

# Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC

Manoel Lima de Menezes\*

Andréa Sanchez\*

Priscila Raquel Martins\*

Márcia Zeferino Garcia\*\*

Oduvaldo Câmara Marques Pereira\*\*\*

Arnaldo Alves Cardoso\*\*\*\*

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 2, p. 35-42, 1999.

\* Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências, Departamento de Química. Av. Edmundo C. Coube s/n, 17033-360 - Bauru, SP

\*\* Universidade Sagrado Coração, Rua Irmã Arminda 10-50, 17044-160 - Bauru, SP

\*\*\* Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Departamento de Farmacologia, Rubião Júnior, 18618-000 - Botucatu, SP

\*\*\*\* Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Av. Prof. Francisco Degni s/n, 14801-970 - Araraquara, SP

## RESUMO

*Desenvolveu-se um método analítico para a extração e determinação das concentrações de cafeína em amostras de urina por cromatografia líquida de alta performance. O método envolve a injeção direta da amostra de urina em uma coluna cromatográfica ISRP (150mm x 4,6mm DI), empregando uma fase móvel composta por uma solução de fosfato dibásico de sódio 0,05µmol. L<sup>-1</sup> (pH 8,0) e acetonitrila (90:10 v/v).*

*As recuperações de cafeína presentes em amostras de urina fortificadas foram maiores que 98,40 ± 0,90% com um desvio padrão relativo de 0,48%. O limite de detecção para a determinação de cafeína foi de 0,1 mg.µL<sup>-1</sup>. O range de linearidade do detector foi determinado entre as concentrações 0,1 a 18,0µg.mL<sup>-1</sup> para a cafeína.*

**Unitermos:** urina, cafeína, ISRP coluna.

## INTRODUÇÃO

A cafeína é um alcalóide encontrado em diversas espécies de vegetais: café (*Coffea arabica*), chá (*Thea sinensis*), cacau (*Theobroma cacao*), mate (*Ilex paraguayensis*) e guaraná (*Paulinea sorbilis*). Quando ingerida atua como diurético e como estimulante do sistema nervoso central, embora seus efeitos corticais sejam de menor duração quando comparados aos compostos anfetamínicos. Em doses elevadas, a cafeína estimula os centros medular, vasomotor e respiratório, provocando taquicardia e aumento da frequência respiratória (Larini, 1993). Devido às

suas propriedades estimulantes, também é bastante utilizada como *doping* por atletas (Moraes, 1991). Pela sua popularidade, a cafeína tem sido uma droga largamente consumida e o seu papel na saúde humana tem recebido uma considerável atenção nas últimas duas décadas. A dose letal de cafeína é de 10,0g, quantidade contida aproximadamente em 100 xícaras de café (Andrade et al., 1995).

As amostras de urina e sangue são os fluidos biológicos mais comuns para a determinação da cafeína. A preparação da amostra é um pré-requisito importante para a determinação da cafeína presente em amostras de fluidos biológicos por HPLC. A extração é usualmente efetuada por partição líquido-líquido (Rasmussen & Brosen, 1996).

### **Aplicações das colunas cromatográficas ISRP (Internal Surface Reverse Phase) em determinações de analitos presentes em amostras de fluidos biológicos**

A separação e quantificação de pequenas moléculas de matrizes constituídas de macromoléculas têm apresentado um desafio importante no campo da cromatografia líquida. Em particular, análises de drogas, metabólitos e pesticidas presentes em fluidos biológicos, têm sido historicamente problemáticas. Isto se deve à necessidade de remover primeiro as proteínas, para evitar que danifiquem as colunas cromatográficas. A preparação convencional da amostra envolve procedimentos de precipitação de proteínas, seguido por extração e pré-concentração dos analitos. Em muitos casos, a preparação da amostra é desvantajosa, porque decompõe alguns compostos que apresentam dificuldades para serem extraídos, consumindo tempo para efetuar a análise. As fases estacionárias com superfície interna de fase reversa (ISRP) foram desenvolvidas por Pinkerton (Pinkerton, 1991). Esta fase estacionária permite a injeção direta das amostras de fluidos biológicos sem tratamento prévio. Estas colunas cromatográficas foram empregadas nas determinações de medicamentos presentes em soro sanguíneo, leite e urina, por injeção direta no HPLC. Os resultados apresentados foram extraordinários no campo da análise de fluidos biológicos. Na coluna cromatográfica ISRP, a extração da cafeína, presente em amostras de fluidos biológicos, ocorre por dois mecanismos:

a) Em geral, as proteínas presentes em amostras de fluidos biológicos possuem moléculas com dimensões médias de 144 Å, sendo denominadas de macromoléculas. Isto impede que as mesmas penetrem nos poros da sílica, que possuem diâmetro médio de 100 Å. Após a imobilização da albumina humana sobre a superfície da fase estacionária, esta passa a possuir propriedades hidrofílicas. Desta forma, as proteínas presentes na amostra de fluido biológico não são adsorvidas, por possuírem propriedades hidrófobas.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 2, p. 35-42, 1999.

b) A cafeína possui uma molécula pequena, capaz de penetrar nos poros da sílica e ser adsorvida pela fase estacionária, dimetil-octadecil-silano, possibilitando a extração da amostra de fluido biológico. A FIGURA 1 apresenta o modelo do mecanismo de separação em uma partícula da fase estacionária ISRP.

Vários métodos analíticos, utilizando a técnica de injeção direta da amostra empregando colunas ISRP, têm sido desenvolvidos e avaliados para aplicações semelhantes, tais como: a determinação de fenilalanina em plasma humano, para diagnóstico e tratamento de fenilcetonúria; determinação de drogas enantioméricas em soro; extração e identificação de carbamazepina em soro humano (Hermansson & Grahn, 1994) e extração e separação de pesticidas em leite cru, (Menezes & Felix, 1996). Muitas fases estacionárias, contendo proteínas ligadas sobre a superfície da sílica, tais como: albumina de soro bovino (Haginaka & Kanasuji, 1997), albumina de soro humano (Menezes et al., 1998), ovomucóide, avidin, conalbumina (Haginaka et al., 1993), têm sido desenvolvidas para a resolução de compostos enantioméricos.

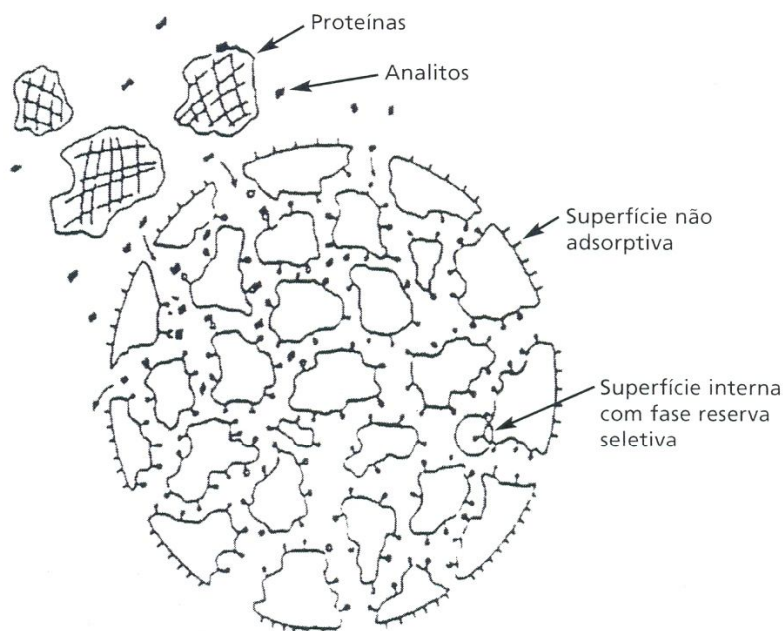


FIGURA 1 - Partícula da fase estacionária ISRP.

Neste trabalho, descrevemos a aplicação da coluna cromatográfica ISRP-C<sub>18</sub> (internal surface reverse phase) na determinação da cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC.



## MATERIAL E MÉTODO

### Método

#### Reagentes

A Acetonitrila foi obtida da Carlo Erba (Milan, Italy), cafeína, fosfato dibásico de sódio e ácido clorídrico p.a foram adquiridos da Merck (E. Merck, Darmstadt, Germany). A água deionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q, obtido da Millipore, (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### Fortificação das amostras de urina com cafeína e preparação da curva de calibração.

A amostra de urina foi diluída 1:125 e a esta adicionado quantidades conhecidas de cafeína, para obter concentrações de 5,0, 8,0 e 12,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Estas amostras foram injetadas diretamente no sistema de cromatografia líquida equipado com uma coluna cromatográfica ISRP-C<sub>18</sub>.

As soluções-padrão foram preparadas efetuando-se a diluição de uma solução-padrão de cafeína com uma concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , preparada previamente em um balão volumétrico, com a solubilização de 0,05g de cafeína em 10,0ml de água pura. A curva de calibração foi obtida efetuando-se diluições da solução concentrada (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cafeína), obtendo-se soluções com concentrações de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cafeína.

#### Instrumentação

Os experimentos cromatográficos foram realizados em um sistema isocrático de cromatografia líquida de alta performance, Varian Modelo 2510, equipado com uma bomba recíproca, um detector ultravioleta com comprimento de onda variável, Varian Modelo 2550 com comprimento de onda ajustado em 220nm e um integrador Modelo SP 4400 chromajet adquirido da Varian Associates, Inc. (Sunnyvale, CA, USA). As amostras e as soluções-padrão foram injetadas em uma coluna ISRP-C<sub>18</sub> (150mm x 4,6mm DI), com uma válvula manual de injeção, (Rheodyne 7125, Cotati, CA, USA), ligada a um *loop* de 10  $\mu\text{L}$ .

#### Condições cromatográficas

A coluna cromatográfica ISRP-C<sub>18</sub> (150mm x 4,6mm DI), empregada, foi preparada conforme protocolo de Pompon (Menezes et al. 1998). A extração e separação da cafeína foi realizada em temperatura

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 2, p. 35-42, 1999.

ambiente, com um fluxo de fase móvel ajustado em  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{minuto}^{-1}$ . A fase móvel empregada foi composta por uma mistura de solução de fosfato dibásico de sódio  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 8,0) e acetonitrila (90:10 v/v).

### **Avaliação da extração de cafeína na amostra de urina fortificada**

Os experimentos foram realizados injetando-se triplicatas para cada concentração da amostra de urina previamente fortificada, contendo concentrações de cafeína na ordem de 5,0, 8,0 e  $12,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos foram avaliados em função da percentagem de extração e desvio-padrão relativo.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico simples e rápido para a determinação de cafeína em amostras de urina, para auxiliar na área da toxicologia analítica, nos segmentos da toxicologia forense e toxicologia clínica.

O método de injeção direta desenvolvido permite a extração, separação e determinação da concentração da cafeína em amostras de urina sem o tratamento prévio da amostra. A amostra de urina foi diluída 1:125, para que se possa assegurar que os metabólitos e pequenas concentrações de proteínas sejam eluídas rapidamente da coluna cromatográfica, com um tempo de retenção de  $2,50 \pm 0,02$  minutos.

A FIGURA 2 apresenta os cromatogramas da solução-padrão de cafeína ( $12,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), (cromatograma A), amostra de urina (cromatograma B) e amostra de urina fortificada com  $8,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  cafeína (cromatograma C). No cromatograma C, observou-se que a cafeína é extraída da matriz sem picos interferentes. Isto se deve ao fato de empregarmos soluções alcalinas na composição da fase móvel. Desta forma, a extração da cafeína foi realizada empregando-se uma fase móvel constituída por uma solução aquosa de fosfato dibásico de sódio  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 8,0) e acetonitrila (90:10 v/v).

Esta fase móvel com pH 8,0 torna a cafeína um composto com propriedades apolar, sendo moderadamente adsorvida na fase estacionária interna da coluna ISRP-C<sub>18</sub>. Também é importante enfatizar que, em pH básico, os metabólitos com propriedades ácidas ou ligeiramente ácidos, tais como: ácido benzóico, ácido hipúrico, ácido metil hipúrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tricloroacético, fenóis, hidroquinona, catecol, amino-ácidos etc; presentes na amostra de urina sejam facilmente neutralizados, tornando-os muito solúveis na fase móvel. Estes compostos na forma iônica não são adsorvidos pela fase estacionária com superfície interna de fase reversa.

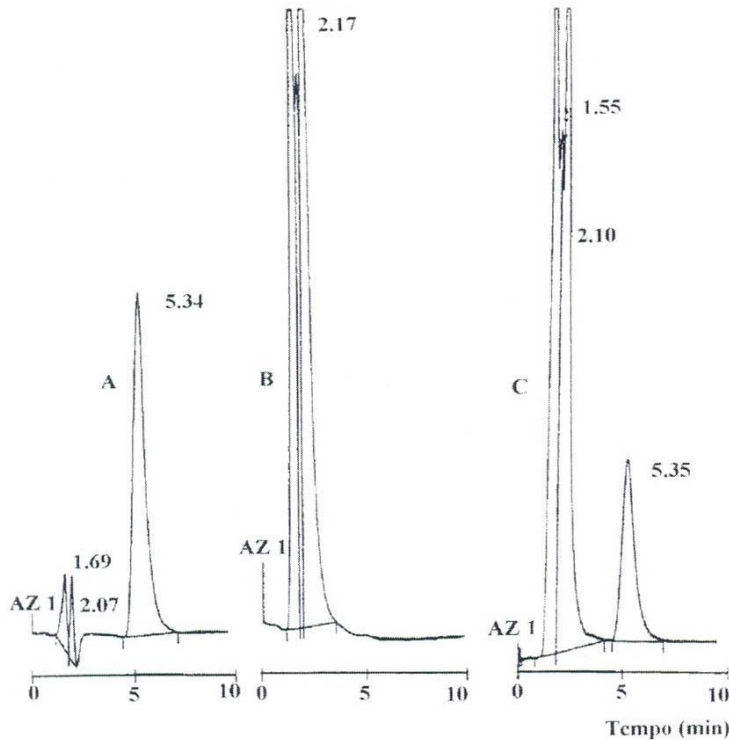


FIGURA 2 - Cromatogramas obtidos com: solução-padrão contendo  $12,0\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cafeína (A), amostra de urina sem ser fortificada (B) e cromatograma obtido com amostra de urina fortificado com  $8,0\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cafeína (C).

O emprego da fase móvel com pH alcalino proporcionou a extração da cafeína presente nas amostras de urina fortificadas, com um tempo de retenção de  $5,35 \pm 0,01$  minutos, sem a presença de pico cromatográficos interferentes, como pode ser observado nos cromatogramas A e C da FIGURA 2.

Os experimentos cromatográficos para avaliar a performance da extração foram checados, efetuando-se a fortificação de amostras de urina com cafeína, cujas concentrações de  $5,0$ ,  $8,0$  e  $12,0\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram injetadas em triplicata, em cada uma das concentrações. Os resultados foram extraordinários, obtendo-se valores de extração maiores que  $98,40 \pm 0,90\%$ . O método analítico proposto por Rasmussen & Broesen (1996), para a determinação de cafeína presente em amostra de urina, apresenta uma recuperação de extração entre 86 a 95%, empregando-se a técnica de extração líquido-líquido usando acetato de etila e 2-propanol como solventes. Comparando-se os métodos, constata-se que o novo método proposto não requer preparação da amostra, é extremamente prático e oferece maior precisão dos resultados. A reprodutibilidade dos resultados foi checada calculando-se os desvios-padrão relativos, encontrando-se valores muito significativos, como pode ser observado na TABELA 1.



MENEZES, Manoel  
Lima de et al.  
Determinação de  
cafeína em amostras  
de urina por injeção  
direta no HPLC.  
*Salusvita*, Bauru,  
v. 18, n. 2, p. 35-42,  
1999.

TABELA 1 - Avaliação da extração da cafeína nas amostras de urina fortificadas e os respectivos desvios-padrão relativos..

Nível de fortificação ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
5,0	101,02 $\pm$ 2.15	1,16
8,0	98,40 $\pm$ 0.90	0,48
12,0	100,12 $\pm$ 0.60	0,31

O limite de detecção foi determinado medindo-se a concentração mínima de cafeína detectada, considerando-se a altura do pico correspondente a duas vezes o pico do ruído. Desta forma, encontrou-se um limite de detecção de  $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cafeína em um comprimento de onda ajustado em 220nm. A linearidade do detector foi determinada, avaliando-se as relações lineares entre as concentrações de 0,1 a  $18,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## CONCLUSÃO

O método desenvolvido é simples e rápido, empregando-se a coluna cromatográfica ISRP- $C_{18}$  na determinação das concentrações de cafeína em amostras de urina com uma boa precisão.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, à Universidade Estadual Paulista-UNESP, pela ajuda dos recursos financeiros, ao Instituto de Saúde dos Trabalhadores do Município de Bauru pelo uso da infraestrutura dos laboratórios.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determination of caffeine in urine samples by direct injection into HPLC. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 2, p. 35-42, 1999.

## ABSTRACT

*A method has been developed for extraction and determination of caffeine in urine samples by high performance liquid chromatography. The method involved direct injection of urine in a ISRP- $C_{18}$  (150mm x 4.6mm ID), column and the use of 90:10 (v/v) 0.05 mol.L<sup>-1</sup> sodium phosphate dibasic (pH 8.0) : acetonitrile mobile phase.*

*The recovery was higher than 98.40  $\pm$  0.90 % for caffeine and there was 0.48% relative standard deviation. The limit detection was 0.1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and a range of 0.1 to 18.00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of caffeine for linearity was observed.*

**Key Word:** ISRP column, urine, caffeine.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. B. et. al. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (Clae). *Química Nova*, v. 18 n. 4, p. 379-381, 1995.
- HAGINAKA, J. et.al. Direct injection assay of drug enantiomers in serum on ovomucoid-bonded silica materials by liquid chromatography. *J.Chromatogr*, v. 620, p. 199-204, 1993.
- HAGINAKA, J, KANASUGI, N. Enantioselectivity of bovine serum albumin-bonded columns produced with isolated protein fragments II. Characterization of protein fragments and chiral binding sites. *J. Chromatogr. A*, v. 769, p. 215-223, 1997.
- HERMANSSON, J., GRAHN, A. Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase. *J.Chromatogr. A*, v. 660, p. 119-129, 1994.
- LARINI, L. *Toxicologia*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1993.
- MENEZES, M. L., FELIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methyl-parathion and pentachlorophenol pesticides from raw milk. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.
- MENEZES, M. L., FELIX,G., DEMARCHI, A. C. C. O. On-line extraction and determination of carbofuran in raw milk by direct HPLC injection on an ISRP column. *Chromatographia*, v. 47, n.1/2, p. 81-83, 1998.
- MENEZES, M. L., FELIX, G. Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on an ISRP column, with columns switching. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*. v. 19, n. 19, p. 3221-3228, 1996.
- MORAES, E. C. F. *Toxicologia Analítica*. São Paulo: Roca, 1991.
- PINKERTON, T. C., High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection. *J. Chromatogr*. v. 544, p. 13-23, 1991.
- RASMUSSEN, B. B., BROSEN, K., Determination of theophylline and its metabolites in human urine and plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 676, n. 1, p. 169-174, 1996.
- MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 2, p. 35-42, 1999.