

*Małgorzata Grembecka, Marta Szpryngier, Beata Zabielska, Piotr Szefer*

## DOBÓR WARUNKÓW CHROMATOGRAFICZNYCH ROZDZIELANIA I OZNACZANIA TEOBROMINY W SUPLEMENTACH DIETY

Katedra i Zakład Bromatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: prof. dr hab. *P. Szefer*

*Dokonano doboru warunków rozdzielania i oznaczania teobrominy w wybranych suplementach diety z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych.*

Hasła kluczowe: teobromina, HPLC/UV-DAD, suplementy diety.  
Key words: theobromine, HPLC/UV-DAD, diet supplements.

Teobromina jest 3,7-dimetyloksantyną, alkaloidem purynowym występującym w wielu produktach żywnościowych, m.in. w kakao, czekoladzie i jej przetworach oraz herbacie. Jest ona jednym z najczęściej spożywanych alkaloidów na świecie (1, 2). Jednocześnie nieświadomie dostarczamy ją naszemu organizmowi, gdyż jest głównym produktem przemiany kofeiny, stąd też produkty bogate w kofeinę są również znaczącym źródłem teobrominy. Nie jest ona substancją obojętną dla organizmu, ale wykazuje szereg działań farmakologicznych. Farmakopea Polska (VI) (3) zalicza teobrominę do wykazu B – substancji silnie działających. Maksymalna doustna dawka jednorazowa wynosi 0,75 g, natomiast maksymalna doustna dawka dobową to 3 g. Z tego też względu należy zwracać uwagę na ilość kofeiny dostarczonej w ciągu dnia, uwzględniając jej obecność w pożywieniu, napojach, a także suplementach diety.

W celu wywołania działania moczopędnego rekomendowana dawka tego związku wynosi 300–500 mg, co odpowiada jego zawartości w 150–300 filiżankach herbaty, 2–3 filiżankach kakao, 60–100 g gorzkiej czekolady lub 170–340 g mlecznej czekolady. Jak wykazano, biodostępność teobrominy z produktów spożywczych takich, jak czekolada czy herbata jest znacznie mniejsza niż czystej substancji, co prawdopodobnie jest związane z obecnością w nich taniny i tłuszczu (1, 4).

Celem pracy była optymalizacja warunków oznaczania teobrominy w wybranych suplementach diety z wykorzystaniem HPLC i detekcją UV-DAD.

### MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiło 6 suplementów diety ogólnie dostępnych w sprzedaży, tj. Sesja, System Slim Figura 3. Stabilizacja, Teramax – Ginseng Exclusive Energy, Enerbox, Guarana Forte oraz Zielona Herbata.

Badane produkty poddano homogenizacji, która polegała na dokładnym roztarciu w młynku wcześniej zważonych tabletek, kapsułek (bez otoczek) bądź proszku. Z każdego suplementu diety pobierano po trzy 1 g odważki, które przenoszono ilościowo do kolby miarowej poj. 100 cm<sup>3</sup> za pomocą 50 cm<sup>3</sup> porcji wody dejonizowanej. Kolby wraz zawartością ogrzewano w gorącej łaźni wodnej przez ok. 3–5 min., a następnie chłodzono w strumieniu zimnej wody. Zawartość kolb uzupełniano wodą dejonizowaną do kreski i mieszano. Tak przygotowane próby zostały przesączone przez sączi bibułowe MN 615<sup>1/4</sup> (Ø 110 mm), a następnie przez sączi Titan 2 HPLC Filter LT, o średnicy 0,45 µm (RC Membrane).

Analiz dokonano za pomocą chromatografu UltiMate 3000 (Dionex, ESA) z detektorem UltiMate 3000 Photodiode Array Detector UV. Zadowalający rozdział chromatograficzny uzyskano przy zastosowaniu fazy ruchomej o składzie woda/metanol w proporcjach 80/20 v/v w przebiegu izokratycznym przy prędkości przepływu 1 cm<sup>3</sup>/min. Analizę przeprowadzono na kolumnie Thermo Hypersil Green ENV 5 µm (250 × 4,6 mm), a nastrzyk wynosił 20 µm. Wszystkie oznaczenia prowadzono w temp. optymalnej dla rozdziału chromatograficznego, wynoszącej 25°C oraz dla dł. fali 272 nm. Całkowity czas analizy dla teobrominy wyniósł 8 min, a czas retencji 5,1 min.

W celu potwierdzenia uzyskanych wyników dokonano walidacji zastosowanej metodyki, tj. określono jej dokładność, precyzję, powtarzalność, liniowość, zakres pomiarowy, granicę wykrywalności i oznaczalności (5).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przed przystąpieniem do analizy suplementów diety sporządzono sześć krzywych kalibracyjnych dla teobrominy. Miało to na celu sprawdzenie powtarzalności wskazań aparatu oraz umożliwienie wyznaczenia parametrów walidacyjnych takich, jak granica wykrywalności i oznaczalności. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji oraz granicę wykrywalności i oznaczalności dla zastosowanej metody analitycznej przedstawiono w tab. I.

Tab e l a I. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji (n = 6) teobrominy oraz granica wykrywalności i oznaczalności metody

Tab l e I. Analytical data of the averaged calibration curves (n = 6) and the limits of detection and quantification of theobromine

Parametr analityczny	Teobromina
Zakres oznaczalności (µg/cm <sup>3</sup> )	0,25–20
Wyraz wolny	0,0326
Współczynnik kierunkowy prostej	1,1959
Współczynnik korelacji	0,9999
Granica wykrywalności (ng/cm <sup>3</sup> )	48
Granica oznaczalności (ng/cm <sup>3</sup> )	145

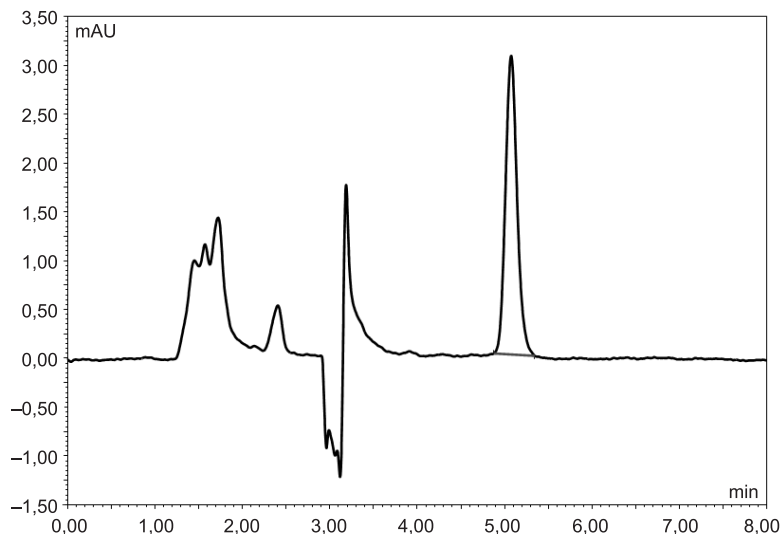
Uzyskany wysoki współczynnik korelacji pozwala stwierdzić, że istnieje liniowa zależność pomiędzy oznaczoną zawartością teobrominy, a otrzymaną powierzchnią piku w szerokim zakresie pomiarowym. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że precyzja zastosowanej metody wynosiła od 0,20 do 1,64%. Dokładność metody została zweryfikowana za pomocą metody dodawania wzorca. Analizowany materiał wzbogacono teobrominą w zakresie pomiarowym krzywej wzorcowej (tab. II). Wybrany suplement diety, Guarana Forte, wzbogacano kolejno 5, 10 i 20 mg teobrominy. Odzysk wyniósł odpowiednio 99%, 93,6% i 96% (średnio 96,2%), co jest zgodne z kryterium akceptacji odpowiadającym przedziałowi 95–105% (6).

Tab e l a II. Oszacowany odzysk teobrominy dla wybranego suplementu diety

Table II. Estimated recovery of theobromine in the chosen diet supplement

Nazwa suplementu	Liczba wykonanych prób n	Średnia zawartość mg/tabletka	Wzbogacenie (mg)	Odzysk (%)	RSD (%)	Błąd względny (%)
Guarana forte	12	4,82	5	99	2,69	-1,0
	12		10	93,6	0,20	-6,4
	8		20	96,0	2,09	-4,0

Spośród sześciu badanych suplementów diety jedynie Guarana Forte odznaczała się zawartością teobrominy w zakresie pomiarowym zaproponowanej metody. Średnie stężenie teobrominy w 1 kapsułce (masa kapsułki 0,55 g) Guarany Forte wynosiła 4,82 mg (ryc. 1). W trzech suplementach, tj. Sesji, System Slim Figurze



Ryc. 1. Chromatogram próbki badanego suplementu Guarana Forte,  $t_R = 5,1$  min.

Ryc. 1. Chromatogram of sample of Guarana Forte dietary supplement,  $t_R = 5,1$  min.

oraz Enerboxie zawartość tego związku była poniżej LOD. Natomiast w Zielonej Herbacie oraz Ginseng Exclusive Energy stężenie teobrominy znajdowało się powyżej granicy wykrywalności, jednak poniżej zakresu oznaczalności.

*Marchei* i współpr. (7), którzy podjęli się badań suplementów diety na obecność metyloksantyn przyjęli zakres pomiarowy dla teobrominy od 0,06 do 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Stwierdzili brak tego związku w trzech suplementach diety, natomiast w pozostałych osiemnastu zakres wahał się w przedziale od 12,1 do 193  $\mu\text{g}/\text{g}$ , dając średni wynik 84  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Produkty te odznaczały się znacznie większą zawartością teobrominy niż Guarana Forte, jedyne spośród sześciu suplementów, w którym oznaczono teobrominę na poziomie 8,83  $\mu\text{g}/\text{g}$ .

Zarówno w przypadku niniejszych badań, jak również tych przeprowadzonych przez *Marchei* i współpr. (7) żaden z badanych produktów nie posiadał na etykiecie informacji dotyczącej zawartości teobrominy. W związku z tym jedynym źródłem odniesienia mogą być dane podawane przez Farmakopeę Polską VI (6). Według tego źródła maksymalna dawka dobową to 3 g. W przypadku Guarany Forte zalecane przez producenta dzienne spożycie to 2 kapsułki, łącznie 9,64 mg teobrominy, co daje w przeliczeniu na dobową dawkę farmakologiczną zaledwie 0,3% jej wartości. Biorąc pod uwagę fakt, że przeciętny Polak spożywa dziennie 62 g czekolady (8), co odpowiada ok. 100–300 mg teobrominy (4), to w połączeniu z dwiema kapsułkami suplementu nie stanowi to nawet równowartości jednorazowej maksymalnej dawki farmakologicznej, wynoszącej 0,75 g.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż u osoby przyjmującej analizowane suplementy diety wg wskazań producenta, nie ma możliwości przekroczenia dawki zalecanej dla teobrominy.

M. Grembecka, M. Szpryngier, B. Zabielska, P. Szefer

SELECTION OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS FOR SEPARATION AND ANALYSIS  
OF THEOBROMINE IN DIETARY SUPPLEMENTS

Summary

The aim of the present work was to select optimal conditions for separation and determination of theobromine in selected diet supplements by HPLC with UV-DAD detection. The analysis was performed on a 5  $\mu\text{m}$  particle Thermo Hypersil Green ENV column (250x4.6 mm) and the UltiMate 3000 (Dionex, ESA) HPLC system provided with an UltiMate 3000 Photodiode Array UV Detector. Satisfactory separation was achieved with 20/80 v/v methanol/water mobile phase isocratic elution at 1 ml/min flow rate. The method described in this study was found suitable to determine concentrations of theobromine in the range 0.25-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and the detection limit was found to be 145 ng/ml.

PIŚMIENNICTWO

1. Steng M.U., Eyong E.U., Akpanyung E.O., Agiang M.A., Aremu C.Y.: Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 1997; 51: 231–243. – 2. Steng M.U., Eyong E.U., Eka O.U., Umoh I.B., Bong P.E., Ettarh R.R.: Caffeine and theobromine levels in selected Nigerian beverages. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2000; 54: 337–344. – 3. Farmakopea Polska (VI). Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2002. – 4. Matissek R.: Evaluation of xanthine derivatives in chocolate – nutritional and chemical aspects. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 1997; 205: 175–184. – 5. Konieczka P., Namieśnik J.: Walidacja procedur analitycznych. w: *Bulska E., Konieczka P., Namieśnik J.*

Ocena i Kontrola Jakości Wyników Pomiarów Analitycznych. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne 2007.  
– 6. *Jakubowska M.*: Walidacja metod analitycznych. Katedra Chemii Analitycznej Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej, 2009 [home.agh.edu.pl/~kca/an\\_zaooczneV\\_walid.ppt](http://home.agh.edu.pl/~kca/an_zaooczneV_walid.ppt). – 7. *Marchei E., Pellegrini M., Pacifici R., Palmi I., Pichini S.*: Development and validation of high – performance liquid chromatography – mass spectrometry assay for methylxanthines and taurine in dietary supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005; 37: 499–507. – 8. Główny Urząd Statystyczny, Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2008, Warszawa.

Adres: 80-416 Gdańsk, Al. Gen. J. Hallera 107.