

AGNIESZKA WIKIERA, MAGDALENA MIKA

## WPLYW METYLOKSANTYN NA EMULGACJĘ I BIODOSTĘPNOŚĆ LIPIDÓW MASŁA SZACOWANĄ *IN VITRO*

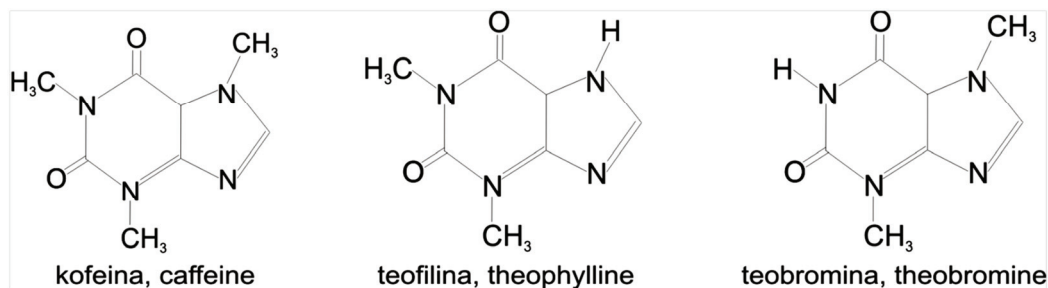
### Streszczenie

Badano wpływ powszechnie spożywanych wraz z dietą N-metyloksantyn: kofeiny, teofiliny i teobrominy na emulgację lipidów masła i ich biodostępność w warunkach żołądka i jelit człowieka symulowanych *in vitro*. Materiał badawczy stanowiło masło wiejskie, do którego dodawano testowane związki w ilości 40  $\mu\text{mol/g}$ . Na podstawie wyników stwierdzono, że w badanej dawce każdy z alkaloidów intensyfikował tworzenie emulsji poprzez zwiększanie stopnia jej dyspersji. Siła proemulgującego działania alkaloidów zależała od rozmieszczenia grup metylowych w cząsteczce i wzrastała zgodnie z szeregiem 1,3-dimetyloksantyna (teofilina)  $\rightarrow$  1,3,7-trimetyloksantyna (kofeina)  $\rightarrow$  3,7-dimetyloksantyna (teobromina). Jednocześnie każdy z testowanych alkaloidów ograniczał w sposób istotny biodostępność lipidów. W przypadku teofiliny ilość kwasów tłuszczowych i glicerolu uwalnianych z lipidów masła zmniejszała się względem próby kontrolnej średnio o 9 %, w przypadku kofeiny o około 16 %, a w przypadku teobrominy aż o 27 %. Wyniki takie sugerują, że w warunkach symulowanego trawienia lipidów w przewodzie pokarmowym alkaloidy musiały oddziaływać nie tylko na hydrofobowy substrat, wspomagając jego emulgację, ale także na lipazę trzustkową, wypierając ją z powierzchni miceli, a tym samym ograniczając jej kontakt z substratem i skutecznie ją inhibując.

**Słowa kluczowe:** metyloksantyny, emulgacja lipidów, biodostępność lipidów, *in vitro*

### Wprowadzenie

Metyloksantyny to związki należące do grupy alkaloidów purynowych, powstające w wyniku kilkukrotnej metylacji ksantyny. Ich najważniejszymi przedstawicielami są: kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna), teofilina (1,3-dimetyloksantyna) i teobromina (3,7-dimetyloksantyna) (rys. 1).



Rys. 1. Struktura przestrzenna cząsteczek kofeiny, teofiliny i teobrominy.

Fig. 1. The chemical structures of caffeine, theophylline and theobromine.

Alkaloidy te są powszechnie spożywane przez ludzi, jako składniki żywności, używek i leków. Średnie dzienne spożycie kofeiny ocenia się na 80 - 400 mg/osobę [21]. Alkaloid ten jest składnikiem kawy (0,43 - 0,85 mg/ml) [4], herbaty (0,1 - 0,2 mg/ml) [13], czekolady i wyrobów czekoladowych (0,7 - 10,8 mg/100 g) [5]. Jest także obecny w niektórych lekach, szczególnie przeciwkaszlowych i przeciwprzeziębieniowych [9] oraz w środkach odchudzających [10]. Teobromina i teofilina mogą powstawać w organizmie człowieka na skutek przemian kofeiny [11], ale mogą być także dostarczane jako składnik kakao, kawy czy herbaty [5, 6]. W ekstrakcie herbaty zawartość teofiliny szacuje się na poziomie około 1,5 mg/l [5, 15], a teobrominy na poziomie 7,5 - 21 mg/l [7, 13]. Zawartość tych alkaloidów w 100 g czekolady zwykle nie przekracza 3 mg w przypadku teofiliny i 1 g w przypadku teobrominy [7]. Ogólnie średnie dzienne spożycie teofiliny, wynikające tylko i wyłącznie z picia czarnej herbaty i używania kakao szacuje się na około 0,51 mg, natomiast średnie dzienne spożycie teobrominy wynosi około 39 mg [28]. Ponadto oba alkaloidy są wykorzystywane dość powszechnie w medycynie, teofilina jako główny składnik leków moczopędnych, a teobromina jako środek nasercowy i przeciwkaszlowy [24].

Spożyte wraz dietą alkaloidy purynowe nie są kumulowane w organizmie człowieka, lecz dość szybko (okres połowicznego rozpadu wynosi od 4 do 10 h) metabolizowane w wątrobie do kwasu moczowego, który jest wydalany wraz z moczem [23]. Wszystkie wykazują szerokie działanie farmakologiczne, do którego należy stymulacja centralnego układu nerwowego i ośrodków wegetatywnych, głównie naczynioruchowego i oddechowego [17] oraz zmniejszanie napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych [16]. Znanych jest szereg dowodów świadczących, że przyjmowane wraz z dietą kofeina, teofilina i teobromina przyspieszają lipolizę komórkową [12, 27] i stymulują termogenezę [10, 3], a w konsekwencji prowadzą do zmniejszenia masy ciała [27, 3]. Istnieją także przesłanki pozwalające sądzić, że związki te dzięki właściwościom inhibitującym wobec niektórych enzymów [22, 27] oraz chelatowaniu jonów

metali [20, 14] mogą ograniczać biodostępność przynajmniej niektórych składników diety.

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu fizjologicznych dawek, powszechnie obecnych w diecie N-metyloksantyn: kofeiny, teofiliny i teobrominy, na proces trawienia i przyswajania lipidów. W związku z faktem, że biodostępność lipidów zależy bezpośrednio od przebiegu ich hydrolizy, a ta z kolei od stopnia zemulgowania, kolejno analizowano wpływ metyloksantyn na oba te procesy.

### **Material i metody badań**

Do badań użyto czystych preparatów kofeiny, teofiliny i teobrominy, zakupionych w firmie Sigma Chemicals Inc., oraz masło wiejskie, produkowane według tradycyjnej domowej receptury, zakupione na placu handlowym Nowy Kleparz w Krakowie. Zawartość suchej masy w analizowanym maśle wynosiła 86,14 %, a zawartość tłuszczu 81,17 %.

Do symulowania trawienia w przewodzie pokarmowym człowieka wykorzystano pochodzące z firmy Sigma Chemicals Inc.: pepsynę o deklarowanej aktywności 4750 U/mg, preparat wieloskładnikowy – Pancreatinum zawierający enzymy trzustkowe o deklarowanej aktywności równej 8\*United States Pharmacopoeia, oraz ekstrakt soli żółciowych.

Do oznaczenia ilości glicerolu i kwasów tłuszczowych uwolnionych podczas hydrolizy lipidów zastosowano odpowiednio test enzymatyczny firmy Cormay oraz czerwień krezolową firmy Sigma Chemicals Inc.

W celu zbadania wpływu metyloksantyn na proces emulgacji i biodostępność lipidów zawartych w maśle zastosowano metodę trawienia *in vitro* opisaną przez Mikę i wsp. [18]. Badane próbki masła poddawano kolejno dwóm inkubacjom symulującym środowisko żołądka (pH 2,0) i jelita cienkiego (pH 7,5). Naważki masła ( $0,5 \pm 0,001$  g wg s.m.) z dodatkiem badanych alkaloidów (roztwory wodne) w ilości 40  $\mu\text{mol}$  na 1 g masła lub z dodatkiem wody redestylowanej (próba kontrolna), zakwaszono 0,5 M HCl (w ilości ustalonej na podstawie miareczkowań) do pH 2,0. Następnie dodawano 0,75 ml roztworu pepsyny i wodę redestylowaną w takiej ilości, aby łączna objętość wprowadzanych płynów wynosiła 2,0 ml. Dokładnie mieszano, szczelnie zamykano i inkubowano w temp. 37 °C w pozycji horyzontalnej z wytrząsaniem przez 120 min. Po tym czasie część próbek przeznaczoną do oznaczenia stopnia emulgacji żółdkowej ustawiano w pozycji wertykalnej na 10 min w celu rozdzielenia frakcji zemulgowanej (krople tłuszczu < 100  $\mu\text{m}$ ). Do pozostałych próbek dodawano wyliczoną na podstawie miareczkowań ilość 1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,375 ml roztworu pankreatyny z żółcią i zbuforowaną do pH 7,5 wodę redestylowaną (w takiej ilości, aby łączna objętość wprowadzanych płynów wynosiła 1,15 ml). Całość dokładnie mieszano, a następnie próbki z próbkami przeznaczonymi do oznaczenia stopnia emulgacji jelitowej

szczelnie zamykano. Pozostałe próbki przeznaczone do oznaczenia biodostępności lipidów przeniesiono ilościowo do worków dializacyjnych, które umieszczano w kolbach stożkowych zawierających po 50 ml wody redestylowanej alkalizowanej do pH 7,5. W obu przypadkach drugą inkubację, odpowiadającą emulgacji i trawieniu w jelicie cienkim, prowadzono w łaźni wodnej z wytrząsaniem (200 wychyleń/min), w temp. 37 °C przez 240 min. Po tym czasie próbki do oznaczenia stopnia emulgacji lipidów ustawiano w pozycji wertykalnej na 10 min, a z kolb stożkowych pobierano próbki dializatu i oznaczano ilość uwolnionego z masła glicerolu, stosując kolorymetryczną metodę enzymatyczną opisaną przez Fossati'ego i Prencipe [8]. Ilość wolnych kwasów tłuszczowych pozostałych po trawieniu w workach dializacyjnych oznaczano metodą miareczkową wobec czerwieni krezolowej.

Wpływ metyloksantyn na biodostępność lipidów szacowano z równania: biodostępność [%] =  $D \cdot 100 / A$ , gdzie D jest ilością glicerolu lub ilością wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych z lipidów masła w obecności metyloksantyn, natomiast A jest ilością glicerolu lub ilością wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych z lipidów masła w próbie kontrolnej.

Stopień zemulgowania lipidów masła po symulowanym trawieniu w żołądku i jelicie cienkim oznaczano stosując procedurę opisaną przez Wikierę i wsp. [30]. Jako wielkość graniczną kropeł tłuszczu zemulgowanego przyjęto 100 µm za pracą Armanda i wsp. [1].

Wszystkie eksperymenty wykonano w czterech powtórzeniach. Otrzymane wyniki analizowano przy użyciu programu statystycznego StatGraphics Plus wersja 5.1, stosując jednoczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem LSD Fishera przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Lipoliza tłuszczów odbywa się na granicy faz olej/woda, a do jej sprawnego przebiegu konieczna jest uprzednia emulgacja substratu. Wiadomo, że katalizowana przez lipazy trzustkowe hydroliza tłuszczów przebiega najintensywniej, jeżeli wielkość kropeł tłuszczu powstałej emulsji nie przekracza 10 µm [25]. W niniejszej pracy dodatek metyloksantyn do trawionego *in vitro* masła w dawce 40 µmol na 1 g nie przeszkadzał w osiągnięciu takiego stopnia emulgacji. Co więcej, wszystkie testowane N-metyloksantyny tj. kofeina, teofilina i teobromina wykazywały nawet właściwości proemulgujące (tab. 1).

Tabela 1

Wyniki emulgacji lipidów masła w obecności metyloksantyn (40  $\mu\text{mol/g}$  masła) w środowisku symulowanego przewodu pokarmowego.

Emulsification results of butter lipids in the presence of methylxanthines (40  $\mu\text{mol/g}$  butter) in the medium of *in vitro* simulated gastrointestinal tract.

Rodzaj próbki Type of sample	Lipidy zemulgowane Emulsified lipids [%]		Średnia wielkość kropeł emulsji Mean size of emulsion droplet [ $\mu\text{m}$ ]	
	żołądek gastric medium	dwunastnica duodenal medium	żołądek gastric medium	dwunastnica duodenal medium
Próba kontrolna / Control	19,5 <sup>a</sup>	69,5 <sup>a</sup>	12,11 <sup>a</sup>	11,37 <sup>a</sup>
Kofeina / Caffeine	19,5 <sup>a</sup>	70,0 <sup>a</sup>	10,64 <sup>b</sup>	8,78 <sup>c</sup>
Teofilina / Theophylline	19,0 <sup>a</sup>	70,0 <sup>a</sup>	11,45 <sup>ab</sup>	9,80 <sup>b</sup>
Teobromina / Theobromine	20,0 <sup>a</sup>	79,5 <sup>b</sup>	10,14 <sup>b</sup>	8,22 <sup>c</sup>

\* Emulsja zawierająca krople o średnicy nie przekraczającej 100  $\mu\text{m}$  / Emulsion containing droplets of a diameter not exceeding 100  $\mu\text{m}$ .

Różne litery indeksu górnego w kolumnie oznaczają różnice statystycznie istotne pomiędzy wartościami średnimi ( $p < 0,05$ ; test LSD) / Different superscript letters in column denote statistically significant differences between mean values ( $p < 0.05$ ; LSD test).

Właściwości te przejawiały się głównie w zdolności do zmniejszania wielkości kropeł powstałej emulsji bez istotnego wpływu na ilość zemulgowanego tłuszczu. Jedynie w przypadku teobrominy działającej w środowisku dwunastnicy zaobserwowano dodatkowo statystycznie istotny wzrost objętości warstwy zemulgowanego tłuszczu z 69,5 do 79,5 %. Każda z metyloksantyn, niezależnie od warunków działania, zwiększała natomiast udział w emulsji miceli małych (o średnicy do 10  $\mu\text{m}$ ), co przekładało się na istotne zmniejszenie średniej wielkości kropeł tworzących emulsję. Działanie takie występowało częściej w worku dializacyjnym, a więc w środowisku zasadowym, kiedy dochodziło do dysocjacji alkaloidów. Średnia wielkość miceli zmniejszała się w tych warunkach nawet o 3,17  $\mu\text{m}$ , podczas gdy w środowisku kwaśnym (żołądek) zmniejszenie średnicy miceli nie przekraczało 1,97  $\mu\text{m}$ . Większość znanych współczesnej nauce emulgatorów, jak: białka, fosfolipidy czy surfaktanty swoje działanie zawdzięcza amfipatycznemu charakterowi cząsteczek tj. jednoczesnej obecności w strukturze molekularnej zarówno stref polarnych, jak i niepolarnych [19, 2]. Taki dipolarny charakter mają również metyloksantyny. Każda z nich zawiera w cząsteczce ugrupowania hydrofobowe w postaci grup metylowych i ugrupowania hydrofilowe w postaci atomów tlenu i grup aminowych. Jak wynika z wykonanych badań, siła proemulgacyjnego działania metyloksantyn maleje zgodnie z szeregiem: teobromina > kofeina > teofilina. Najprawdopodobniej więc jest ona w większym stopniu zależna od rozmieszczeniem grup metylowych w cząsteczce alkaloidów niż od ich liczby. Kofeina

jest trimetyloksantyną, a teobromina podobnie jak teofilina to dimetyloksantyny. Jednak tylko teofilina nie ma grupy metylowej w pozycji N7 pierścienia purynowego, co wskazywałoby na kluczową rolę tej właśnie grupy w procesie emulgacji.

Przedstawione w tab. 1. wyniki, wskazujące jednoznacznie na proemulgujące działanie metyloksantyn w procesie symulowanego trawienia tłuszczu w przewodzie pokarmowym, nie przełożyły się na poprawę biodostępności tłuszczu. Wręcz przeciwnie, zauważono, że każdy z dodawanych do trawionego *in vitro* masła alkaloidów powodował statystycznie istotne ograniczenie uwalniania glicerolu i kwasów tłuszczowych (tab. 2).

Tabela 2

Biodostępność lipidów masła w obecności metyloksantyn (40  $\mu\text{mol/g}$  masła) szacowana *in vitro*.  
*In vitro* assessed bioavailability of butter lipids in the presence of methylxanthines (40  $\mu\text{mol/g}$  butter).

Rodzaj próbki Type of sample	Biodostępność / Bioavailability [%]*	
	kwasy tłuszczowe / fatty acids	glicerol / glycerol
Próba kontrolna / Control sample	100,0 <sup>a</sup>	100,0 <sup>a</sup>
Kofeina / Caffeine	84,4 <sup>c</sup>	83,5 <sup>c</sup>
Teofilina / Theophylline	92,5 <sup>b</sup>	90,1 <sup>b</sup>
Teobromina / Theobromine	69,9 <sup>d</sup>	76,8 <sup>d</sup>

\* Biodostępność względem próby niezawierającej metyloksantyn (próby kontrolnej) / Bioavailability compared to sample containing no methylxanthines (control sample).

Różne litery indeksu górnego w kolumnie oznaczają różnice statystycznie istotne pomiędzy wartościami średnimi ( $p < 0,05$ ; test LSD) / Different superscript letters in column denote statistically significant differences between mean values ( $p < 0.05$ ; LSD test).

Możliwość negatywnego wpływu metyloksantyn, a ściślej kofeiny na absorpcję lipidów z przewodu pokarmowego sugerowali wcześniej Wang i wsp. [26]. Według tych autorów takie działanie kofeiny jest konsekwencją modulowania przez nią metabolizmu tłuszczów w enterocytach, a dokładniej reorganizacji procesów wbudowywania i sekrecji lipidów przez chylomikrony. W cytowanej pracy nie analizowano jednak ani aktywności lipazy trzustkowej, ani stopnia emulgacji lipidów, a jak dowodzą wyniki niniejszej pracy, może to być kolejna, po sugerowanej przez Wang reorganizacji chylomikronów, przyczyna ograniczania przez metyloksantyny dostępności lipidów diety. W niniejszych badaniach ilość oznaczanych produktów lipolizy była tym mniejsza, im większą siłą emulgującą wykazywała obecna podczas trawienia metyloksantyna. Oznacza to, że biodostępność lipidów masła była najmocniej hamowana przez teobrominę (zmniejszenie ilości uwalnianych kwasów tłuszczowych i glicerolu względem próby kontrolnej średnio o 27 %), w mniejszym stopniu przez kofeinę (zmniejszenie średnio o około 16 %), a w najmniejszym stopniu przez teofilinę (zmniejszenie ilości

uwalnianych kwasów tłuszczowych i glicerolu względem próby kontrolnej średnio o około 9 %). Wynik taki sugeruje, że alkaloidy poprawiając emulgację lipidów trawionego masła musiały jednocześnie wypierać lipazę z powierzchni emulsji, ograniczając tym samym jej kontakt z hydrofobowym substratem. Takie działanie metyloksantyn nie byłoby ewenementem. Na podstawie licznie publikowanych prac wiadomo, że niektóre substancje powierzchniowo czynne np. sole żółciowe, fosfolipidy, białka czy surfaktanty mogą w istotny sposób ograniczać dostęp lipaz do zemulgowanych substratów [19, 29]. Mun i wsp. [19] podają nawet, że zdolność wymienionych emulgatorów do wypierania lipazy z emulsji maleje zgodnie z szeregiem: niejonowe surfaktanty > fosfolipidy > białka [19]. Istnieje również możliwość, że metyloksantyny nie tylko wypierały enzym z powierzchni miceli, ale łączyły się także bezpośrednio z jego białkiem, inhibując go. Ta hipoteza wymaga jednak dalszej weryfikacji.

### Wnioski

1. Kofeina, teobromina i teofilina wspomagają w sposób istotny symulowaną *in vitro* emulgację lipidów w żołądku i dwunastnicy.
2. Siła proemulgującego działania metyloksantyn zmniejsza się zgodnie z szeregiem: teobromina > kofeina > teofilina.
3. N-metyloksantyny istotnie ograniczają biodostępność lipidów masła, wypierając hydrolizującą je lipazę trzustkową z powierzchni miceli lub bezpośrednio ją inhibując.
4. Zdolność metyloksantyn do zmniejszania biodostępności lipidów maleje zgodnie z szeregiem: teobromina > kofeina > teofilina.

### Literatura

- [1] Armand M., Borel P., Dubois C., Senft M., Peyrot J., Salducci J., Lafont H., Lairon D.: Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am. J. Physiol.*, 1994, **266**, 372-381.
- [2] Bauer E., Jakob S., Mosenthin R.: Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australian J. Anim. Sci.*, 2005, **18**, 282-295.
- [3] Berube-Parent S., Pelletier C., Dore J., Tremblay A.: Effects of encapsulated green tea and guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. *Br. J. Nutr.*, 2005, **94**, 432-436.
- [4] Carnago M.C.R., Toledo M.C.F.: Caffeine content of commercial Brazilian coffee. *Cienc. Technol. Aliment.*, 1998, **18**, 421-424.
- [5] Caudle A.G., Bell L.N.: Caffeine and theobromine contents of ready-to-eat chocolate cereals. *Research and Professional Briefs*, 2000, **100 (6)**, 690-692.
- [6] Eteng M.U., Ettarh R.R.: Comparative effects of theobromine and cocoa extract on lipid profile in rats. *Nutr. Res.*, 2000, **20 (10)**, 1513-1517.
- [7] Food Standards Agency: 1998. Food surveillance information sheet 144.

- [8] Fossati P., Prencipe L.: Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, 1982, **28** (10), 2077-2080.
- [9] Gokulakrishnan S., Chandraraj K., Sathyanarayana N.G.: Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **37**, 225-232.
- [10] Greenway F.K., de Jonge L., Blanchard D., Frisard M., Smith S.R.: Effect of dietary herbal supplement containing caffeine and ephedra on weight, metabolic rate, and body composition. *Obesity Res.*, 2004, **12** (7), 1152-1157.
- [11] Grosso L.M., Bracken M.B.: Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann. Epidemiol.*, 2005, **15**, 460-466.
- [12] Haller C.A., Jacob P. III, Benowitz N.L.: Enhanced stimulant and metabolic effects of combined ephedrine and caffeine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004, **75**, 259-273.
- [13] Hicks M.B., Hsieh Y., Bell L.N.: Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration. *Food Res. Int.*, 1996, **29**, 325-330.
- [14] Kalayli S., Ocak M., Küçük M., Abbasoğlu R.: Does caffeine bind to metal ions? *Food Chem.*, 2004, **84**, 383-388.
- [15] Lima W.P., Carnevali Jr L.C., Eder R., Costa Rosa L.F., Bacchi E.M., Seelaender M.C.: Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. *Clin. Nutr.*, 2005, **24**, 1019-1028.
- [16] Lorist M.M., Tops M.: Caffeine and effects on cognition with special attention to adenosine-dopamine interaction. *Brain Cogn.*, 2003, **53**, 82-94.
- [17] Mandel H.G.: Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food Chem. Tox.*, 2002, **40**, 1231-1234.
- [18] Mika M., Wikiera A., Żyła K.: Effects of non fermented tea extracts on *in vitro* digestive hydrolysis of lipids and on cholesterol precipitation. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, **226** (4), 731-736.
- [19] Mun S., Decker E.A., McClements D.J.: Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Res. Int.*, 2007, **40**, 770-781.
- [20] Nafisi S., Shamloo D.S., Mohajerani N., Omidi A.: A comparative study of caffeine and theophylline binding to Mg(II) and Ca(II) ions: studied by FTIR and UV spectroscopic methods. *J. Mol. Struct.*, 2002, **608**, 1-7.
- [21] Papaioannou T.G., Karatzi K., Karatzis E., Papamichael Ch., Lekakis J.P.: Acute effects of caffeine on arterial stiffness, wave reflections, and central aortic pressures. *A.J.H.*, 2005, **18**, 129-136.
- [22] Sugawara M., Mochizuki T., Takekuma Y., Miyazaki K.: Structure-affinity relationship in the interactions of human organic anion transporter 1 with caffeine, theophylline, theobromine and their metabolites. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2005, **1714**, 85-92.
- [23] Tarka S.M., Shilvey C.A.: Methylxanthines. Toxicological aspects of food. Elsevier Applied Science Publishers, London 1987.
- [24] Usmani O., Belvisi M., Patel H., Crispino N., Birrell M., Korbonits M., Korbonits D., Barnes P.: Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *FASEB J.*, 2005, **19** (2), 231-233.
- [25] Van Aken G.A.: Relating food emulsion structure and composition to the way it is processed in the gastrointestinal tract and physiological responses: what are the opportunities? *Food Biophys.*, 2010, **5**, 258-283.
- [26] Wang S., Noh S.K., Koo S.I.: Epigallocatechin gallate and caffeine differentially inhibit the intestinal absorption of cholesterol and fat in ovariectomized rats. *J. Nutr.*, 2006, **136**, 2791-2796.
- [27] Westerterp-Plantenga M., Diepvens K., Joosen A., Berube-Parent S., Tremblay A.: Metabolic effects of spices, teas, and caffeine. *Physiol. Behav.*, 2006, **89**, 85-91.
- [28] WHO: Evaluation of certain food additives and contaminants. 44<sup>th</sup> Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 1995, **859**, 5-8.



- [29] Wickham M., Garrod M., Leney J., Wilson P.D.G., Fillery-Travis A.: Modification of a phospholipidstabilized emulsion interface by bile salt: effect on pancreatic lipase activity. *J. Lipid Res.*, 1998, **39**, 623-632.
- [30] Wikiera A., Mika M., Żyła K.: Wpływ katechin i wybranych stabilizatorów żywności na emulgację lipidów masła w warunkach symulowanego *in vitro* przewodu pokarmowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **3 (64)**, 137-144.

#### EFFECT OF METHYLOXANTINES ON EMULSIFICATION AND BIOAVAILABILITY OF BUTTER LIPIDS AS ASSESSED *IN VITRO*

##### S u m m a r y

The effect was assessed of the N-methylxanthines: caffeine, theophylline, and theobromine, commonly consumed with the diet, on the emulsification of butter lipids and bioavailability thereof under the *in vitro* simulated conditions of human stomach and intestines. The research material was farmhouse butter containing a 40  $\mu\text{mol}/1\text{g}$  addition of the tested compounds. Based on the results obtained, it was found that, in the dose analyzed, each of the alkaloids intensified the process of forming the emulsion by increasing the dispersion degree thereof. The power of the pro-emulsifying activity of alkaloids depended on the arrangement of methyl groups in a molecule and increased according to the order: 1,3-dimethylxanthine (theophylline)  $\rightarrow$  1,3,7-trimethylxanthine (caffeine)  $\rightarrow$  3,7-dimethylxanthine (theobromine). At the same time, each of the alkaloids significantly reduced the bioavailability of lipids. In the case of theophylline, the amount of fatty acids and glycerol, released from the lipids, decreased by 9% on the average compared to the control sample; in the case of caffeine: by 16%, and as for the theobromine by as much as 27%. The results as indicated above suggest that under the conditions of simulated digestion of lipids in the alimentary canal, the alkaloids must have impacted not only the hydrophobic substrate that stimulated emulsification thereof, but, also, the pancreatic lipase. In the latter case, they partially displaced the pancreatic lipase from the micelle's surface, and, thereby, reduced its direct contact with the substrate, and effectively inhibited it.

**Key words:** methylxanthines, emulsification of lipids, bioavailability of lipids, *in vitro* ☒