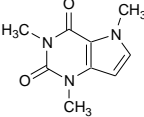
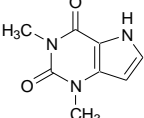
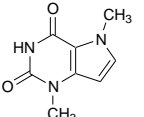


## Ćwiczenie

Oceny poziomu czystości kofeiny – zanieczyszczenie teobrominą, teofiliną oraz zanieczyszczeniami indywidualnie nieokreślonymi (substancje pokrewne)

Ćwiczenie polega zbadaniu substancji pokrewnych

| Nazwa związku | Wzór   |
|---------------|--|
| Kofeina       | <br><chem>CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C</chem> |
| Teofilina     | <br><chem>CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2</chem>  |
| Teobromina    | <br><chem>CN1C=NC2=C1C(=O)NC(=O)N2C</chem>    |

**Badanie wykonuje się metodą HPLC, stosując podane poniżej parametry rozdzielania:**

*Roztwór badany.* Rozpuścić 0,100 g substancji badanej w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 50,0 ml. Uzupełnić 1,0 ml tego roztworu fazą ruchomą do 10,0 ml.

*Roztwór porównawczy.* Uzupełnić 2,0 ml roztworu badanego fazą ruchomą do 100,0 ml. Uzupełnić 1,0 ml tego roztworu fazą ruchomą do 10,0 ml.

*Kolumna:*

- *wymiary:* długość 0,25 m, średnica wewnętrzna 4 mm,
- *faza nieruchoma:* żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi związany na końcu OD (5 µm).

*Faza ruchoma:* zmieszać 17 objętości acetonitrylu do chromatografii OD i 83 objętości wody OD.

*Szybkość przepływu:* 1,0 ml/min.

*Detekcja:* spektrofotometr przy 275 nm.

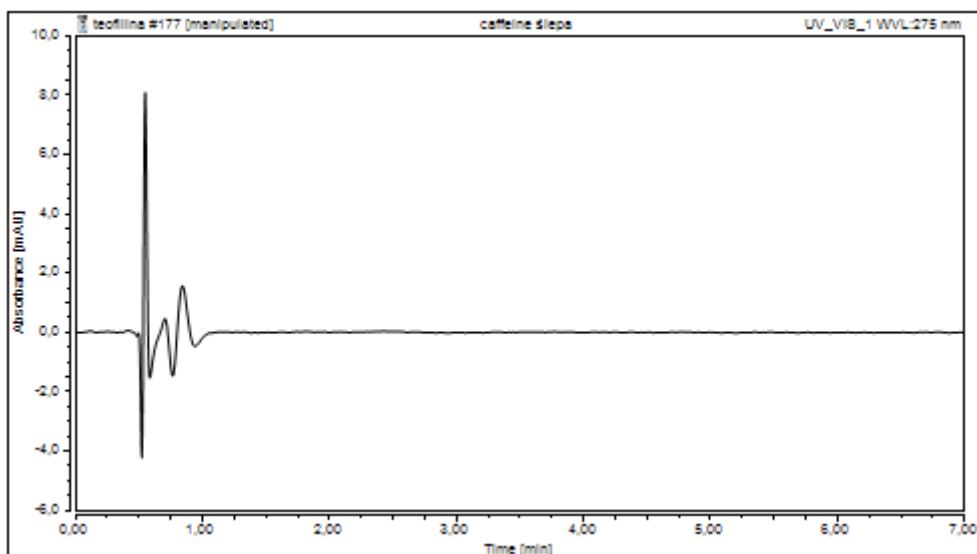
*Wprowadzenie:* 10 µl.

Określić poziom zanieczyszczenia kofeiny teobrominą i teofiliną oraz zanieczyszczeniami indywidualnie określanymi lub indywidualnie nieokreślanymi

Oznaczenie poziomu zanieczyszczeń w badanych seriach (1-3).

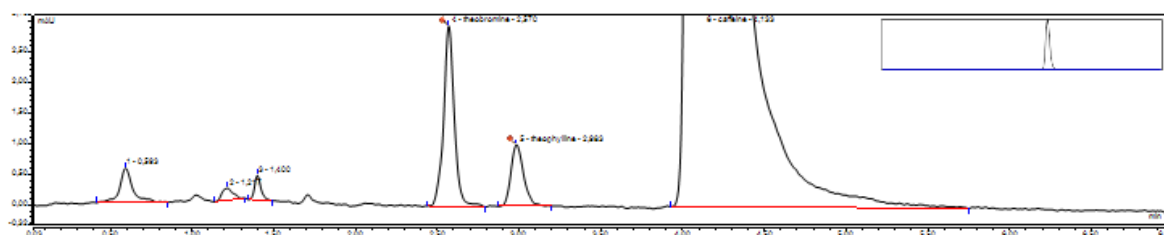
Wykonać chromatogramy:

- próby ślepej - rozpuszczalników
- po 1 roztworze badanym (seria 1-3)
- 3 roztwory porównawcze



Rycina 1. Chromatogram ślepej próby - fazy ruchomej.

## Wyniki analizy serii SERIA 1

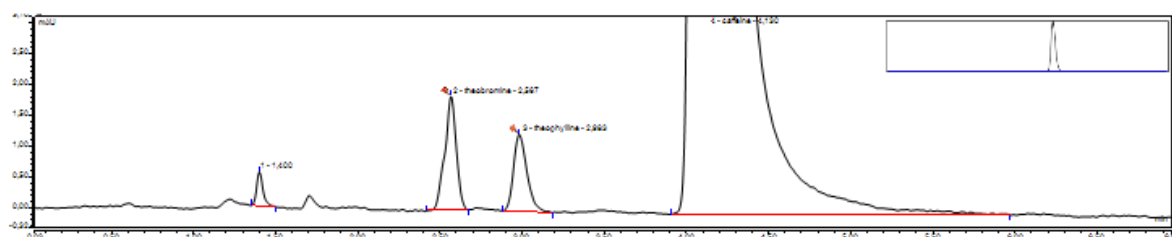


Rycina 2. Chromatogram badanej serii 1.

Tabela 1. Wyniki oznaczania serii 1

| Integration Results |            |                    |               |                |                 |                   |             |
|---------------------|------------|--------------------|---------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------|
| No.                 | Peak Name  | Retention Time Min | Area mAU*min  | Height mAU     | Relative Area % | Relative Height % | Amount n.a. |
| 1                   | x          | 0,593              | 0,053         | 0,562          | 0,06            | 0,07              | n.a.        |
| 2                   | y          | 1,217              | 0,016         | 0,198          | 0,02            | 0,03              | n.a.        |
| 3                   | z          | 1,400              | 0,018         | 0,405          | 0,02            | 0,05              | n.a.        |
| 4                   | teobromina | 2,570              | 0,224         | 2,948          | 0,24            | 0,39              | n.a.        |
| 5                   | teofilina  | 2,983              | 0,090         | 1,002          | 0,10            | 0,13              | n.a.        |
| 6                   | kofein     | 4,133              | 94,694        | 756,020        | 99,58           | 99,33             | n.a.        |
| <b>Total:</b>       |            |                    | <b>95,096</b> | <b>761,135</b> | <b>100,00</b>   | <b>100,00</b>     |             |

## SERIA 2

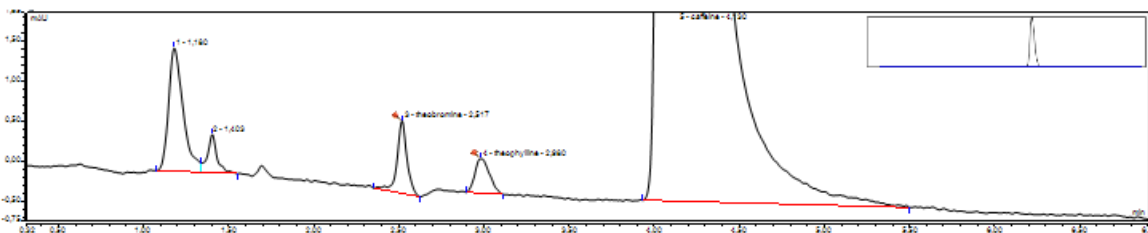


Rycina 3. Chromatogram badanej serii 2.

Tabela 2. Wyniki oznaczania serii 2

| Integration Results |            |                    |               |                |                 |                   |             |
|---------------------|------------|--------------------|---------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------|
| No.                 | Peak Name  | Retention Time Min | Area mAU*min  | Height mAU     | Relative Area % | Relative Height % | Amount n.a. |
| 1                   | z          | 1,400              | 0,025         | 0,551          | 0,03            | 0,07              | n.a.        |
| 2                   | teobromina | 2,567              | 0,150         | 1,845          | 0,16            | 0,25              | n.a.        |
| 3                   | teofilina  | 2,983              | 0,119         | 1,251          | 0,13            | 0,17              | n.a.        |
| 4                   | kofein     | 4,130              | 94,672        | 732,580        | 99,69           | 99,50             | n.a.        |
| <b>Total:</b>       |            |                    | <b>94,967</b> | <b>736,227</b> | <b>100,00</b>   | <b>100,00</b>     |             |

**SERIA 3**



Rycina 4. Chromatogram badanej serii 3.

Tabela 3. Wyniki oznaczania serii 3

| Integration Results |            |                       |                 |                |                    |                      |                |
|---------------------|------------|-----------------------|-----------------|----------------|--------------------|----------------------|----------------|
| No.                 | Peak Name  | Retention Time<br>Min | Area<br>mAU*min | Height<br>mAU  | Relative Area<br>% | Relative Height<br>% | Amount<br>n.a. |
| 1                   | y          | 1,180                 | 0,153           | 1,539          | 0,16               | 0,21                 | n.a.           |
| 2                   | z          | 1,403                 | 0,031           | 0,479          | 0,03               | 0,07                 | n.a.           |
| 3                   | teobromina | 2,517                 | 0,061           | 0,903          | 0,06               | 0,13                 | n.a.           |
| 4                   | teofilina  | 2,980                 | 0,043           | 0,431          | 0,04               | 0,06                 | n.a.           |
| 5                   | kofeina    | 4,130                 | 97,169          | 713,164        | 99,70              | 99,53                | n.a.           |
| <b>Total:</b>       |            |                       | <b>97,458</b>   | <b>716,516</b> | <b>100,00</b>      | <b>100,00</b>        |                |

**Zadanie 1.**

Obejrzyć chromatogramy roztworów badanych, odczytać wartości czasów retencji substancji badanej (kofeiny) i zanieczyszczeń (teobrominy i teofiliny oraz zanieczyszczeń indywidualnie nieokreślanych); obliczyć retencję względną w odniesieniu do kofeiny.

**Wyjaśnić znaczenie wyznaczania retencji względnej, jakie parametry mogą mieć wpływ na wartości retencji względnej?**

Tabela 4.

Czasy retencji oraz retencja względna substancji badanej i zanieczyszczeń

| Nazwa związku      | t <sub>r</sub> [min] | Retencja względna |
|--------------------|----------------------|-------------------|
| Kofeina            |                      |                   |
| Teofilina          |                      |                   |
| Teobromina         |                      |                   |
| Zanieczyszczenie X |                      |                   |
| Zanieczyszczenie Y |                      |                   |
| Zanieczyszczenie Z |                      |                   |

## Zadanie 2.

Obliczyć stężenie kofeiny w roztworze porównawczym, przygotowanym z roztworu badanego (wartość nominalna 100%).

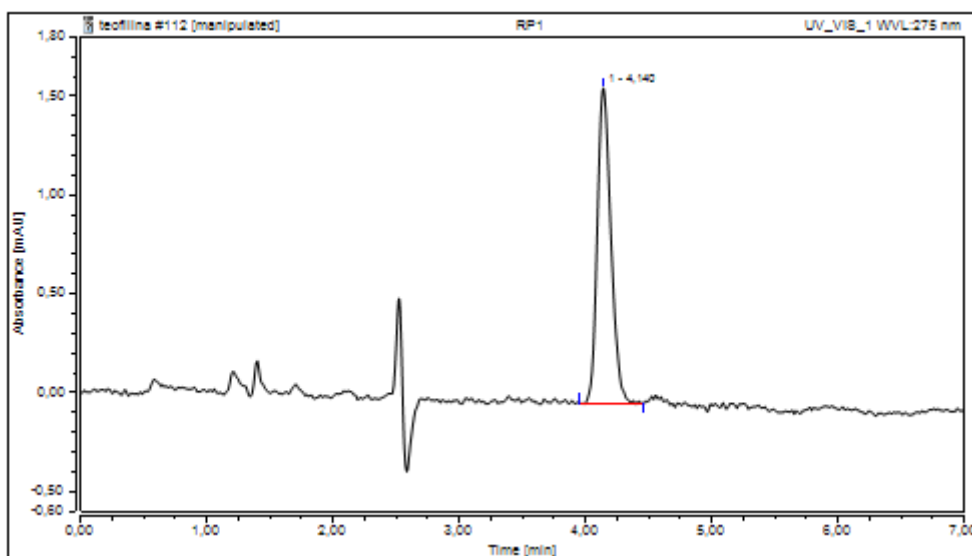
*Roztwór badany.* Rozpuścić 0,100 g substancji badanej w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 50,0 ml. Uzupełnić 1,0 ml tego roztworu fazą ruchomą do 10,0 ml.

*Roztwór porównawczy.* Uzupełnić 2,0 ml roztworu badanego fazą ruchomą do 100,0 ml. Uzupełnić 1,0 ml tego roztworu fazą ruchomą do 10,0 ml.

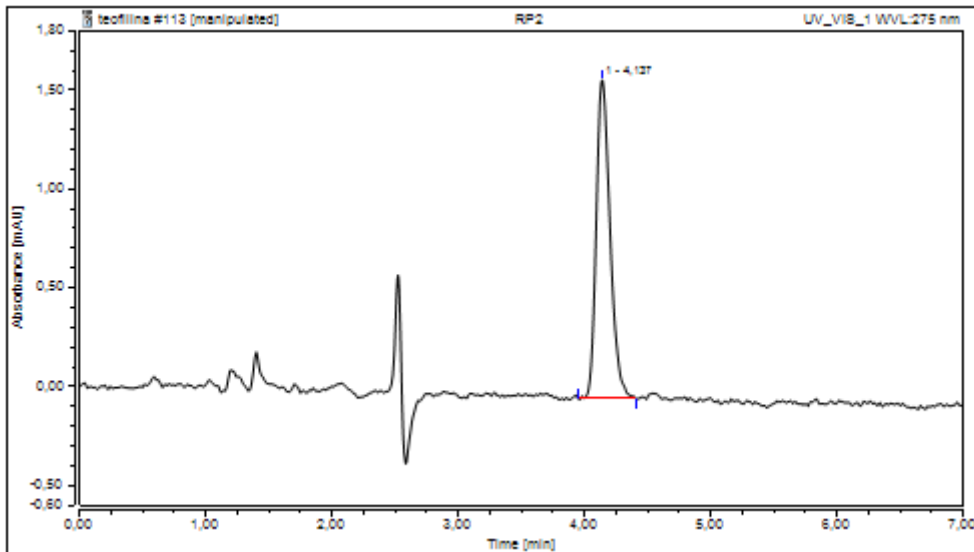
**Odpowiedź:** ..... %

## Zadanie 3.

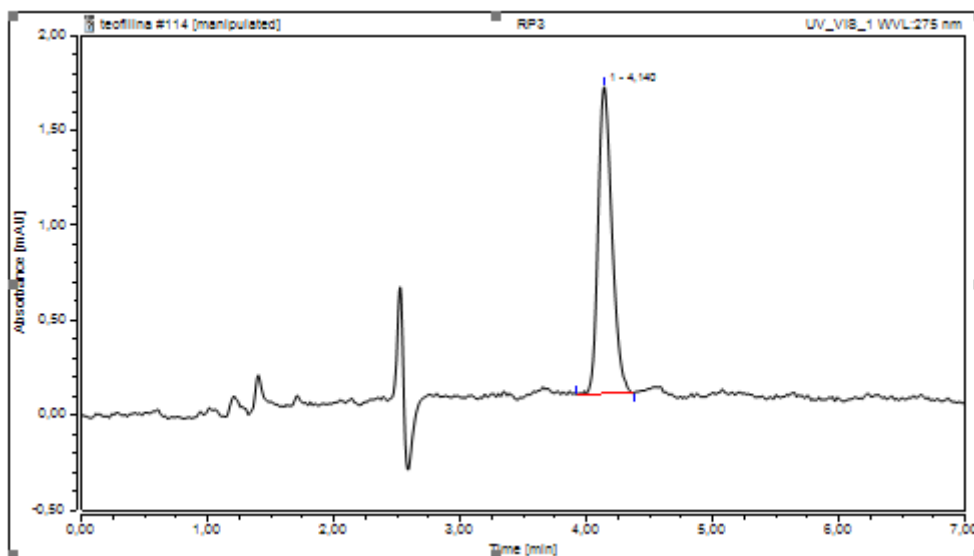
- Obejrzeć chromatogramy roztworów porównawczych, odczytać pole powierzchni i pikę kofeiny i wyliczyć wartość średnią
- Chromatogram roztworu porównawczego – ważne aby wykonać 3 oznaczenia



Rycina 5. Chromatogram roztworu porównawczego (1); pole powierzchni kofeiny wynosi 0,200.



Rycina 6. Chromatogram roztworu porównawczego (2); pole powierzchni kofeiny wynosi 0,205.



Rycina 7. Chromatogram roztworu porównawczego (3); pole powierzchni kofeiny wynosi 0,204

Pole powierzchni pików kofeiny o stężeniu ..... **wartość średnia** .....

#### Zadanie 4.

Obliczyć zawartość teobrominy i teofiliny w badanych seriach kofeiny oraz zaproponować limity zanieczyszczeń.

Wyniki badania serii 1-3

| Nr serii | Teobromina  |               | Teofilina        |               | Suma zanieczyszczeń [%] |
|----------|---|---------------|------------------|---------------|-------------------------|
|          | Pole powierzchni                                    | Zawartość [%] | Pole powierzchni | Zawartość [%] |                         |
| 1        | 0,224   |               | 0,090            |               |                         |
| 2        | 0,150   |               | 0,119            |               |                         |
| 3        | 0,061   |               | 0,043            |               |                         |
|          | Zanieczyszczenia indywidualnie nieokreślone seria 1 |               |                  |               |                         |
| X        | 0,053   |               | -                | -             | -                       |
| Y        | 0,016   |               | -                | -             | -                       |
| Z        | 0,018   |               | -                | -             | -                       |
|          | Zanieczyszczenia indywidualnie nieokreślone seria 2 |               |                  |               |                         |
| X        | -   | -             | -                | -             | -                       |
| Y        | -   | -             | -                | -             | -                       |
| Z        | 0,025   |               |                  |               |                         |
|          | Zanieczyszczenia indywidualnie nieokreślone seria 3 |               |                  |               |                         |
| X        | -   | -             | -                | -             | -                       |
| Y        | 0,153   |               |                  |               |                         |
| Z        | 0,031   |               |                  |               |                         |

Które z zanieczyszczeń indywidualnie nieokreślanych należy uwzględnić w badaniu profilu zanieczyszczeń i dlaczego?, a które można pominąć?

*Wartości graniczne:*

- *teofilina*: nie więcej niż powierzchnia piku głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (0,2%)
- *teobromina*: nie więcej niż powierzchnia piku głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (0,2%)
- *zanieczyszczenia indywidualnie nieokreślone*: dla każdego zanieczyszczenia, nie więcej niż 0,5-krotności powierzchni piku głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (a) (0,10%),
- *suma zanieczyszczeń*: nie więcej niż 1,5-krotności powierzchni piku głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (a) (0,3%),
- *wartość graniczna pominięcia*: 0,25-krotność powierzchni piku głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (a) (0,05%).

## **Zadanie 5.**

### **Sprawdzenie współczynników odpowiedzi detektora**

**W oznaczaniu stosowano detektor spektrofotometryczny, a wyniki odnoszono do piku kofeiny, zatem konieczne jest sprawdzenie czy współczynnik odpowiedzi detektora mieści się w granicach 0,8 do 1,2 dla teobrominy i teofiliny w odniesieniu do kofeiny.**

**Dlaczego takie badanie się wykonuje, czy można przeprowadzić analizę w inny sposób?**

**Jeżeli dla danego zanieczyszczenia przygotujemy roztwór porównawczy zawierający dane zanieczyszczenie, w tym przypadku teobrominę i teofilinę.**

**Jeżeli nie, należy sprawdzić czy odpowiedzi detektora są takie same, możemy to zrobić w dwojaki sposób, albo przygotować krzywe wzorcowe w zakresie stężeń roztworu porównawczego albo przygotować roztwory zanieczyszczeń i substancji badanej o nominalnym stężeniu ok.0,2% w odniesieniu do roztworu badanego i takie roztwory nastrzyknąć 6 razy.**

**Przygotować roztwory do krzywej wzorcowej w zakresie od 10% do 150% wartości nominalnej (0,2%).**



### Zadanie 6.

Wyznaczyć krzywe wzorcowe dla substancji badanej i zanieczyszczeń indywidualnie określanych w zakresie stężeń 10-150% roztworu porównawczego (0,2% = 0,0004 mg/ml).

*Wykonanie oznaczenia.*

Rozpuścić ok. 0,060 g substancji badanej (kofeiny, teobrominy, teofiliny) w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 100,0 ml. Uzupełnić 1,0 ml tego roztworu fazą ruchomą do 100,0 ml (roztwór A).

Odmierzyć kolejno:

1. 1,0 ml roztworu A + 0,0 ml wody
2. 0,8 ml roztworu A + 0,2 ml wody
3. 0,67 ml roztworu A + 0,33 ml wody
4. 0,6 ml roztworu A + 0,4 ml wody
5. 0,53 ml roztworu A + 0,47 ml wody
6. 0,47 ml roztworu A + 0,53 ml wody
7. 0,40 ml roztworu A + 0,60 ml wody
8. 0,33 ml roztworu A + 0,67 ml wody
9. 0,27 ml roztworu A + 0,33 ml wody
10. 0,20 ml roztworu A + 0,8 ml wody
11. 0,13 ml roztworu A + 0,87 ml wody
12. 0,07 ml roztworu A + 0,93 ml wody

Obliczyć zawartość danej substancji w  $\mu\text{g/ml}$  przy danym rozcieńczeniu roztworu, przyjmując, że odważono:

- 63,3 mg kofeiny
- 66,0 mg teobrominy
- 60,9 mg teofiliny

| Nr roztworu | Stężenie w $\mu\text{g/ml}$ |            |           |
|-------------|-----------------------------|------------|-----------|
|             | Kofeina                     | Teobromina | Teofilina |
| 1           |                             | -          |           |
| 2           |                             |            |           |
| 3           |                             |            |           |
| 4           |                             |            |           |
| 5           |                             |            |           |
| 6           |                             |            |           |
| 7           |                             |            |           |
| 8           |                             |            |           |
| 9           |                             |            |           |
| 10          |                             |            |           |
| 11          |                             |            |           |
| 12          |                             | -          |           |

**Zadanie 7.**

Odczytać z chromatogramów wielkości pól powierzchni dla poszczególnych substancji oraz stężeń, wyniki podano w tabelach. Obliczyć dla każdej substancji metodą najmniejszych kwadratów parametry prostej  $y = ax + b$  i  $y = ax$

| Nr roztworu | Stężenie kofeiny [µg/ml] | Pole powierzchni | $y = ax + b$ | $y = ax$ |
|-------------|--------------------------|------------------|--------------|----------|
| 1           |                          | 0.3807           | a            | a        |
| 2           |                          | 0.3042           | błąd         | błąd     |
| 3           |                          | 0.2501           | b            | sa       |
| 4           |                          | 0.2269           | błąd         | sy       |
| 5           |                          | 0.1983           | sa           | r        |
| 6           |                          | 0.1862           | sb           |          |
| 7           |                          | 0.1569           | sy           |          |
| 8           |                          | 0.1215           | ta           |          |
| 9           |                          | 0.1166           | tb           |          |
| 10          |                          | 0.0836           | r            |          |
| 11          |                          | 0.0427           |              |          |
| 12          |                          | 0.025            |              |          |

| Nr roztworu | Stężenie teobrominy [µg/ml] | Pole powierzchni | $y = ax + b$ | $y = ax$ |
|-------------|-----------------------------|------------------|--------------|----------|
| 1           |                             | 0.061            | a            | a        |
| 2           |                             | 0.051            | błąd         | błąd     |
| 3           |                             | 0.045            | b            | sa       |
| 4           |                             | 0.039            | błąd         | sy       |
| 5           |                             | 0.035            | sa           | r        |
| 6           |                             | 0.031            | sb           |          |
| 7           |                             | 0.026            | sy           |          |
| 8           |                             | 0.021            | ta           |          |
| 9           |                             | 0.015            | tb           |          |
| 10          |                             | 0.009            | r            |          |
|             |                             |                  |              |          |

| Nr roztworu | Stężenie teofiliny [µg/ml] | Pole powierzchni | $y=ax+b$ | $y=ax$ |
|-------------|----------------------------|------------------|----------|--------|
| 1           |                            | 0.436            | a        | a      |
| 2           |                            | 0.3386           | błąd     | błąd   |
| 3           |                            | 0.264            | b        | sa     |
| 4           |                            | 0.241            | błąd     | sy     |
| 5           |                            | 0.22             | sa       | r      |
| 6           |                            | 0.1983           | sb       |        |
| 7           |                            | 0.1699           | sy       |        |
| 8           |                            | 0.1407           | ta       |        |
| 9           |                            | 0.1083           | tb       |        |
| 10          |                            | 0.0773           | r        |        |
| 11          |                            | 0.0515           |          |        |
| 12          |                            | 0.0249           |          |        |

### Zadanie 8.

- Sporządzić wykres zależności  $P = f(c)$  i wyznaczyć parametry prostej.
- Z badać istotność współczynnika  $b$ , (jeżeli  $t_b < t_{0,05}(n-2)$  to  $b = 0$ ).
- Odczytać wartość współczynnika kierunkowego prostych  $a$  i porównać
- Sporządzić wykres zależności wielkości piku kofeiny, teobrominy i teofiliny od stężenia danej substancji w µg/ml

### Zadanie 9.

#### Sprawdzenie współczynników odpowiedzi detektora

| Nazwa związku | a | CF = $a_k/a_i$ |
|---------------|---|----------------|
| kofeina       |   | 1              |
| teofilina     |   |                |
| teobromina    |   |                |

- współczynnik korekcyjny (0,8-1,2)

istotny jest tylko dla teobrominy pole powierzchni piku należy pomnożyć przez współczynnik Cf

### Zadanie 10.

- **Obliczyć zawartość zanieczyszczeń indywidualnie określanych oraz zaproponować wartości graniczne dla analizowanych serii**

| Nr serii | Teobromina       |               | Teofilina        |               | Suma zanieczyszczeń [%] |
|----------|------------------|---------------|------------------|---------------|-------------------------|
|          | Pole powierzchni | Zawartość [%] | Pole powierzchni | Zawartość [%] |                         |
| 1        |                  |               | 0,090            | 0,089         |                         |
| 2        |                  |               | 0,119            | 0,117         |                         |
| 3        |                  |               | 0,043            | 0,042         |                         |

- **Zaproponować nowe wartości graniczne:**

*Wartości graniczne:*

- *teofilina*: nie więcej niż powierzchnia pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (0,2%)
- *teobromina*: nie więcej 4-krotność powierzchni pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (0,8%)
- *zanieczyszczenia indywidualnie nieokreślane*: dla każdego zanieczyszczenia, nie więcej niż 0,5-krotności powierzchni pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (a) (0,10%),
- *suma zanieczyszczeń*: nie więcej niż 5-krotność powierzchni pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (a) (1,0%),
- *wartość graniczna pominięcia*: 0,25-krotność powierzchni pikę głównego na chromatogramie roztworu porównawczego (a) (0,05%).

### **Wnioski jakie nasuwają się po przeanalizowaniu poziomów zanieczyszczeń**

- Czy możliwe jest, że badane serie kofeiny pochodzą od tego samego producenta?
- Jeżeli od tego samego producenta, wyprodukowane w tym samym czasie o czy były przechowywane w takich samych warunkach?
- Czy możliwe jest przypadkowe zanieczyszczenie kofeiny teobrominą i teofiliną?

### **Zadania końcowe (11):**

- Sprawdzić warunki przechowywania kofeiny wg FPX?
- Podaj mechanizm działania oraz zastosowanie kofeiny, teobrominy i teofiliny
- Podaj preparaty, w których znajdują się powyższe substancje