

Maciej Bilek, Kinga Stawarczyk¹⁾, Agnieszka Stępień²⁾

ANALIZA ZAWARTOŚCI KOFEINY W NAPARACH KAKAO Z WYKORZYSTANIEM WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ*)

Wydziałowe Laboratorium Analiz Zdrowotności Środowiska i Materiałów Pochodzenia
Rolniczego, Wydziału Biologiczno-Rolniczego, Uniwersytet Rzeszowski
Kierownik: prof. dr hab. inż. J. Kaniuczak

¹⁾ Zakład Botaniki i Biotechnologii Roślin Użytkowych, Instytutu Biotechnologii
Stosowanej i Nauk Podstawowych, Uniwersytetu Rzeszowskiego
Kierownik: dr hab. Ł. Luczaj

²⁾ Zakład Biotechnologii, Instytutu Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych,
Uniwersytetu Rzeszowskiego
Kierownik: prof. dr hab. M. Gonchar

Oznaczono zawartość kofeiny w naparach sporządzonych z różnych rodzajów kakao, dostępnych w sklepach województwa podkarpackiego. Zawartość kofeiny ustalono za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV-Vis typu DAD. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż kakao w diecie dzieci i młodzieży stanowi marginalne źródło kofeiny.

Hasła kluczowe: kofeina, kakao, proszek kakaowy, napar kakaowy, HPLC–DAD.
Key words: caffeine, cocoa, cocoa powder, cocoa brew, HPLC–DAD.

Uprawa kakaowca praktykowana była przez ludy Mezoameryki już w czasach prekolumbijskich, a napoje sporządzane z jego nasion spożywano podczas obrzędów, rytuałów i ważnych uroczystości. *Linneusz* nadał drzewu nazwę *Theobroma cacao* (gr. *theos*–bóg i *broma*–pokarm), gdyż Indianie wierzyli, że pierwsze z nich zasadził bóg Quetzalcoatl (1).

Ziarna kakaowca, pozbawione łupiny nasiennej, w swoim składzie zawierają do 69% tłuszczu, 1–4% teobrominy, ok. 0,3% kofeiny, garbniki katechinowe (5%), procyjanidyny, flobafeny i skrobię (2).

Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) należy do szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie alkaloidów purynowych (3, 4). Występuje w liściach, owocach i nasionach ponad 60 gatunków roślin, m.in. w nasionach *Theobroma cacao*, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Paulinia guarana*, orzechach *Cola acuminata* i *Cola nitida*, liściach *Camelia sinensis* oraz *Ilex paraguariensis* (Yerba mate) (5, 6, 7). Obecnie najważniejszymi źródłami kofeiny w codziennej diecie są: kawa, herbata,

*) Badanie przeprowadzono w ramach projektu Centrum Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych (Program Operacyjny Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, NoPOPW.01.03.00-18-018/09).

kakao, guarana, napoje orzeźwiające (typu „soft drink”) i energetyzujące (4, 5, 6, 8). Kofeina syntetyczna lub pochodząca z dekofeinacji dodawana jest także do cukierków, czekolad, kremów, płatków śniadaniowych, napojów czekoladowych, gum do żucia i suplementów diety (8). Jest także składnikiem leków przeciwbólowych oraz preparatów łagodzących objawy grypy i przeziębienia (3, 9). Kofeina i surowce ją zawierające stosowane są także jako leki wzmacniające akcję serca, w migrenach, stanach zmęczenia, w zatruciach alkoholem i narkotykami (10, 11).

Metyloksantyny, do których należy kofeina, mają bardzo szeroki zakres działania, począwszy od moczopędnego, poprzez spazmolityczne, pobudzające ośrodek oddechowych, naczynioruchowy i ośrodkowy układ nerwowy. Wpływ kofeiny na układ nerwowy skutkuje polepszeniem procesów kojarzeniowych oraz zmniejszeniem zmęczenia i senności. Kofeina rozszerza także naczynia mózgowe i wieńcowe (10, 11). Przedawkowanie kofeiny skutkuje natomiast bezsennością, podnieceniem, zaburzeniami funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego, nerwowego i przewodu pokarmowego. Działanie moczopędne kofeiny przyczynia się ponadto do utraty wapnia z organizmu (3, 4, 5, 7, 9).

Celem przeprowadzonych badań było oznaczenie zawartości kofeiny metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w naparach uzyskanych z kakao i oszacowanie ewentualnego zagrożenia, wynikającego ze spożycia tych naparów przez dzieci i młodzież.

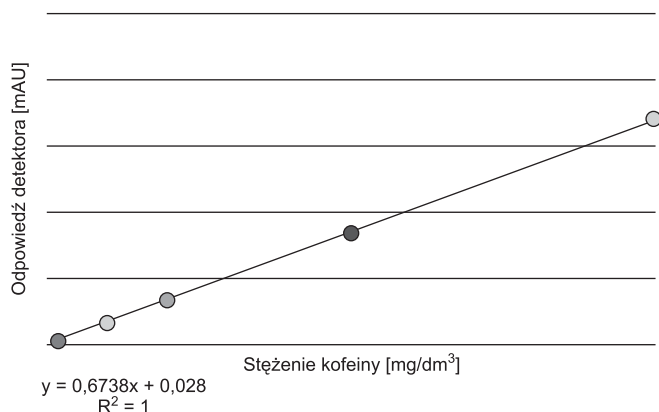
MATERIAŁ I METODY

Próbki kakao zostały zakupione na terenie województwa podkarpackiego (tab. I). Oznaczono zawartości kofeiny w naparze sporządzonym wg zaleceń producentów, czyli z dwóch łyżeczek kakao na szklanekę napoju, co stanowi ok. 5 g kakao na 250 cm³ naparu. Po otwarciu opakowania do analizy pobierano naważkę proszku kakaoowego o masie 1 g ($\pm 0,0001$ g), umieszczano w kolbie miarowej 50 cm³, a następnie uzupełniano wrzącą wodą destylowaną. Uzyskany napar po 10 min schładzano do temperatury pokojowej i uzupełniano wodą destylowaną do obj. 50 cm³. Napar sączano przez filtr strzykawkowy MCE o średnicy porów 0,45 μ m, 10-krotnie rozcieńczano i tak przygotowane próbki poddawano analizie chromatograficznej.

Oznaczenie zawartości kofeiny w naparach kakao wykonano za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego DionexUltiMate 3000 z detektorem UV-Vis typu DAD. Zestaw ten składał się z tacy na rozpuszczalniki, pompy analitycznej LPG-3400 z degazerem próżniowym, automatycznego podajnika próbek WPS-3000, termostatu kolumn TCC-3000 RS. Analizy wykonywano przy długości fali 274 nm. Zastosowano przepływ izokratyczny, a rozdział chromatograficzny prowadzono przy użyciu kolumny analitycznej BioBasic C18 (250 mm, 4,6 mm, ziarno 5 μ m) i kolumny ochronnej Uniguard Drop-In GuardColumnCartridgesBioBasic C18 (10 mm, 4,6 mm, ziarno 5 μ m) firmy ThermoScientific oraz optymalne warunki chromatografowania: obj. nastrzyku 20 μ l, prędkość przepływu fazy ruchomej 1 cm³/min, skład fazy ruchomej metanol : woda (30:70, v/v), temperatura tacy automatycznego podajnika próbek: otoczenia, temp. kolumny: 25°C. Czas analizy wynosił 10 min, przy czasie retencji kofeiny 5,1 min. Praca zestawu chromatogra-

ficznego i obróbka uzyskanych danych koordynowane były przez oprogramowanie Chromeleon ver. 6.8.

Krzywą kalibracyjną sporządzono dla serii wzorców kofeiny o stężeniach 1, 5, 10, 25, 50 mg/dm³ (ryc.1) Stwierdzono liniową zależność ($R^2 = 1$) zawartości kofeiny i wielkości sygnału detektora, wyrażonego powierzchnią piku.



Ryc. 1. Krzywa kalibracji dla kofeiny w zakresie od 1 do 50 mg/dm³ (5 poziomów stężenia).

Fig.1. Calibration curve for caffeine from 1 to 50 mg/dm³ (5 concentration levels).

Dokładność metody oszacowano poprzez oznaczenie zawartości kofeiny w fortyfikowanych próbkach naparów kakao dla całego zakresu stężeń. Średni odzysk kofeiny w naparach kakao wyniósł 87,9%, przy względnym odchyleniu standardowym wynoszącym 1,86%.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zawartość kofeiny w artykułach spożywczych w tym i w kakao jest zależna od wielu parametrów. Wpływają na nią m.in. gatunek, czynniki genetyczne i fenotypowe, sposób uprawy, dojrzałość roślin przy zbiorach, a w szczególności warunki fermentacji i obróbka technologiczna samych ziaren (mielenie, sposób tłoczenia tłuszczu, zastosowana alkalizacja). Istotne różnice w zawartości kofeiny np. w herbatach dostrzegane są także w zależności od sposobu przygotowania samych naparów (12, 13).

Przetestowano osiem potencjalnych długości fal sugerowanych w literaturze (13, 14). Jako optymalną przyjęto długość fali 274 nm (13) i przy niej wykonano wszystkie oznaczenia. Zawartość kofeiny w naparach kakao przedstawiono w tab. I.

Badane napary kakao zawierały zróżnicowane ilości kofeiny, wynoszące od 21,0 do 47,2 mg/dm³. Najwyższą zawartość odnotowano w naparze otrzymanym z surowego, sproszkowanego kakao firmy SuroVital, określanego przez producenta jako „organiczne”. Wynosiła ona 47,2 mg/dm³. Najniższą zawartość kofeiny stwierdzono w naparach produktów DecoMerreno, Cacao Majestic, Ivory, Królewskie, Cocoa

Powder i Kakao Ciemne, a jej średnia zawartość wynosiła 21–24 mg/dm³. W pięciu naparach z kakao (Wedel, Baroque, Delicante, Wawel i Royal Holland) oznaczono zawartości pośrednie kofeiny w zakresie 30–32,5 mg/dm³. Z wyjątkiem naparów uzyskanych z surowego, sproszkowanego kakao firmy SuroVital, określanego przez producenta jako „organiczne”, w pozostałych naparach stwierdzono zawartości kofeiny na poziomie zbliżonym do zawartości przedstawianych w dostępnej literaturze (3, 14, 15, 16).

Tab e l a I. Zawartość kofeiny w analizowanym naparze kakao

Tab l e I. Caffeine concentrations in the analysed infusions of cocoa powder

Nr	Nazwa kakao	Średnia zawartość kofeiny w naparze (mg/dm ³) ± SD, (n=3)	Zakres min – max (mg/dm ³)	Średnia zawartość kofeiny w kubku naparu kakao (mg/250 cm ³)
1.	Cacao DecoMerreno, extra ciemne Maspex–GMW sp.z o.o., Polska	21,9 ± 0,09	21,8 – 21,9	5,5
2.	Surowe kakao sproszkowane, SuroVital s.c. Polska	47,2 ± 0,65	46,4 – 47,6	11,8
3.	Cacao Majestic, Tesco/Food Care sp. z o.o., Polska	22,4 ± 0,625	22,0 – 23,1	5,6
4.	E. Wedel, E. Wedel sp. z o.o., Polska	30,1 ± 0,07	30,0 – 30,1	7,5
5.	Baroque, Biedronka/ Food Care sp. z o.o., Polska	31,3 ± 0,73	30,5 – 31,9	7,8
6.	Delicante, Celiko S.A., Polska	28,4 ± 0,25	28,1 – 28,5	7,1
7.	Ivory, Intermarche/ Celiko S.A., Polska	23,8 ± 0,19	23,7 – 24,1	5,6
8.	Royal Holland, Gellwe/ Food Care sp. z o.o., Polska	32,6 ± 0,30	32,3 – 32,9	8,2
9.	Królewskie, Gellwe/ Food Care sp. z o.o., Polska	21,0 ± 0,73	20,6 – 21,9	5,3
10.	CocoaPowder, wyprodukowane dla Tesco, Polska	23,8 ± 0,04	27,0 – 27,1	5,9
11.	Kakao ciemne, Krüger Polska sp. z o.o.	23,1 ± 0,08	22,9 – 23,1	5,8
12.	Wawel, Wawel S.A., Polska	31,5 ± 0,27	31,3 – 31,8	7,9

Kofeinę można zakwalifikować jako jeden z nielicznych, naturalnych środków pobudzających, prawnie dostępnych dla dzieci (17). Przykładowo 2–5-letnie dzieci w USA spożywają 16 mg kofeiny, 6–11-latki już 26 mg, a młodzież aż 59–80 mg kofeiny każdego dnia (9). Według danych literaturowych kubek kawy (w zależności od rodzaju i długości parzenia) zawiera od 20 do 182 mg kofeiny, herbaty: 18–80 mg, kubek Coca-Coli: ok. 20 mg, czekolady: od 18 do 74 mg/100 g, puszka napoju energetycznego: 80–120 mg kofeiny (3, 6, 12).

U dzieci długoterminowe skutki spożywania kofeiny nie są opisane, jednak wspomniane powyżej właściwości farmakologiczne wskazują na oczywistą konieczność kontroli spożywanej ilości kofeiny przez najmłodszych konsumentów. Jej maksymalne dzienne pobranie wraz z produktami spożywanymi przez dzieci i młodzież normowane jest jedynie w kilku krajach, m.in. w USA (1 mg/kg masy ciała), Niemczech (2,5 mg/kg masy ciała) i Wielkiej Brytanii (3 mg/kg masy ciała) (3). W Unii Europejskiej nie ma prawnych zaleceń dotyczących maksymalnego, dziennego pobrania kofeiny w tej grupie populacyjnej (9). W Polsce brak jest nie tylko tego typu unormowań prawnych, ale także aktualnych badań epidemiologicznych, informujących o ilości kofeiny spożywanej przez najmłodszych.

Jedynie wytyczne, które normują bezpieczne ilości przyjmowanej kofeiny, odnaleźć można w „Farmakopei Polskiej VIII”, klasyfikującej kofeinę czystą (*Coffeinum purum*) i jej monohydrat (*Coffeinum monohydryicum*), jako leki pobudzające. Dopuszczalna dawka jednorazowa zwykle stosowana dla osoby dorosłej to 100–200 mg, zaś dawka dobową wynosi 300–500 mg. „Farmakopea Polska VIII” określa także maksymalne dawki: jednorazową na 300 mg i dobową na 1500 mg (18). Kofeina nie jest uwzględniona w tabelach dawkowania leków dla dzieci i młodzieży (19), jednak korzystając z powszechnie stosowanych wzorów na obliczanie dawek można przyjąć, że dopuszczalna, jednorazowa lecznicza dawka kofeiny dla sześciolatka o prawidłowej masie ciała wyniesie 70–100 mg (wg wzoru *Clarka*), 75 mg (wg wzoru *Gowlinga*) i 100 mg (wg wzoru *Younga*). Z kolei dla dwunastolatka o prawidłowej masie ciała ilości te wynosić będą odpowiednio 140–200 mg (wg wzoru *Clarka*) i 150 mg (wg wzoru *Gowlinga* i *Younga*) (20).

Przedstawione powyżej wyniki wskazują wyraźnie, że kofeina dostarczana wraz z naparami kakao nie stanowi dla dzieci i młodzieży poważnego zagrożenia, pomimo ugruntowanych zwyczajów żywieniowych, przejawiających się wysokim spożyciem kakao przez najmłodszych.

WNIOSKI

1. Najwyższą zawartość kofeiny stwierdzono w naparze sporządzonym z surowego, sproszkowanego kakao (47,2 mg/dm³).

2. Zawartość kofeiny w naparach z różnego rodzaju kakao, w przypadku pozostałych naparów kakao, była większa niż 20 mg/dm³ (5 mg/250 cm³) i wynosiła od 21 do 32,5 mg/dm³.

3. Najniższą zawartość kofeiny oznaczono w naparze kakao DecoMerreno, CacaoMajestic, Ivory, Królewskie, CocoaPowder oraz Kakao ciemne i wynosiła ona 21–24 mg/dm³.

4. Zawartość kofeiny w naparach kakao poza jednym wyjątkiem (surowe, sproszkowane kakao firmy SuroVital s.c. Polska) była zgodna z danymi literaturowymi z innych krajów.

5. Kakao stanowi w żywieniu dzieci i młodzieży marginalne źródło kofeiny.

M. Bilek, K. Stawarczyk, A. Stępień

ANALYSIS OF CAFFEINE CONTENT IN COCOA INFUSIONS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Summary

The aim of this research was to determine the amount of caffeine in the cocoa infusions, and estimate the possible risk arising from the consumption of cocoa infusions by the youngest consumers. Caffeine concentrations were determined by High Performance Liquid Chromatography with UV/Vis detection (HPLC-DAD). Our results, except in one case (47,2 mg/dm³ – organic raw cocoa powder) are consistent with the relevant literature data (20–40 mg/dm³) and suggest that cocoa in the diets of children and adolescents is the marginal source of caffeine.

PIŚMIENICTWO

1. *Typek J.*: Od natury do receptury, niezwykle wynalazek natury. Farmacja Krakowska 2004; 3: 28-30.
- 2. *Kohlmünzer St.*: Farmakognozja. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998. – 3. *Frankowski M., Kowalski A., Ociepa A., Siepak J., Niedzielski P.*: Kofeina w kawach i ekstraktach kofeinowych i odkofeinowanych dostępnych na polskim rynku. *BromatChemToksykol.* 2008; 41(1): 21-27. – 4. *Paradkar M. M., Irudayaraj J.*: Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chem.* 2002; 78: 261-266. – 5. *Dworżański W., Opielak G., Burdan F.*: Niepożądane działania kofeiny. *Pol. Merk. Lek.* 2009; 27: 357-361. – 6. *Cichocki M.*: Napoje energetyzujące – współczesne zagrożenie zdrowotne dzieci i młodzieży. *Przegląd lekarski.* 2012; 69(10): 854-860. – 7. *Bojarowicz H, Przygoda M.*: Kofeina. Cz I Powszechność stosowania kofeiny oraz jej działanie na organizm. *ProblHigEpidemiol.* 2012; 93(1): 8-13. – 8. *Caudle G., A., Gu Y., Bell L. N.*: Improved analysis of theobromine and caffeine in chocolate food products formulated with cocoa powder. *Food Res Int* 2001; 31: 599-603. – 9. *Wierzejska R.*: Kofeina – powszechny składnik diety i jej wpływ na zdrowie. *Roczn.PZH* 2012; 63(2): 141-147. – 10. *Janiec W., Krupińska J.*: Farmakodynamika. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002. – 11. *Kohlmünzer St.*: Farmakognozja. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998
11. *Jarosz M., Wierzejska R., Mojska H., Świdorska K., Siuba M.*: Zawartość kofeiny w produktach spożywczych. *Bromat.Chem.Toksykol.* 2009; 3: 776-781. – 12. *Rosario Brunetto M., Gutierrez :L., Delgado Y., Gallignani M., Zambrano A., Gomez A., Ramos G., Romero C.*: Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chem.* 2007; 100: 459-467. – 13. *Belay A., Ture K., Redi M., Asfaw A.*: Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chem.* 2008; 108: 310-315. – 14. *Mandel H. G.*: Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food Chem. Toxicol.* 2002; 40: 1231-1234. – 15. *Zoumas B. L., Kreiser W. R., Martin R.*: Theobromine and caffeine content of chocolate products. *J. Food Sci.* 1980; 45(2): 314-316. – 16. *Bernstein G. A., Carroll M. E., Thuras P. D., Cosgrove K. P., Roth M. E.*: Caffeine dependence in teenagers. *DrugAlcoholDepend.* 2002; 66: 1-6. – 17. Farmakopea Polska wydanie VIII. Minister Zdrowia. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Warszawa 2008. – 18. *Bożkowska K., Sivińska-Golębiowska H., Prokopczyk J., Kamińska E.*: Dawkowanie leków u noworodków, dzieci i młodzieży. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005. – 19. *Jachowicz R. (red.)*: Receptura apteczna. Podręcznik dla studentów farmacji. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2010.

Adres: 36-100 Kolbuszowa, Werynia 502