

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Kristýna Vitoušová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

Elektrochemické stanovení theobrominu a theofylinu na elektrodách
uhlíkového typu

Bc. Kristýna Vitoušová

Diplomová práce

2019

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology
Department of Analytical Chemistry

Electrochemical determination of Theobromine and Theophylline at Carbon
Based Electrodes

Bc. Kristýna Vitoušová

Thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Vitoušová**
Osobní číslo: **C17491**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Elektrochemické stanovení theobrominu a theofylinu
na elektrodách uhlíkového typu**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s principy voltametrické analýzy a proveďte literární rešerši týkající se alkaloidů s xantinovým skeletem, možností jejich stanovení s důrazem na elektroanalytické metody.
2. V experimentální části proveďte, pomocí square-wave a diferenčně pulzní voltametrie, optimalizaci stanovení obou alkaloidů s využitím vybrané elektrody uhlíkového typu.
3. Navržené metody následně otestujte na modelových a reálných vzorcích.
4. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 9. 5. 2019

.....
Bc. Kristýna Vitoušová

Tímto děkuji vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D. za velmi zajímavé téma, trpělivost a pomoc při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat babičce, příteli a přátelům za podporu při studiu na vysoké škole.

ANOTACE

Práce je zaměřena na stanovení theobrominu a theofylinu na elektrodách uhlíkového typu. Teoretická část zahrnuje popis alkaloidů a jejich dělení, dále vlastnosti, využití a význam theobrominu a theofylinu. Jako další následuje kapitola o čokoládě, která je hlavním zdrojem těchto dvou alkaloidů, a na závěr je zmíněno několik metod, pomocí kterých je lze stanovit ve vzorcích potravinářského, biologického nebo farmaceutického typu. Experimentální část obsahuje přípravu potřebných roztoků, pracovních elektrod, použitých metod a zařízení. V části výsledky a diskuse je kromě úvodních experimentů uvedena optimalizace metody pro stanovení obou alkaloidů s následným ověřením spolehlivosti metody pomocí analýz modelových a reálných vzorků.

KLÍČOVÁ SLOVA

theobromin, theofylin, alkaloidy, voltametrie, kakaové boby, čokoláda, xanthiny, purinové alkaloidy

TITLE

Electrochemical determination of Theobromine and Theophylline at Carbon Based Electrodes

ANNOTATION

This work is focused on determination of theobromine and theophylline on carbon based electrodes. The theoretical part contains description of alkaloids and their distribution, as well as the properties, use and importance of theobromine and theophylline. Furthermore, there is a chapter about chocolate which is the main source of these two alkaloids, and finally there are several methods which can be used determination in food, biological or pharmaceutical samples. The experimental part contains preparation of necessary solutions, working electrodes and used methods and devices. In the results and discussion section, besides the initial experiments, the optimization of the method for the determination of both alkaloids with the subsequent verification of the method reliability by the analysis of model and real samples is presented.

KEYWORDS

Theobromine, Theophylline, alkaloids, Voltammetry, Cocoa beans, Chocolate, Xanthines, purine alkaloids

Obsah

1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 ALKALOIDY	11
2.2 THEOBROMIN	15
2.2.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti a syntéza	15
2.2.2 Výskyt a význam	17
2.3 THEOFYLIN	17
2.3.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti a syntéza	17
2.3.2 Výskyt a význam	19
2.4 KAKAO	20
2.5 METODY STANOVENÍ.....	26
2.5.1 Matrice a úprava vzorků	26
2.5.2 Voltametrická stanovení methylxanthinů	27
2.5.3 Chromatografická stanovení methylxanthinů	28
2.5.4 Další možnosti stanovení	29
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Chemikálie a materiály	30
3.2 Příprava pracovních elektrod	32
3.3 Přístroje a zařízení.....	33
3.4 Použité metody.....	33
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	34
4.1 Úvodní experimenty	34
4.2 Optimalizace podmínek voltametrického stanovení	42
4.3 Kalibrační závislost, mez detekce a mez stanovitelnosti	50
4.4 Analýza modelových vzorků.....	52
4.5 Analýza reálných vzorků.....	53
5. ZÁVĚR.....	54
6. POUŽITÁ LITERATURA.....	56

1. ÚVOD

Tato práce se zabývá stanovením theobrominu a theofylinu na elektrodách uhlíkového typu. V teoretické části jsou přiblíženy alkaloidy, zejména jejich vlastnosti a dělení. Z nich byly vybrány purinové alkaloidy, kam řadíme theobromin a theofylin. Byly popsány jejich fyzikálně – chemické vlastnosti, syntéza, využití a význam. Theobromin a theofylin jsou hlavními alkaloidy kakaa, o kterém je i jedna z následujících kapitol. Na závěr této části byly uvedeny metody, pomocí kterých lze tyto alkaloidy stanovit. Nejčastěji zvolenou metodou je vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) a méně častá jsou pak voltametrická měření, která jsou právě předmětem této práce.

Experimentální část zahrnuje přípravu jednotlivých roztoků, jako jsou standardní roztoky theofylinu a theobrominu a zásobní roztoky základních elektrolytů. Dále byla popsána příprava pracovních elektrod a obnova jejich povrchu před daným měřením. Byly zmíněny přístroje a zařízení použité pro měření. Poslední kapitola výsledky a diskuse obsahuje stanovení optimálních podmínek měření a jejich následné ověření na modelových a reálných vzorcích. Reálné vzorky čokolády a kakaového prášku byly upraveny vhodně zvolenou extrakcí a následně změřeny.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ALKALOIDY

Alkaloidy jsou dusíkaté bazické sloučeniny představující rozmanitou skupinu látek, kde jednotliví zástupci mají řadu rozdílných vlastností a biologických účinků. V současné době je jich známo již přes 10 000. Většina z nich náleží k rostlinným alkaloidům, které jsou obsaženy v semenech, listech, kořenech, kůře aj., vyskytují se v některých houbách a bakteriích a vzácně i u živočichů především u obojživelníků. Řada alkaloidů je přítomna v jedovatých rostlinách (amanitin v houbách, akonitin v bylině oměj šalamounek). Významným zdrojem jsou některé léčivé rostliny (kostival, rutnák, podběl, devětsil, řešetlák) a píceiny (bobovité, hvězdnicovité). Základní rozdělení alkaloidů, podle struktury, je uvedeno v tabulce 1. Méně nebezpečné alkaloidy chinin a kofein mohou být použity k aromatizaci potravin. Vyznačují se často hořkou chutí, pálivým účinkem nebo štiplavou vůní. V přírodě někdy působí jako ochrana před hmyzem. Předpokládá se, že účelem akumulace purinových alkaloidů je ochrana před poškozením mladých listů, květů a plodů škůdci [1,2]. Běžně je výraz alkaloid chápán jako jedovatá látka, ale biologický účinek těchto látek se značně liší a závisí také na dávce nebo délce jejich příjmu. Nejčastěji se vyskytují jako směsi látek příbuzné struktury, a to jako volné látky, N-oxidy, soli karboxylových kyselin, jejich estery nebo amidy, některé se vyskytují jako glykosidy. Některé jsou považovány za produkty detoxikace, regulátory růstu, rezervní formy dusíku [3]. Řada alkaloidů a příbuzných sloučenin se tvoří během termického zpracování potravin. Např. z tryptofanu při Maillardově reakci vzniká řada indolových alkaloidů jako jsou beta-karbolin a jeho deriváty (norharman, harman a vyšší homology), z derivátů chinolinu, chinoxalinu a dalších biologicky aktivních dusíkatých heterocyklických sloučenin [3, 4, 5].

Alkaloidy dělíme na 3 hlavní základní skupiny:

- **pravé alkaloidy** – jsou heterocyklické dusíkaté báze odvozené od aminokyselin. Mají široké spektrum fyziologických účinků a ve vysokých dávkách jsou toxické pro člověka i jiné živočichy. Pravým alkaloidem s pyridinovým kruhem je např. alkaloid nikotin a řada dalších alkaloidů tabáku. Od piperidinu je dále odvozen alkaloid pepře piperin, od pyrrolizidinu alkaloidy řady léčivých rostlin zvané neciny, od chinolizidinu alkaloidy lupiny, od chinolinu chinin z kůry chinovníku, morfin, kodein a další alkaloidy z opia.

- **pseudoalkaloidy** – jsou heterocyklické dusíkaté báze, ale jejich prekurzory jsou terpenoidy nebo puriny. Patří k nim alkaloidy kávy, čaje a kakaa (purinové alkaloidy jako kofein, theobromin či theofylin), ale také glykoalkaloidy (solanin a chakonin z brambor, tomatin z rajčat, rutin z černého bezu, čaje a pohanky). Potravinářsky významné pseudoalkaloidy jsou odvozeny od purinu nebo jsou steroidními sloučeninami, které obsahují v molekule dusík.
- **protoalkaloidy** – jsou bazické aminy odvozené od aminokyselin, ale dusík není součástí aromatického systému, např. kapsaicin vyskytujících se v pálivých paprikách [3, 4].

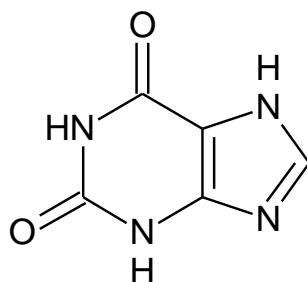
Tabulka 1: Přehled významných alkaloidů [3]

Dělení podle základního skeletu	Funkční skupiny	Prekurzory	Příklady
Pravé alkaloidy			
pyridinové, piperidinové, pyrrolidinové alk.	Lys, Arg, Orn, nikotinová kyselina	alkaloidy tabáku	nikotin, nornikotin, anatabin, anabisin
pyrrolizidinové alk.	Lys, Phe Arg, Ile, Leu, Orn, Val, Thr	alkaloidy pepře alkaloidy starčeku	piperin senecionin lupamin, lupinin
chinolizidinové, chinolinové alk.	Lys Trp, mevalonová kys.	alkaloidy lupiny alk. chinovníku	chinin, chinidin
Protoalkaloidy			
Kapsaicinoidy (vanillylamidy)	Leu, Phe, Val, maloyl Co-A	alkaloidy papriky	kapsaicin
Pseudoalkaloidy			
purinové alkaloidy	puriny	alkaloidy kávy, čaje, kakaa	kofein, theobromin, theofylin
steroidní (terpenoidní) glykoalkaloidy	mevalonová kyselina	glykoalkaloidy brambor, rajčat	solanin, tomatin

Mezi další významné skupiny týkající se, svou strukturou, této práce patří xantinové a purinové alkaloidy (viz. níže).

Xanthiny a methylxanthiny

Xanthin (3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion) (Obrázek 1) patří do skupiny purinu a má se za to, že má rozhodující biologický význam, protože hraje významnou úlohu jako meziprodukt při degradaci adeninu a guaninu na kyselinu močovou. Xanthin je ve vodě mírně rozpustný. Xanthiny jsou purinové báze, o nichž je známo, že působí jako antidepresiva, antiterapeutická a antihyperuricidní činidla. Jedním z derivátů xanthinu jsou kofein a theofylin, kteří se nacházejí v řadě farmaceutických přípravků a léčiv, protože mají vlastnosti jako jsou stimulace centrálního nervového systému, indukují sekreci žaludečních šťáv a působí jako diuretikum. Kromě toho jsou tyto sloučeniny považovány za rizikové faktory astmatu, selhání ledvin a kardiovaskulárních onemocnění [6, 7, 8, 9,10].

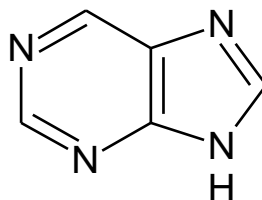


Obrázek 1: Strukturní vzorec xanthinu

N-methylderiváty xanthinu zahrnující theofylin, theobromin a kofein jsou alkaloidy, které jsou široce distribuovány v rostlinných produktech a nápojích. Tyto sloučeniny se přirozeně vyskytují v potravinářských výrobcích, jako jsou čaj, káva a kakaové boby, přičemž theobromin a kofein patří k významným xanthinům v čokoládě, a to nejen z pohledu obsahu, ale podílejí se i na chuti čokolády. Methylxanthiny jsou stabilní sloučeniny a s výjimkou reakcí při fermentaci čajových listů a kakaových bobů k dalším reakcím během technologického zpracování surovin a skladování prakticky nedochází [2, 3, 8, 11, 12, 13].

Purinové alkaloidy

Purin, 7H – imidazo[4,5-d] pyrimidin, je bicyklická molekula složená z kondenzovaných heterocyklů imidazolu a pyrimidinu. (Obrázek 2) Deriváty purinu obsahující kyslík jsou často zastoupeny v izomerní formě laktamu; stejně jako u xanthinu [14].



Obrázek 2: Strukturální vzorec purinu

Alkaloidy odvozené od purinu jsou nejrozšířenějšími alkaloidy v potravinách. Purin je produkt oxidace xanthinu a jeho deriváty jsou velmi rozpustné ve vodě [3]. Puriny obsahující hydroxylové skupiny vykazují špatnou rozpustnost ve vodě a organických rozpouštědlech, zatímco aminopuriny jsou poměrně rozpustné. S výjimkou kyseliny močové jsou sloučeniny amfoterní, čímž se získávají ve vodě rozpustné soli s kyselinami i bázemi. Kyselý charakter purinových derivátů se zvyšuje s počtem hydroxylových skupin v molekule. Body tání purinů jsou poměrně vysoké a jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Teploty tání vybraných purinů [14]

Název	Bod tání (°C)
Purine	217
Adenine	360–365
Guanine	365
Xanthine	-
Kyselina močová	-
Theobromin	351
Theofylin	269–272

Rozdíly v strukturách mezi těmito sloučeninami spočívají v tom, že –NH skupina v molekulách theobrominu a theofylinu je v kofeinu nahrazena skupinou N-CH₃, kde theobromin je izomer theofylinu [2, 12, 13]. Nejčastěji se stanovují v potravinářských výrobcích, biologických tekutinách nebo při kontrole jakosti bezkofeinových nápojů a čokolády, stejně jako ve výrobních procesech a ve farmaceutickém průmyslu [13].

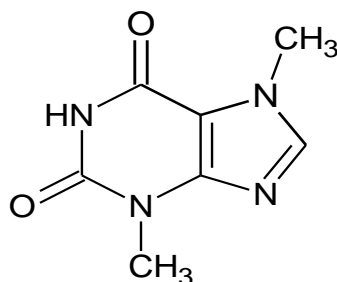
Z hlediska fyziologických poruch souvisejících s purinovým metabolismem je popsáno metabolické onemocnění způsobené nepřítomností xanthinové oxidasy (xanthinurie) a stejně tak i rozšířené onemocnění „dna“, kde se jedná o usazování kyseliny močové v kloubech v důsledku

její nadměrné koncentrace v krvi. Jiné organismy jsou schopné degradovat kyselinu močovou, dále na allantoin (většina savců a plazů), kyselinu antaloovou a nakonec močovinu (Ryby) [14]. Mnoho derivátů purinu nachází své uplatnění v medicíně díky širokému spektru biologické aktivity. Vykazují různé fyziologické účinky např. na centrální nervový, kardiovaskulární, gastrointestinální, respirační a renální systém [2, 12, 13]. Zajímavostí je, že u koní jde v případě kofeinu a theofylinu o zakázané látky, zatímco pro theobromin je stanovena hraniční koncentrace v moči 2,0 mg/ml [15].

2.2 THEOBROMIN

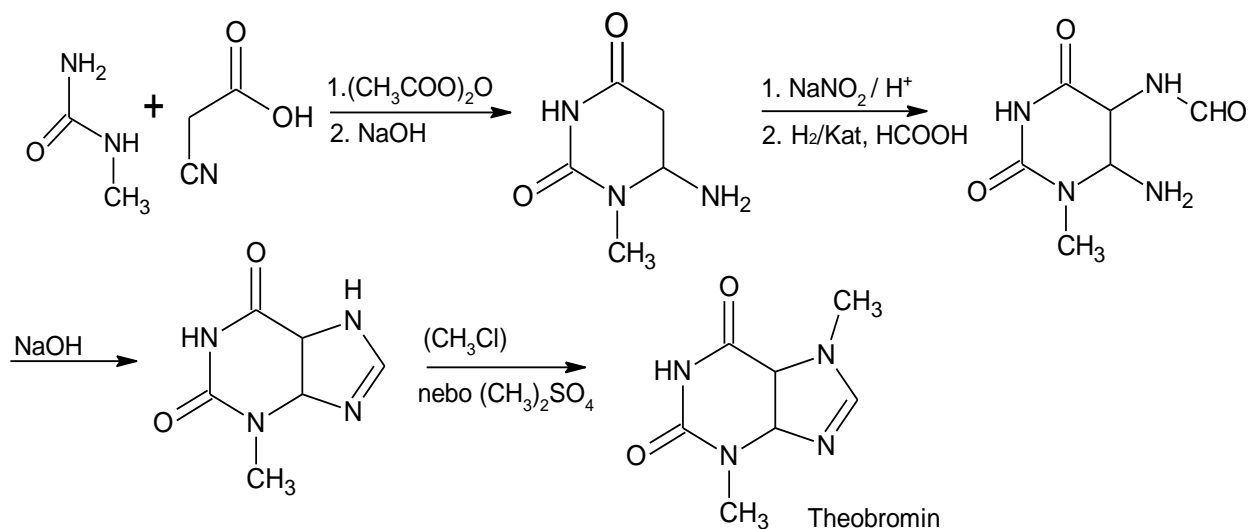
2.2.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti a syntéza

Theobromin (obrázek 3) je odvozen od slova Theobroma, což je rodový název kakaovníku. Theobromin byl prvně objeven v roce 1841 v kakaových bobech a prvně byl izolován z kakaových bobů v roce 1878 [16].



Obrázek 3: Strukturální vzorec Theobrominu

Jak můžeme vidět na obrázku 4, syntéza theobrominu začíná reakcí monomethylmočoviny s kyselinou kyanoctovou jako výchozích látek. Tato reakce vede k 3 - methylxanthinu, ze kterého methylací vzniká theobromin [14].



Obrázek 4: Schéma syntézy Theobrominu

Theobromin je ve vodě slabě rozpustný krystalický prášek, hořké chuti, bílé barvy [16, 17, 18, 19]. Theobromin a xanthin vykazují antioxidační i prooxidační vlastnosti [10]. Theobromin je málo rozpustný v ethanolu, rozpustný v kyselinách a zásadách a obtížně rozpustný v amoniaku, jak je uvedeno v tabulce 3. Soli theobrominu lze velmi snadno rozložit na volnou kyselinu a bázi ve vodném roztoku, zatímco volná báze je stabilnější [17, 18, 19]. Theobromin je toxický pro některé živočichy, např. psi, kteří jej metabolizují pomaleji než člověk [3]. Vzhledem k mírné akutní toxicitě theobrominu pro řadu živočišných druhů, legislativa EU stanovuje maximální obsah theobrominu v krmném materiálu. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) došel k závěru, že příjem theobrominu z živočišných produktů, např. masa, mléka a vajec je ve srovnání s přímou spotřebou kakaových výrobků zanedbatelný [16].

Tabulka 3: Fyzikálně chemické vlastnosti Theobrominu [5, 19, 20, 21]

Triviální název	Theobromin
Systematický název	3,7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion 3,7-dimethylxanthin 2,6-dihydroxy-3,7-dimethylpurin
Empirický vzorec	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
Molární hmotnost	180,16 g/mol
Registrační číslo	CAS 83-67-0
Bod tání	351 °C
Rozpustnost	slabě rozpustný <1 mg/ml ve vodě, ethanol: slabě rozpustný

2.2.2 Výskyt a význam

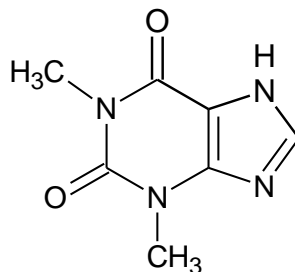
Theobromin je jedním z důležitých přírodních methylxanthinových alkaloidů v rostlinách a jejich produktech [18]. Theobromin je hlavní alkaloid kaka, který je přítomen v množství 3,7 % bez obsahu tuku a obsah kofeinu je 0,2 % [8, 22]. Ačkoli theobromin se nachází v několika rostlinách, primárními zdroji theobrominu v lidské stravě jsou čokoláda a kakaový prášek [5, 16, 18, 23]. Čokoláda obecně obsahuje 5-7,5 mg/g theobrominu [17]. Theobromin je také hlavní alkaloid v mladém perikarpu (oplodí) kakaového bobu a je přítomen v kotyledimech (děložní lístek) kakaových bobů. Množství theobrominu v kakau a kakaových produktech je ve srovnání s obsahem theofylinu vyšší [8].

V medicíně je theobromin využíván jako vazodilatátor, diuretikum a srdeční stimulant. Díky svým diuretickým účinkům a vasodilatační kapacitě byl použit k léčbě vysokého krevního tlaku [5, 16, 18, 23]. Kromě toho je theobromin slabým inhibítozem fosfodiesterázy a blokátorem receptoru adenosinu. Proto je důležitou a účinnou složkou léčiv kardiovaskulárních a renálních onemocnění při klinické léčbě [5,18]. Použití theobrominu přineslo pozitivní účinky na zdraví včetně ochrany povrchu zubů, potlačování kašle a kardiovaskulární ochrany, zvyšuje HDL cholesterol. Theobromin inhibuje tvorbu močových kamenů, což může být užitečné při léčbě pacientů s těmito potížemi [1]. Theobromin potenciálně inhibuje angiogenezi indukovanou buňkami rakoviny vaječníků prostřednictvím inhibice produkce vaskulárního endotelového růstového faktoru. [8]. Po svém objevení se theobromin využíval k některým terapeutickým účelům, např. při edémech, syfilis, poruchách oběhového aparátu (ateroskleróze, některých cévních chorobách, angině pectoris, hypertenzi) [16]. Theobromin se používá hlavně při výrobě pentoxifylinu [14]. Theobromin je údajně téměř třikrát účinnější při utišení kašle než kodein, který je považován za nejlepší lék proti kašli [24]

2.3 THEOFYLIN

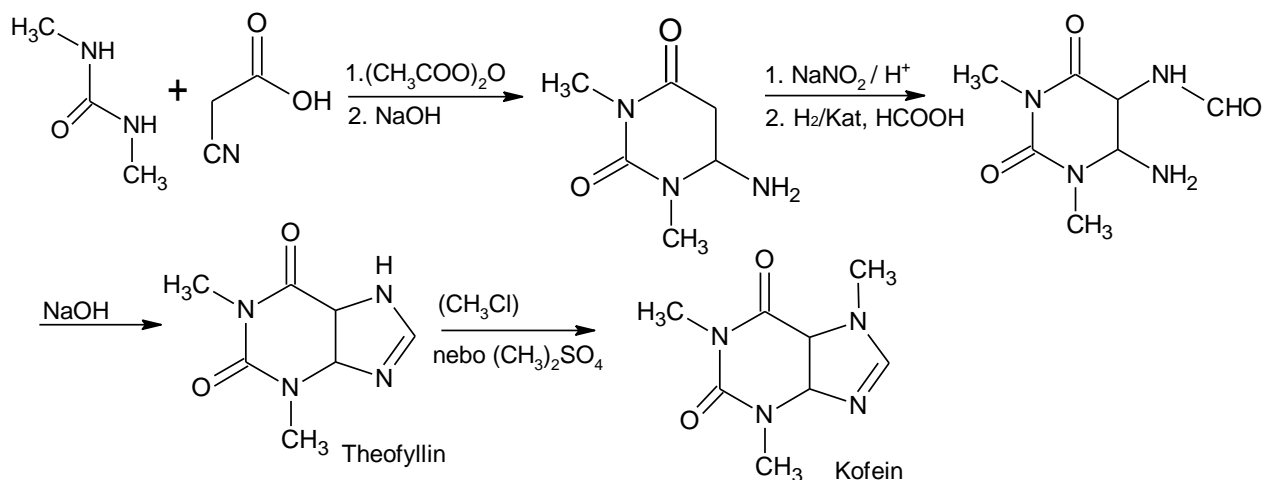
2.3.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti a syntéza

Theofylin (obrázek 5) a kofein mají velmi podobné chemické struktury, až na jednu methylovou skupinu. Zatímco theofylin je dimethylxanthin, kofein je trimethylxanthin, jen theofylin má o jednu – CH₃ skupinu méně [25,26]. Jako zástupce methylxanthinů nese strukturní a farmakologickou podobnost s kofeinem a theobrominem [9,27].



Obrázek 5: Strukturální vzorec Theofylinu

Byla popsána řada syntetických cest pro puriny s takovými výchozími látkami, jako je kyanovodík nebo formamid, ale byly dosaženy malé výtěžky. Reakce začínající N, N-dimethylmočovinou s kyselinou kyanoctovou vede ke vzniku theofylinu. Ten lze methylovat za vzniku kofeinu, jak můžeme vidět na obrázku 6 [14].



Obrázek 6: Schéma syntézy Theofylinu

V tabulce 4 jsou vypsány základní informace a fyzikálně – chemické vlastnosti. Theofyllin je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek hořké chuti a bez zápachu. Je obtížně rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v bezvodém ethanolu. Je rozpustný v roztocích alkalických hydroxidů, v amoniaku a v minerálních kyselinách.

Tabulka 4: Fyzikálně – chemické vlastnosti Theofylinu [19, 20, 21]

Triviální název	Theofylin
Systematický název	1,3 – dimethyl - 3,7 - dihydro -1H-purin-2,6-dion 1,3 - dimethylxanthin 2,6 - dihydroxy-1,3 - dimethylpurin
Empirický vzorec	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
Molární hmotnost	180,16 g/mol
Registrační číslo	CAS 58-55-9
Bod tání	273–274 °C
Rozpustnost	voda: 8,3 mg/ml slabě rozpustný NH ₄ OH: 50 mg/ml alkohol: 12,5 mg/ml 0,1 M HCl: rozpustný 0,1 M NaOH: rozpustný

Účinná koncentrace theofylinu je 5 až 20 µg / ml. Pokud je koncentrace vyšší než 20 µg / ml, může dojít k arytmií, horečce, dehydrataci, nespavosti, anorexii, kómatu a tachykardii, pálení žáhy, dokonce i zástavě dýchacích cest a srdeční zástavě [3, 28, 29, 30].

2.3.2 Výskyt a význam

Theofylin je přírodní alkaloid, který se nachází v potravinářských výrobcích a přírodních produktech jako je čaj, káva, kakaové boby a čokoláda. Theofylin se dále vyskytuje v celé řadě nealkoholických nápojů [9, 25 ,26, 27, 30]. Dále se theofylin vyskytuje v lékových formulacích, kde může být podáván orálně nebo i intravenózně, ale to se provádí jen zřídka kdy [28,29].

Bylo zjištěno, že theofylin může mít různé fyziologické a stimulující účinky, jako je relaxace bronchiálního svalu, sekrece žaludeční kyseliny a stimulace centrálního nerovného systému (CNS). Theofylin je jedním z nejčastěji používaných léků pro léčbu příznaků chronického astmatu. Theofylin má silnější stimulační účinek na CNS než kofein. Farmakologické účinky theofylinu jsou stimulace srdečního svalu a diurézy, může způsobit částečné blokování adenosinových receptorů [3, 11, 25, 28, 30, 31]. Jako vasodilatační činidlo se používá pentoxifylin, derivát theobrominu [14]. Theofylin se již dlouho používá k léčbě astmatických příznaků u dětí a dospělých, stejně jako apnoe u předčasně narozených dětí. Bezpečné a účinné použití theofylinu vyžaduje pečlivé úpravy dávkování na základě měření koncentrace theofylinu v krevním séru [27, 29, 32]. Během několika desetiletí byl theofylin používán jako terapeutická látka chronického

onemocnění dýchacích cest (astma). Na druhé straně jsou tyto sloučeniny v lidské plazmě všudypřítomné díky konzumaci celé řady nealkoholických nápojů. Vysoké množství těchto alkaloidů však v lidském těle způsobuje zřetelné podráždění gastrointestinálního traktu a způsobuje spoustu nežádoucích účinků jako jsou nevolnost, zvracení, tachykardie, palpitace, arytmie, bolesti hlavy, nespavost, anorexie, pálení žáhy. Kromě toho může být theofylin metabolizován v játrech systémem cytochromu P450 a následně se podílí na řadě nežádoucích interakcí s jinými běžně předepsanými léky [25, 26, 29].

2.4 KAKAO

Původ a historie využití kakaa

První zmínky o kakau historici připisují roku 2000 př. n. l. na základě nejstarších nálezů nápojových šálků a talířů se zbytky kakaa, které byly objeveny v Latinské Americe v malé vesnici v údolí Ulúa v Henduranu. V roce 200–900 n.l. kakao bylo jedním z hlavních produktů v mayském zemědělství a náboženství [8]. Kakao hrálo klíčovou roli v ekonomickém, společenském, náboženském a politickém životě pre-hispánských Mayů. Kakaový nápoj byl podáván mladým královským novomanželům a semena byla nabízena rodině nevěsty jako znamení úcty ze strany ženicha [23]. Například kakao se používalo jako dar pro zemřelé hodnostáře na jejich pohřebních ceremoniích [8]. Semena kakaa byla pro Maye tak cenná, že byly silnou jednotkou měny. Z toho vyplývá, že kakao nebylo dostupné společnosti ve větším měřítku a bylo k dispozici pouze pro ty, kdo měli moc a vliv [23]. V roce 1737 byl kakaovník nazýván *Theobroma cacao*, který odkazuje na mýtické pozadí stromu doslovně znamená „kakao, jídlo bohů“. Podle mexických zdrojů bylo pro kakao nalezeno až 150 způsobů užití kakaa jako léku. Byly využity různé části kakaa *Theobroma*, konkrétně kakaové boby připravené jako čokoláda, kakaová kůra, kakaové máslo, kakaový květ, kakaová buničina a kakaový list. Kakao bylo přivezeno do Evropy Španěly v roce 1505. V roce 1653 bylo kakao v Evropě používáno spíše jako lék než jako chutná potravina. Používání čokolády bylo uznáno jako stimulant funkce sleziny a další trávicí funkce. Navíc v 17. a 18. století byla čokoláda pravidelně předepisována nebo smíchána s léky pro všechny druhy onemocnění a onemocnění z nachlazení a kašle, aby podporovala trávení, plodnost, posílila duševní výkonnost i jako antidepresivum [8, 33, 34].

***Theobroma cacao* (Kakaovník pravý)**

Jde o zelený strom, který může dorůst do výšky pěti až osmi metrů. Kakaovník je jemná plodina a její stromy musí být chráněny před silnými větry, protože má poměrně slabý kořenový systém, půda musí být dobře provzdušňována a škůdci a nemoci musí být pečlivě kontrolovány. Bohatě kvete, za život vykvetě 50 000 až 100 000 květů, ale pouze jeden ze sta je oplodněn a stane se z něj plod – kakaový lusk. Plody rostou přímo na kmeni nebo silných větvích. (Obrázek 8) Na jednom stromu uzrává přibližně 50–80 plodů. Dnes obvykle trvá až 4 roky, než se kakaové stromy stanou produktivními a mohou zůstat produktivními 25–30 let. Zralé lusky, ty měří mezi 10–15 cm (průměr ve středu) a jsou 15–25 cm dlouhé, sklízí se dvakrát do roka, protože cyklus od opylení až do zralosti trvá přibližně 6 měsíců. Plod obsahuje asi 20–60 semen. (Obrázek 7) [23,34].

Kakao

Kakao je populární a důležitá aromatická přísada při výrobě nápojů a cukrovinek, želatiny, pečiva a obecně potravin. Stimulační účinek kakaa je způsoben přítomností purinových bází, jako je theobromin, theofylin a kofein. Odrůda, zralost ovoce, a fermentační proces ovlivňují obsah alkaloidů [22, 23]. Navíc přítomnost methylxanthinů, peptidů a minerálních látek může synergicky zvyšovat nebo snižovat antioxidační vlastnosti kakaa a kakaových výrobků [8]. Methylxanthiny mají jak pozitivní, tak negativní účinky na zdraví. Kakao je také bohaté na mikronutrienty, jako je měď nacházející se v kakau [8, 17].



Obrázek 7: Kakaový lusk



Obrázek 8: Kakaovník pravý

Kakaové boby

Semena jsou obsažena v pulpní látce v lusku. Druhy kakaových bobů rozeznáváme Criollo, Forastero a Trinitario. Criollo pochází ze střední Ameriky a jižního Mexika. Boby se používají k výrobě těch nejjemnějších a nejkvalitnějších druhů čokolád. Pododrůdy Criolla jsou Porcelana a Chuao. Forastero je původem z Brazílie. Jde o nejrozšířenější odrůdu s výraznou hořkostí a kyselostí, jeho pododrůdou je Arriba. Trinitario vzniklo křížením Criolla a Forestara. Mezi pododrůdy Trinitaria patří Sambirano, Rio Caribe a Sur del Lago [34, 35]. Kakaové lusky z kaka se sklízí a boby se odstraní a fermentují. Sušené a pražené boby obsahují asi 300 látek [36]. Kvalita kakaových bobů závisí na mnoha faktorech, jako je genotyp, půdní faktory, klimatické podmínky, a především posklizňové technologie [37]. Složení kakaových bobů je vypsáno v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení čerstvého kakaového bobu [23]

Složka	Průměrná koncentrace (% hm)	
	Dřeň	Semeno
Voda	80-85	35-45
Lipidy	<0,5	45-55
Cukry (sacharóza, glukóza a fruktóza)	10-16	0,5-2
Polysacharidy	1,5-3,0	14-20
Pektin	4-7	2,0
Protein	0,6	1,5
Organické kyseliny	1-3	0,3-0,9
Anorganické soli	0,5-1,0	0,5-1,0
Polyfenoly	<1,0	7-10
Alkaloidy (theobromin a kofein)	<0,1	3,5

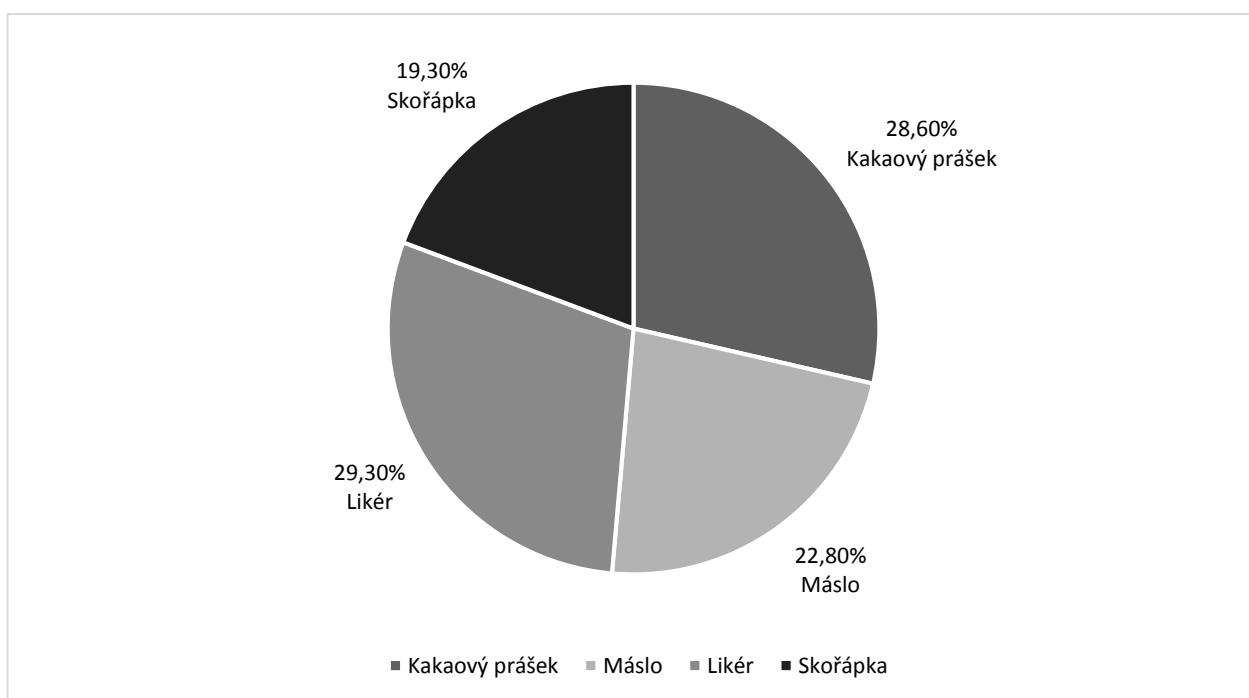
Celkový obsah alkaloidů kakaových bobů, semen kávovníku pravého (*Theobroma cacao*) bývá v rozmezích 0,7-3,2 % v sušině. V tabulce 6 je znázorněno procentuální zastoupení kofeinu a theobrominu v kakau a jeho výrobcích [3, 38].

Tabulka 6: Obsah Theobrominu a Kofeinu v kakau a jeho výrobcích

	Kakaové boby	Hořká čokoláda	Mléčná čokoláda	Čokoládové nápoje
Kofein	0,02 - 0,5 %	0,02 - 0,03 %	0,01 - 0,02 %	10 - 12,5 mg/l
Theobromin	0,6 - 3,1 %	0,3 - 0,7 %	0,1 - 0,4 %	260-440 mg/l

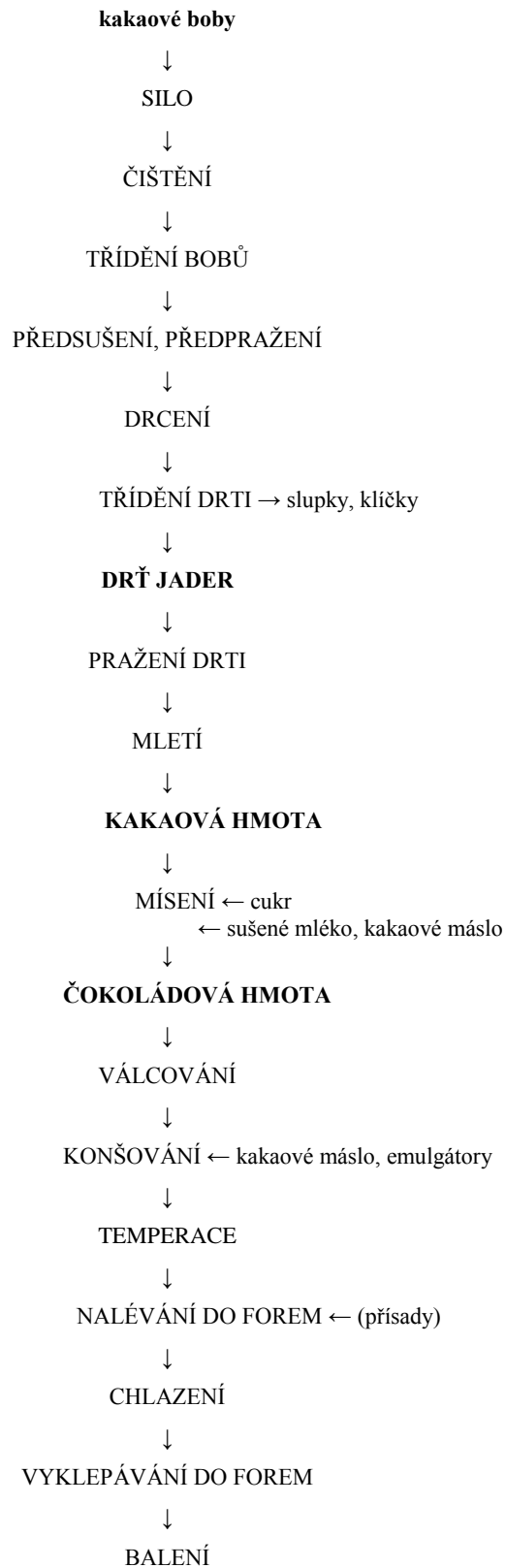
Technologie výroby čokolády

Kakaové boby jsou při zpracování čištěny a tříděny, následně praženy a rozemlety na kakaovou hmotu, která je dále zpracována na čokoládovou hmotu nebo je z ní vyráběn kakaový prášek. Zpracovatelské kroky sestávají v podstatě z míchání a hnětení surovin, rozpadu, předběžného vyčištění po přiložení cukru a kakaového másla ke kakaové hmotě, temperování, finální rafinace, plastifikace, skladování a tvarování [24,35]. Produkty při zpracování kakaava a jejich procentuální zastoupení jsou znázorněna na obrázku 9. Na obrázku 10 je uveden technologický postup zpracování kakaových bobů [23, 39].



Obrázek 9: Grafické znázornění vznikajících produktů při zpracování kakaových bobů

Kakaové máslo je nejen důležitým produktem pro potravinářský průmysl, ale také přísadou mnoha kosmetických a farmaceutických produktů. Kakaové máslo se získává výhradně lisováním nebo mechanickou extrakcí ve vyhřívaném lisu z kakaových hrotů nebo kakaové hmoty, a shromáždí se ve formě světle žlutého oleje [40].



Obrázek 10: Schéma technologického postupu zpracování kakaových bobů

Čokoláda

Hlavním kritériem pro kvalitu všech druhů čokolády je chuť, která může být negativně ovlivněna kontaminací plísněmi, ke které může dojít během fermentace, sušení nebo dokonce i během skladování, zejména ve vlhkém prostředí. Luskovité boby jsou výsledkem sušení předtím, než nastávají počáteční změny spojené s fermentací. Taková fazole neobsahují žádné z prekurzorů čokoládové příchutě. Čokoláda vyrobená z takových bobů má hořkou, trpkou a nepříjemnou chuť. Infikované boby jsou výsledkem napadení škůdci přítomnými ve skladech, jako jsou *Cadra cautela* (Mandlová můra), *Araecerus fasciculatas*, *Lasioderma serracorne* (Červotoč tabákový) a *Tribolium castaneum* (Potemník hnědý). Tito škůdci představují nebezpečí i pro jiné potraviny v čokoládových továrnách, kde je relativně snadné najít podmínky, ve kterých přežívají [35]. Čokoláda je vyráběna v mnoha druzích, které se člení do skupin podle jakostních požadavků s ohledem na obsah kakaa, cukru, mléka, tuku a ostatních ingrediencí dle vyhlášky 76/2003, jak je uvedeno v tabulce 7 [24,35]. Třídění výrobní skupiny čokoládových cukrovinek, je podrobně zpracováno v Zákoně o potravinách a tabákových výrobcích č.110/1997 Sb. ve vyhlášce 76/2003 Sb., oddíl 5, § 20. V příloze č. 8 této vyhlášky je uvedeno členění čokolád a čokoládových bonbónů na druhy a skupiny [41].

Tabulka 7: Dělení čokolády podle vyhlášky 76/2003

Druh	Skupina
čokoláda (hořká čokoláda) mléčná čokoláda family mléčná čokoláda bílá čokoláda	bez přísad s přísadami na vaření plněná
Chocolate a la taza Chocolate familiar a la taza	
čokoládové bonbóny formované	formované v různých tvarech, s různými náplněmi (tukovými, krémovými, likérovými atd.), nebo bez náplně
čokoládové bonbóny máčené nebo polomáčené	různé druhy vložek (želé, fondán, vylehčené hmoty pěnou a další), máčené čokoládou, mléčnou čokoládou, family mléčnou čokoládou, nebo bílou čokoládou, s výjimkou Chocolate a la taza a Chocolate familiar a la taza
čokoládové dražé	podle druhu vložek

Je zřejmé, že čokoláda může mít neurologické účinky, protože u citlivých jedinců vyvolá migrénu [42]. Čokoláda se má skladovat při teplotě do 20 °C a relativní vlhkosti maximálně 70 %. O čokoládě se v poslední době často hovoří v souvislosti s jejími pozitivními účinky na zdraví, zejména na snižování rizika kardiovaskulárních onemocnění, a i některých typů rakoviny. Čokoláda s vysokým obsahem kakaá je skutečně dobrým zdrojem antioxidantů [24.]

2.5 METODY STANOVENÍ

Pro současné stanovení methylxanthinů v potravinách a biologických tekutinách byly navrženy různé analytické techniky a protokoly pro přípravu vzorků. Po izolaci z matrice byly pro analýzu těchto složek použity různé analytické techniky, včetně vysoce výkonné kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS), spektrofotometrie, spektrofluorimetrie a voltametrie. Ve většině případů tyto metody zahrnují zdlouhavou předběžnou úpravu vzorků před samotným stanovením, dlouhé časy analýzy nebo omezené aplikace [2, 7, 9, 18, 22, 27, 37].

2.5.1 Matrice a úprava vzorků

Nejčastěji zkoumanými vzorky pro analýzu alkaloidů theobrominu, theofylinu a kofeinu jsou vzorky potravin, zejména káva, čaj, kakao a jejich výrobky, nealkoholické a energetické nápoje. Dalšími vzorky, které jsou významné pro farmaceutický průmysl jsou vzorky léků. Poslední významnou skupinou jsou vzorky biologického původu, a to moč a krevní sérum. Dále v této kapitole jsou popsány použité postupy při zpracování vzorků před voltametrickým stanovením.

PENG, GAO a MEKASSA zvolili velice podobný způsob zpracování vzorku před samotným stanovením. Navážili 1–5 g čaje, 2–7 g čokolády a 1–2 g kávy, které následně převedli do 50–100 ml horké vody a nechali vařit po dobu 30 minut. Následovala filtrace a po ní vzorky zředili a upravili na pH 7,0–7,5 fosfátovým pufrem [9, 18, 26].

HUANSHUN analyzoval vzorek čaje a mléčného nápoje, kdy vzorek čaje zpracoval obdobným způsobem viz. výše. Vzorek mléčného nápoje upravil následujícím způsobem. K 2,5 g vzorku přidal 10 ml vody. Roztok nechal intenzivně protřepávat, extrahovat ultrazvukem 10 minut a poté přidal 2 ml 0,085 M $K_4[Fe(CN)_6]$ a 2 ml 0,25 M roztoku $ZnSO_4$ po ochlazení na laboratorní teplotu. Výsledný roztok protřepával 2 minuty a zředil vodou. Roztok byl centrifugován 10 minut. Po filtraci filtrát převedl do odměrné baňky a zředil ho vodou [43].

TAJÍK vzorek čaje zpracoval zpočátku stejným způsobem tedy extrakcí ve vroucí vodě. Dále odebral 10 ml vzorku a nechal centrifugovat po dobu 15 minut. Vzniklý supernatant odfiltraval. Pak přenesl určitý objem roztoku do odměrné baňky a zředil ho na značku pomocí fosfátového pufru o pH 7,0 [30].

XIA pro přípravu vzorků kávy a kakaa zvolil následující postup. Navážil 5,0 g kávy a kakaa a 2,0 g MgO, který převedl do oddělených 250 ml baněk a přidal 150 ml destilované vody. Každý vzorek byl protřepáván a udržován v refluxu při 100 °C po dobu 45 minut. Po vytemperování na teplotu místnosti každý vzorek přefiltroval, filtrát převedl do dělicí nálevky a extrahoval 50 ml chloroformu. Organickou fází odpařil za použití rotační odparky a zbytek rozpustil ve 100 ml destilované vody [2].

ŠVORC opět zvolil stejný postup pro zpracování čokoládového vzorku. Pět čokoládových tyčinek každé značky zvážil a převedl na prášek pomocí třecí misky a tloučku. 1 g prášku rozpustil ve vroucí vodě a zfiltraval za sníženého tlaku. Filtrát doplnil deionizovanou vodou do 100 ml odměrné baňky, aby získal zásobní roztok čokoládového vzorku [44].

2.5.2 Voltametrická stanovení methylxanthinů

V předchozí kapitole jsme se seznámili se způsoby úpravy vzorků před analýzou. Nyní se zaměříme přímo na analýzy, zejména voltametrická stanovení. Všechna uvedená měření byla provedena pomocí LSV, DPV, CV a SW voltametrie v tříelektrodovém systému složeného z pracovní, referentní a pomocné elektrody. Jako pomocná elektroda sloužil vždy platinový drát. Měření by se dala rozdělit podle druhu použitých pracovních elektrod, a to na modifikované a nemodifikované. Práce, které se zabývaly stanovením na nemodifikovaných pracovních elektrodách, jsou zmíněny v následujícím odstavci.

CAMPEAN, SPATARU, a ŠVORC ke svému měření zvolili nemodifikované elektrody, konkrétně elektrodu ze skelného uhlíku, borem dopovanou diamantovou elektrodu a grafitovou tužkovou elektrodu. Pracovní a pomocnou elektrodu doplnili referentní elektrodou buď nasycenou kalomelovou elektrodou (SCE) nebo Ag/AgCl 3M (KCl). Elektrolyty, ve kterých měření prováděli byly různého druhu a odlišném pH, například acetátový pufr (pH 4,5); 0,1 M fosfátový pufr (pH 9,0); 0,04 M Britton – Robinsonův pufr (pH 2–12) a roztoky silných anorganických kyselin. Koncentrační rozmezí theobrominu bylo stanoveno v rozmezí 1–400 μM [6, 31, 45, 44].

PENG, GAO, ZEN, MEKASSA a HUANSHUN pracovali s modifikovanými elektrodami ze skelného uhlíku. V těchto pracích se můžeme potkat s elektrodou modifikovanou vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNTs), mezoporézním uhlíkem s Nafionem a kompozitních materiálů na bázi oxidů olova a ruthenia; CdSe. TAJÍK použil modifikovanou grafenovou pastovou elektrodu pomocí 1-(4-brombenzyl)-4-ferocenyl-1H-1,2,3-triazol (1,4-BBFT), který byl použit pro její konstrukci a (n-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát) byl použit jako pojivo. Opět jako pomocná elektroda byl použit platinový drát a jako referenční elektroda byla použita Argentochloridová Ag/AgCl (3M KCl) nebo nasycená kalomelová elektroda (SCE). Jako podpůrný elektrolyt zvolili 0,1 M fosfátový pufr (pH 2 - 11,0); 0,01 M H₂SO₄ (pH 1,7) [9, 18, 26 28, 30, 43].

2.5.3 Chromatografická stanovení methylxanthinů

Mezi nejpoužívanější metody ke stanovení methylxanthinů řadíme chromatografii. V tabulce je stručný výčet prací zabývajících se stanovení theobrominu a theofylinu pomocí chromatografie.

Tabulka 8: Chromatografické stanovení methylxanthiny pomocí HPLC

Kolona	Mobilní fáze	Detekce	Zdroj
C18 reverzní fáze kazeta Seppak	ACN a voda (20:80)	UV-VIS (276 nm)	[22]
NOVAPAK C18 Izokratické podmínky	20 % methanol ve vodě	UV detekce (274 nm)	[37]
LC-18-DB	methanol:pufr (oktansulfonát sodný, kyselina citronová) 20:80	UV detekce	[12]
Izokratická eluce	10 % acetonitrilu / 90 % vody	UV detekce 274 nm	[46]
Bondesil C18 Reverzní fáze	methanol/ethanol, CH ₃ COOH, H ₂ O, 20:75:5	UV detekce 273 nm	[13]
SF – silikagel s fluores. ind.	aceton/toluen/chloroform (4:3:3)	UV detekce	[47]
HPLC LiChrosorb Si 60	methanol	UV detekce 272 nm	[48]
MIP kolona	methanol, chloroform	UV detekce 270 nm	[32]

2.5.4 Další možnosti stanovení

Zatímco v předešlých kapitolách jsme si přiblížili metody nejpoužívanější a ty, kterých se týká tato práce, ještě zmíním tři méně obvyklé metody, a to extrakce ethanem a oxidem uhličitým, spektrofotometrická metoda stanovení, a nakonec metoda iontové mobilní spektrometrie.

SINGH stanovil kofein a theofylin v čistých alkaloidech nebo farmaceutických formulacích pomocí spektrofotometrické metody. Princip je založen na oxidaci kofeinu a theofylinu s metaperiodanem sodným v přítomnosti kyseliny octové a následné kopulaci s hydrochloridem 3 - methyl-2-benzothiazolinon hydrazonu (MBTH), čímž se získá modře zbarvený produkt s maximem 630 nm [27].

MOHAMED provedl superkritickou extrakci za použití etanu a CO₂, pomocí vysokotlakého zařízení. Extrakce provedl při 343,2 K za použití CO₂ při tlaku 20 a 40 MPa a etanu při tlaku 15–28 MPa. Výtěžky kakaového másla získaného extrakcí ethanem byly mnohem vyšší než výtěžky získané CO₂, a to z důvodu vyšší rozpustnosti tuku v etanu [40].

JAFARI jako první použil iontovou mobilní spektrometrii (IMS) bez separační techniky (např. HPLC). V této metodě sloučeniny extrahoval z matric a poté vyčistil pomocí molekulárně potištěné polymerní extrakce na pevné fázi (MIP-SPE). Eluát následně vstříkával do zařízení ESI – IMS. Když roztok prošel kolonou MIP, promyl ho směsí methanolu a vody. Nakonec nechal analyt eluovat methanolem, kde eluát po odpaření a následné úpravě analyzoval pomocí ESI-IMS [25].

DYKE se zabýval studií, která měla potvrdit přítomnost kofeinu v testu pozitivního vzorku moči u dostihového koně. Theobromin byl detekován pomocí HPLC po dobu 72 hodin a kofein GC-MS po dobu 48 hodin po chronickém požití arašídů máčených v čokoládě koňmi. Methylxanthiny byly detekovány pomocí ELISA po dobu 120 hodin po podání čokolády [49].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie použité k měření byly dodány od různých dodavatelů nebo byly připraveny v laboratoři. K přípravě roztoků byla používána destilovaná voda.

Seznam použitých chemikálií:

Dihydrogenfosforečnan sodný	PENTA CHRUDIM
Hydrogenfosforečnan sodný	PENTA CHRUDIM
Hydroxid sodný	PENTA CHRUDIM
Chlorid draselný	LANCHEMA – CHEMOPOL
Kyselina boritá	LANCHEMA – CHEMOPOL
Kyselina fosforečná	LANCHEMA – CHEMOPOL
Kyselina chlorovodíková	MERCK
Kyselina octová	LACHEMA – CHEMOPOL
Kyselina sírová	PENTA CHRUDIM
Kyselina chloristá	PENTA CHRUDIM
Tetraboritan sodný	PENTA CHRUDIM

Theobromin s molární hmotností 180,16 g/mol byl dodán firmou SIGMA ALDRICH v 25 g balení. Theofylin s molární hmotností 180,16 g/mol byl dodán firmou SIGMA ALDRICH v 50 g balení.

Příprava roztoků základních elektrolytů

Zásobní roztoky kyselin a pufrů použitých jako základní elektrolyty byly připraveny ve 100 ml odměrných baňkách o požadované koncentraci nebo pH. Odměrné baňky byly doplňovány destilovanou vodou a pro lepší rozpuštění bylo využito ultrazvukové lázně.

Zásobní roztoky kyselin o požadované koncentraci 0,1 M byly připraveny odměřením vhodného objemu do 100 ml odměrných baněk a doplněno destilovanou vodou. Chlorid draselný o koncentraci 0,1 M byl navážen, rozpuštěn, a nakonec doplněn destilovanou vodou po rysku.

Acetátový pufr 0,1 M o pH 4,26 byl připraven smícháním octanu sodného s kyselinou octovou a doplněn destilovanou vodou. Fosfátový pufr 0,1 M o pH 8,00 byl namíchán pomocí

dihydrogenfosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu sodného rozpuštěním v destilované vodě. Borátový pufr 0,1 M o pH 9,89 byl připraven rozpuštěním tetraboritanu sodného s hydroxidem sodným v destilované vodě. Dále byl připraven Britton – Robinsonův pufr, který se skládá ze dvou komponent. Složka A je zásaditá a obsahuje 0,2 M hydroxid sodný a kyselá složka B se skládá ze tří kyselin 0,04 M, konkrétně kyseliny fosforečné, kyseliny borité a kyseliny octové. Obě složky byly připraveny do 500 ml zásobních lahví.

Dále byly připraveny roztoky Britton – Robinsonova pufru zahrnující celou škálu pH smícháním složky A se složkou B v takových poměrech, aby se dosáhlo požadovaného pH a konečný objem byl 40 ml.

Příprava standardních roztoků

Byla připraveny standardní roztoky theobrominu o koncentraci $2,22 \cdot 10^{-3}$ mol/l a theofylinu o koncentraci 0,011 mol/l navážením standardů do 10 ml odměrných baněk. Ty pak byly vloženy na 5 minut do ultrazvukové lázně a následně doplněny destilovanou vodou po rysku. Takto byly uchovávané při laboratorní teplotě.

Příprava modelových vzorků

Modelový vzorek 1 byl připraven naředěním standardních roztoků theofylinu o koncentraci 0,011 mol/l a theobrominu o koncentraci $0,222 \cdot 10^{-3}$ mol/l a doplněn na 25 ml. Modelový vzorek 2 byl připraven stejným způsobem jako modelový vzorek 1 s jediným rozdílem, že byl doplněn roztokem filtrátu čokolády Figara na objem 50 ml. Skutečné koncentrace theofylinu a theobrominu byly stanoveny pomocí metody standardního přídatku a metodou kalibrační křivky. Jako zásobní elektrolyt byl pipetován fosfátový pufr o pH 8,00 na konečný objem 15 ml do voltametrické nádoby.

Příprava reálných vzorků

Vzorky čokolády a kakaového prášku byly zakoupeny v místním supermarketu a vzorek kakaových bobů byl zakoupen v obchodě se zdravou výživou. Vzorky byly extrahovány a uchovávané v lednici. Koncentrace reálných vzorků byla stanovena metodou standardního přídatku. Do voltametrické nádoby byl pipetován zásobní elektrolyt fosfátový pufr o pH 8,00 na konečný objem 15 ml.

Vzorky 70 % čokolády Lindt, 90 % čokolády Lindt a hořké čokolády Figaro byly zpracovány stejným způsobem. Bylo naváženo 6,5 g vzorku, které byly převedeny do 100 ml vroucí vody a bylo vařeno po dobu 30 min při 100 °C. Následně byl vzorek zfiltrován a filtrát převeden do zásobní lahvičky. Takto zpracované vzorky se uchovávaly v lednici při 5 °C.

Vzorek kakaových bobů a kakaového prášku byl zpracován tak, že bylo naváženo 3 g vzorku, ke kterým bylo přidáno 50 ml 0,1 M NaOH. Roztok byl vložen na 15 minut do ultrazvukové lázně a následně zfiltrován. Takto připravený roztok se převedl do zásobní lahvičky a uchovával v lednici.

3.2 Příprava pracovních elektrod

Uhlíková pastová elektroda s parafínovým / silikonovým olejem

K měření bylo využito uhlíkových pastových elektrod, které byly připraveny z CR5 uhlíku a uhlíku Sigradur G. Jako pojivo byl použit parafínový nebo silikonový olej.

Uhlíkové pastové elektrody byly připraveny, aby byly v poměru 75:25 %. Bylo naváženo 0,15 g práškového uhlíku CR5 a k němu postupně přidáván v prvním případě parafínový a v druhém případě silikonový olej na konečnou hmotnost 0,2 g. Tato směs byla převedena do třecí misky a pomocí keramického tloučku byla homogenizována, dokud nevznikla pasta, kterou pomocí špachtle bylo naplněno elektrodové tělo o průměru 2 mm. Před každým měřením bylo třeba obnovit povrch elektrody. V případě uhlíkových pastových elektrod byl povrch obnovován pomocí vlhkého filtračního papíru.

Uhlíková pastová elektrody ze skelného uhlíku

Dalším typem elektrody je elektroda ze skelného uhlíku, která byla připravena v poměru 80:20 %. Bylo naváženo 0,16 g uhlíku Sigradur-G a doplněno pomocí parafínového oleje na hmotnost 0,2 g. Následně stejným způsobem byla směs homogenizována do vzniku pasty a bylo jí naplněno elektrodové tělo, ale jen do 1 cm, kvůli zatuhnutí pasty v těle elektrody.

Po přípravě všech typů použitých uhlíkových pastových elektrod bylo nutné zkontrolovat jejich funkčnost a správné naplnění pomocí měření ohmického odporu za použití běžného multimetru.

3.3 Přístroje a zařízení

K voltametrickému měření byl použit elektrochemický analyzátor PGSTAT 128N (Metrohm-Autolab, Nizozemí) vybavený stojanem pro elektrody, elektrochemickou nádobkou, magnetickým míchadlem. Pro měření byly použity elektrody zmíněné v předchozí kapitole, které byly připraveny v laboratoři a dále elektroda ze skelného uhlíku (GCE) (Metrohm, \varnothing 2mm) a bórem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) (Windsor Scientific, UK), kdy jejich povrch se oproti uhlíkovým pastovým elektrodám obnovoval leštěním. Měření probíhalo v tříelektrodovém systému, kdy pracovními elektrodami byly výše uvedené doplněné referentní elektrodou typu Ag/AgCl 3M KCl a jako pomocná elektroda sloužil Pt plíšek. Byl použit software „NOVA 1.11“. K měření pH byl použit přenosný pH metr (ORION STAR 325, Fischer Scientific, ČR) s Rossovou elektrodou.

3.4 Použité metody

Square wave voltametrie (SWV)

Metoda square wave voltametrie byla použita v úvodních experimentech při výběru vhodné elektrody a prostředí. Povrch pastových elektrod byl obnoven způsobem zmíněným viz. výše před každým měřením. Měření bylo provedeno při uvedených podmínkách, předdefinovaných softwarem:

Počáteční potenciál: 0 V

Koncový potenciál: 1,4 V

Rychlost skenu: 0,125 V/s

Frekvence: 25 Hz

Diferenčně pulzní voltametrie (DPV)

Diferenčně pulzní voltametrie byla využita jak při úvodních experimentech a následně při optimalizaci podmínek, tak i k samotnému měření modelových a reálných vzorků. Povrch elektrod byl obnovován stejně jako u square wave voltametrie. Podmínky byly následující:

Počáteční potenciál: 0 V

Koncový potenciál: 1,5 V

Amplituda pulzu: 25 mV

Délka pulzu: 0,05 s

Rychlost skenu: 10 mV/s

Pro účely optimalizace bylo vždy do měrné nádoby pipetováno 15 ml příslušného elektrolytu a k němu bylo přidáno určité množství standardního roztoku theofylinu o c 0,011 mol/l případně standardního roztoku theobrominu u koncentraci $2,22 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

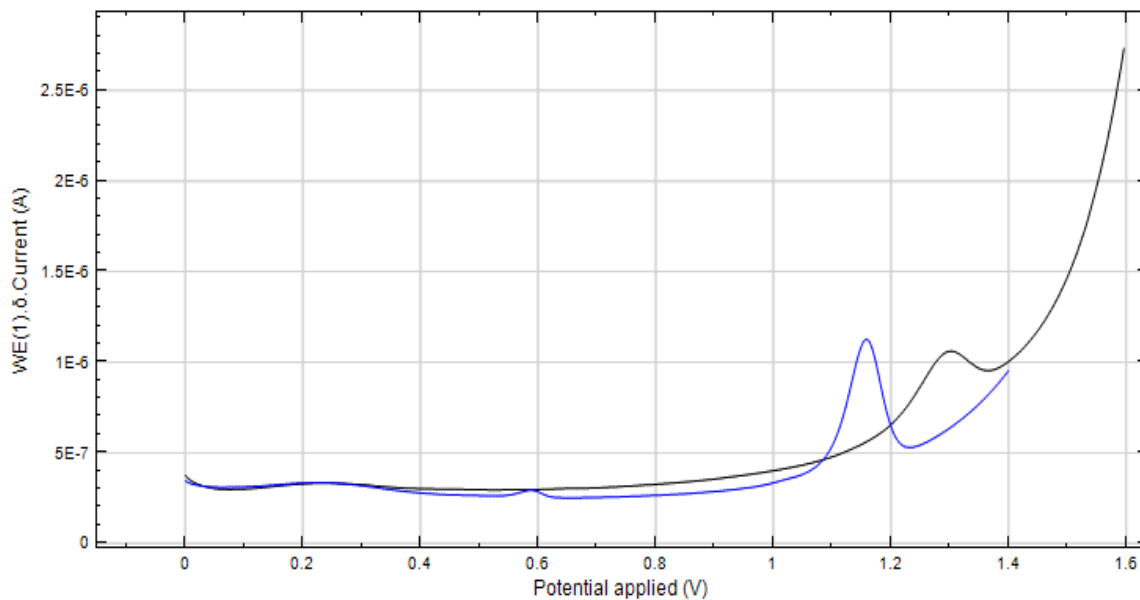
4.1 Úvodní experimenty

Výběr vhodného elektrolytu, elektrody a techniky

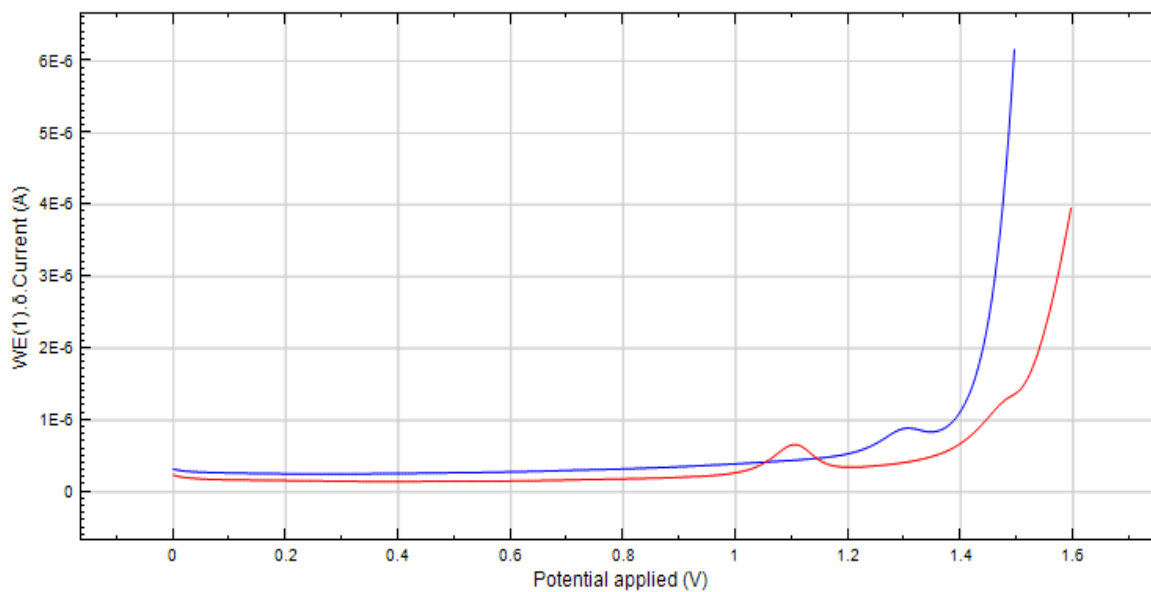
Cílem úvodních experimentů bylo vybrat techniku, typ elektrody a vhodné prostředí pro stanovení theofylinu a theobrominu. Byly testovány elektrody BDDE, GCE, GCPE, CR5/PO a CR5/SO. Měření bylo provedeno technikou SWV a DPV za předdefinovaných podmínek softwaru NOVA 1.11 a byly použity elektrolyty 0,1 M H₂SO₄, HCl, KCl, HClO₄ a acetátový pufr (pH 4,21), fosfátový pufr (pH 7,44), borátový pufr (pH 9,89), B–R pufr B (pH 1,81) a B–R pufr A.

Důležité bylo, aby oba signály byly od sebe navzájem dobře rozlišitelné a nepřekrývaly se. Výběr základního elektrolytu byl následně zúžen na fosfátový pufr, Britton – Robinsonův pufr a acetátový pufr s využitím elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a techniky diferenčně pulzní voltametrie (DPV), která poskytovala vyšší signály než SWV. Jak je vidět z obrázků 11 a 12, k oxidaci v Britton – Robinsonově pufru (pH 1,81) a acetátovém pufru (pH 4,21) dochází pro theofylin při potenciálu 1,1 V a pro theobromin při potenciálu 1,3 V. Co se týče možného použití zbývajících elektrod, v případě pastových elektrod bylo pozorováno příliš vysoké pozadí, což by v důsledku vedlo k nižší citlivosti metody. Měření s BDDE sice nabízelo slibné výsledky, nicméně pouze pro oddělená stanovení obou alkaloidů.

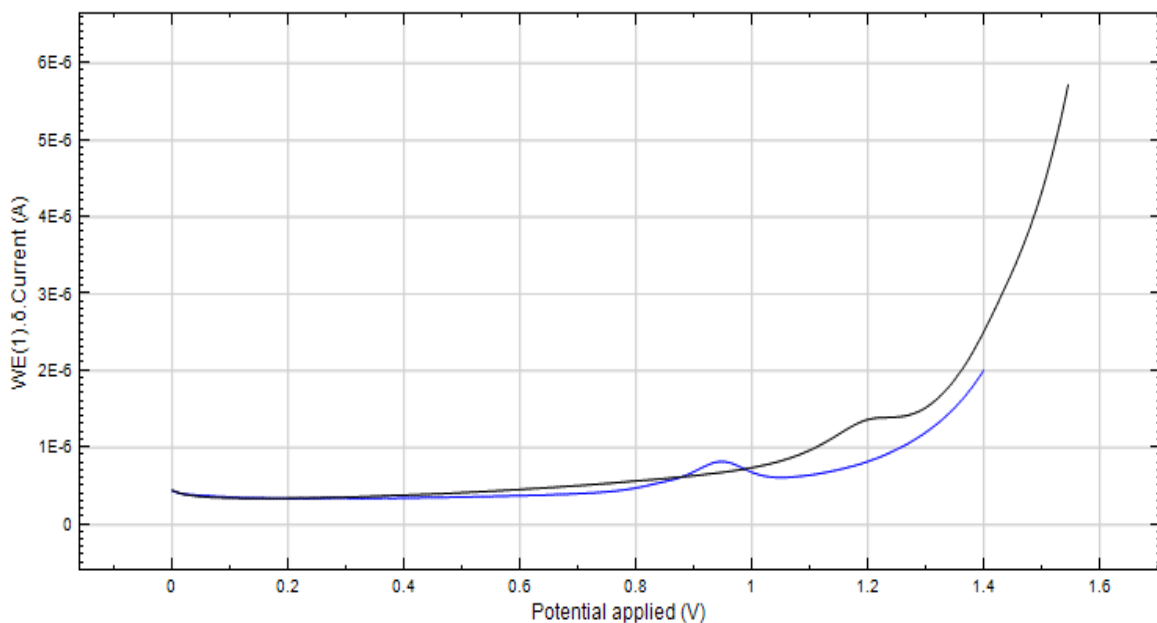
Obrázek 13 ukazuje, že v prostředí fosfátového pufru (pH 7,44) se theofylin oxiduje při potenciálu 0,9 V a theobromin se oxiduje při potenciálu 1,2 V. Lze vyvodit, že s rostoucím pH hodnoty potenciálu klesají, viz. pH studie. Obrázek 14 a 15 znázorňuje příklad nevhodných podmínek, kdy se píky obou látek překrývají.



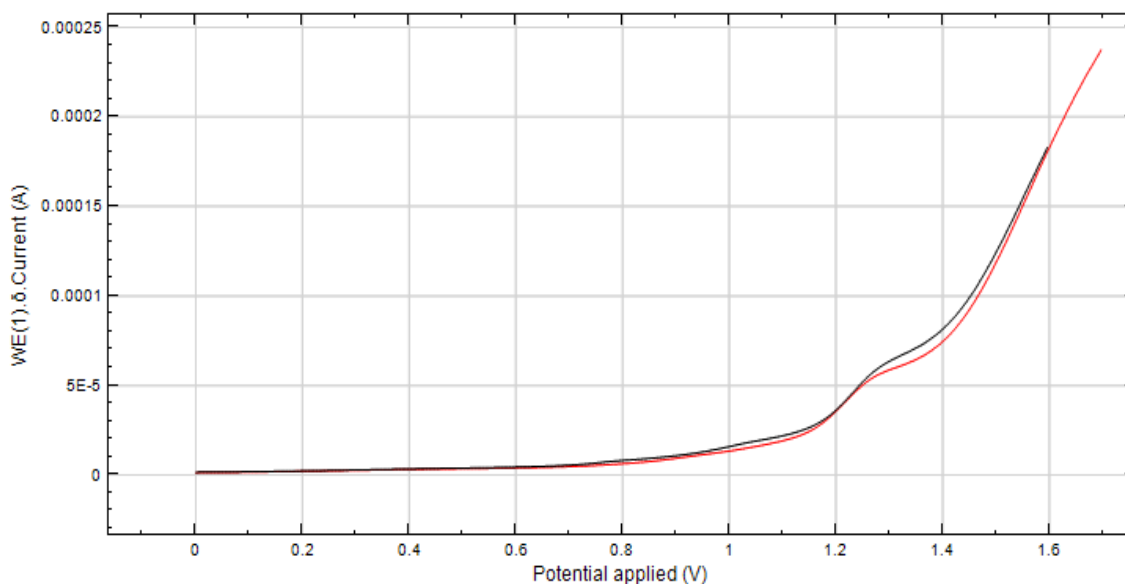
Obrázek 11: Voltamogram DPV theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l (modrá) a theobrominu o koncentraci $30 \cdot 10^{-6}$ mol/l (černá) na GCE v B-R pufru B (pH 1,81)



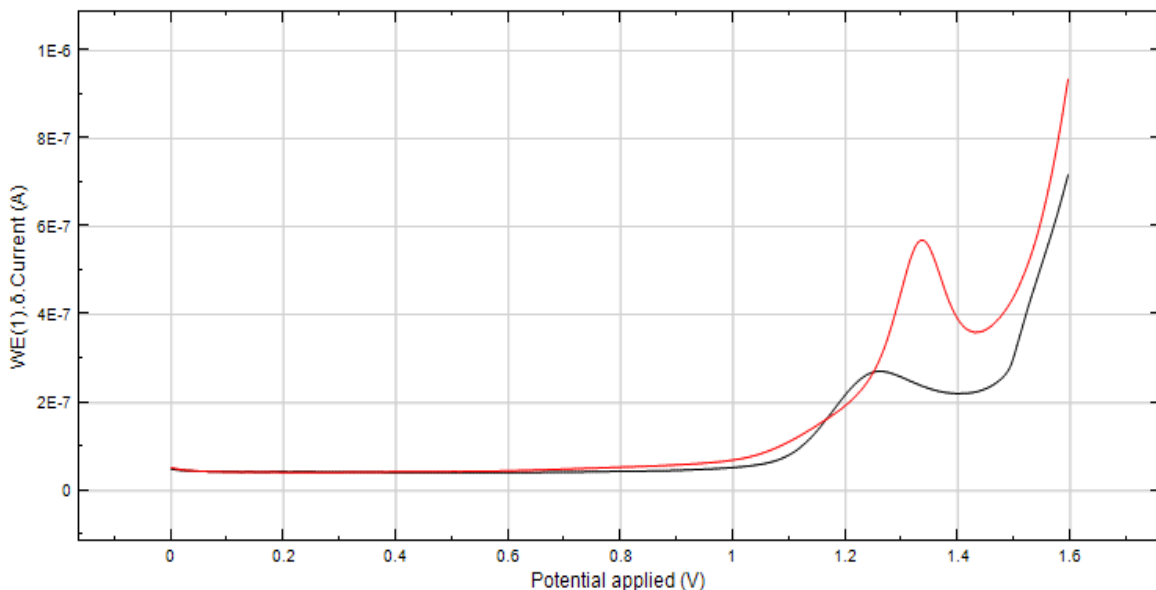
Obrázek 12: Voltamogram DPV theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l (červená) a theobrominu o koncentraci $30 \cdot 10^{-6}$ mol/l (modrá) na GCE v acetátovém pufru (pH 4,21)



Obrázek 13: Voltamogram DPV theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l (modrá) a theobrominu o koncentraci $30 \cdot 10^{-6}$ mol/l (černá) na GCE v prostředí fosfátového pufru (pH 7,44)



Obrázek 14: Voltamogram SWV theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l (černá) a theobrominu o koncentraci $30 \cdot 10^{-6}$ mol/l (červená) na GCE v Britton – Robinsonově pufru A (0,2 M NaOH)

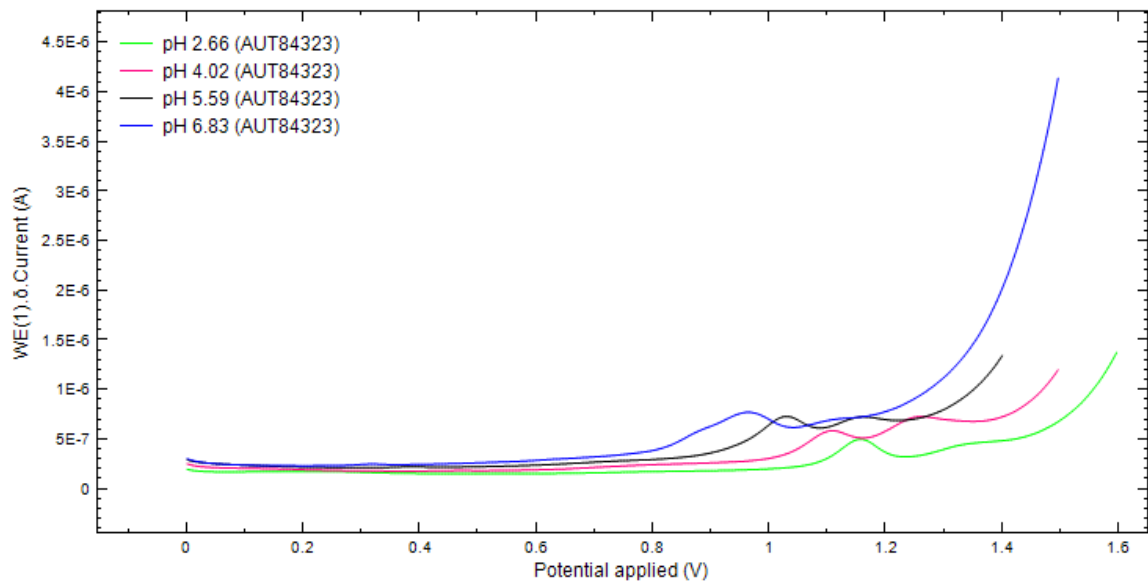


Obrázek 15: Vzorový voltamogram (DPV); theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l (černá) a theobrominu o koncentraci $30 \cdot 10^{-6}$ mol/l (červená) na BDDE v acetátovém pufru (pH 4,21)

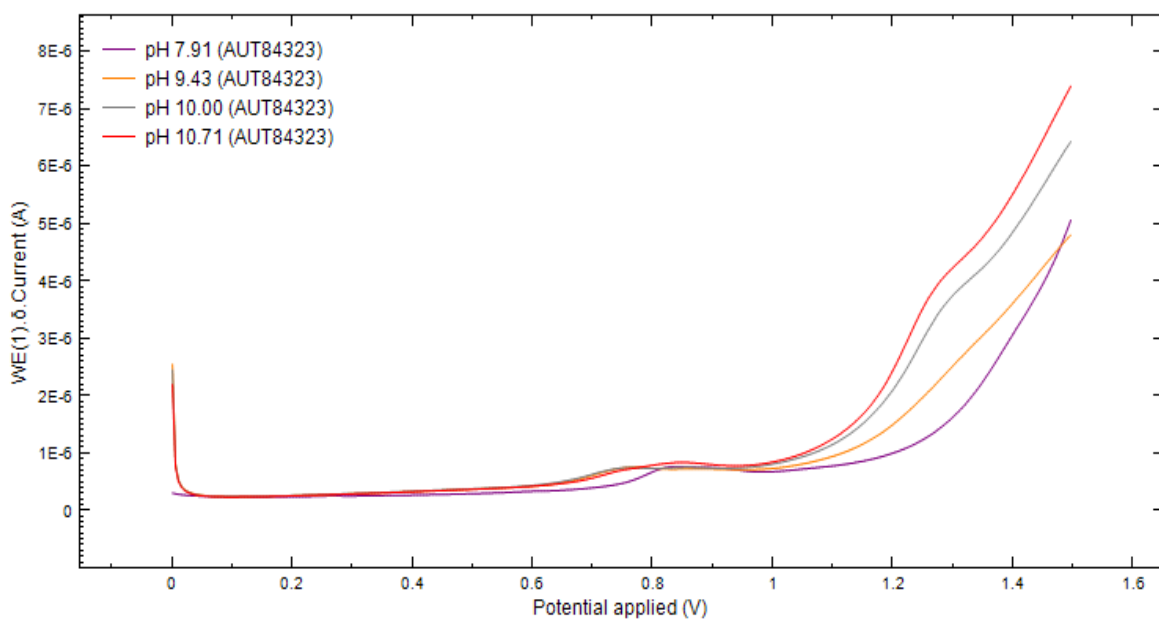
Závislost na pH

Z úvodního měření vyplynulo, že nejlepší elektrodou je GCE a metoda DPV v prostředí Britton – Robinsonova pufru B (pH 1,81). Dalším krokem bylo namíchat pomocí B–R pufru A a B roztoky zahrnující celou škálu pH a sledovat tak jeho elektroaktivitu. Při pH 9,23 vznikaly problémy, kdy měření byla nevyhodnotitelná, kvůli špatnému signálu a neostrému píku. Bylo tedy třeba vyměnit B–R pufr za borátový, aby bylo možno doměřit roztoky v celé škále pH. Podle R. G. Batese a V. E. Bowera byl namíchán borátový pufr smícháním příslušných objemů tetraboritanu sodného s 0,1 M hydroxidem sodným o jednotlivých pH 9,43, 10,00 a 10,71 a doměřeno opět stejným způsobem.

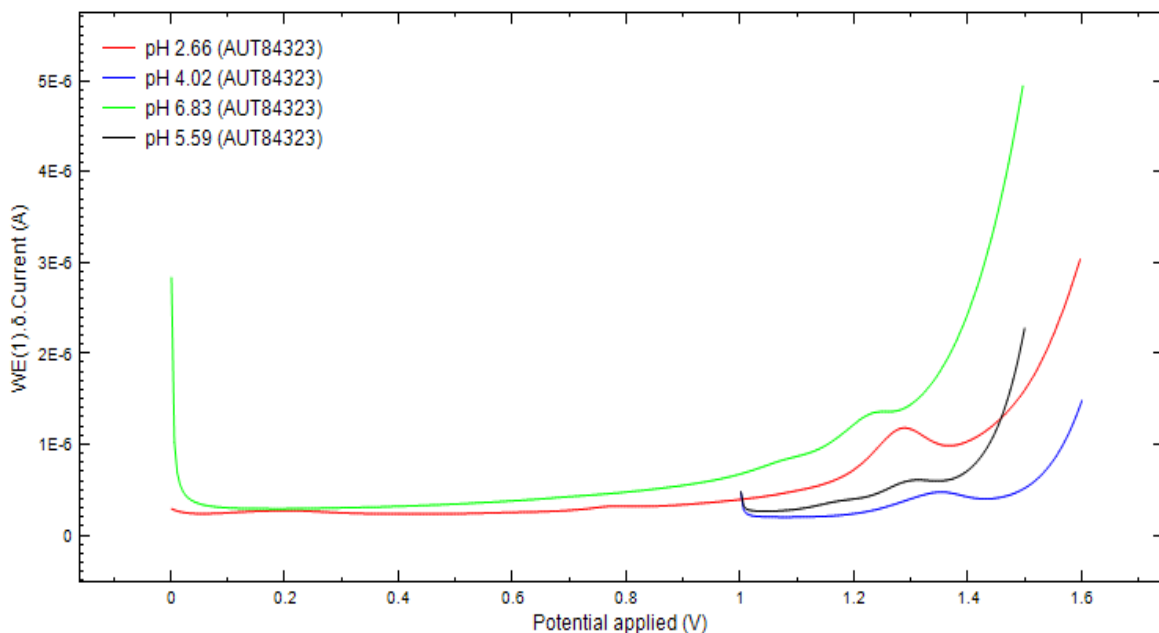
Obrázek 16 ukazuje voltamogram v kyselém prostředí a obrázek 17 v zásaditém prostředí theofylinu, tak je tomu i obrázek 18 a 19 pro theobromin. Můžeme vidět, že s rostoucím pH se píky posouvají k méně pozitivnějším potenciálům. Nejlepší signály jsou v kyselém a neutrálním prostředí. Čím více je prostředí alkalické, tím jsou píky širší a hůře vyhodnotitelné. Byl sestrojen graf, kde byly vyneseny závislosti proudu I a potenciálu E píků na pH. (Obrázek 20 a 21) Z grafu na obrázku je zřejmé, že nejlepší pH je 7,91.



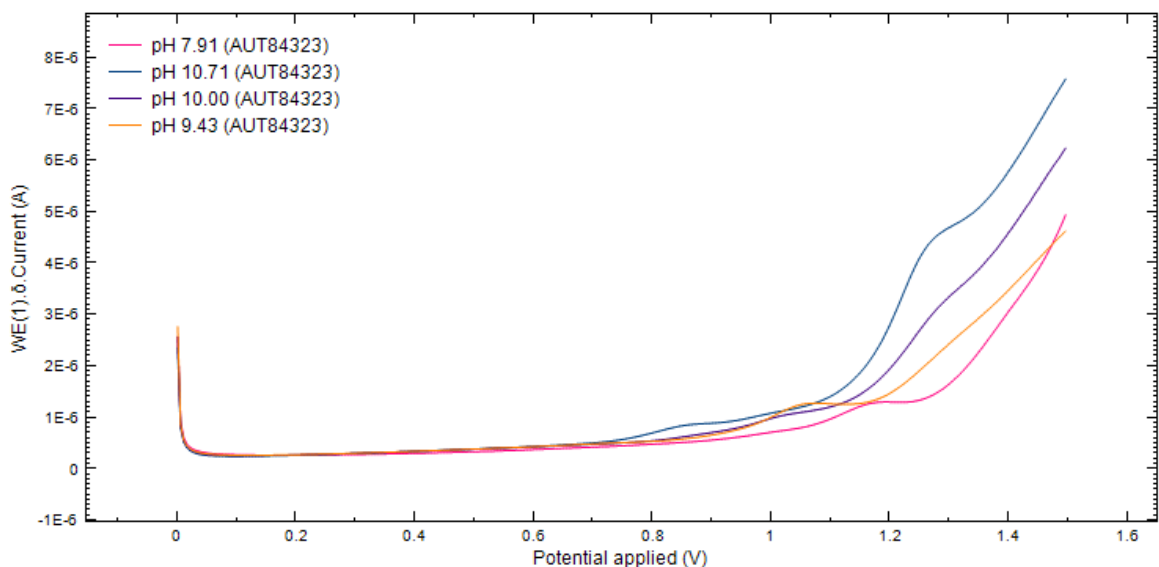
Obrázek 16: Voltamogram theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l v kyselém prostředí v Britton – Robinsonově pufru v rozmezí od 2,6 – 6,83 pH, na GCE, metoda DPV



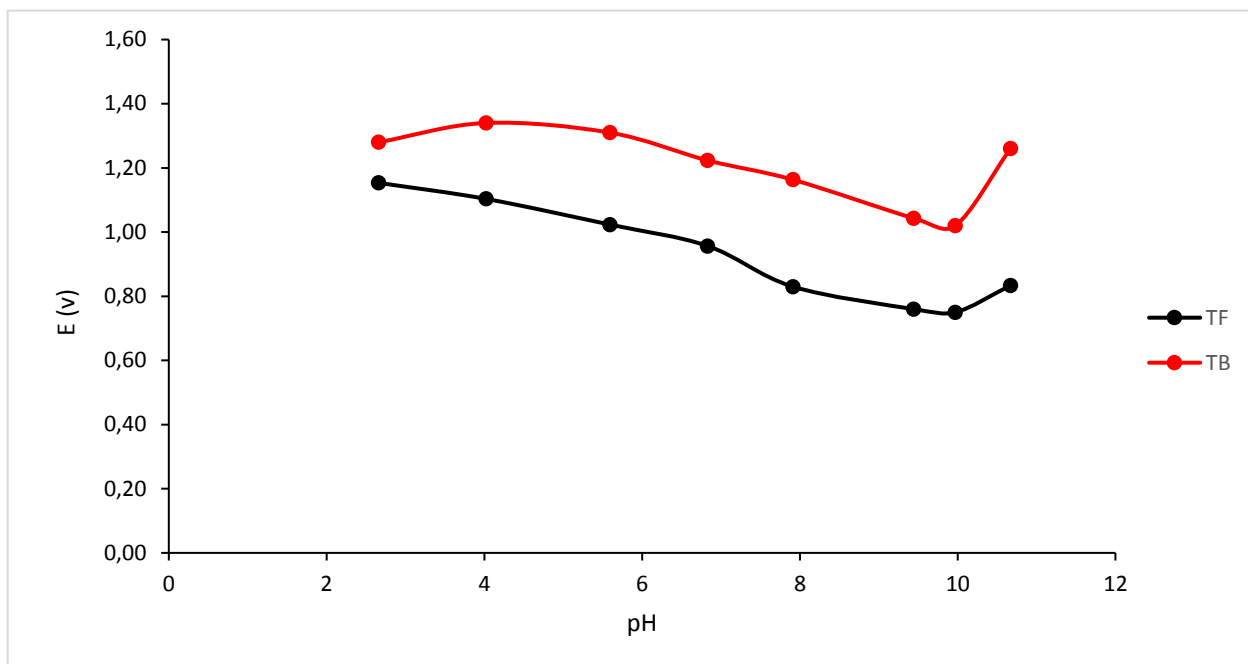
Obrázek 17: Voltamogram theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l v alkalickém prostředí, Britton – Robinsonova pufru A + B a v prostředí borátového pufru v rozmezí od 7,91- 10,71 pH, na GCE, metoda DPV



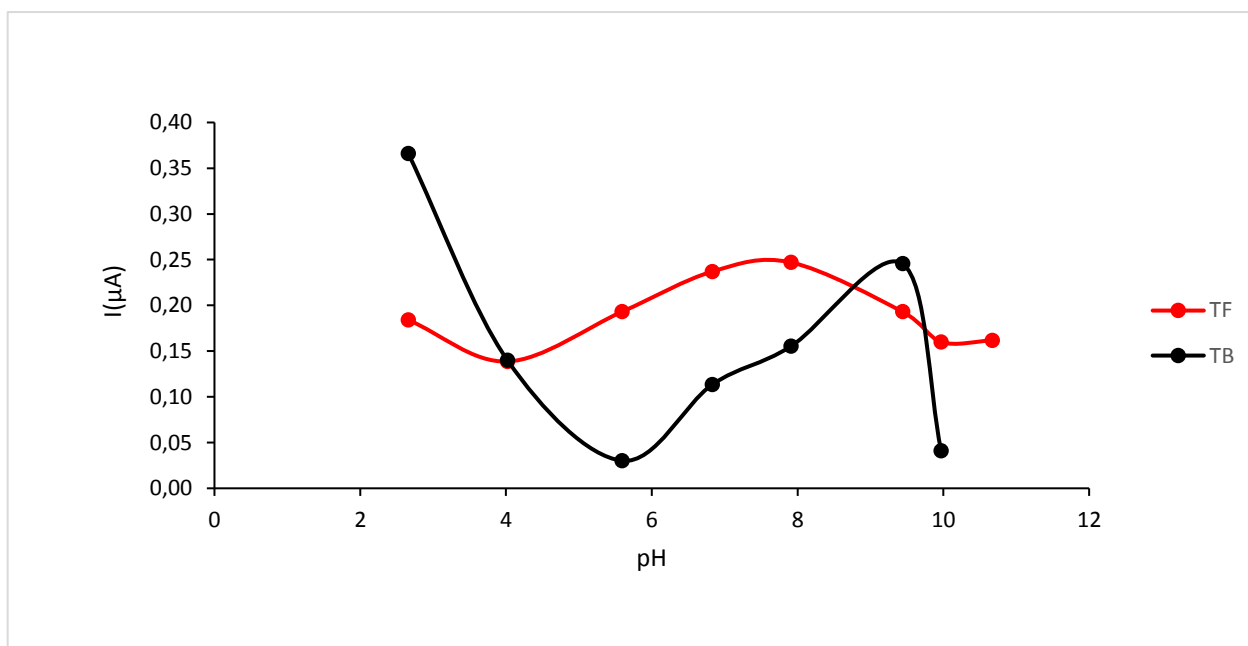
Obrázek 18: Voltamogram theobrominu o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l v kyselém prostředí v Britton – Robinsonově pufru A+B v rozmezí 2,66-6,83 pH, na GCE, metoda DPV



Obrázek 19: Voltamogram theobrominu o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l v alkalickém prostředí Britton – Robinsonově pufru A+B a v prostředí borátového pufru v rozmezí 7,91- 10,71 pH, na GCE, metoda DPV

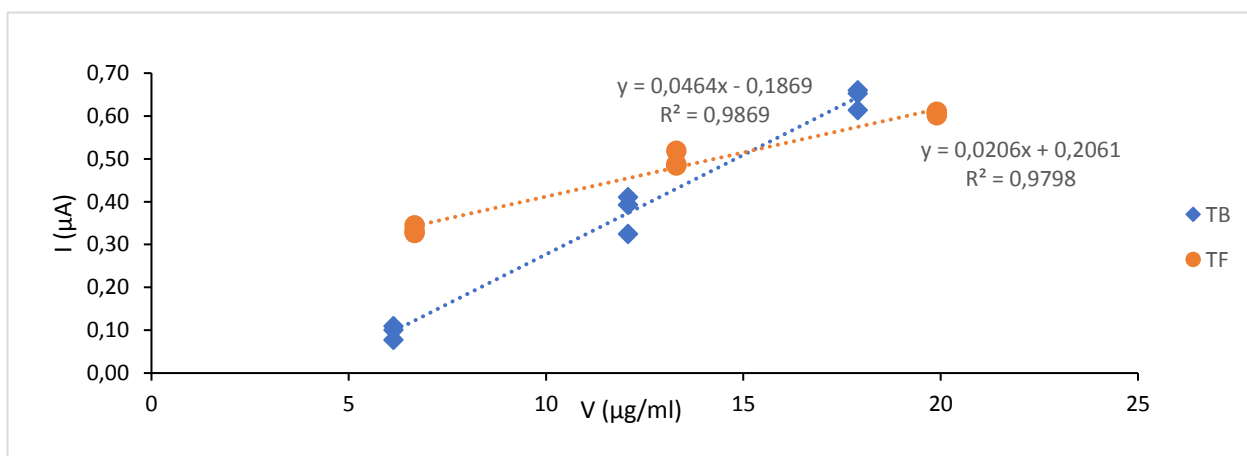


Obrázek 20: Graf závislosti potenciálu na pH pro theobromin (TB) o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l a theofylin (TF) o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l

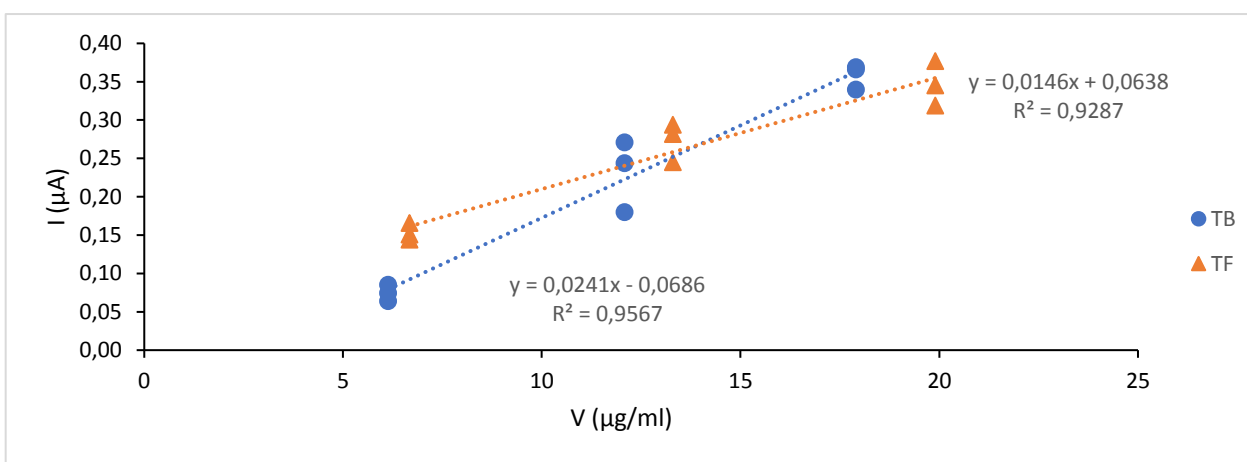


Obrázek 21: Graf závislosti proudu na pH pro theobromin (TB) o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l a theofylin (TF) o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l

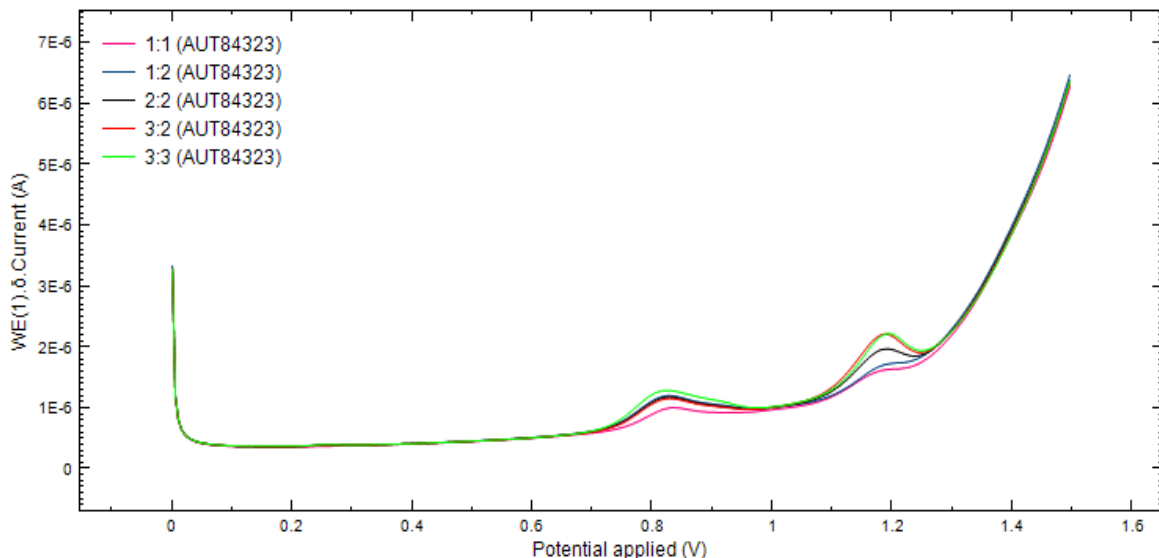
Jako nejvhodnější pH pro měření bylo zvoleno pH 7,91, jelikož při tomto pH byly signály nejstabilnější a nejcitlivější. Bylo tedy dále potřeba zaměřit se na oblast pH kolem 8. Byl připraven fosfátový pufr o pH 8,00 a borátový pufr o pH 8,1. Nejprve byl proměřen theofylin s theobrominem v jednotlivých prostředích odděleně, a nakonec se měřila jejich směs, kdy jeden byl v nadbytku. Tím se sledovalo, jestli se vzájemně ovlivňují. Bylo zjištěno, že nadbytek jedné látky neměl vliv na signál druhé. Pík se neposouval ani k nižšímu ani k vyššímu potenciálu a proud zůstal stejný, což můžeme vidět na obrázku 24. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny a vyneseny do grafů, které jsou na obrázku 22 pro fosfátový pufr a na obrázku 23 pro borátový pufr. Z grafu se jeví jako nejlepší varianta fosfátový pufr o pH 8,00.



Obrázek 22: Graf závislosti proudu na koncentraci theofylinu a theobrominu pro jednotlivé přídavky v prostředí fosfátového pufru (pH 8,00), na GCE, metoda DPV



Obrázek 23: Graf závislosti proudu na koncentraci theofylinu a theobrominu pro jednotlivé přídavky v prostředí borátového pufru (pH 8,1), na GCE, metoda DPV



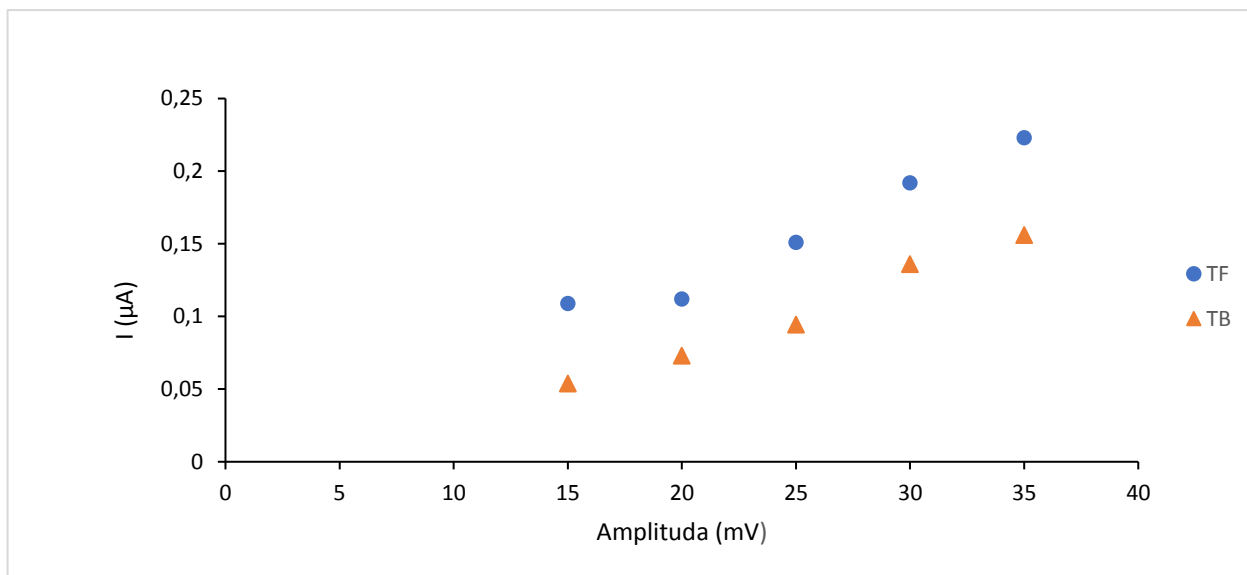
Obrázek 24: Voltamogram směsi theobrominu o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l a theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Poměry uvedeny v legendě popisují v pořadí theobromin: theofylin, ale na voltamogramu první pík patří theofylinu. Měřeno ve fosfátovém pufru pH 8,0, na GCE, metoda DPV

4.2 Optimalizace podmínek voltametrického stanovení

Amplituda pulzu

Po úvodním experimentu, pomocí kterého bylo určeno, na jaké elektrodě, v jakém prostředí a s kterou technikou budeme pracovat, další na řadě byla optimalizace podmínek. Jako elektroda byla zvolena GCE elektroda v prostředí fosfátového pufru o pH 8,00 a metoda diferenčně pulzní voltametrie. V následujících kapitolách je popsáno postupné určování optimálních podmínek zvolené metody, jako jsou amplituda a délka pulzu, vzdálenost mezi pulzy, rychlost skenu a vliv míchání na stabilitu signálu.

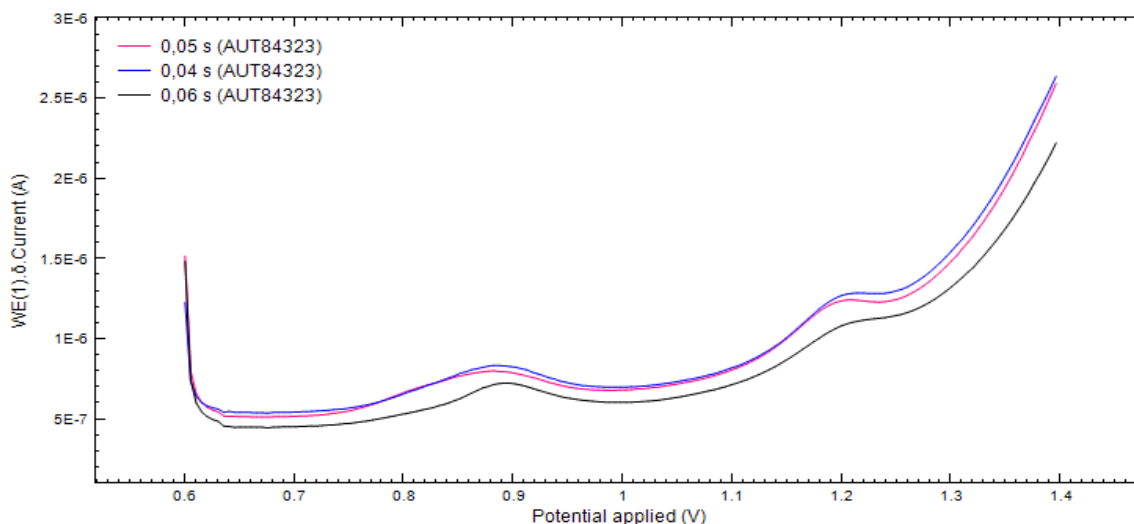
Měření amplitudy pulzu bylo proměřeno při hodnotách amplitudy v rozmezí 15–35 mV na GCE v 15 ml fosfátového pufru se standardním roztokem theofylinu o c 0,011 mol/l a se standardním roztokem theobrominu o c $2,22 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Každá hodnota byla naměřena třikrát. Na základě sestaveného grafu (obrázek 25), kde je vynesena závislost proudu na amplitudě byla zvolena amplituda 25 mV. Předběžné měření probíhalo při 25 mV, tedy hodnota zůstala stejná.



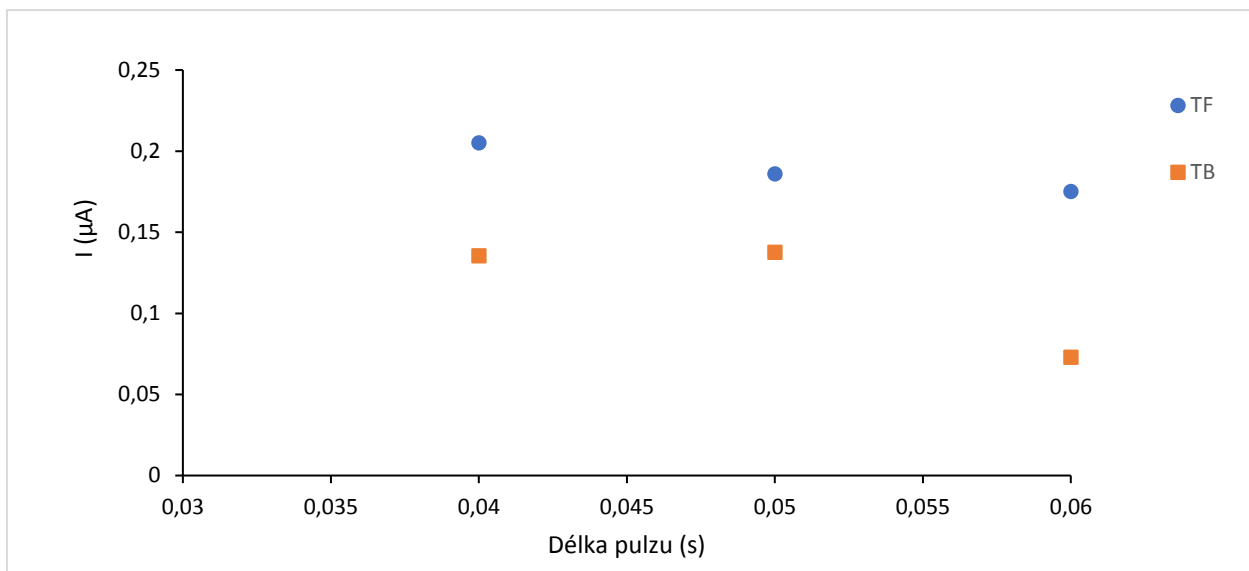
Obrázek 25: Graf závislosti proudu I na amplitudě směsi theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l a theobrominu o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l

Délka pulzu

Dalším optimalizovaným parametrem, který byl třeba určit byla délka pulzu od 0,04 - 0,06 s. Měření probíhalo už při optimalizované amplitudě, tedy při 25 mV v prostředí fosfátového pufru pH 8,00. Z výsledků na obrázku 26 voltamogramu a obrázku 27 z grafu je zřejmé, že nejvhodnější délka pulzu je 0,05 s.



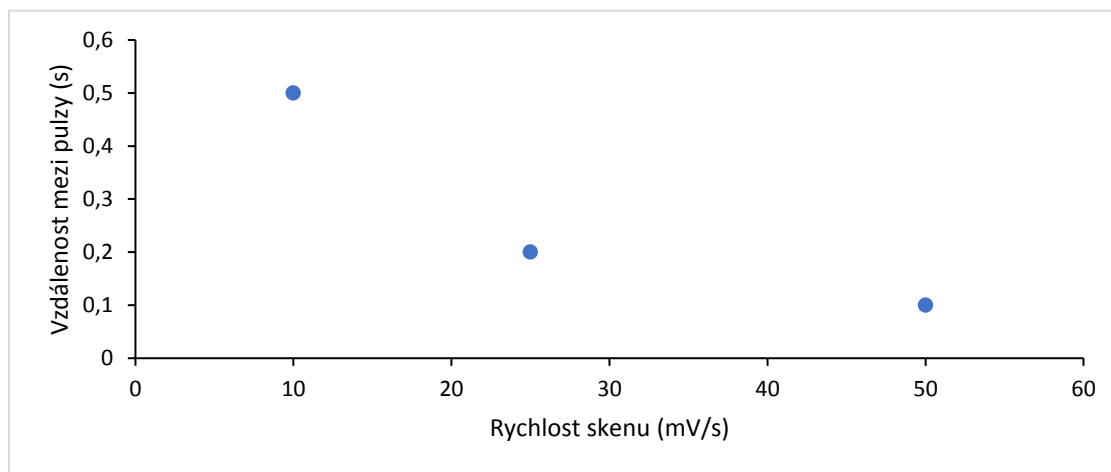
Obrázek 26: Voltamogram závislosti směsi theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l a theobrominu o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l na délce pulzu, fosfátový pufr pH 8,00, na GCE, metoda DPV, amplituda 25 mV, rychlost skenu 10 mV/s, vzdálenost mezi pulzy 0,5 s



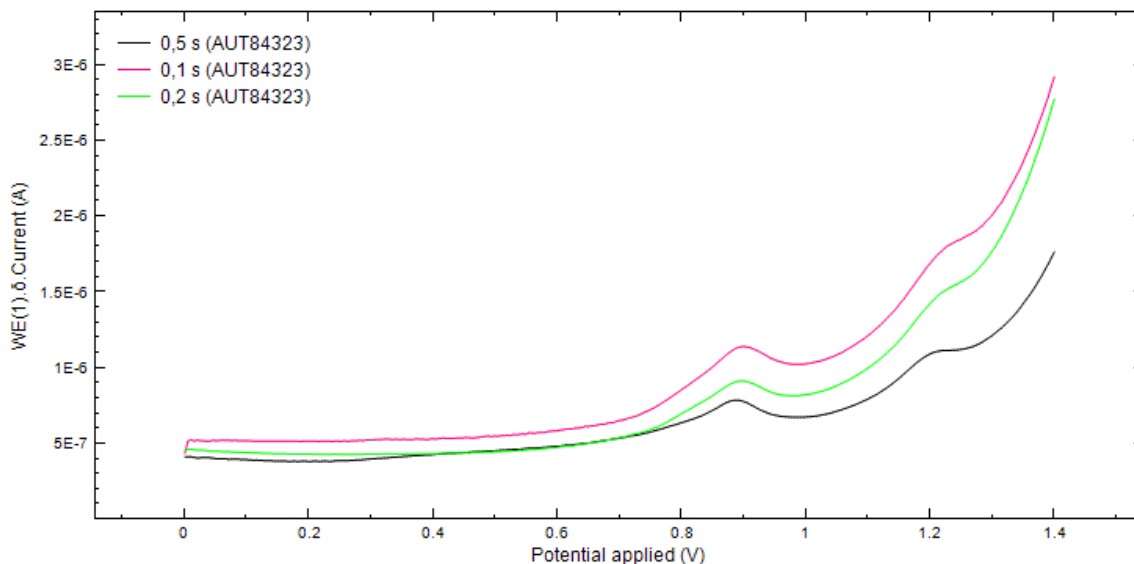
Obrázek 27: Graf závislosti proudové odezvy theobrominu o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l a theofylinu o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l na délce pulzu.

Vzdálenost mezi pulzy a rychlost skenu

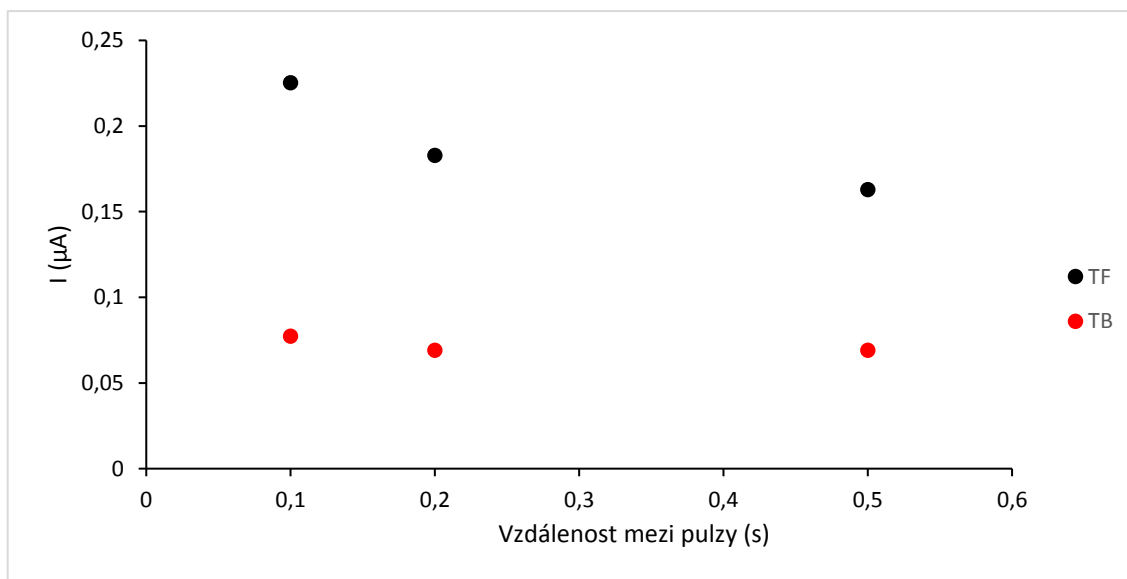
K již optimalizovaným parametrům amplitudě a délce pulzu bylo dále potřeba určit vzdálenost mezi pulzy, která jako jediná měla vliv na rychlost skenu. Se zvyšováním vzdálenosti mezi pulzy se snižovala rychlost skenu. (obrázek 28). Ke zjištění optimální vzdálenosti mezi pulzy bylo provedeno měření v rozmezí 0,1 - 0,5 s. Ze získaného voltamogramu (obrázek 29) a následně sestrojeného grafu (obrázek 30) lze považovat za nejlepší vzdálenost mezi pulzy 0,2 s, což odpovídá rychlosti skenu 25 mV/s.



Obrázek 28: Graf závislosti parametru vzdálenosti mezi pulzy na rychlosti skenu.



Obrázek 29: Voltamogram směsi theofylinu a theobrominu v závislosti na vzdálenosti mezi pulzy, fosfátový pufr o pH 8,00, GCE, metoda DPV, amplituda 25 mV, délka pulzu 0,5 s

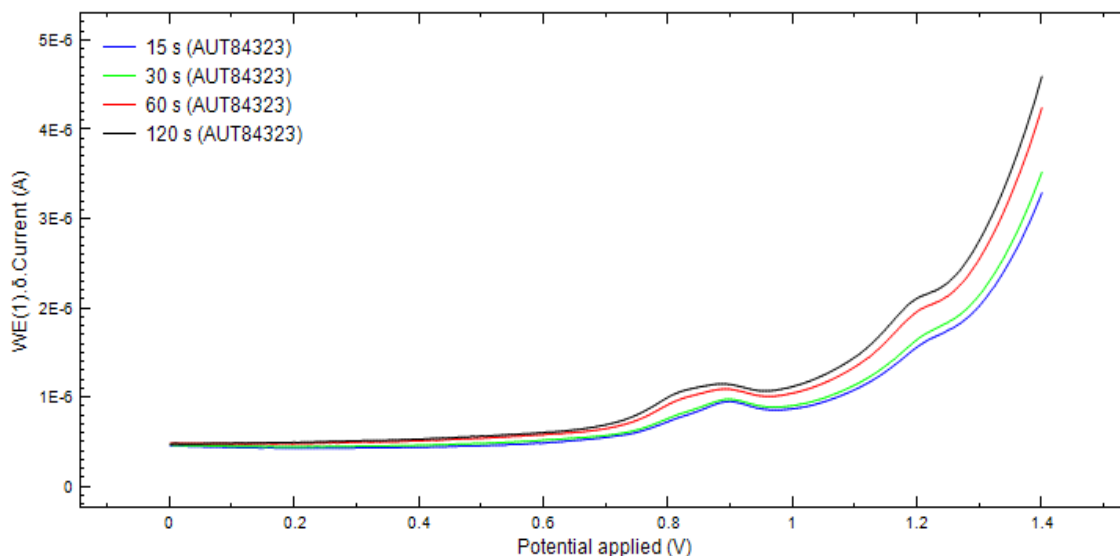


Obrázek 30: Graf závislosti proudu směsi theobrominu a theofylinu na vzdálenosti mezi pulzy, fosfátový pufr o pH 8,00, GCE, metoda DPV, amplituda 25 mV, délka pulzu 0,5 s

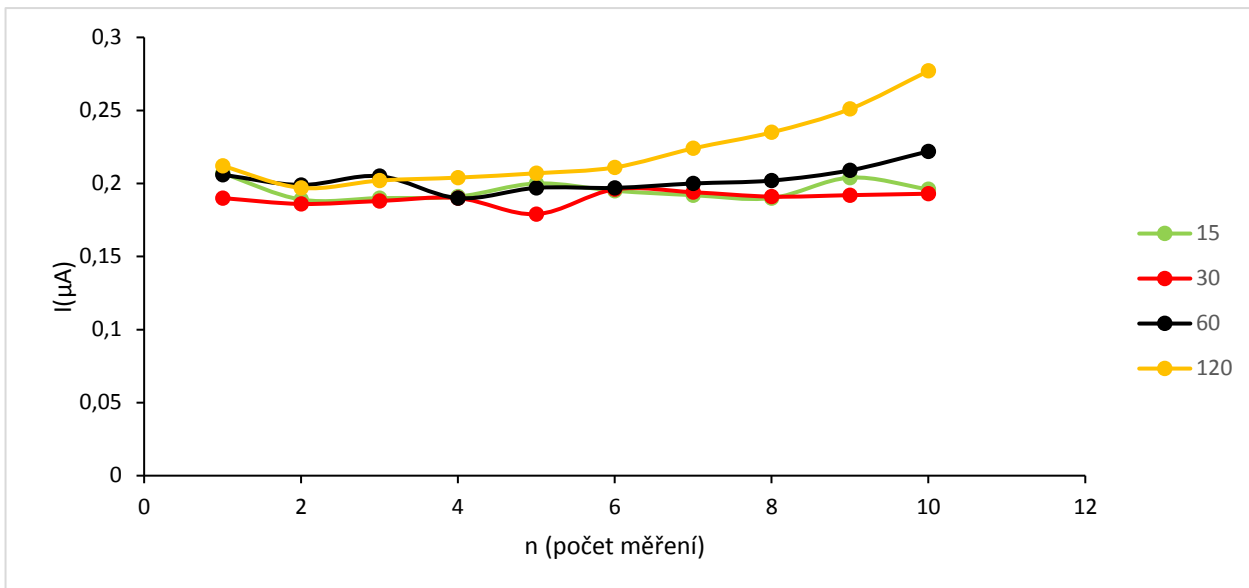
Vliv míchání na stabilitu a citlivost signálu.

K již optimalizovaným podmínkám bylo třeba zjistit, jaký vliv má míchání na stabilitu a citlivost signálu. Zvolení vhodné doby míchání napomáhá k tomu, aby se odstranily produkty oxidace od elektrody. K měřeným časům míchání bylo zvoleno 5, 30, 60 a 120 s. Z voltamogramu (obrázek 31) můžeme vidět, že nejvhodnější doba by byla 15 nebo 30 sekund. Když se podíváme na graf závislosti proudové odezvy zvláště theofylin (obrázek 32) a theobromin (obrázek 33), můžeme si všimnout, že theofylin je téměř konstantní, za to u theobrominu míchání moc neprospívá. Signál theobrominu při 15 sekundách lineárně klesá. S delší dobou míchání je theobromin méně stabilní. Byl vytvořen graf závislosti zprůměrovaných proudů na jednotlivých dobách míchání. (obrázek 34) Doba míchání 15 sekund byla zvolena jako nejlepší kompromis pro obě dvě látky.

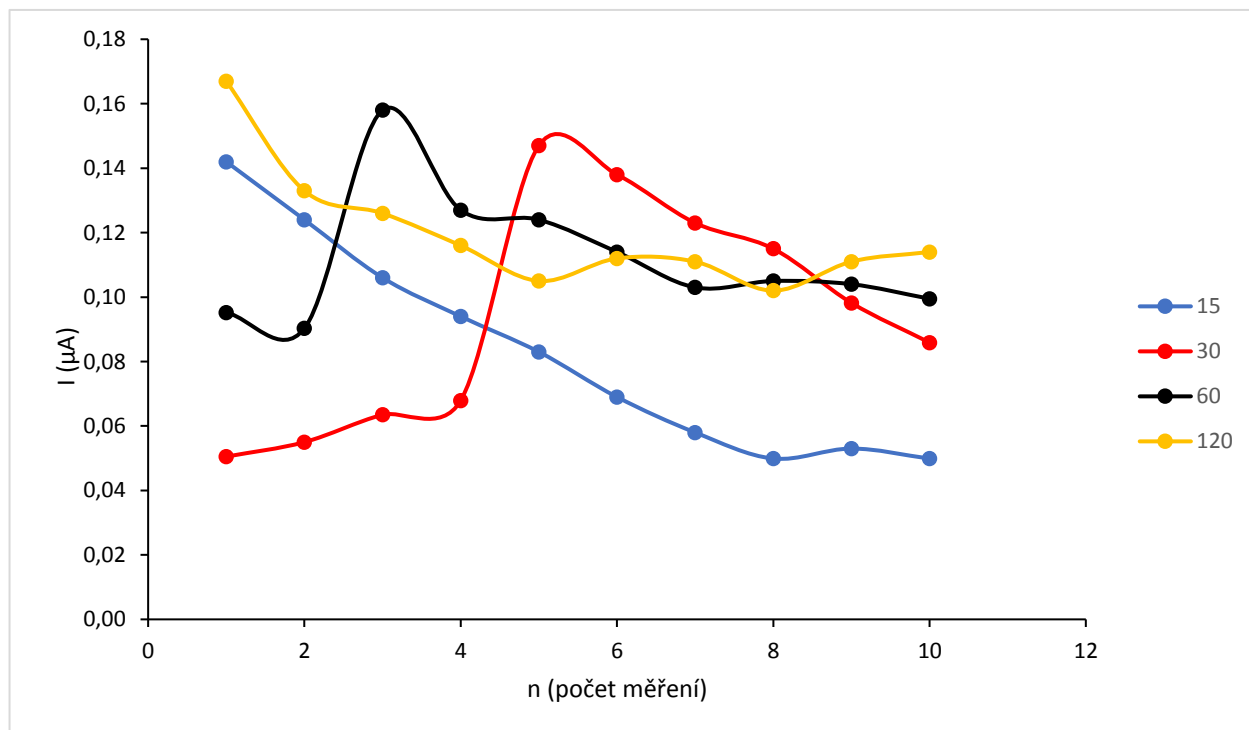
Dále bylo provedeno 10 měření pro stejné podmínky, a to doba míchání 15 s, amplituda 25 mV, rychlost skenu 25 mV/s, vzdálenost mezi pulzy 0,2s a délka pulzu 0,05 s v 15 ml fosfátového pufru o pH 8,00 s přidavkem standardního roztoku theobrominu o c $2,22 \cdot 10^{-3}$ mol/l a standardního roztoku theofylinu o c 0,011 mol/l. Voltamogram 10 opakování. (obrázek 35). Výsledky byly vyneseny do grafu závislosti proudu na počtu měření (obrázek 36). Relativní odchylka pro theobromin s mícháním byla 0,43 % a pro theofylin byla 2,6 %.



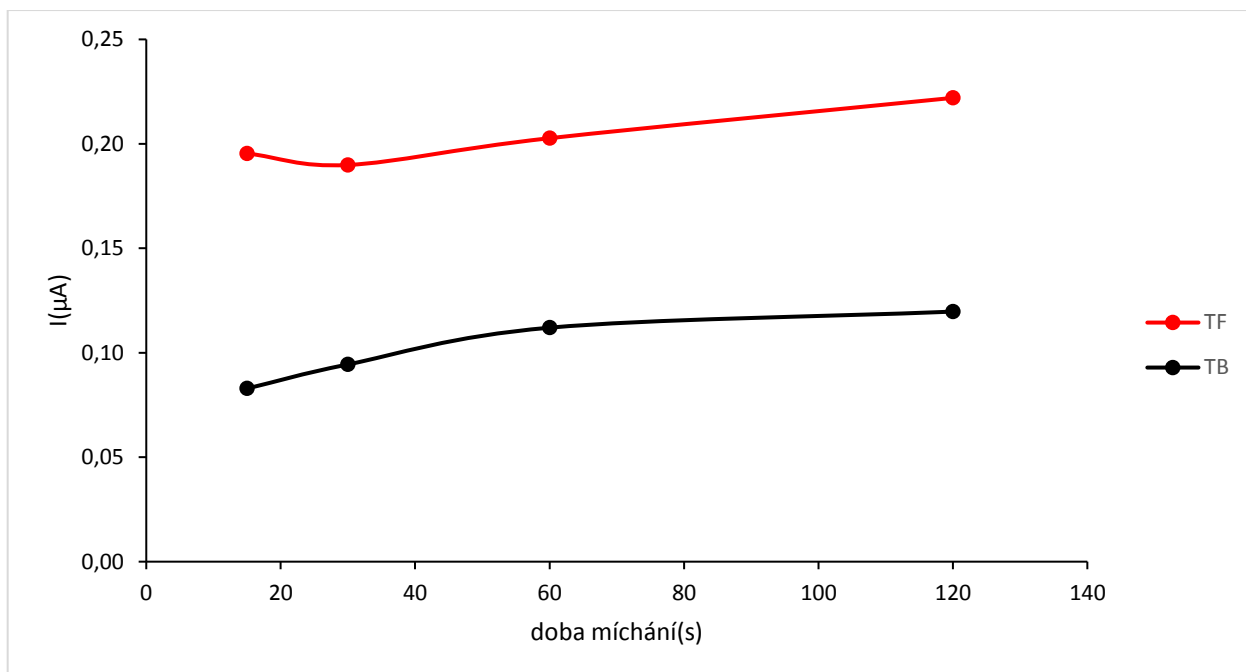
Obrázek 31: Voltamogram směsi theofylinu a theobrominu zaznamenaný pro různé doby míchání, a to 15, 30, 60 a 120 s, fosfátový pufr pH 8,00, na GCE, metoda DPV, amplituda 25 mV, rychlost skenu 25 mV/s, vzdálenost mezi pulzy 0,2 s, délka pulzu 0,05 s



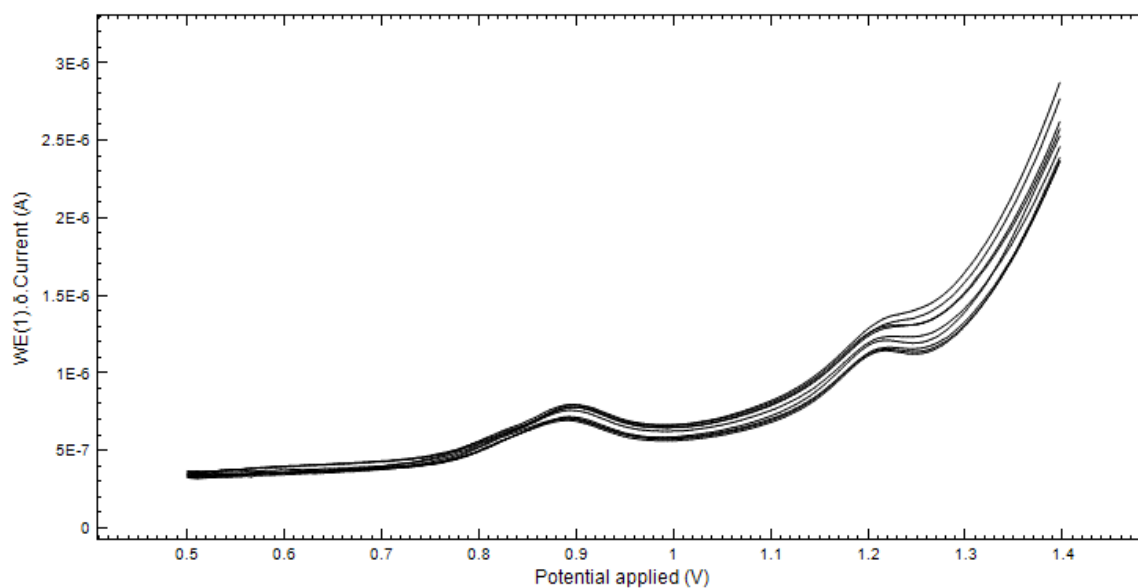
Obrázek 32: Graf závislosti proudu na počtu měření theofylinu při různých dobách měření.



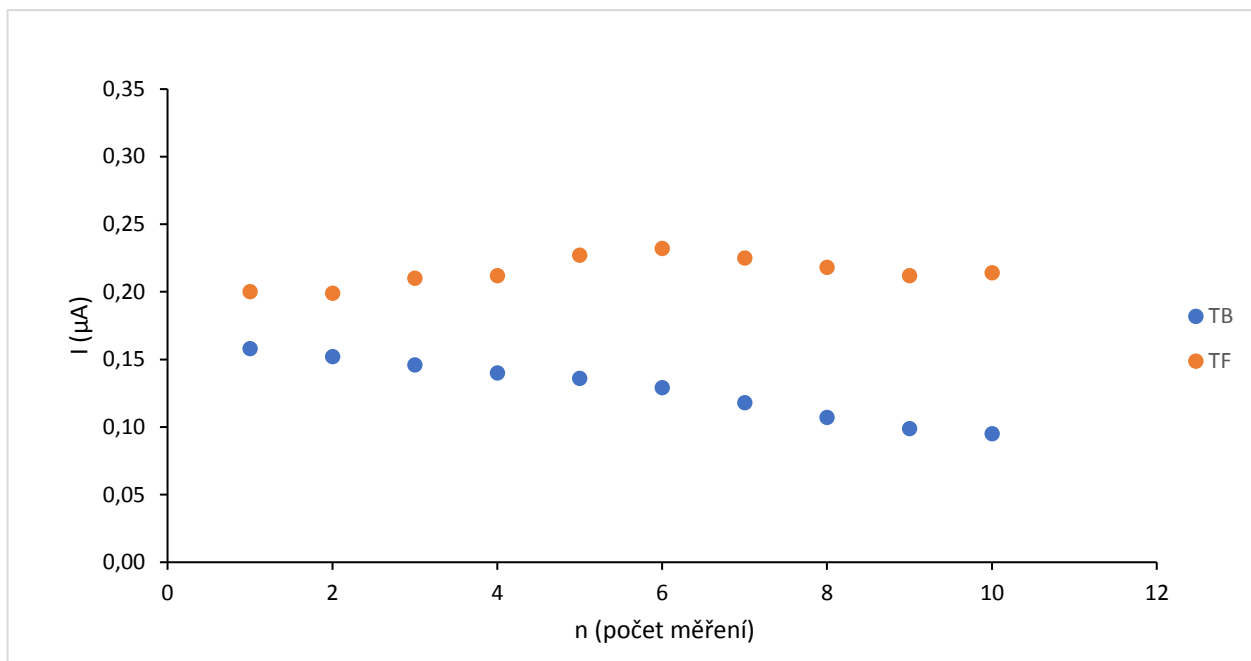
Obrázek 33: Graf závislosti proudu na počtu měření pro jednotlivé doby míchání pro theobromin.



Obrázek 34: Graf závislosti zprůměrovaných hodnot proudu na době míchání pro theofylin a theobromin.



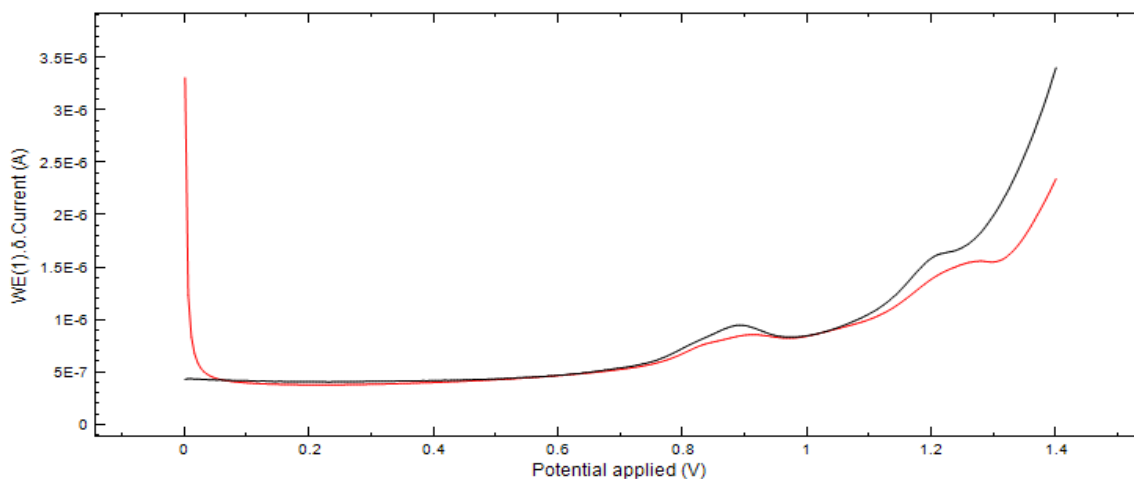
Obrázek 35: Voltamogram 10 opakovaných měření za stejných podmínek, doba míchání 15 s, amplituda 25 mV, rychlost skenu 25 mV/s, vzdálenost mezi pulzy 0,2 s, délka pulzu 0,05 s, GCE, metoda DPV, fosfátový pufr pH 8,00 s theobrominem o koncentraci $34 \cdot 10^{-6}$ mol/l a s theofylinem o koncentraci $37 \cdot 10^{-6}$ mol/l



Obrázek 36: Graf závislosti proudu na 10 opakování měření za stejných podmínek směsi theofylinu a theobrominu

Optimální podmínky

Z provedených optimalizačních měření byla zvolena elektroda ze skelného uhlíku (GCE) a vhodné prostředí 0,1 M fosfátového pufru o pH 8,00. Bylo porovnáno měření za původních podmínek, které automaticky nastavil software a mezi těmi optimalizovanými. (obrázek 37). Optimalizované podmínky jsou: Amplituda 25 mV, délka pulzu 0,05 s, vzdálenost mezi pulzy 0,2 s, rychlost skenu 25 mV/s, doba míchání 15 s.

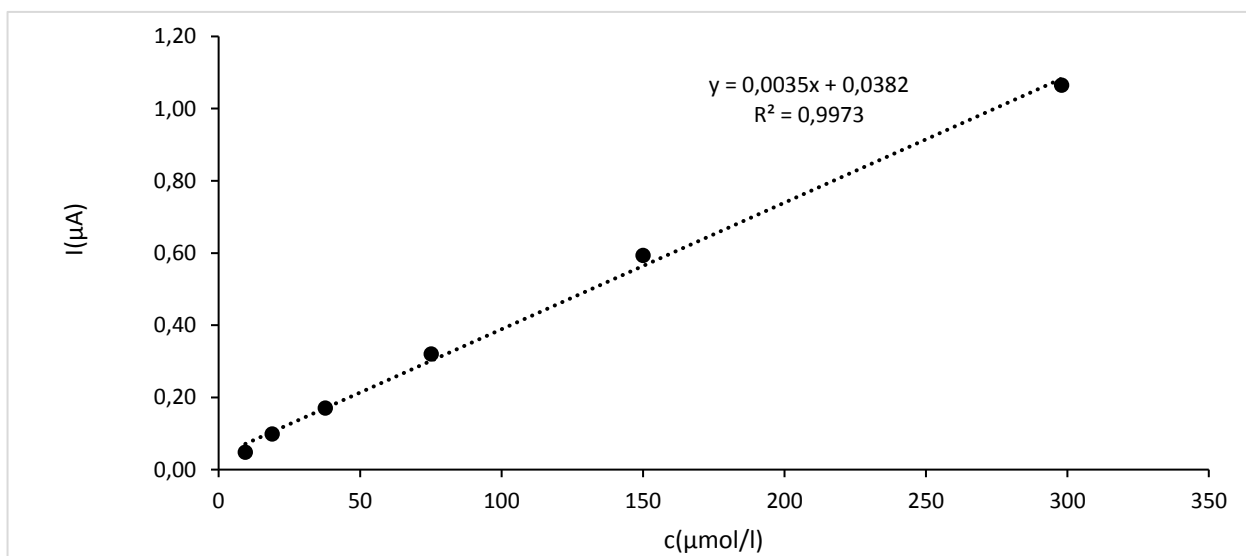


Obrázek 37: Voltamogram měření původních (červená) a optimalizovaných (černá) podmínek.

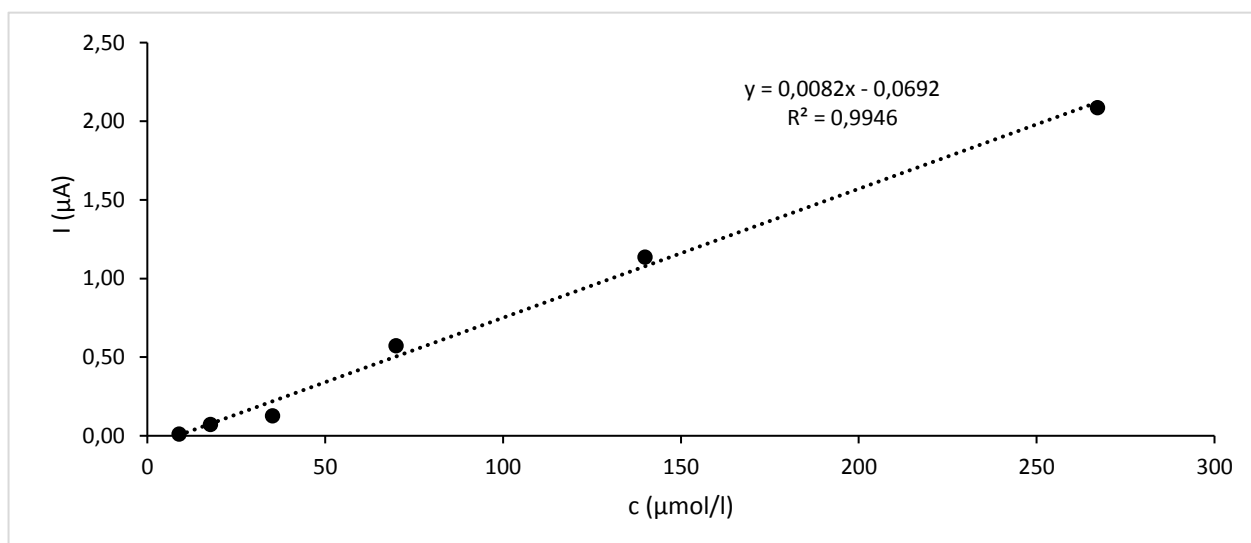
4.3 Kalibrační závislost, mez detekce a mez stanovitelnosti

Nakonec před samotným stanovením theofylinu a theobrominu v modelových a reálných vzorcích bylo potřeba sestavit kalibrační křivku. Kalibrační závislost proudu na koncentraci, která byla v rozmezí od $9,44 \cdot 10^{-6}$ - $298,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l pro theofylin (obrázek 38) a pro theobromin byla v rozmezí od $8,9 \cdot 10^{-6}$ - $267,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l. (obrázek 39)

Hodnota prvního kalibračního bodu u theofylinu i theobrominu byla 10krát proměřena a vypočtena směrodatná odchylka a následně vypočítána mez detekce a mez stanovitelnosti.



Obrázek 38: Kalibrační závislost proudu na koncentraci theofylinu v rozmezí $9,44 - 298 \cdot 10^{-6}$ mol/l



Obrázek 39: Kalibrační závislost proudu na koncentraci theobrominu v rozmezí $8,9 - 267 \cdot 10^{-6}$ mol/l

Mez detekce:

Theofylin

$$LOD = \frac{3 \cdot SMODCH}{směrnice}$$

$$LOD = \frac{3 \cdot 0,0013}{0,0035}$$

$$LOD = 1,11 \mu\text{mol/l} = 200 \mu\text{g/l}$$

Theobromin

$$LOD = \frac{3 \cdot 0,000289}{0,0082}$$

$$LOD=0,106 \mu\text{mol/l} = 19 \mu\text{g/l}$$

Meze detekce 200 $\mu\text{g/l}$ pro theofylin a 19 $\mu\text{g/l}$ pro theobromin odpovídá koncentraci, kdy je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu.

Mez stanovitelnosti:

Theofylin

$$LOD = \frac{10 \cdot SMODCH}{směrnice}$$

$$LOD = \frac{10 \cdot 0,0013}{0,0035}$$

$$LOD=3,71 \mu\text{mol/l} = 668 \mu\text{g/l}$$

Theobromin

$$LOD = \frac{10 \cdot 0,000289}{0,0082}$$

$$LOD=0,35 \mu\text{mol/l} = 63 \mu\text{g/l}$$

Mez stanovitelnosti 668 $\mu\text{g/l}$ pro theofylin a 63 $\mu\text{g/l}$ pro theobromin odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že je možné kvantitativní vyhodnocení.

4.4 Analýza modelových vzorků

Po optimalizaci všech potřebných parametrů diferenčně pulzní voltametrie a sestavení kalibrační křivky bylo možno přejít už k samotným modelovým a reálným vzorkům, pomocí kterých byla ověřena spolehlivost metody. Měření bylo prováděno na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) v prostředí 0,1 M fosfátového pufru (pH 8,00). Byla nastavena doba míchání na 15 sekund, kdy signály byly nejstabilnější a nejcitlivější. Stanovení modelových vzorků bylo vyhodnocováno metodou kalibrační křivky a metodou standardního přídatku.

Počáteční potenciál: 0,0V

Koncový potenciál: 1,4 V

Amplituda pulzu: 25 mV

Délka pulzu: 0,05 s

Vzdálenost mezi pulzy: 0,2 s

Rychlost skenu: 25 mV/s

Doba míchání: 15 s

Modelové vzorky byly připraveny, jak je uvedeno v experimentální části. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí metody kalibrační křivky a metodou standardního přídatku. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 9 a 10. Rozdílné výsledky modelového vzorku 2 od teoretické koncentrace jsou nejspíše způsobeny vlivem matrice, kdy v samotném Figuru se theobromin a theofylin neprojeví. Měření mohla být ovlivněna dalšími látkami přítomnými v čokoládě.

Tabulka 9: Vypočtené hodnoty pro Theofylin v modelových vzorcích

Vzorek	Kalibrační křivka	Standardní přídavek	Teoretická koncentrace	Výtěžnost*
MV1	0,415 mg/25ml	0,405 mg/25ml	0,4 mg/25 ml	101 %
MV2	0,72 mg/50ml	0,85 mg/50ml	0,8 mg/50ml	106 %

*(standardní přídavek/ teoretická koncentrace) · 100

Tabulka 10: Vypočtené hodnoty pro Theobromin v modelových vzorcích

Vzorek	Kalibrační křivka	Standardní přídavek	Teoretická koncentrace	Výtěžnost**
MV1	0,148 mg/25ml	0,159 mg/5ml	0,16 mg/25 ml	101 %
MV2	0,45 mg/50ml	0,35 mg/50ml	0,32 mg/50ml	109 %

** (standardní přídavek/ teoretická koncentrace) · 100

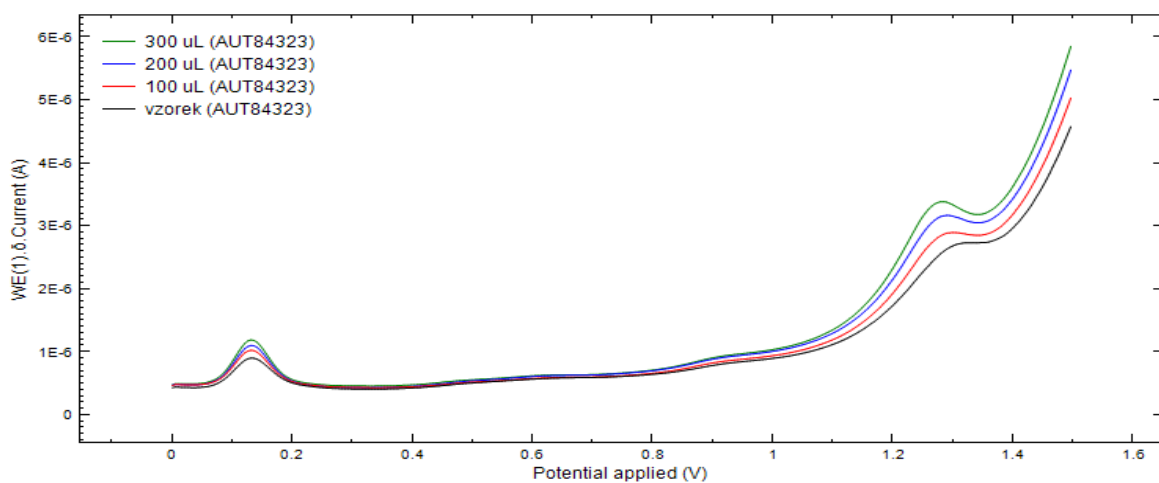
4.5 Analýza reálných vzorků

Příprava reálných vzorků byla již uvedena v experimentální části. Reálné vzorky byly stanoveny obdobně jako modelové vzorky, tedy s využitím metody vícenásobného standardního přídávku. (Tabulka 11)

U vzorku 70 % Lindt čokolády nebyl nalezen theofylin díky nízké koncentraci theofylinu nebo malé citlivosti metody. U vzorku 90 % Lindt byl patrný i obsah theofylinu, ale jelikož se vyskytuje v čokoládě ve stopovém množství, byl obtížně stanovitelný. U vzorku kakaových bobů a kakaového prášku byly naměřeny u theobrominu krásné píky, ale u theofylinu to bylo podstatně horší. Příklad stanovení je na obrázku 40, kde je voltamogram 90 % čokolády Lindt s barevně oddělenými přídávky theobrominu. Byl učiněn i pokus o výpočet obsahu obou alkaloidů metodou kalibrační křivky, avšak tyto hodnoty byly vyšší než u druhé použité metody, což mohlo být způsobeno vlivem matrice.

Tabulka 11: Výsledky stanovení theobrominu a theofylinu v reálných vzorcích (mg/g)

Vzorek	Standardní přídavek (TB) (N=3) [mg/g]	Standardní přídavek (TF) (N=3) [mg/g]
70 % Lindt	1,48 ± 0,022	-
90 % Lindt	1,89 ± 0,079	0,39 ± 0,012
Kakaové boby	6,22 ± 0,745	0,23 ± 0,0036
Kakaový prášek	8,79	0,42



Obrázek 40: Voltamogram čokolády Lindt s obsahem kaka 90 %. Pík theobrominu při potenciálu 1,3 V s jednotlivými přídávky.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit alkaloidy theofylin a theobromin, které se vyskytují především v čokoládě. Bylo sledováno jejich elektrochemické chování na uhlíkových pastových elektrodách a na elektrodě ze skelného uhlíku a borem dopované diamantové elektrodě. Uhlíkové pastové elektrody byly připraveny v laboratoři z uhlíkových prášků CR5 a Sigradur G a jako pojivo byl použit silikonový neb parafinový olej.

Na základě úvodních experimentů byla vybrána vhodná elektroda, prostředí základního elektrolytu a metoda, které byly dále používány k optimalizaci podmínek a následnému ověření spolehlivosti metody na modelových a reálných vzorcích. Měření probíhala na elektrodách GCE, BDDE, GCPE/PO, CR5/PO, CR5/SO. Elektrolyty byly použity 0,1 M H₂SO₄, HCl, HClO₄, KCl, NaOH, acetátový, borátový, Britton – Robinsonův a fosfátový pufr. Všechna měření byla provedena pomocí metody LSV, DPV a SW voltametrie. Po spojení výsledků měření theobrominu a theofylinu byla jako nejlepší elektroda zvolena GCE a metoda DPV, kdy signály theobrominu a theofylinu byly nejintenzivnější a nejstabilnější. Dalším krokem byla studie závislosti na pH a byl zvolen nejvhodnější základní elektrolyt fosfátový pufr o pH 8,00. Výsledkem bylo stanovení theofylinu a theobrominu vedle sebe, protože píky byly od sebe vzdálené a navzájem rozeznatelné.

Následně byly optimalizovány podmínky, konkrétně amplituda pulzu na 25 mV, délka pulzu na 0,05 s, vzdálenost mezi pulzy na 0,2 s, rychlost skenu na 25mV/s. Dále bylo důležité proměřit závislost míchání na stabilitě a citlivosti proudu. Ukázalo se, že při míchání jsou signály stabilnější. Pro dobu míchání bylo vybíráno mezi hodnotami 15, 30, 60 a 120 sekund. Doba míchání byla vybrána 15 sekund.

Posledním krokem před samotným měřením vzorků bylo proměřit a sestavit kalibrační graf v rozsahu koncentrací $9,44 \cdot 10^{-6}$ - $298,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l pro theofylinu a pro theobromin byl rozsah koncentrací $8,9 \cdot 10^{-6}$ - $267,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Na základě těchto koncentrací byla vypočtena mez detekce pro theofylin LOD = 200 µg/l pro theobromin LOD = 19 µg/l a mez stanovitelnosti pro theofylin LOQ = 668 µg/l a pro theobromin LOQ = 63 µg/l.

Na závěr byla ověřena spolehlivost metody na modelových a reálných vzorcích. Vzorek 70 % čokolády Lindt obsahoval 1,48 mg/g, vzorek 90 % čokolády obsahoval 1,89 mg/g, kakaové boby obsahovaly 6,22 mg/g a kakaový prášek obsahoval 8,79 mg/g theobrominu stanovený metodou

standardního přídatku. Co se týče obsahu theofylinu, ten ve vzorku 70 % čokolády Lindt nebyl stanoven, díky nevyhodnotitelnému signálu. Vzorek 90 % čokolády Lindt obsahoval 0,39 mg/g, kakaové boby 0,23 mg/g a kakaový prášek 0,42 mg/g theofylinu stanovený metodou standardního přídatku.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] RODRIGUEZ A., et.al., HPLC method for urinary theobromine determination: Effect of consumption of cocoa products on theobromine urinary extraction in children. *Clinical Biochemistry* 48 (2015), s. 1138-1143
- [2] XIA Z., et. al. Simultaneous determination of caffeine theophylline and theobromine in food samples by a kinetic spectrophotometric method. *Food Chemistry* 141 (2013), s. 4087-4093
- [3] VELISEK J., et. al., Chemie potravin II. OSSIS, Tábor 2009, 3. vydání. ISBN 978-80- 86659-16-9
- [4] Bezpečnost potravin. *Alkaloidy*[online]. 2019 [cit 23-3-2019] Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92002.aspx>
- [5] MASCAVAGE L. M., et. al., Alkaloids. Ullman's Encyclopedie of Industrial Chemistry, 2. vydání, VCH: Weinheim 2012
- [6] SPATARU N., et. al., Anodic voltammetry of Xanthine, Theophylline, Theobromine and Caffeine at Conductive Diamond Electrodes and Its Analytical Application. *Electroanalysis* 14 (2002), č. 11, s. 721-728
- [7] SRDIENOVIC B., et. al., Simultaneous HPLC determination of Coffeine, Theobromine and Theophylline in Food, Drinks and Herbal Products. *Journal of Chromatographic Science* 46 (2008), s. 144-149
- [8] JALIL A. M. M., et.al., Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There Link between Antioxidant Properties and Health. *Molecules* 2008, 13, s. 2190-2219
- [9] MEKASSA B., et. al., Simultaneous determination of caffeine and theophylline using square-wave voltammetry at poly (L-aspartic acid) /functionalized multi-walled carbon nanotubes composite modified electrode. *Sensing and Bio-Sensing Research* 16 (2017), s 46-54
- [10] AZAM S., et. al., Antioxidant and prooxidant properties of coffeine, theobromine and xanthine. *Medical Science Monitor* 2003, 9(9), s. 325-330

- [11] HEARD CH. M., et. al., In vitro transdermal delivery of coffeine, theobromine and theophylline and catechine from extract of Guarana, Paullinia Cupana. *International Journal of Pharmaceutics* 317 (2006), s 26-31
- [12] ARESTA A., et. al., Simultaneous determination of Caffeine, Theobromine, Theophylline, Paraxanthine and Nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection. *Food Chemistry* 2005, 93, s 177-181
- [13] BISPO M. S., et. al., Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 2002, 40, s. 45-48
- [14] LENZ H. H., Purinové alkaloidy. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2012, svazek 30, VCH-Weinheim, s 541-546
- [15] BALSSA F., et. al., Easy preparative scale syntheses of labelles xanthines: Caffeine, Theobromine and Theophylline. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2007, 50, s 33-41
- [16] Bezpečnost potravin. *Theobromin*[online]. 2019 [cit 23-3-2019] Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92362.aspx>
- [17] LI S., et. al., Solubilities of theobromine and caffeine in supercritical carbon dioxide: corelation with denzity-based moduls. *Fluid Phase Equilibria* 1991, 68. s. 263-280
- [18] PENG Y., et. al., A simple and Sensitive method for the Voltammetric Analysis of Theobromine in Food Simples Using nanobiocomposite Sensor. *Food Analytical Methods* 2017, 10, s. 3375-3384
- [19] ČESKÝ LÉKOPIS 2017, 3. díl, ISBN 978-80-271-0500-7
- [20] Sigma Aldrich. *Theophylline/Theobromine*[online] 2019 [cit 15-4-2019] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- [21] PubChem. *Theophylline/Theobromine*[online]. 2019 [cit 15-4-2019] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- [22] NAIK J. P., Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determination Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49, s. 3579-3583
- [23] VEGA C., et. al., *Theobroma cacao* – An Introduction to the Plant, Its Composition, Use and Health Benefites. *Cacao butter and Related Compounds* 2012, s. 35-62
- [24] Bezpečnost potravin. *Čokoláda*[oline]. 2019 [cit 23-3-2019]. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76547.aspx>
- [25] JAFARI M. T., et. al., A new method based on electrospray ionisation ion mobility spectrometry (ESI-IMS) for simultaneous determination of caffeine and theophylline. *Food Chemistry* 2011, 126, s. 1964-1970
- [26] GAO Y., et. al., Simultaneous determination of theophylline and caffeine by large mesoporous carbon/ Nafion modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2013, 706, s. 7– 12
- [27] SINGH D. K., et.al., Spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in pure alkaloids and its applications in pharmaceutical formulations. *Analytical Biochemistry* 2006, 349, s. 176-180
- [28] ZEN J. M., et. al., Determination of Theophylline in Tea and Drink formulation using a Nafion® lead – ruthenium oxide pyrochlore chemically method modified electrode. *Talanta* 1999, 50, s. 635-640
- [29] WILD D. G., (2013). *Immunoassay Handbook – Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques* 2013, 4. vydání, *Pharmacological Effects*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00BK7QWJ/immunoassay-handbook/amikacin-pharmacological>
- [30] TAJÍK S., et. al., Applications of a new ferrocene-derivative modified-graphene paste electrode for simultaneous determination of isoproterenol, acetaminophen and theophylline. *Sensors and Actuators B* 197 2014, s. 228-236

- [31] CAMPEAN A., et. al., Voltammetric determination of some alkaloids and other compounds in pharmaceuticals and urine using an electrochemically activated glassy carbon electrode. *Central European Journal of Chemistry* 2011, 9(4), s. 688-700
- [32] MULLET W. M., et al., Determination of Theophylline in Serum by Molecularly Imprinted Solid – Phase Extraction with Pulsed Elution. *Analytical Chemistry* 1998, 70(17), s. 3636-3641
- [33] DILLINGER T. L., et. al., Food of the Gods: Cure of Humanity? A cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate. *Journal of Nutrition* 2000, 130, s. 2057–2072
- [34] Světová čokoláda[online]. 2019 [cit 10-4-2019] Dostupné z:
<http://www.svetovacokolada.cz/index.php?page=druhy>
- [35] SINGHAL R.S., et. al. Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity. 1997[online] 2019 [cit 10-4-2019] Dostupné z:
<https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHIFQA00Q/handbook-indices-food/handbook-indices-food>
- [36] Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Cocoa, Dark Chocolate and Milk Chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, vyd. 47, no 12, s. 4821–4824
- [37] BRUNETTO M. R., et. al., Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample clean up in a switching-column systém. *Food Chemistry* 2007, 100, s. 459-467
- [38] ZOUMAS B. L., et. al., Theobromine and caffeine content of chocolate products. *Journal of food science*, 1980, 45, s. 314-316
- [39] ČAPÍKOVÁ J., *Technologie čokolády a cukrovinek*, VŠCHT Praha 1999
- [40] MOHAMED R. S., et. al., Extraction of Caffeine, Theobromine and Cocoa Butter from Brazilian Cocoa Beans Using Supercritical CO₂ and Ethane. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2002, 41(26), s. 66751-6758

- [41] Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb., vyhláška 76/2003 Sb., oddíl 5 § 20; příloha 8[online] 2019 [cit 10-3-2019]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/nabidka/cs/2003-76/zneni-20040501#p23-1>
- [42] MICHENER W., et. al., Pharmacological Versus Sensory Factors in the Satiation of Chocolate Craving. *Physiology and Behaviour* 1994, 56(3), s. 419–422
- [43] HUANSHUN Y., et. al., Electrochemical determination of theophylline in foodstuff, tea and soft drinks based on urchin-like CdSe microparticles modified glassy carbon electrode. *Food Chemistry* 2012, 134, s. 1225–1230
- [44] ŠVORC L., et. al., A progressive electrochemical sensor for food quality control: Reliable determination of theobromine in chocolate products using a miniaturized boron-doped diamond electrode. *Microchemical Journal* 2018, 142, s. 297–304
- [45] LY S. Y., et. al., Determination of Caffeine Using a Simple Graphite Pencil Electrode with Square – Wave Anodic Stripping Voltammetry. *Microchimica Acta* 2004, 146, s. 207–213
- [46] BROWN T. J., et. al. Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Standard Reference Material 2384, Baking Chocolate, Using Reversed – Phase Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, s. 3259-3263
- [47] OELLIG C., et. al., Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin – layer chromatography. *Journal of Chromatography A* 2018, 1533, s. 208-212
- [48] JOHANNSEN M., et. al., Solubilities of xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria* 1994, 95, s. 215–216
- [49] DYKE T. M., et. al., Detection and Determination of Theobromine and Caffeine in Urine after Administration of Chocolate – Coated Peanuts to Horses. *Journal of Analytical Toxicology* 1998, 22, s. 112–116