detekce a na dosažené výsledky, které zahrnují linearitu, mez detekce a mez stanovitelnosti.

Pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů je využívána kapalinová chromatografie s UV detekcí nebo s MS detekcí. Jednotlivé metody se liší použitou stacionární a mobilní fází, druhem eluce, koncentračním rozsahem a mezi detekce a stanovitelnosti. Pro větší přehlednost jsou tyto parametry shrnuty v Tab. 3, konkrétně se jedná o typ chromatografické kolony, složení mobilní fáze A a B, druh eluce, typ detekce a koncentrační rozsah.

V citovaných publikacích jsou nejčastěji analyzovány vzorky moči a v některých případech také krevní plasmy. Většina publikací se zabývá detekcí až čtrnácti kofeinových metabolitů (Bendriss et al., 2000; Caubet et al., 2002; Kim et al., 2019; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003; Weimann et al., 2005), v dalších publikacích je stanovován kofein a jeho tři významné metabolity (theophylin, theobromin a 1,7- dimethylxantin) (Chen et al., 2017; Lopez-Sanchez et al., 2018) a v některých případech jde pouze o stanovení kofeinu samotného nebo v kombinaci s theobrominem (Abu-Qare & Abou-Donia, 2001). Nejčastěji byla použita stacionární fáze typu C₁₈ (Abu-Qare & Abou-Donia, 2001; Bendriss et al., 2000; Caubet et al., 2002; Chen et al., 2017; Kim et al., 2019; Lopez-Sanchez et al., 2018; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003), mimo to byl také použit typ C₃₀ (Weimann et al., 2005). Teplota v kolonovém prostoru se pohybovala v rozmezí 23 – 60 °C.

Jako polární mobilní fáze (MFA) byla použita voda okyselená kyselinou octovou nebo mravenčí (Abu-Qare & Abou-Donia, 2001; M. S. Caubet et al., 2002; Chen et al., 2017; Kim et al., 2019; Weimann et al., 2005), jednotlivé mobilní fáze se lišily množstvím přidané kyseliny. Některé publikace uvádějí jako mobilní fázi A vodný roztok s metanolem okyselený kyselinou mravenčí nebo octovou (Bendriss et al., 2000; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003). Nejčastěji zvolenou mobilní fází B byl acetonitril (Abu-Qare & Abou-Donia, 2001; Caubet et al., 2002; Lopez-Sanchez et al., 2018; Weimann et al., 2005) nebo acetonitril s přídavkem kyseliny octové (Kim et al., 2019), v některých publikacích byl zvolen metanol s přídavkem kyseliny mravenčí nebo octové (Bendriss et al., 2000; Chen et al., 2017; Rybak et al., 2014), popřípadě byl zvolen pouze metanol (Schneider et al., 2003). Byl sledován vliv obsahu kyseliny v mobilní fázi na intenzitu signálu (Chen et al., 2017). Ve většině publikací byla použita gradientová eluce (Abu-Qare & Abou-Donia, 2001; Caubet et al., 2002; Chen et al., 2017; Kim et al., 2019; Lopez-Sanchez et al., 2018; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003; Weimann et al., 2005). Pouze v jedné publikaci byla využita eluce izokratická (Bendriss et al., 2000).

Ke stanovení kofeinu a jeho metabolitů bylo využito hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem (Chen et al., 2017; Kim et al., 2019; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003; Weimann et al., 2005). Druhým způsobem detekce bylo použití UV detektoru v rozmezí vlnových délek 270 – 385 nm (Bendriss et al., 2000; Caubet et al., 2002; Lopez-Sanchez et al., 2018).

Při použití UV detekce kofeinu a jeho metabolitů byl koncentrační rozsah publikovaných metod desetiny až desítky mg/l. Použití hmotnostní detekce s trojitým kvadrupólem umožňuje dosažení výrazně nižší meze stanovitelnosti, až o dva řády. Hmotnostní detekce umožňuje širší rozsah metod až přes čtyři řády (Chen et al., 2017; Rybak et al., 2014; Weimann et al., 2005).

Tab.3: Přehled podmínek analýzy z publikací I. část

Kolona	MFA (pH MF)	MFB	Eluce, % MFB	Typ detekce	Koncentrační rozsah [mg/l]	Citace
Kinetex C18 (100 mm x 3 mm; 2,6 µm)	0,1% kyselina octová ve vodě	0,1% kyselina octová v acetonitrilu	gradientová, 15%-90%	MS (trojitý kvadrupól)	0,01 – 0,17	(Kim et al., 2019)
Zorbax C18 (2,1 × 100 mm; 3,5 µm)	10 mM fosfátový pufr (6,8)	acetonitril	gradientová, 3% - 8%	UV (272 – 385 nm)	0,1 - 40	(Lopez-Sanchez et al., 2018)
Waters Symmetry C18 (75 mm × 4,6 mm; 3,5 µm)	25 mM roztok kyseliny mravenčí ve vodě	25 mM roztok kyseliny mravenčí v metanolu	gradientová, 5% - 40%	MS (trojitý kvadrupól)	0,004 – 3,0	(Chen et al., 2017)
Synergi Fusion-RP C18 (100 × 3,0-mm; 2,5 µm)	0,05% kyselina mravenčí v 5% metanolu	0,05% kyselina mravenčí v 90% metanolu	gradientová, 0% - 60%	MS (trojitý kvadrupól)	CAFF 0,002 – 10 THEO 0,002 – 3,6 THBM 0,002 – 45 DMX 0,002 – 36	(Rybak et al., 2014)
Ultrasphere ODS (250 x 34,6 mm; 5 µm)	0,05% kyselina mravenčí a 1,5% 2- propanol v 3% metanolu	metanol	gradientová, 47% - 90%	MS (trojitý kvadrupól)	0,02 - 0,45	(Schneider et al., 2003)
Eclipse XDB-C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm)	0,1% kyselina octová a 0,25% tetrahydrofuran ve vodě (3,3)	acetonitril	gradientová, 3,5 % - 12%	UV (270 – 290 nm)	1,0 – 40	(Caubet et al., 2002)

Tab.3: Přehled podmínek analýzy z publikací II. část

Kolona	MFA (pH MF)	MFB	Eluce, % MFB	Typ detekce	Koncentrační rozsah [mg/l]	Citace
Supelco C18 (2 cm × 4,0 mm; 5 μm)	voda (3)	acetonitril		UV	0, 1 - 1,0	(Abu-Qare & Abou-Donia, 2001)
Rexchrom S5-100-ODS (25 cm x 34,6 mm; 5 μm)	0,05% kyselina octová v methanolu v poměru 92,5:7,5	0,05% kyselina octová v methanolu v poměru 60:40	izokratická	UV (280 nm)	0,5 - 17,5	(Bendriss et al., 2000)
YMC-Pack C30 (50 x 2,1 mm; 3 μm)	0,5% kyselina octová	acetonitril	gradientová, 1,5% - 100%	MS (trojitý kvadrupól)	0,001 - 9,7	(Weimann et al., 2005)

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

V průběhu experimentální části byly použity následující základní látky, modifikátory MF a rozpouštědla

- Standard: Kofein – čistota ~ 100 % (Sigma Aldrich)
- Standard: Theophylin – čistota pro HPLC ~ 100 % (Sigma Aldrich)
- Standard: Theobromin – čistota pro HPLC ~ 99 % (Sigma Aldrich)
- Standard: 1,7-dimethylxantin – čistota pro HPLC ~ 98 % (Sigma Aldrich)
- Standard: Etofylin – čistota ~ 100 % (European Pharmacopoeia Reference Standard)
- Kyselina mravenčí – 100 % (Fisher chemical)
- Kyselina octová – 100 % (Sigma Aldrich)
- Metanol pro LC-MS (J.T. Baker)
- Deionizovaná voda generovaná přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo Scientific)

3.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

V této kapitole je shrnuto veškeré instrumentální vybavení a spotřební materiál použitý v průběhu experimentální části a vyhodnocování dat.

- Kapalinový chromatograf Thermo UltiMate 3000 s UV detektorem DAD-3000RS
- Hmotnostní detektor Velos Pro (ionizace vyhřívaným elektrosprejem, lineární iontová past)
- Chromatografická kolona: KinetexEvo C₁₈ (150 x 3,0 mm, 5 µm) (Phenomenex)
- Výrobek deionizované vody: Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo Scientific)
- Analytické váhy: MS105DU (Meter Toledo™)
- Automatická pipeta: Eppendorf Research Plus o objemu 10 – 100, 100 – 1000 µl, 1 – 10 ml (Eppendorf®)
- Odměrné sklo: třída přesnosti A (FisherBrand)
- Laboratorní sklo
- Skleněná dávkovací stříkačka: o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µl (Hamilton)

- Spotřební materiál: krimpovací vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem s pryžovým septem, plastové špičky, centrifugační zkumavky
- Krimpovací kleště
- Ovládací software a zpracování výsledků: Thermo Scientific Xcalibur, LTQTune, Microsoft Excel 365

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Mobilní fáze

V průběhu experimentální části bylo použito celkem pět různých mobilních fází lišících se použitou organickou kyselinou a její koncentrací. MFA byla vodná fáze s kyselinou octovou či mravenčí, MFB čistý metanol nebo metanol s kyselinou mravenčí. Volba sloužení mobilní fáze vycházela z literární rešerše.

Mobilní fáze 1

MFA₁ byla připravena odpipetováním 1000 μ l 100 % kyseliny octové pomocí automatické pipety do 100ml odměrné baňky, která byla částečně naplněna deionizovanou vodou. V dalším kroku byl objem doplněn po rysku. MFB₁ tvořil 100 % metanol.

Mobilní fáze 2

MFA₂ byla připravena odpipetováním 100 μ l 100 % kyseliny mravenčí pomocí automatické pipety do 100ml odměrné baňky, která byla částečně naplněna deionizovanou vodou. Poté byl objem odměrné baňky doplněn po rysku. MFB₂ tvořil 100 % metanol.

Mobilní fáze 3

MFA₃ byla připravena odpipetováním 200 μ l 100 % kyseliny mravenčí pomocí automatické pipety do 100ml odměrné baňky, která byla částečně naplněna deionizovanou vodou. Poté byl objem odměrné baňky doplněn po rysku. MFB₃ tvořil 100 % metanol.

Mobilní fáze 4

MFA₄ byla připravena odpipetováním 500 μ l 100 % kyseliny octové pomocí automatické pipety do 100ml odměrné baňky, která byla částečně naplněna deionizovanou vodou. Poté byl objem odměrné baňky doplněn po rysku. MFB₄ tvořil 100 % metanol.

Mobilní fáze 5

MFA₅ byla připravena odpipetováním 100 µl 100 % kyseliny mravenčí pomocí automatické pipety do 100ml odměrné baňky, která byla částečně naplněna deionizovanou vodou. Poté byl objem odměrné baňky doplněn po rysku. MFB₅ byla připravena odpipetováním 100 µl 100 % kyseliny mravenčí pomocí automatické pipety do 100ml odměrné baňky, která byla částečně naplněna 100 % methanolem. V následujícím kroku byla odměrná baňka doplněna metanolem po rysku.

3.3.2 Zásobní roztoky standardů

Zásobní roztok kofeinu (CAFF) byl připraven přesným navážením asi 8 mg, navážka byla následně kvantitativně převedena do 5ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. *Zásobní roztok theophylinu (THEO)* byl připraven přesným navážením asi 5 mg, navážka byla následně kvantitativně převedena do 5ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. *Zásobní roztok thebrominu (THBM)* byl připraven přesným navážením asi 3 mg, navážka byla následně kvantitativně převedena do 10ml odměrné baňky, automatickou pipetou bylo přidáno 100 µl amoniaku a baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. *Zásobní roztok 1,7- dimethylxantinu (DMX)* byl připraven přesným navážením asi 5 mg, navážka byla následně kvantitativně převedena do 5ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. *Zásobní roztok vnitřního standardu etofylinu (ETF)* byl připraven přesným navážením asi 2,5 mg, navážka byla následně kvantitativně převedena do 5ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Všechny připravené roztoky standardů byly rozpipetovány do vialek, zakrimpovány hliníkovým víčkem s pryžovým septem a umístěny do hlubokomrazícího boxu s teplotou – 85 °C. Ze zásobních roztoků standardů byly ředěním připraveny individuální roztoky standardů o koncentraci 100 mg/l pro přímou infuzi do detektoru a infuzi do proudu mobilní fáze. Přípravu standardů shrnuje Tab. 4.

Tab.4: Příprava roztoků standardů

Analyt	M [g/mol]	Čistota [%]	m [mg]	V [ml]	Rozpouštědlo	c [mg/l]
CAFF	194,19	100	7,69	5	H ₂ O	1538
THEO	180,16	100	5,39	5	H ₂ O	1078
THBM	180,16	99	3,08	10	H ₂ O + NH ₃	308
DMX	180,16	98	5,71	5	H ₂ O	1142
ETF	224,22	100	2,42	5	H ₂ O	484

3.3.3 Směsné roztoky standardů

Pro kalibraci bylo třeba připravit směsné pracovní roztoky standardů. Nejprve byl vytvořen směsný pracovní roztok standardů A (ST – A, $c = 20 \text{ mg/l}$) a z něho byl následně připraven směsný pracovní roztok standardů B (ST – B, $c = 2 \text{ mg/l}$) a z tohoto roztoku byl vytvořen směsný pracovní roztok standardů C (ST – C, $c = 0,05 \text{ mg/l}$). Směsný pracovní roztok standardů A byl připraven odpipetováním vypočteného objemu roztoků jednotlivých standardů do 25ml odměrné baňky dle Tab.5 a poté byla odměrná baňka doplněna po rysku deionizovanou vodou. ST – B, který byl následně použit pro přípravu vlastních kalibračních roztoků, byl vytvořen odpipetováním 1 ml roztoku ST – A do 10ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku deionizovanou vodou. ST – C, který byl použit při hledání meze detekce, byl vytvořen odpipetováním 0,125 ml roztoku ST – B do 5ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku deionizovanou vodou.

Tab.5: Příprava směsného pracovního roztoku standardů A ($c = 20 \text{ mg/l}$)

Analyt	c [mg/l]	V [ml]
CAFF	1538	0,3251
THEO	5016	0,0997
THBM	619,74	0,8068
DMX	1003,5	0,4983

3.3.4 Příprava kalibračních roztoků

Pro kalibraci bylo připraveno dvanáct kalibračních úrovní ve třech na sobě nezávislých opakováních. Kalibrační roztoky byly připravovány ve vialkách z čirého skla v objemu 1 ml. Pro přípravu kalibračních roztoků byl připraven pracovní roztok vnitřního standardu o koncentraci 1 mg/l ze zásobního roztoku vnitřního standardu ($c = 484 \text{ mg/l}$). Podle kalibračního stupně byl do vialky napipetován příslušný objem deionizované vody (V_{H_2O}) pomocí automatické pipety. Poté byl skleněnou stříkačkou Hamilton přidán směsný pracovní roztok standardů (ST- B). Posledním krokem bylo přidání pracovního roztoku vnitřního standardu ($c = 1 \text{ mg/l}$) (V_{VS}) pomocí skleněné stříkačky Hamilton. Vialky byly zakrimpovány hliníkovými víčky s pryžovým septem a následně byl roztok dobře promíchán. Přípravu kalibračních roztoků shrnuje Tab.6.

Tab.6: Příprava kalibračních roztoků

Koncentrační roztok	V _{ST-C} [μl]	V _{vs} [μl]	V _{vody} [μl]	c [mg/l]	Celkový objem [ml]
1	5	100	895	0,01	1000
2	7,5	100	893,5	0,015	
3	10	100	890	0,02	
4	25	100	875	0,05	
5	50	100	850	0,1	
6	100	100	800	0,2	
7	175	100	725	0,35	
8	250	100	650	0,5	
9	375	100	525	0,75	
10	500	100	400	1	
11	625	100	275	1,25	
12	750	100	150	1,5	

3.4 Úprava reálných vzorků

Vzorky moči byly odebírány vždy po 2 hodinách od vypití kávy. Vzorek byl uchovávan v lednici při 4 °C. Pomocí automatické pipety bylo odebráno 20 ml do odstředivacích zkumavek a vzorky byly odstředěny při 20 000 otáčkách/min po dobu 10 minut. Reálné vzorky odebrané po 2 hodinách byly ředěny 10x a 100x. Méně ředěný vzorek byl připraven odpipetováním 1 ml supernatantu pomocí automatické pipety do 10ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku deionizovanou vodou a důkladně promíchána. Druhý ředěný vzorek byl připraven odpipetováním 1 ml 10x ředěného vzorku pomocí automatické pipety do 10ml odměrné baňky, která byla poté doplněna po rysku deionizovanou vodou a důkladně promíchána. Z výsledků analýzy byla určena koncentrace jednotlivých analytů ve spikovacím roztoku (Tab.7). Spikovací roztok slouží k obohacení reálného vzorku o přesně známé množství stanovovaných látek a k následnému výpočtu výtěžnosti analytické metody. Spikovací roztok byl připraven dále popsaným způsobem. Příslušné objemy jednotlivých zásobních roztoků standardů byly napipetovány pomocí automatické pipety dle Tab.7 do 5 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Podle výsledků analýzy 10x a 100x ředěného vzorku byl jako vhodný vzorek zvolen 10x ředěný roztok, ze kterého byly připraveny dvě odlišné sady po osmi vzorcích k další analýze. První sada byla vytvořena odpipetováním 800 μl 10x ředěného vzorku pomocí automatické pipety do skleněných vialek. Poté bylo přidáno 100 μl spikovacího roztoku a následně 100 μl roztoku vnitřního standardu, oba roztoky byly přidány pomocí skleněných stříkaček

Hamilton. Prvním krokem přípravy druhé sady bylo napipetování 100 μl deionizované vody do skleněných vialek, následně bylo přidáno 800 μl ředěného vzorku pomocí automatické pipety a 100 μl roztoku vnitřního standardu pomocí skleněné stříkačky Hamilton.

Tab.7: Příprava spikovacího roztoku standardů

Analyt	V [μl]	c [mg/l]
CAFF	33	10
THEO	46	2
THBM	81	10
DMX	50	10

4 Výsledky a diskuze

Následující kapitola je věnována popisu a zhodnocení průběhu vývoje a validace analytické metody pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů v moči pomocí HPLC/MS. Cílem optimalizace chromatografické metody bylo nalezení ideálních podmínek, které umožňují rozdělení separovaných složek v přijatelném čase. Následně byla provedena optimalizace nastavení parametrů detektoru tak, aby v průběhu analýzy vzorku byl signál detektoru intenzivní a stabilní. Při výběru optimálních parametrů bylo přihlíženo zejména k výsledkům dosaženým pro kritický analyt (THEO), který je v reálném vzorku moči obsažen v nejnižší koncentraci ze všech analytů (Lávičková, 2021). Výsledná metoda byla validována a použita k analýze reálného vzorku moči.

4.1 Přímá infuze jednotlivých stanovovaných látek

V prvním kroku byla prováděna přímá infuze individuálních standardů o koncentraci 100 mg/l. Cílem tohoto kroku bylo určení pozitivní nebo negativní ionizace podle velikosti odezvy. Jako vhodnější byla zvolena pro všechny analyty pozitivní ionizace, což korelovalo s citovanými publikacemi (Kim et al., 2019; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003). Na základě sledování fragmentace protonovaných molekul pro každý z analytů byly vybrány produktové ionty, pro které odezva detektoru byla maximální. Výběr vhodných MRM přechodů byl proveden po aplikaci výrobcem doporučené normalizované kolizní energie 35 %. Tab. 8 shrnuje molekulové a fragmentové ionty jednotlivých analytů, fragmentové ionty vybrané pro kvantitativní analýzu jsou tučně vyznačeny. Vybrané fragmentové ionty se shodují s ionty, které byly analyzovány v publikacích (Chen et al., 2017; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003).

Tab.8: Molekulové a fragmentové ionty jednotlivých analytů

Analyt	Molekulový iont	Fragmentový iont	
CAFF	195	138	
THEO	181	163	124
THBM	181	163	138
DMX	181	163	124
ETF	225	181	

4.2 Infuze do proudu mobilní fáze

Mobilní fáze pro tento krok byla zvolena na základě publikace (Lávičková, 2021). Do proudu mobilní fáze byly vpravovány individuální roztoky standardu o koncentraci 100 mg/l. Průtok byl nastaven na 1 ml/min a poměr mobilní fáze A a mobilní fáze B byl 90:10. Byla provedena první optimalizace iontové optiky a také kolizní energie. Výsledky první optimalizace byly použity pro vytvoření první metody pro hmotnostní detekci.

4.3 Optimalizace chromatografické separace

Chromatografická kolona KinetexEvo C₁₈ (150 x 3,0 mm, 5 μm) byla zvolena na základě literární rešerše pro vývoj analytické metody stanovení kofeinu a jeho metabolitů (THEO, THBM, DMX) v moči (Abu-Qare & Abou-Donia, 2001; Bendriss et al., 2000; M.-S. Caubet et al., 2002; Chen et al., 2017; Kim et al., 2019; Lávičková, 2021; Lopez-Sanchez et al., 2018; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003). Analýzy byly prováděny s pěti různými mobilními fázemi (MF₁ – MF₅) a byl použit směsný roztok standardů o koncentraci 50 mg/l.

4.3.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Optimalizace složení mobilní fáze byla prováděna na základě porovnání retenčních časů a intenzity jednotlivých analytů pro různá složení mobilní fáze. Byl sledován průběh chromatografické separace, tvar píku, kapacitní poměr, odezva detektoru a celková délka analýzy. Dle literatury lze očekávat vliv obsahu kyseliny v mobilní fázi na intenzitu signálu (Chen et al., 2017).

Během optimalizace složení mobilní fáze bylo porovnáváno pět různých složení mobilních fází, které jsou shrnuté v Tab. 9. Gradientový rozsah MFB se pohyboval v rozmezí 6 – 30 %. Složení mobilní fáze nemělo velký vliv na intenzitu píků analytů. Rovněž pro všechna zvolená složení mobilní fáze bylo možné docílit dobré separace analytů, a i ostatní parametry – tvar píku a kapacitní poměr – byly vyhovující. Výsledky analýz pro jednotlivé mobilních fáze byly prakticky srovnatelné, proto bylo při výběru složení mobilní fáze přihlédnuto také k ceně a ke koncentraci aditiva. Na základě výsledků analýz, rešerše literatury a vyhodnocení ekologických a ekonomických dopadů byla jako MFA zvolena 0,1 % kyselina mravenčí v deionizované vodě a jako MFB 0,1 % kyselina mravenčí v metanolu. Optimalizace složení mobilní fáze byla prováděna při maximálním nástřiku roztoku standardů 25 μl. Tento instrumentálně maximálně možný

nástřík, který následně vedl k dosažení co nejnižší meze detekce, byl z hlediska symetrie píku vyhovující.

Tab.9: Složení mobilních fází

MFA	MFB
1% kyselina octová ve vodě	metanol
1% kyselina octová ve vodě	metanol
0,1% kyselina mravenčí ve vodě	metanol
0,1% kyselina mravenčí ve vodě	0,1% kyselina mravenčí v metanolu
0,2% kyselina mravenčí ve vodě	metanol

4.4 Optimalizace hmotnostní detekce

Optimalizace hmotnostní detekce byla prováděna do proudu mobilní fáze (0,1 % kyselina mravenčí ve vodě či metanolu) (88 % MFA:12 % MFB). Parametry detekce byly optimalizovány při infuzi roztoků jednotlivých standardů. V průběhu optimalizace byla sledována stabilita elektrospreje. Koncentrace směsného standardu byla 50 mg/l. Optimalizace hmotnostní detekce vedla k optimálnímu počtu bodů na pík (15-25 bodů) při původním doporučeném nastavení maximální doby plnění pasti na 100 ms s počtem mikroskenů 1, optimalizace těchto parametrů neprováděla.

4.4.1 Optimalizace podmínek elektrospreje

Optimalizace podmínek elektrospreje měla za cíl zvolit vhodnou kombinaci napětí na HESI kapiláře, průtoků hlavního a vedlejšího zmlžujícího plynu a teploty na HESI kapiláře pro zajištění stabilní a co nejintenzivnější odezvy detektoru. Rozsah optimalizace pro jednotlivé parametry popisuje Tab.10, ve které jsou zvolené výsledné parametry tučně vyznačeny. Prvním optimalizovaným parametrem byla teplota HESI kapiláry pro hodnoty 300, 350, resp. 400 °C, jako optimální byla zvolena teplota 350 °C. Dále bylo optimalizováno napětí na HESI kapiláře v rozmezí hodnot 2,00 kV - 4,00 kV (po 0,25 kV) a jako optimální byla zvolena hodnota 2,75 kV. Dále byl upravován průtok hlavního zmlžujícího plynu a jako optimální byl zvolen průtok 70 arb. Jako poslední parametr byl upravován průtok pomocného zmlžujícího plynu, byl zvolen průtok 20 arb.

Tab.10: Optimalizace podmínek elektrospreje

Teplota HESI kapiláry	300 °C	350 °C	400 °C
Napětí na HESI kapiláře	2,00 - 4,00 kV (po 0,25 kV)		2,75 kV
Průtok hlavního zmlžujícího plynu	50 arb.	60 arb.	70 arb.
Průtok vedlejšího zmlžujícího plynu	15 arb.	20 arb.	25 arb.

4.4.2 Optimalizace parametrů iontové optiky

Optimalizace parametrů iontové optiky je prováděna za účelem zajištění efektivního přenosu iontů z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru a je důležitá pro dosažení co nejnižší meze detekce. Optimalizace se provádí upravováním parametru S – lens a F – lens. S – lens jsou ploché prstencové elektrody, které jsou umístěny přímo za transferovou trubicí, F – lens jsou umístěny těsně před vstupem do lineární iontové pasti a regulují rychlost iontu (Kahoun, 2020). Nejprve bylo prováděno měření potenciálu na S – lens v rozmezí 0–70 V, poté bylo měření prováděno na F – lens v rozmezí (- 15) – (-5) V. V obou případech bylo měření provedeno třikrát a nastavený parametr byl vypočítán aritmetickým průměrem naměřených hodnot. Při nastavení parametrů do výsledné metody bylo přihlíženo k hodnotám kritického analytu (THEO) a parametry byly upraveny tak, aby tomuto analytu co nejvíce vyhovovaly. Průběh optimalizace a výsledné parametry, které jsou tučně vyznačeny, jsou uvedeny v Tab.11.

Tab.11: Optimalizace parametrů iontové optiky

Iont	S-lens [%]	Průměrná hodnota [%]	F-lens [V]	Průměrná hodnota [V]
Iont 181 (THEO, THBM, DMX)	69	67	-6,0	-6,5
	66		-7,5	
	66		-6,0	
Iont 195 (CAFF)	65	65	-7,0	-6,5
	64		-6,5	
	66		-6,0	
Iont 225 (ETF)	68	67	-6,5	-6,7
	69		-7,0	
	64		-6,5	

4.4.3 Optimalizace kolizní energie

Kolizní energie byla optimalizována s cílem nalezení vhodné hodnoty pro optimální fragmentaci molekulových iontů analytu na ionty fragmentové. Pro optimalizaci kolizní energie byly zvoleny takové fragmentové ionty, pro které byla odezva detektoru nejvyšší. Hodnota kolizní energie byla určována pro kofein a jeho metabolity (CAFF, THEO, THBM, DMX) a také pro vnitřní standard (ETF). Kolizní energie byla měřena pro každý fragment ve třech opakováních a výsledná hodnota byla vypočítána jako aritmetický průměr, při výběru hodnoty kolizní energie do výsledné analytické metody bylo přihlíženo zejména k hodnotám kritického analytu (THEO). Průběh optimalizace a výsledný parametr, které jsou tučně vyznačeny, jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab.12: Optimalizace kolizní energie

Fragment	Kolizní energie [%]	Průměrná hodnota [%]
Fragment 138 (CAFF)	28	28
	27	
	28	
Fragment 138 (THBM)	26	26
	25	
	26	
Fragment 124 (THEO, DMX)	27	28
	29	
	28	
Fragment 181 (ETF)	36	36
	37	
	35	

4.5 Výsledná analytická metoda

V následující kapitole jsou shrnuty výsledné optimalizované podmínky chromatografické separace a hmotnostní detekce.

Souhrn optimalizovaných podmínek chromatografické separace

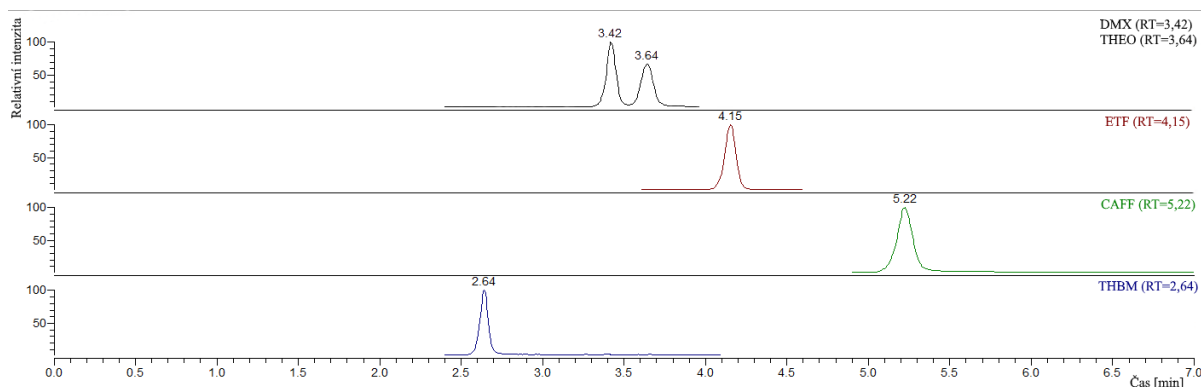
- Chromatografická kolona: KinetexEvo C₁₈ (150 x 3,0 mm, 5 μm)
- Objem nástřiku: 25 μl
- Teplota v kolonovém prostoru: 35 °C
- Mobilní fáze: MFA – deionizovaná voda + 0,1 obj. % kyseliny mravenčí
MFB – metanol + 0,1 obj. % kyseliny mravenčí
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- Celková doba analýzy: 11 minut

Souhrn optimalizovaných podmínek hmotnostní detekce

- Teplota HESI kapiláry: 350 °C
- Napětí na HESI kapiláře: 2,75 kV
- Průtok hlavního zmlžujícího plynu: 70 arb.
- Průtok vedlejšího zmlžujícího plynu: 20 arb.
- S-lens: 67 %
- F-lens: - 6,5 V
- Kolizní energie: 28 %

Fragmentové ionty

- CAFF – 138
- THEO – 124
- THBM – 138
- DMX – 124
- ETF – 181



Obr. 8: Chromatogram (nástřík 25 μ l směsného roztoku standardů o koncentraci 0,35 mg/l při výsledných optimalizovaných podmínkách separace a detekce)

4.6 Validace metody

Validaci analytické metody bylo možné provést po ukončení optimalizace chromatografické separace a hmotností detekce. Validace měla za cíl nalézt koncentrační rozsah metody a prokázat vhodnost metody pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů v moči. Validačními parametry byly mez detekce a mez stanovitelnosti, linearita a rozsah metody, přesnost a správnost.

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou se výrazně liší analytický signál od šumu. Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je možné kvantitativní vyhodnocení díky přesnosti a správnosti (Nováková & Douša, 2021b).

Linearitu metody lze vyjádřit jako schopnost metody poskytnout v daném rozsahu korelace mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Ke kvantitativní analýze slouží rovnice kalibrační křivky (Rov. 1)

$$y = k \cdot x + q \quad \text{Rov. 1}$$

kde k je směrnice kalibrační přímky, y je odezva detektoru, x je koncentrace analytu a q je úsek na ose y . Pro hodnocení linearity lze využít koeficient determinace (R^2), pro který platí kritérium přijatelnosti $R^2 \geq 0,9800$ (Nováková & Douša, 2021b).

Při sběru dat pro hodnocení linearity a koncentračního rozsahu metody dle pravidel FDA je třeba provést analýzu tzv. blanku, tedy rozpouštědla bez analytu a vnitřního standardu, dále rozpouštědla s přidavkem vnitřního standardu. Kalibrační křivku musí tvořit alespoň šest koncentračních úrovní, které pokrývají koncentrační rozsah metody.

Kritéria přijatelnosti jsou splněna, pokud pro jednotlivé koncentrační úrovně kalibrace platí, že vypočtená hodnota koncentrace analytu je v rozmezí $\pm 15\%$ teoretické koncentrace kalibračního roztoku. Pro nejnižší limit kvantifikace, tedy kalibrační roztok s nejnižší koncentrací, musí být vypočtená hodnota koncentrace v rozsahu $\pm 20\%$ teoretické koncentrace kalibračního roztoku (FDA, 2018).

V předložené bakalářské práci byla nejprve nalezena mez detekce a mez stanovitelnosti na základě poměru signálu a šumu (S/N). Následně byla na základě získaných hodnot meze stanovitelnosti připravena tzv. široká kalibrace. Rovněž bylo nutné nalézt vhodnou koncentraci vnitřního standardu. Vyhodnocení široké kalibrace umožnilo volbu koncentračním rozsahu pro vlastní validaci metody a nalezení rozsahu metody pro jednotlivé analyty. Analýza reálného vzorku a reálného vzorku obohaceného o standardy pomocí spikovacího roztoku umožnila určení přesnosti a správnosti metody.

4.6.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro určení hodnot meze detekce a meze stanovitelnosti byla postupně snižována koncentrace směsného roztoku standardů z hodnoty 0,05 mg/l (ST-C) až na hodnotu 0,005 mg/l a byl sledován poměr S/N. V přílohách A a B. jsou uvedeny hodnoty S/N použité pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti. Na základě literatury byla mez detekce stanovena jako koncentrace, při které je S/N rovno 3, a mez stanovitelnosti jako koncentrace analytu, při které je S/N rovno 10 (Nováková & Douša, 2021b). Výsledné hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v Tab. 13 a 14. Mez detekce se pohybovala v rozmezí 0,00071 – 0,0035 mg/l, roste v řadě CAFF, DMX, THEO a THBM. Mez stanovitelnosti byla následně v rozsahu 0,0024 – 0,013 mg/l. Na základě získaných hodnot meze stanovitelnosti byla připravena široká kalibrace v rozsahu 0,005 – 6,25 mg/l. Výsledky široké kalibrace byly zhodnoceny, byl vybrán optimální koncentrační rozsah pro každý analyt, kde lze očekávat splnění kritérií linearit. Definitivní rozsah metody pro vlastní validaci byl stanoven v rozmezí 0,01 – 1,5 mg/l.

Tab.13: Mez detekce

Analyt	Mez detekce [mg/l]
CAFF	0,00071
THEO	0,0030
THBM	0,0035
DMX	0,0019

Tab.14: Mez stanovitelnosti

Analyt	Mez stanovitelnosti [mg/l]
CAFF	0,0024
THEO	0,011
THBM	0,013
DMX	0,0071

4.6.2 Optimalizace koncentrace vnitřního standardu

Byla provedena optimalizace koncentrace vnitřního standardu v analyzovaném vzorku a v kalibračních roztocích standardů v koncentračním rozsahu 0,05 – 1,5 mg/l. Byl sledován poměr plochy píků analytů a vnitřního standardu. Plochy píků analytů a vnitřního standardu by měly být srovnatelné. Ideálně by odezva vnitřního standardu měla být 1/3–2/3 odezvy analytu (Nováková, 2021). Na základě analýz kalibračních roztoků s různou koncentrací vnitřního standardu a následného porovnání ploch píků analytů a vnitřního standardu byla vybrána koncentrace vnitřního standardu v analyzovaném roztoku 0,1 mg/l, Tato koncentrace byla optimální pro všechny analyzované látky v jejich koncentračních rozsazích.

4.6.3 Linearita a rozsah metody

Pro hodnocení linearity a rozsahu metody byly připraveny kalibrační roztoky v koncentračním rozsahu 0,01 – 1,5 mg/l (Tab. 6) ve čtyřech na sobě nezávislých opakováních. V přílohách C až F jsou uvedeny výsledky měření, které vedly k určení koncentračního rozsahu metody pro jednotlivé analyty. Pro každý kalibrační roztok byla pomocí softwaru vypočtena diference, tedy procentuálně vyjádřený rozdíl mezi naměřenou a teoretickou hodnotou koncentrace pro daný kalibrační bod. Podle pravidel FDA validace je nejnižší kalibrační bod shodný s mezí stanovitelnosti, tedy nejnižší limit kvantifikace. Pro tento bod nesmí hodnota diference překročit 20 % teoretické koncentrace reálného vzorku a pro všechny ostatní kalibrační body musí být diference maximálně 15 % teoretické koncentrace kalibračního roztoku. V Tab. 15 jsou uvedeny koncentrační rozsahy

kalibrace pro jednotlivé analyty, stanoveny na základě vypočtených diferencí. U všech kalibračních bodů pro jednotlivé analyty byly splněny podmínky dle literatury (FDA, 2018) s výjimkou dvou nejnižších kalibračních bodů pro analyt THEO. Pro nejnižší koncentrace se hodnoty difference u analytu THBM pohybovaly pro jednotlivá opakování v rozmezí 2 – 6 %, u DMX 6 – 14 %, u CAFF 11 – 20 %. Pro THEO dva kalibrační roztoky nesplňovaly požadovanou hodnotu, byly vyšší než 20 %. Pro ostatní kalibrační body pro analyty CAFF, THBM a DMX byly difference vždy do 10 %, pro THEO 0 – 16 %. Při volbě optimálního koncentračního rozsahu bylo brán na zřetel, že THEO je tzv. kritický analyt, který se v reálném vzorku vyskytuje v nejnižší koncentraci.

Tab.15: Koncentrační rozsahy jednotlivých analytů

Analyt	Koncentrační rozsah [mg/l]
CAFF	0,05 - 1,25
THEO	0,01 - 0,35
THBM	0,1 - 1,5
DMX	0,05 - 1,25

Definitivní rozsah metody byl stanoven v rozmezí 0,05 – 1,25 mg/l pro CAFF, 0,01 – 0,35 mg/l pro THEO, 0,1 – 1,5 mg/l pro THBM a 0,05 – 1,25 mg/l pro DMX. Dosažené meze stanovitelnosti byly srovnatelné s některými dříve publikovanými metodami (Kim et al., 2019; Schneider et al., 2003). Ve většině publikací, kde je použita hmotnostní detekce byla mez stanovitelnosti výrazně nižší (Chen et al., 2017; Kim et al., 2019; Rybak et al., 2014; Schneider et al., 2003; Weimann et al., 2005). Vzhledem k faktu, že ve všech citovaných publikacích byl použit jako hmotnostní analyzátor trojitý kvadrupól, je tento výsledek očekávatelný. V předložené bakalářské práci byla použita lineární iontová past, což je viditelné na výsledných mezích stanovitelnosti, které jsou vyšší než v citovaných publikacích.

Hlavní přínos předložené bakalářské práce je úspěšné převedení již zavedené metody z UV detekce na MS detekci. V porovnání s dříve vyvinutou metodou v naší laboratoři pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC/UV (Lávičková, 2021) bylo dosaženo lepších výsledků v optimalizaci meze stanovitelnosti. Mez stanovitelnosti předchozí metody (Lávičková, 2021) byla 0,2 mg/l, v nově vyvinuté metodě se mez stanovitelnosti pro jednotlivé analyty pohybují o řád níže. Použití MS detektoru umožňuje v daném retenčním čase vyhodnocovat pouze zadanou hmotu. V případě dříve vyvinuté

metody bylo zpracování dat obtížné vzhledem k překryvu píků stanovovaných látek s jinými analyty v matici reálného vzorku.

V přílohách C až F jsou pro každý analyt rovněž uvedeny hodnoty fragmentových iontů použitých pro validaci, rovnice kalibrační křivky a vypočtený koeficient determinace. Pro všechny analyty ve vybraném koncentračním rozsahu splňoval koeficient determinace kritérium přijatelnosti, nejnižší hodnota 0,9968 byla dosažena pro DMX, nejvyšší 0,9975 pro THBM a CAFF.

4.6.4 Přesnost a správnost

Přesnost metody nebo také opakovatelnost je hodnota udávající míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky analýzy za předem specifikovaných a pro každé opakování stejných podmínek. Správnost metody nebo také výtěžnost lze popsat jako těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou (Nováková & Douša, 2021b).

K hodnocení přesnosti a správnosti byly připraveny dvě sady vzorků v osmi opakováních, popis přípravy je uveden v kapitole 3.4. Zdrojová data pro výpočet přesnosti a správnosti jsou uvedena v příloze G. Dle literatury jsou pro koncentrační úrovně použité v tomto experimentu stanovena kritéria přijatelnosti pro přesnost maximální hodnota 15 % a pro správnost v rozmezí 80 – 110 % pro CAFF, THBM, DMX. Pro THEO byla kritéria přijatelnosti pro přesnost maximální hodnota 21 % a pro správnost v rozmezí 60 – 115 % (AOAC, 2016). Dle výsledků uvedených v Tab. 16 byla stanovená kritéria přijatelnosti pro přesnost i správnost splněna pro všechny analyty.

Tab.16: Správnost a přesnost

		CAFF	THEO	THBM	DMX
Přesnost [%]	Neobohacený	3,0	7,0	3,6	4,7
	Obohacený	2,5	4,4	4,1	2,4
Správnost [%]		93	84	88	89

5 Závěr

Tématem bakalářské práce je vývoj a optimalizace metody stanovení kofeinu a jeho metabolitů (Theophylin, Theobromin, 1,7-dimethylxantin) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

V teoretické části práce byly shrnuty základní informace o kofeinu a jeho metabolitech, byl popsán metabolismus kofeinu v lidském organismu. Vlastnímu vývoji metody předcházela literární rešerše dosud publikovaných metod stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC. Hlavní zřetel byl brán na metody s hmotnostní detekcí. Byl sledován vliv složení mobilní fáze na intenzitu signálu.

V průběhu experimentální části se povedlo optimalizovat podmínky chromatografické separace a hmotnostní detekce pro stanovení kofeinu, theophylinu, theobrominu a 1,7-dimethylxantinu s použitím etofylinu jako vnitřního standardu. Validace metody byla úspěšně provedena a na základě výsledků byla potvrzena vhodnost metody pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů v moči. Mezi základní validační parametry patřila mez detekce a mez stanovitelnosti, koncentrace vnitřního standardu, linearita a rozsah metody a přesnost a správnost. Rozsah metody byl stanoven v rozmezí 0,05 – 1,25 mg/l pro CAFF, 0,01 – 0,35 mg/l pro THEO, 0,1 – 1,5 mg/l pro THBM a 0,05 – 1,25 mg/l pro DMX. Metoda byla použita k analýze reálného vzorku moči. Bylo dosaženo velmi dobrých výsledků v posuzování přesnosti a správnosti.

Hlavní přínos předložené bakalářské práce je úspěšné převedení již zavedené metody z UV detekce na MS detekci. V porovnání s dříve vyvinutou metodou v naší laboratoři pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC/UV (Lávičková, 2021) bylo dosaženo lepších výsledků v optimalizaci meze stanovitelnosti. Mez stanovitelnosti předchozí metody (Lávičková, 2021) byla 0,2 mg/l, v nově vyvinuté metodě se meze stanovitelnosti pro jednotlivé analyty pohybují o řád níže. Použití MS detektoru umožňuje v daném retenčním čase vyhodnocovat pouze zadanou hmotu. V případě dříve vyvinuté metody bylo zpracování dat obtížné vzhledem k překryvu píků stanovovaných látek s jinými analyty v matici reálného vzorku.

Uvedenou validovanou metodu je možné rozšířit o další metabolity kofeinu. Na základě necílené analýzy vytipovat další detekovatelné metabolity kofeinu v moči a pokusit se je přidat do stávající metody. Možným předmětem navazující práce je analýza

kofeinu a jeho metabolitů z dalších matric, mezi které patří například krevní plazma, vzorky léčiv či potravin.

6 Citovaná literatura

Abu-Qare, A. W., & Abou-Donia, M. B. (2001). A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 26). www.elsevier.com/locate/jpba

AOAC. (2016). *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

Barone, J. J., & Roberts, H. R. (1996). Caffeine Consumption. In *Fd Chem. Toxic* (Vol. 34, Issue 1).

Bendriss, E.-K., Markoglou, N., & Wainer, I. W. (2000). Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine a a a. In *Journal of Chromatography B* (Vol. 746). www.elsevier.com/locate/chromb

Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., & Aromatario, M. (2015). Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? In *Current Neuropharmacology* (Vol. 13).

Caubet, M.-S., Elbast, W., Dubuc, M.-C., & Brazier, J.-L. (2002). Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 27). www.elsevier.com/locate/jpba

Chen, F., Hu, Z. Y., Parker, R. B., & Laizure, S. C. (2017). Measurement of caffeine and its three primary metabolites in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS and clinical application. *Biomedical Chromatography*, 31(6). <https://doi.org/10.1002/bmc.3900>

Committee on Military Nutrition Research. (2001). *Caffeine for the sustainment of mental task performance: formulations for military operations*. National Academy Press.

FDA. (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceuticals* *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceuticals Contains Nonbinding Recommendations*. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/defa>

ult.htm and/or <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm>

Holčapek, M. (2022). *Molekulová spektrometrie (C549)*. <https://holcapek.upce.cz/vyuka-molekul-spektrometrie.php>

Kahoun, D. (2020). Laboratorní cvičení z hmotnostní spektrometrie. *Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích*.

Kim, H. J., Choi, M. S., Ur Rehman, S., Ji, Y. S., Yu, J. S., Nakamura, K., & Yoo, H. H. (2019). Determination of urinary caffeine metabolites as biomarkers for drug metabolic enzyme activities. *Nutrients*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/nu11081947>

Lávičková, K. (2021). *Metabolismus kofeinu v lidském organismu, stanovení vybraných metabolitů metodou HPLC*. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita

Lopez-Sanchez, R. D. C., Lara-Diaz, V. J., Aranda-Gutierrez, A., Martinez-Cardona, J. A., & Hernandez, J. A. (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*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2085059>

McGachy, L., Tomášová, P., & Rošková, Z. (2021). *Toxikologie a ekotoxikologie I*. VŠCHT Praha (1. vydání, 2021). <https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?isid=978-80-7592-097-3>

Nathanson, J. A. (1984). *Caffeine and Related Methylxanthines: Possible Naturally Occurring Pesticides*.

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. In *Food Additives and Contaminants* (Vol. 20, Issue 1, pp. 1–30). <https://doi.org/10.1080/0265203021000007840>

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>

Nováková, L. (2021). *Přednáška 22.ročník Školy hmotnostní spektrometrie*.

Nováková, L., & Douša, M. (2021a). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* neuveden.

Nováková, L., & Douša, M. (2021b). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* neuveden.

PubChem. (2022). *National Library of Medicine.* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Rybak, M. E., Pao, C. I., & Pfeiffer, C. M. (2014). Determination of urine caffeine and its metabolites by use of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Estimating dietary caffeine exposure and metabolic phenotyping in population studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(3), 771–784. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7506-9>

Schneider, H., Ma, L., & Glatt, H. (2003). Extractionless method for the determination of urinary caffeine metabolites using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 789(2), 227–237. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00065-5)

Weimann, A., Sabroe, M., & Poulsen, H. E. (2005). Measurement of caffeine and five of the major metabolites in urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(3), 307–316. <https://doi.org/10.1002/jms.785>

Záruba, K. (2016). *Analytická chemie 1. díl.* VŠCHT Praha (1. vydání, 2016). https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-950-1

7 Přílohy

7.1 Příloha A

Analyt	Koncentrace [mg/l]	S/N	Průměr S/N	Mez detekce [mg/l]
CAFF 195	0,005	27	21	0,00071
		19		
		18		
		21		
THEO 124	0,005	5	5	0,0030
		5		
		5		
		5		
THBM 138	0,005	4	4,3	0,0035
		5		
		5		
		3		
DMX 124	0,005	7	8	0,0019
		8		
		8		
		9		

7.2 Příloha B

Analyt	Koncentrace [mg/l]	S/N	Průměr S/N	Mez stanovitelnosti [mg/l]
CAFF 195	0,005	27	21	0,0024
		19		
		18		
		21		
THEO 124	0,01	8	9	0,011
		7		
		11		
		10		
THBM 138	0,01	7	8	0,013
		7		
		8		
		9		
DMX 124	0,01	14	14	0,0071
		11		
		15		
		16		

7.3 Příloha C

Označení analytu	Fragmentový ion	Rovnice kalibrační křivky	Koeficient determinace
CAFF	138	$Y = 0.003509 + 0.18258 * X$	$R^2 = 0.9975$

Kalibrační roztok	Koncentrační úroveň [mg/l]	Vypočtená koncentrace [mg/l]	Diference
4	0,0500	0,0429	-14%
		0,0420	-16%
		0,0401	-20%
		0,0445	-11%
5	0,100	0,0940	-6%
		0,0926	-7%
		0,0967	-3%
		0,0919	-8%
6	0,200	0,2089	4%
		0,2141	7%
		0,2120	6%
		0,2094	5%
7	0,350	0,3651	4%
		0,3696	6%
		0,3481	-1%
		0,3527	1%
8	0,500	0,5083	2%
		0,5251	5%
		0,5294	6%
		0,5213	4%
9	0,750	0,7511	0%
		0,7242	-3%
		0,6793	-9%
		0,7357	-2%
10	1,000	0,9670	-3%
		0,9392	-6%
		0,9944	-1%
		1,0128	1%
11	1,250	1,1956	-4%
		1,2350	-1%
		1,2805	2%
		1,3765	10%

7.4 Příloha D

Označení analytu	Fragmentový ion	Rovnice kalibrační křivky	Koeficient determinace
THEO	124	$Y = 0.007251 + 0.74625 * X$	$R^2 = 0.9973$

Kalibrační roztok	Koncentrační úroveň [mg/l]	Vypočtená koncentrace [mg/l]	Diference
2	0,015	0,011	-26%
		0,010	-30%
		0,013	-12%
		0,013	-14%
3	0,020	0,017	-16%
		0,019	-7%
		0,017	-16%
		0,018	-10%
4	0,050	0,050	0%
		0,053	7%
		0,054	8%
		0,052	4%
5	0,100	0,095	-5%
		0,109	9%
		0,102	2%
		0,098	-2%
6	0,200	0,211	5%
		0,210	5%
		0,194	-3%
		0,211	5%
7	0,350	0,359	3%
		0,343	-2%
		0,347	-1%
		0,335	-4%

7.5 Příloha E

Označení analytu	Fragmentový ion	Rovnice kalibrační křivky	Koeficient determinace
THBM	138	$Y = 0.003509 + 0.18258 * X$	$R^2 = 0.9975$

Kalibrační roztok	Koncentrační úroveň [mg/l]	Vypočtená koncentrace [mg/l]	Diference
5	0,1000	0,0960	-4%
		0,0980	-2%
		0,0972	-3%
		0,0940	-6%
6	0,2000	0,2084	4%
		0,2014	1%
		0,2088	4%
		0,2064	3%
7	0,3500	0,3565	2%
		0,3694	6%
		0,3483	0%
		0,3402	-3%
8	0,5000	0,5147	3%
		0,5055	1%
		0,5144	3%
		0,5048	1%
9	0,7500	0,7443	-1%
		0,7651	2%
		0,6813	-9%
		0,7360	-2%
10	1,0000	1,0191	2%
		0,9941	-1%
		1,0065	1%
		0,9960	0%
11	1,2500	1,2496	0%
		1,3323	7%
		1,2912	3%
		1,2440	0%
12	1,5000	1,4445	-4%
		1,5204	1%
		1,4963	0%
		1,4498	-3%

7.6 Příloha F

Označení analytu	Fragmentový ion	Rovnice kalibrační křivky	Koeficient determinace
DMX	124	$Y = 0.01155 + 0.810944 * X$	$R^2 = 0.9968$

Kalibrační roztok	Koncentrační úroveň [mg/l]	Vypočtená koncentrace [mg/l]	Diference
4	0,0500	0,0428	-14%
		0,0472	-6%
		0,0442	-12%
		0,0458	-8%
5	0,1000	0,0934	-7%
		0,0979	-2%
		0,0978	-2%
		0,0948	-5%
6	0,2000	0,2013	1%
		0,2096	5%
		0,2036	2%
		0,2030	1%
7	0,3500	0,3608	3%
		0,3532	1%
		0,3333	-5%
		0,3562	2%
8	0,5000	0,5117	2%
		0,5467	9%
		0,5157	3%
		0,5306	6%
9	0,7500	0,7327	-2%
		0,7748	3%
		0,6720	-10%
		0,7224	-4%
10	1,0000	0,9500	-5%
		0,9747	-3%
		1,0184	2%
		1,0226	2%
11	1,2500	1,2426	-1%
		1,2658	1%
		1,2536	0%
		1,2807	2%

7.7 Příloha G

	Koncentrace [mg/l]			
	THBM	DMX	THEO	CAFF
1	0,456	0,284	0,040	0,106
2	0,460	0,262	0,049	0,110
3	0,467	0,275	0,043	0,110
4	0,451	0,264	0,043	0,102
5	0,497	0,297	0,044	0,109
6	0,477	0,278	0,046	0,109
1_spike	1,301	1,217	0,218	1,020
2_spike	1,438	1,138	0,209	1,031
3_spike	1,311	1,170	0,204	1,037
4_spike	1,393	1,182	0,207	1,050
5_spike	1,335	1,160	0,209	1,022
6_spike	1,306	1,149	0,229	1,090