

**Note**

**Étude par chromatographie liquide haute performance des métabolites potentiels de la caféine**

**Comparaison de différentes techniques**

M. F. VERGNES, C. GROSSET et J. ALARY\*

*Service de Chimie Analytique, UFR de Pharmacie, F-38700 La Tronche (France)*

(Reçu le 21 juillet 1986; manuscrit modifié reçu le 25 juillet 1988)

Le métabolisme de la caféine chez l'homme est à la fois complexe et quantitativement important. En effet, moins de 1% de la dose absorbée est éliminée dans les urines sous forme inchangée.

La métabolisation est essentiellement hépatique, sous la dépendance du cytochrome P-448. Les nombreux métabolites identifiés sont le résultat d'étapes successives ou compétitives<sup>1</sup>.

Les principales voies du catabolisme sont: (i) des déméthylation en position 1, 3 ou 7, qui donnent naissance à des di- ou monométhylxanthines; (ii) des oxydations sur le carbone 8, qui donnent lieu à la formation d'acides méthyluriques; (iii) des ouvertures de cycle, qui ont été récemment mises en évidence<sup>2</sup> et qui conduisent à la formation de dérivés de l'uracile.

Compte-tenu des deux voies métaboliques principales, nous nous sommes intéressés à deux séries de molécules: (a) la xanthine et ses dérivés diversement méthylés (Fig. 1); (b) l'acide urique et quelques dérivés méthylés correspondants (Fig. 2).

Nous avons tenté de séparer l'ensemble de ces molécules par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP), selon diverses techniques (adsorption et partage).

La chromatographie d'adsorption a surtout été utilisée pour le dosage des xanthiques naturels (caféine, théophylline et théobromine<sup>3</sup>, éventuellement en présence de monométhylxanthine<sup>4</sup>, d'acide urique<sup>5</sup> ou de paraxanthine<sup>6</sup>, mais jamais pour l'ensemble des 17 molécules étudiées.

En effet, sur silice, la séparation des trois principaux xanthiques ne présente pas de difficulté particulière et se prête tout à fait à une détermination quantitative. Par contre, parmi les molécules étudiées, certaines sont peu ou pas solubles dans les solvants organiques.

La chromatographie de partage en phase inverse a été beaucoup plus largement utilisée<sup>7-12</sup>. Les auteurs préconisent le plus souvent une silice sur laquelle est greffé un octadécylsilane. Ils utilisent ou non la technique de l'appariement d'ions, mais ici encore, la totalité des molécules retenues n'a jamais été envisagée.

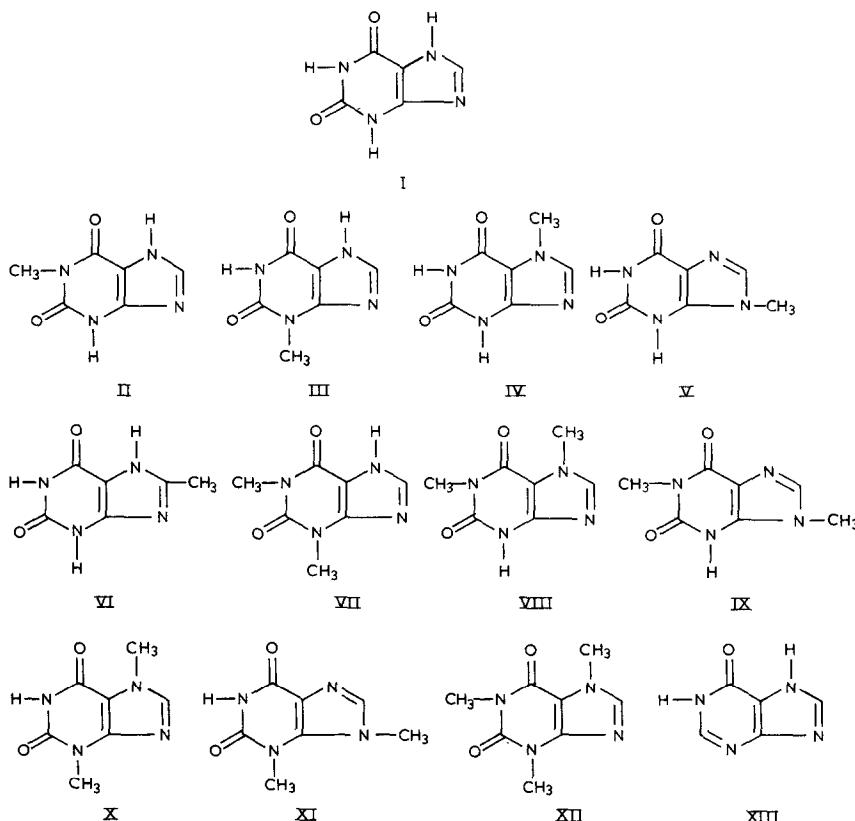


Fig. 1. La xanthine et ses dérivés. I = Xanthine; II = méthyl-1 xanthine; III = méthyl-3 xanthine; IV = méthyl-7 xanthine; V = méthyl-9 xanthine; VI = méthyl-8 xanthine; VII = diméthyl-1,3 xanthine (théophylline); VIII = diméthyl-1,7 xanthine; IX = diméthyl-1,9 xanthine; X = diméthyl-3,7 xanthine (théobromine); XI = diméthyl-3,9 xanthine; XII = triméthyl-1,3,7 xanthine (caféine); XIII = hypoxanthine.

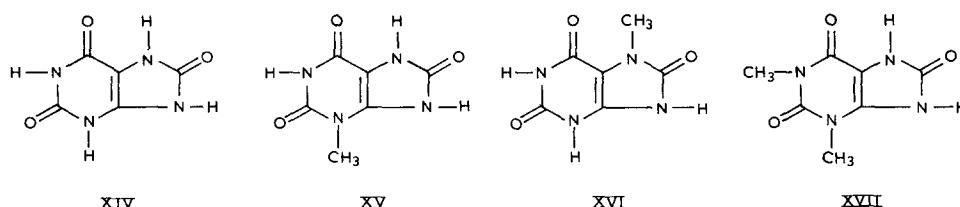


Fig. 2. Acide urique et ses dérivés. XIV = Acide urique; XV = méthyl-3 acide urique; XVI = méthyl-7 acide urique; XVII = diméthyl-1,3 acide urique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Appareillage*

Pompes Waters M 510; vanne d'injection à boucle ( $20 \mu\text{l}$ ); détecteur UV Philips longueur d'onde de détection: 273 nm (cette longueur d'onde permet la détection de toutes les molécules).

### *Produits*

Les dérivés de la xanthine et l'acide urique proviennent de la firme Fluka, les dérivés de l'acide urique de la firme Sigma. Les solvants utilisés sont de qualité pour CLHP.

### *Méthodes*

*Chromatographie d'adsorption.* Les produits utilisés sont en solution dans le dioxane. Colonne: silice Resolve  $5 \mu\text{m}$  (Waters),  $15 \text{ cm} \times 3.9 \text{ mm I.D.}$ ; il s'agit d'une silice poreuse très homogène, de très haute efficacité. Solvant: dichlorométhane-méthanol-ammoniaque concentrée (A:B:1), de manière à ce que les molécules se trouvent exclusivement sous leur forme molaire; gradient obtenu grâce à un programmateur Waters, permettant des gradients non linéaires: gradient retenu No. 7 (Fig. 3); débit  $1 \text{ ml/min}$ .

*Chromatographie de partage.* Les produits utilisés sont en solution dans l'eau bidistillée. Colonnes:  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  (Waters),  $30 \text{ cm} \times 3.9 \text{ mm I.D.}$ ; colonne à compression radiale (Novapak  $C_{18}$ ,  $10 \text{ cm} \times 8 \text{ mm I.D.}$ ), utilisée avec un système de compression (Z module), qui fournit une compression statique de la cartouche, identique sur toute sa longueur;  $10 \text{ cm}$ . Solvant: phosphate monopotassique  $0,05 \text{ M}$  en solution aqueuse-méthanol; gradient linéaire pour la colonne  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$ ; gradient concave No. 5 pour la colonne à compression radiale (Fig. 3); débit  $2,5$  ou  $2 \text{ ml/min}$ .

*Chromatographie de partage avec appariement d'ions.* Les produits utilisés sont en solution dans l'eau bidistillée. Colonne: à compression radiale Nova-Pak  $C_{18}$ ,  $10 \text{ cm} \times 8 \text{ mm I.D.}$ ; solvant: phosphate de tétrabutylammonium  $0,005 \text{ M}$ -méthanol (le contre-ion utilisé est le seul ammonium quaternaire cité dans les techniques de CLHP. Il s'agit du Pic A commercialisé par Waters); gradient concave No. 7 (Fig. 3); débit  $2 \text{ ml/min}$ .

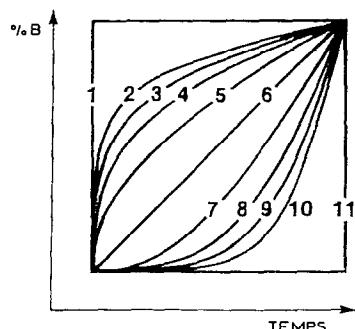


Fig. 3. Courbes de gradients préprogrammés Waters.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### *Chromatographie d'adsorption (Fig. 4)*

Malgré le choix du dioxane comme solvant et en dépit de l'emploi d'ammoniaque, la mise en solution de toutes les molécules n'a pu être obtenue. Par ailleurs, les dérivés de l'acide urique présentaient des pics dédoublés. Huit molécules seulement ont pu être étudiées, elles sont bien séparées, donc identifiables sans ambiguïté. Cependant, la mauvaise dissolution ne permet des applications quantitatives que pour les xanthiques naturels<sup>13</sup>.

### *Chromatographie de partage en phase inverse (Figs. 5 et 6)*

Sur colonne classique tous les composés sont séparés à l'exception de la méthyl-9 xanthine et de la xanthine qui forment un pic unique. Sur colonne à compression radiale la séparation est moins efficace, puisqu'en dehors du couple de molécules cité précédemment, le diméthyl-1,3 acide urique et la théobromine ont également des temps de rétention identiques.

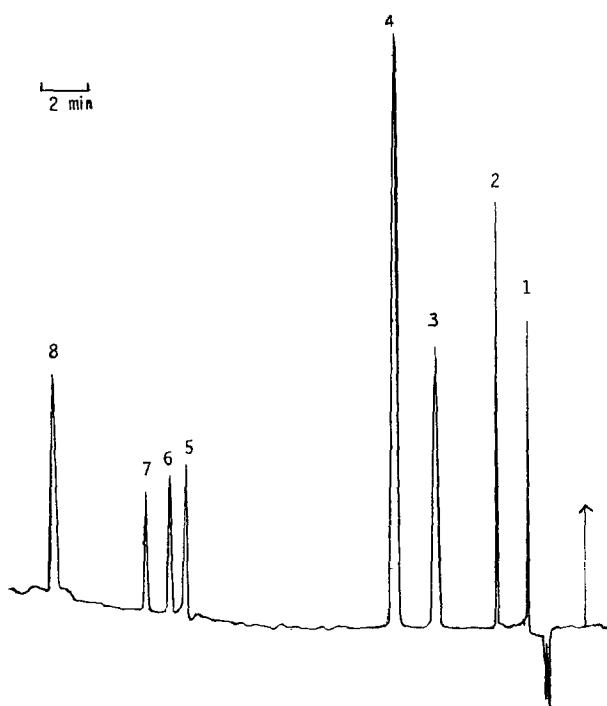


Fig. 4. Séparation de quelques xanthines par CLHP. 1 = Caféine (XII); 2 = théobromine (X); 3 = diméthyl-1,7 xanthine (VIII); 4 = théophylline (VII); 5 = méthyl-7 xanthine (IV); 6 = méthyl-3 xanthine (III); 7 = méthyl-1 xanthine (II); 8 = diméthyl-1,3 acide urique (XVII). Conditions chromatographiques: colonne de silice sphérique Resolve 5 µm. Phase mobile: dichlorométhane (A)-méthanol (B) + 1% d'ammoniaque. Gradient avec 3% de B dans A pendant 8 min, augmentation en 17 min jusqu'à 50% de B dans A selon la courbe 7. Débit 1 ml/min. Détecteur UV à 273 nm.

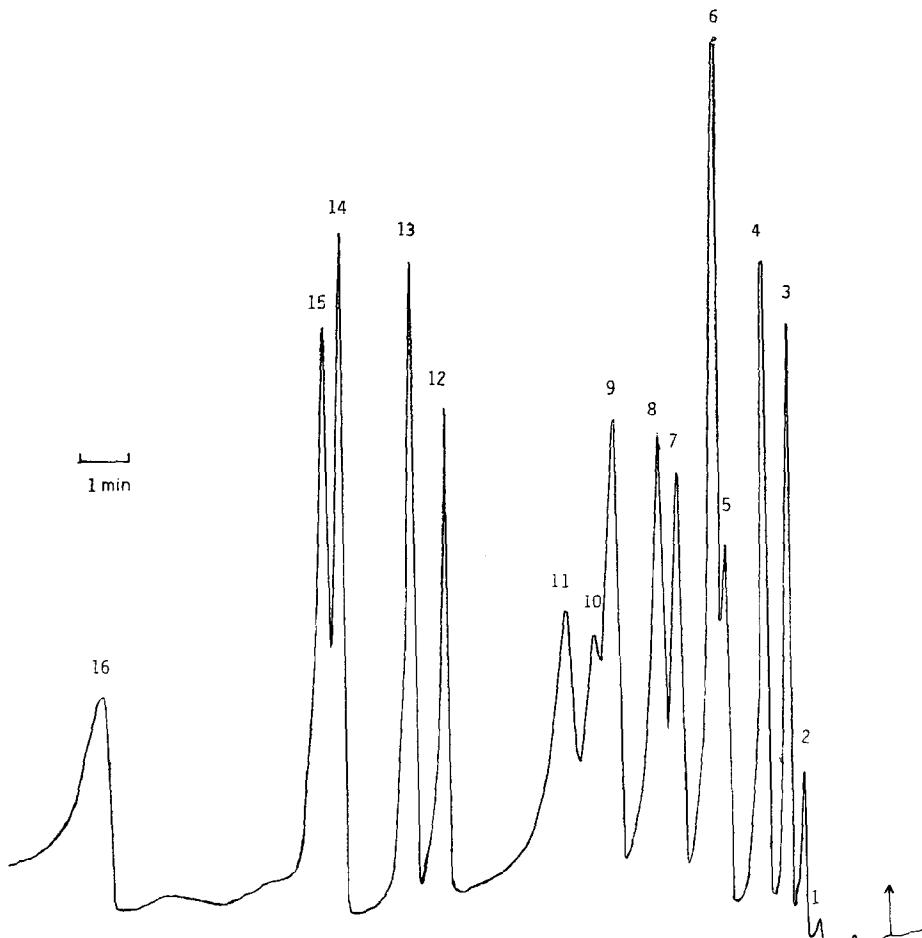


Fig. 5. Séparation de l'ensemble des molécules par CLHP en phase inverse. 1 = acide urique (XIV); 2 = hypoxanthine (XIII); 3 = xanthine (I) + méthyl-9 xanthine (V); 4 = méthyl-3 acide urique (XV); 5 = diméthyl-3,9 xanthine (XI); 6 = méthyl-7 acide urique (XVI); 7 = méthyl-8 xanthine (VI); 8 = méthyl-7 xanthine (IV); 9 = diméthyl-1,9 xanthine (IX); 10 = méthyl-3 xanthine (III); 11 = méthyl-1 xanthine (II); 12 = diméthyl-1,3 acide urique (XVII); 13 = théobromine (X); 14 = diméthyl-1,7 xanthine (VIII); 15 = théophylline (VII); 16 = caféine (XII). Conditions chromatographiques: colonne  $\mu$ Bondapak. Phase mobile: solution aqueuse de phosphate monopotassique 0,05 M (A) -méthanol-phosphate monopotassiques 0,05 M 50/50 (B) (pH 4,5). Gradient de 5 à 30% de B en 4 min. Débit 2,5 ml/min. Détecteur UV à 273 nm.

#### *Chromatographie de partage avec appariement d'ions (Fig. 7)*

Dans cette technique, les ordres d'élution sont modifiés par rapport à la même technique sans utilisation de contre-ion. Deux molécules ne sont pas séparées, ce sont dans ce cas les méthyl-8 et méthyl-3 xanthines. Dans toutes les techniques, les temps de rétention sont reproductibles. Le coefficient de variation est compris entre 0,2 et 2,1% selon les molécules.

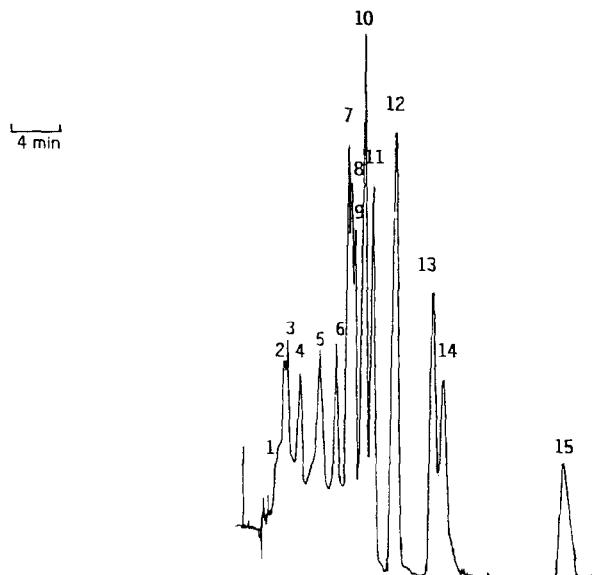


Fig. 6. Séparation de l'ensemble des molécules par CLHP en phase inverse. 1 = Acide urique (XIV); 2 = hypoxanthine (XIII); 3 = xanthine (I) + méthyl-9 xanthine (V); 4 = acide méthyl-3 urique (XV); 5 = diméthyl-3,9 xanthine (XI); 6 = méthyl-7 acide urique (XVI); 7 = méthyl-8 xanthine (VI); 8 = méthyl-7 xanthine (IV); 9 = diméthyl-1,9 xanthine (IX); 10 = méthyl-3 xanthine (III); 11 = méthyl-1 xanthine (II); 12 = diméthyl-1,3 acide urique (XVII) + thébromine (X); 13 = diméthyl-1,7 xanthine (VIII); 14 = théophylline (VII); 15 = caféine (XII). Conditions chromatographiques: cartouche Nova-Pak C<sub>18</sub> à compression radiale. Phase mobile: solution aqueuse de phosphate monopotassique 0,05 M (A)-méthanol (B). Gradient de 3 à 15% de B dans A, selon la courbe 6. Débit 2 ml/min. Détecteur UV à 273 nm.

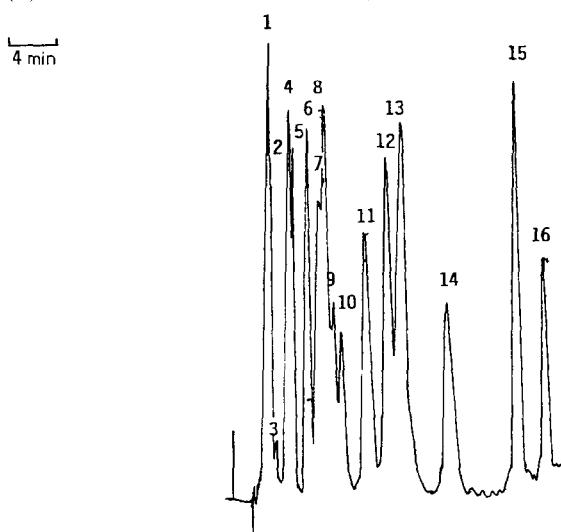


Fig. 7. Séparation de l'ensemble des molécules par CLHP en phase inverse avec appariement d'ions. 1 = Diméthyl-3,9 xanthine (XI); 2 = hypoxanthine (XIII); 3 = xanthine (I); 4 = acide urique (XIV); 5 = méthyl-7 xanthine (IV); 6 = méthyl-3 xanthine (III) + méthyl-8 xanthine (VI); 7 = méthyl-1 xanthine (II); 8 = méthyl-9 xanthine; (V); 9 = méthyl-3 acide urique (XV); 10 = théobromine (X); 11 = méthyl-7 acide urique (XVI); 12 = diméthyl-1,7 xanthine (VIII); 13 = diméthyl-1,9 xanthine (IX); 14 = théophylline (VII); 15 = caféine (XII); 16 = diméthyl-1,3 acide urique (XVII). Conditions chromatographiques: cartouche Nova-Pak C<sub>18</sub> à compression radiale. Phase mobile: solution aqueuse de phosphate de tétrabutylammonium 0,005 M (A)-méthanol (B). Gradient de 8 à 30% de B dans A selon la courbe 7. Débit: 2 ml/min. Détecteur UV à 273 nm.

La chromatographie de partage en phase inverse a permis d'étudier un plus grand nombre de molécules que la chromatographie d'adsorption. L'emploi d'une colonne à compression radiale n'a pas amélioré la résolution des pics, par rapport à l'utilisation d'une colonne classique.

Cependant, la mise en jeu du phénomène d'appariement d'ions a modifié l'ordre d'élution de certains composés et peut donc permettre de confirmer des identifications délicates et tout particulièrement de séparer xanthine et méthyl-9 xanthine qui ont le même temps de rétention dans la technique classique proposée.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. M. Callahan, *9th Colloquium on the Science and Technology of Coffee*, London, 1980.
- 2 J. L. Brazier et B. Ribon, *Med. Nut.*, 18 (1982) 295.
- 3 W. Wildanger, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 72 (1976) 160.
- 4 S. Sved et D. L. Wilson, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 17 (1977) 319.
- 5 O. H. Weddle et W. D. Mason, *J. Pharm. Sci.*, 65 (1976) 865.
- 6 A. Wahlländer, E. Renner et G. Karlaganis, *J. Chromatogr.*, 338 (1985) 369.
- 7 J. Blanchard, J. D. Mohammadi et J. M. Trang, *Clin. Chem.*, 27 (1981) 637.
- 8 C. Bory, P. Baltassat et C. Gonnat, dans A. Frigerio (Rédacteur), *Chromatography and Mass Spectrometry in Biomedical Sciences*, 2, Elsevier, Amsterdam, 1983, p. 105.
- 9 R. K. Desiraju, E. T. Sugita et R. L. Mayock, *J. Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 563.
- 10 L. C. Franconi et G. L. Hawk, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 372.
- 11 R. Klassen et B. Stavric, *J. Liq. Chromatogr.*, 6 (1983) 895.
- 12 B. Stavric, R. Klassen et S. G. Gilbert, *J. Chromatogr.*, 310 (1984) 107.
- 13 M. F. Vergnes et J. Alary, *Talanta*, 33 (1986) 997.