

Charakteristika kofeinu a možnosti jeho stanovení

Martina Faltýnková

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martina FALTÝNKOVÁ**

Osobní číslo: **T080225**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Charakteristika kofeinu a možnosti jeho stanovení**

Zásady pro vypracování:

1. Alkaloidy
2. Výskyt kofeinu
3. Reakce a změny
4. Biologické účinky
5. Stanovení kofeinu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1]VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Praha: Osis, 2002. Steroidní glykoalkaloidy, s. 319. ISBN 80-86659-03-8.

[2]LÜLLMANN, Heinz ; MOHR, Klaus ; WEHLING, Martin. *Farmakologie a toxikologie*. 1s.l.J : Grada Publishing a.s., 2004. 725 s. ISBN 8024708361,9788024708362.

[3]MORAVCOVÁ, J. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Praha: VŠCHT, 2006, 107 s.

[4]ASHIHARA, H. and CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *TRENDS in Plant Science*, 2001, Vol. 6, No. 9, 407-413.

[5]GOKULAKRISHNAN, S., CHANDRARAJ, K., GUMMADI, S. N. Mikrobial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Mikrobial Technology*, 2005, Vol. 37, 225-232.

[6]SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, Vol. 40, 1243-1255.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Zuzana Lazárková, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. května 2011

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MARTINA FALTYNOVÁ

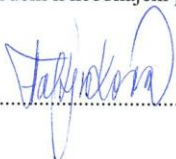
Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 21.5.2011


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na velmi známý alkaloid kofein. Náplní práce je charakterizování kofeinu z hlediska chemického a z hlediska jeho účinků na lidský organizmus. Dále se práce zabývá výskytem kofeinu, jeho metabolismem a reakcemi a změnami, které mohou u kofeinu probíhat. V druhé polovině práce jsou popsány principy metod, kterými lze kofein stanovit a příklady konkrétních stanovení těchto metod, které jsou používány v praxi.

Klíčová slova: alkaloid, kofein, stimulant, kapalinová chromatografie, infračervená spektrometrie

ABSTRACT

This work is focused on the well known alkaloid caffeine. The scope of the work is to characterize this alkaloid in terms of chemical composition and its effects on the human organism. The thesis also deals with the occurrence of caffeine, its metabolism and the reactions and changes that may concern caffeine. In the second half of the work there is described the principles of the caffeine analysis methods and particular examples of these methods that are used in practice.

Keywords: alkaloid, caffeine, stimulant, liquid chromatography, infrared spectrometry

Chtěla bych především poděkovat Ing. Zuzaně Lazárkové Ph.D. za čas, trpělivost a cenné odborné rady, které mi věnovala při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu ve studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA KOFEINU	12
1.1 ZAŘAZENÍ KOFEINU	12
1.2 CHARAKTERISTIKA FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ KOFEINU	13
1.3 METABOLIZMUS KOFEINU	14
1.4 VÝSKYT KOFEINU	15
1.4.1 Kávovník arabský	15
1.4.2 Čajovník čínský	17
1.4.3 Kola pravá	18
1.4.4 Kakaovník pravý	18
1.4.5 Nealkoholické nápoje	19
1.4.6 Guarana (Paulinie nápojná)	19
1.5 REAKCE A ZMĚNY KOFEINU	19
1.6 BIOLOGICKÉ ÚČINKY KOFEINU	20
1.6.1 Nežádoucí účinky	21
2 MOŽNOSTI STANOVENÍ KOFEINU	23
2.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	23
2.1.1 Princip	23
2.1.2 Přístrojové vybavení	23
2.1.3 Použití	24
2.1.4 Praktické stanovení kofeinu kapalinovou chromatografií	25
2.1.4.1 Stanovení ve vzorku kávy	25
2.1.4.2 Stanovení ve vzorku čaje	26
2.1.4.3 Stanovení ve vzorku kakaa	26
2.1.4.4 Stanovení v nealkoholických nápojích typu Cola a v energetických nápojích	26
2.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE	27
2.2.1 Princip	27
2.2.2 Přístrojové vybavení	27
2.2.3 Použití	28
2.2.4 Praktické stanovení kofeinu plynovou chromatografií	29
2.2.4.1 Stanovení v nealkoholických nápojích	29
2.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE	29
2.3.1 Princip	29
2.3.2 Přístrojové vybavení	29
2.3.3 Použití	30
2.3.4 Praktické stanovení kofeinu infračervenou spektrometrií	31
2.3.4.1 Stanovení ve vzorku kávy	31
2.3.4.2 Stanovení ve vzorku nealkoholických nápojů	31
2.3.4.3 Stanovení ve vzorku čaje	31
2.4 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	32
2.4.1 Princip	32
2.4.2 Přístrojové vybavení	32

2.4.3	Použití	33
2.4.4	Praktické stanovení kofeinu kapilární elektroforézou	33
2.4.4.1	Stanovení ve vzorku kávy	33
2.4.4.2	Stanovení ve vzorku zeleného čaje	34
2.4.4.3	Stanovení v nealkoholických nápojích	34
2.5	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	34
2.5.1	Princip	34
2.5.2	Přístrojové vybavení	35
2.5.3	Použití	35
2.5.4	Praktické stanovení hmotnostní spektrometrií	36
2.5.4.1	Stanovení v zeleném čaji	36
2.5.4.2	Stanovení ve spojení s plynovou chromatografií ve vzorku nealkoholických nápojů	36
2.5.4.3	Stanovení ve spojení s kapalinovou chromatografií ve vzorku kávy ..	36
2.6	VOLTAMETRIE.....	37
2.6.1	Princip	37
2.6.2	Přístrojové vybavení	37
2.6.3	Použití	37
2.6.4	Praktické stanovení.....	37
2.6.4.1	Stanovení ve vzorku kávy	37
2.7	POTENCIOMETRIE.....	38
2.7.1	Princip	38
2.7.2	Přístrojové vybavení	38
2.7.3	Použití	38
ZÁVĚR		39
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		40
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		45
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		46
SEZNAM TABULEK		47

ÚVOD

Po staletí lidé konzumují rostliny, u kterých oceňují jejich příznivé účinky na organismus, mezi které patří zlepšení koncentrace a povzbuzení bdělého stavu. Látky, které tyto rostliny obsahují, se díky těmto vlastnostem řadí do skupiny stimulantů. Nejvíce užívaným stimulantem je kofein. Kofein je obsažen v řadě rostlin, jsou to Kávovník arabský (*Coffea arabica*), Kakaovník pravý (*Theobroma cacao*), Čajovník čínský (*Thea sinensis*) a Kola pravá (*Cola vera*) a také se nachází v nealkoholických a energetických nápojích.

Kofein byl objeven v roce 1819 v kávových zrnech německým vědeckým pracovníkem, který se jmenoval Friedlieb Ferdinand Runge. Podařilo se mu extrahovat látku, která byla odpovědná za stimulační účinky kávy. Nejdříve pomocí papírové chromatografie oddělil jednotlivé složky z extraktu kávy a poté kofein separoval a vysušil do podoby bílého prášku hořké chuti. Separovanou látku pojmenoval kofein podle kávy, ze které se mu podařila izolovat.

Tato práce se zabývá charakterizováním kofeinu z hlediska chemického, podle kterého patří do skupiny purinových alkaloidů, protože jeho vzorec je odvozen od purinu. V této skupině ho doprovází teobromin, teofylin, paraxantin, monometylxantin, heteroxantin a metylmočová kyselina. Jeho metabolismus probíhá v játrech a je vylučován močí. Jeho přítomnost lze stanovit ze všech tělních tekutin. Na reakce a změny kofeinu má vliv více faktorů jako je druh kávy, kvalita kávy a způsob pražení. Při chronickém příjmu kofeinu se nedá prokázat poškození organismu, ale u obzvláště citlivých lidí se objevuje nespavost, úzkost a neklid. Problematika vysokého příjmu se v současné době pojí s kardiovaskulárním onemocněním.

Příklady metod, kterými lze kofein stanovit jsou kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a infračervená spektrometrie. Před každým stanovením u všech zmiňovaných metod musí proběhnout příprava vzorku, která u pevných vzorků zahrnuje extrakci chloroformem nebo extrakci v horké vodě, následná filtrace a uchování vzorku před vlastní analýzou. Nejpoužívanější metodou v praxi je vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC. U analýzy se provádí proměřování kalibračních vzorků o známé koncentraci kofeinu a poté následuje analýza vzorku a porovnání s kalibrační řadou.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA KOFEINU

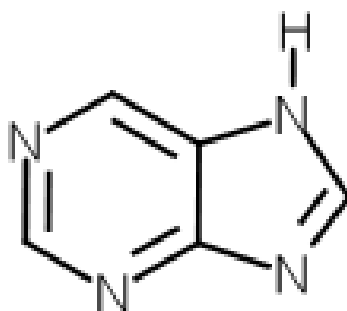
Kofein řadíme mezi alkaloidy, což jsou dusíkaté báze, které se nacházejí v rostlinách. Kofein byl objeven v roce 1819 v kávových zrnech [1]. Kromě méně významných aminů alifatických a menšího počtu mnohem významnějších bází aromatických obsahuje významná většina alkaloidů dusíkatý atom, resp. dusíkaté atomy v nejrůznějších heterocyklických útvarech. Označení alkaloid vzniklo roku 1823 [2, 3].

Prvořadým smyslem alkaloidů obsažených v rostlinách je zřejmě vlastní ochrana rostliny před živočichy jako jsou hmyz, larvy a brouci. Mnohem menší význam pro rostlinu má očividně vylučování alkaloidů jako detoxikačních produktů dusíkatých látek [2, 3].

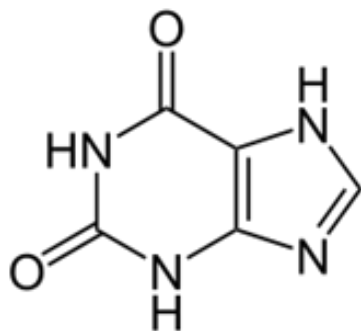
Bylo prokázáno, že alkaloidy se v rostlině tvoří z největší části ve zcela mladých buňkách, ale mohou být uloženy kdekoli v rostlině. Jejich vznik je ovlivněn mnoha faktory, především kvalitou půdy a množstvím dusíkatých látek, pH půdy, světlem, vlhkostí apod. [2].

1.1 Zařazení kofeinu

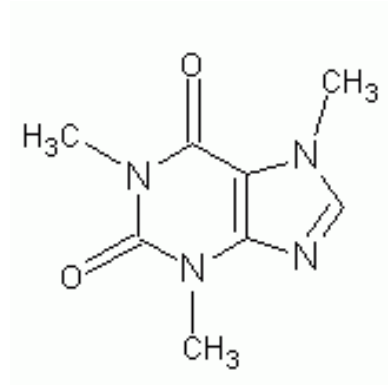
Kofein se podle struktury řadí mezi purinové alkaloidy, které jsou odvozeny od purinu (Obrázek 1), resp. od produktu jeho oxidace xantinu (Obrázek 2). Purinové alkaloidy jsou nejrozšířenějšími alkaloidy v potravinách. Jedná se o metylderiváty xantinu. Nejrozšířenější z nich je 1,3,5-trimetylxantin nazývaný triviálně kofein (Obrázek 3) [3, 4].



Obrázek 1: Vzorec purinu [5]

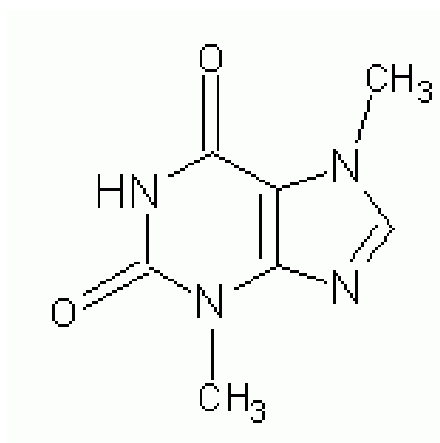


Obrázek 2: Vzorec xantinu [6]

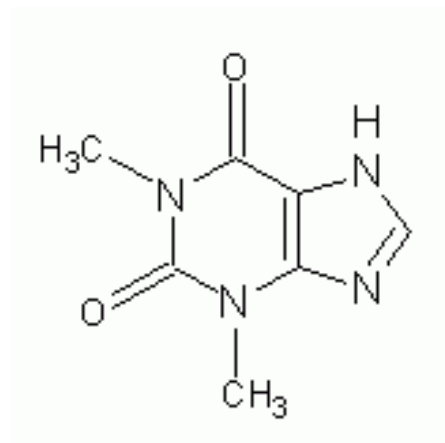


Obrázek 3: Vzorec kofeinu [3]

Kofein je doprovázen dimetylxantiny teobrominem (Obrázek 4.), teofylinem (Obrázek 5) a paraxantinem a rovněž monometylxantinem, heteroxantinem a metylmočovými kyselinami, které jsou s výjimkou kakaa a čokolády minoritními alkaloidy [3, 4].



Obrázek 4: Vzorec teobrominu [7]



Obrázek 5: Vzorec teofylinu [7]

1.2 Charakteristika fyzikálně-chemických vlastností kofeinu

Základní fyzikálně chemické vlastnosti kofeinu jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti kofeinu [8]

název	1,3,7-trimetyl-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion 1,3,7-trimetylxantin
sumární vzorec	$C_8H_{10}N_4O_2$
molární hmotnost	194,19 g.mol ⁻¹
bod tání	234–236,5 °C
hustota (při 20 °C)	1,2 g.cm ⁻³
skupenství (při 20 °C)	pevné
rozpuštnost ve vodě (při 25 °C)	0,217 g.l ⁻¹

1.3 Metabolismus kofeinu

Kofein se po perorálním užití absorbuje z gastrointestinálního traktu, do krve se dostává v průběhu 30 – 45 minut, ale čas vstřebání může dosahovat i 120 minut; děj absorpce je individuální u každého člověka [9, 10]. Jakmile se kofein vstřebá do krevní systémové cirkulace, tak volně prochází všemi tkáněmi. Kofein a jeho primární metabolity paraxantin, teobromin a teofylin jsou zjistiitelné ze všech tělních tekutin, i z pupečnickové krve. Prostřednictvím tělesných tekutin se v těle dále distribuují a následně se metabolizují a vylučují močí [11]. Průměrný poločas kofeinu v organismu je 4 hodiny (interval se pohybuje mezi 2 až 10 hodinami) [10].

Kofein je metabolizován v játrech pomocí jaterních mikrozomálních enzymových systémů dimetylxantináz. Hlavním enzymem zapojeným do metabolismu kofeinu je cytochrom P450 1A2, který je schopen metabolizovat až 95 % kofeinu [10].

Existují exogenní faktory, které ovlivňují metabolismus a rychlost vylučování kofeinu. Je to především kouření, virová infekce, srdeční a jaterní onemocnění, těhotenství, některé potraviny a také užívání drog a některých léků. V těhotenství se snižuje rychlost odbourávání kofeinu, a proto se může hromadit v těle plodů a novorozenců, kteří nemají potřebné enzymy k metabolizování a odbourání z těla. Naopak při kouření cigaret se rychlost metabolismu kofeinu až zdvojnásobuje. Cigaretový kouř obsahuje polycyklické

aromatické uhlovodíky, o kterých je známo, že zvyšují činnost jaterních enzymů. Bylo prokázáno, že větší konzumace kořenové zeleniny (celer, petržel, pastinák a mrkev) snižují aktivitu enzymu, který metabolizuje kofein a naopak košťálová zelenina (kapusta, brokolice, květák a zelí) zvyšuje aktivitu enzymu a tím urychluje i metabolismus kofeinu [10].

1.4 Výskyt kofeinu

Kofein se vyskytuje v řadě rostlin, které se již po dlouhou dobu používají jako poživatiny. Mezi tyto rostliny patří *Coffea arabica*, *Thea sinensis*, *Cola vera*, *Ilex paraguayensis* (čaj maté) a také *Theobroma cacao* [3, 9, 11, 12]. Kofein se vyskytuje i v nealkoholických osvěžujících nápojích, do kterých se přidává. Tento kofein se izoluje při výrobě bezkofeinové kávy [4]. Je možno ho též vyrábět průmyslově. Vyrábí se metylací xantinu, který se získává z kyseliny močové [13].

1.4.1 Kávovník arabský

Nejvýznamnější a nejznámější rostlina, která obsahuje alkaloid kofein je Kávovník arabský (*Coffea arabica* L., Obrázek 6) [3]. Dalším významným druhem je *Coffea robusta*. Tyto dva druhy kávy se liší chemickým složením. Arabica obsahuje více tuků a robusta obsahuje více kofeinu, sacharózy, polyfenolů a kyseliny chlorogenové a jejich derivátů. Arabica zaujímá 80 % světového obchodu, díky svému typickému aroma [14].

Kávovník arabský je stálezelený keř nebo strom pěstovaný v četných odrůdách podobně jako jiné druhy kávovníků. Pěstuje se především v Brazílii, Kolumbii, Mexiku, Guatemale, Angole, Pobřeží slonoviny atd. [13]. U kávovníku vzniká kofein v mladých listech a nezralých plodech a hromadí se v těchto orgánech v průběhu zrání [3].

Obrázek 6: *Coffea arabica* [15]

Sbírají se plody, které se nejprve zbaví dužniny opracováním mezi válci (suchý či mokrá způsob po nabobtnání semen) a procesem fermentace se zbytek dužniny odstraní. Tento krok je důležitý z hlediska sensorických vlastností (chuti a vůně) konečného výrobku, protože v semenech dochází k významným změnám. V loupacím stroji se plody oloupají, slupky se odstraní proudem vzduchu a poté se kávová semena po fázi vysušení praží na teplotu 200 – 250 °C, čímž se vytváří typické aroma a chuť kávy. Při pražení vzniká tzv. kafeol, což je kapalný podíl obsahující furfural, pyridin, kyselinu valerovou a fenol. Kofein částečně sublimuje a zachycuje se v kondenzátoru. Obsah kofeinu je zhruba do 2,5 %, je vázán na kyselinu chlorogenovou. Dalšími obsahovými složkami je trigonelin (*N*-methylbetain kyseliny nikotinové), třísloviny, glukóza, olej, proteiny. Při výrobě bezkofeinové kávy se kofein izoluje extrakcí těkavými organickými rozpouštědly [13], zejména dichlormetanem, nověji superkritickým oxidem uhličitým. Získaný kofein se využívá k obohacení kolových nealkoholických nápojů a ve farmacii [4].

Množství kofeinu je závislé na způsobu přípravy nálevu (teplotě vody, době extrakce aj.) a také na druhu kávy, který se používá (Arabica, Robusta) [9]. Průměrný obsah kofeinu v jednom šálku kávy (100 ml) je asi 80 mg; v bezkofeinové kávě se kofein nachází

v koncentraci 1 – 6 mg.100 ml⁻¹, v instantní kávě 29 mg.100 ml⁻¹, v překapávané 37 – 132 mg.100 ml⁻¹ a ve filtrované 93 – 127 mg.100 ml⁻¹ [4].

1.4.2 Čajovník čínský

Čajovník čínský (*Thea sinensis*, Obrázek 7) je keř nebo strom pěstovaný v Číně, Indii, Barmě, na Cejlonu atd. Obsahuje v listech až 4,5 % kofeinu, který je doprovázen teofylinem, teobrominem a xantinem (směs alkaloidů se dříve nazývala tein). Množství kofeinu je závislé na stáří lístků. Čím jsou lístky mladší, tím více kofeinu obsahují. Běžný šálek čaje obsahuje asi polovinu až třetinu kofeinu ve srovnání se šálkem kávy stejné velikosti [4]. Zpracováním čajových lístků se získává zelený čaj (rychlé sušení na pánvích, aby došlo k deaktivavaci enzymů) nebo černý čaj (listy se nechají zavadnout, pak se srolují, tím se poruší buněčná struktura a aktivují se enzymy, a nechají se fermentovat). K dalším složkám, které čajovník obsahuje, patří třísloviny (až kolem 15 %), silice, flavonové glykosidy a saponiny [13].



Obrázek 7: *Thea sinensis* [16]

1.4.3 Kola pravá

Purinové alkaloidy jsou zastoupeny i v semenech Koly pravé (*Cola vera*), které obsahují 1 – 3 % kofeinu. Alkaloidy jsou vázány na třísloviny a sušením se z nich uvolňuje bezbarvý katechin, který po oxidaci a polymerizaci dává tzv. flobafen, barevný komplex nazývaný jako kolová červeň. Plody koly se využívají jako stimulans, a mají tonizující účinky a používají na výrobu nealkoholických nápojů (viz kapitola 1.4.5) [13].

1.4.4 Kakaovník pravý

Kakaovník pravý (*Theobroma cacao* L., Obrázek 8) je pěstován hlavně v Brazílii, Ghaně a Nigérii. Semena se po vyjmutí z dužniny fermentují (vytvoří se vonné látky, změní barva), praží (vzniká charakteristická vůně a chuť), ochladí a oloupou. Semena se dále drtí mezi horkými válci a po drcení vznikne tzv. kakaová hmota. Kakaové máslo se z ní oddělí lisováním a zbytek se rozele na kakaový prášek. Využití je přednostně v potravinářském průmyslu [13].



Obrázek 8: *Theobroma cacao* [17]

Celkový obsah alkaloidů kávových bobů bývá v rozmezí 0,7 – 3,2 % v sušině. Hlavního alkaloidu teobrominu je 0,6 – 3,1 %, kofeinu pak 0,02 – 0,5 %. Hořká čokoláda obsahuje

0,3 – 0,7 % teobrominu a 0,02 – 0,03 % kofeinu, mléčná čokoláda 0,1 – 0,4 % teobrominu a 0,01 – 0,02 % kofeinu. Čokoládové nápoje obsahují 260 – 440 mg·dm⁻³ teobrominu a 10 – 12,5 mg·dm⁻³ kofeinu [4].

1.4.5 Nealkoholické nápoje

V kolových nápojích (např. Coca Cola) pochází část kofeinu z ořechů některých druhů koly, hlavně Koly zašpičatělé (*Cola acuminata*) a Koly lesklé (*Cola nitida*), kde je jeho obsah 1,5 – 2,5 %. Zbytek je doplňován kofeinem, který pochází z jiných zdrojů (např. získaný při výrobě bezkofeinové kávy). Celkový obsah kofeinu v nealkoholických nápojích se zpravidla pohybuje v rozmezí 50 – 250 mg·dm⁻³ [4].

Podle Vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 52/2002 Sb. se kofein může přidávat do nealkoholických nápojů v nejvyšším povoleném množství 250 mg·dm⁻³, do energetických nápojů pak v nejvyšším povoleném množství 320 mg·dm⁻³ [4].

1.4.6 Guarana (Paulinie nápojná)

Kofein v množství 2,5 – 7,5 % (resp. směs alkaloidů zvaných dříve guaranin) obsahují také guaranové oříšky, tj. semena liany rodu *Paulinia* (*Paullinia cupana*), pocházející z tropů Jižní Ameriky. Po upražení se zpracovávají na hmotu připomínající chutí čokoládu. Slouží také k přípravě osvěžujícího nápoje [4].

1.5 Reakce a změny kofeinu

Metylxantiny jsou jako sloučeniny velmi stabilní a s výjimkou reakcí při fermentaci čajových listů a kakaových bobů k dalším reakcím během technologického zpracování surovin a skladování prakticky nedochází. Při výrobě zeleného a černého čaje vznikají dimetylxantiny a další puriny jako produkty katabolizmu kofeinu [4].

Při pražení kávy se obsah kofeinu prakticky nemění. Trigonellin, který doprovází alkaloidy kávy, se však rozkládá na nikotinovou kyselinu a na těkavé sensoricky aktivní pyridiny. Poměr obsahu trigonellinu a kofeinu se proto využívá jako indikátor stupně pražení kávy [4]. V kávě během procesu pražení dochází k Maillardově reakci. Při této reakci vznikají

jako konečné produkty melanoidiny. Melanoidiny jsou makromolekulární látky hnědé barvy. Tyto látky mohou reagovat se sloučeninami, které ovlivňují chuť a vůni kávy, a proto se u kávy může změnit vnímání jejího aroma. Tato změna je pravděpodobně způsobena reakcí melanoidinů s sensoricky aktivními látkami jako jsou ketony a estery. Zda k těmto reakcím dochází a jak velký mají dopad na sensorické vlastnosti kávy, záleží i na druhu, kvalitě kávy a na způsobu pražení [18].

1.6 Biologické účinky kofeinu

Kofein můžeme díky jeho účinkům na organismus zařadit do skupiny látek, které se nazývají analeptika. Analeptika jsou látky, které působí centrálně dráždivě, při předávkování vyvolávají křeče. Analeptikum, které již v malých dávkách vyvolává pocit „povzbuzení“ se označuje jako psychoanaleptikum. Mezi psychoanaleptika se zařazují metylxantiny (mezi které patří kofein), amfetaminy a nespecifická analeptika [12].

Kofein (1,3,7-trimeylxantin) má z metylxantinů nejsilnější psychoanaleptický účinek. Teofylin (1,3-dimetyl xantin) je o něco méně účinný, teobromin (3,7-dimetyl xantin) centrálně budivý účinek nemá [12].

V denních malých dávkách ($< 3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) působí kofein jako stimulant centrálního nervového systému, zvyšuje výkonnost, zlepšuje náladu, zrychluje reakční dobu a působí močopudně [19]. Vysoké dávky však mají různé neuroendokrinní účinky a velmi vysoké dávky údajně působí teratogenně. Teobromin a teofylin vykazují slabší stimulační účinky než kofein, mohou způsobit abnormality spermatogenních buněk [4]. Kofein jako léčivo se používá pro překonání stavů únavy. Teofylin má zvláštní význam při terapii bronchiálního astmatu [12].

Kofein působí přednostně na mozkovou kůru. Pravděpodobně účinkuje ovlivněním adenosinového receptoru. V pokusech na zvířatech se (sub)letálními dávkami kofeinu dají vyvolat křeče typické pro analeptika a kromě toho podráždění míchy. Účinky terapeutických dávek kofeinu (0,05 – 0,2 g perorálně) na mozkovou kůru záleží na výchozím rozpoložení člověka: únava zmizí, zvyšuje se duševní vnímavost, schopnost zapamatovat si a schopnost přemýšlet. Jestliže je ovšem osoba již plně probuzena, pak

kofein prakticky nevyvolá další zlepšení tělesné ani duševní výkonnosti. Teofylin tak budící účinky na psychiku nemá [12].

Dávky kofeinu, obsažené v 1 – 3 šálcích kávy nebo čaje, zabraňují usnutí i prospání. Paradoxně u starých lidí a hypertoniků může kofein usnutí ulehčit [12]. Vysvětlení tohoto účinku prozatím není známo. Vyšší dávky kofeinu vyvolávají trysk myšlenek, neklid, třes a někdy i srdeční arytmie [19].

Kofein a teofylin ve vysokých dávkách dráždí oběhová centra a také dechové centrum. Krevní tlak nestoupá, protože periferním ovlivněním kožních renálních i koronárních cév nastává vazodilatace. Obě látky stimulují glykogenolýzu, protože inhibují fosfodiesterázu, která aktivuje dekompozici 3^+ , 5^+ -cAMP. Kromě toho se uvolňuje hormon noradrenalin v centrálním nervu a hormon adrenalin z nadledvin. Tím se výše uvedené účinky částečně zesilují. Vazokonstrikce mozkových cév vzniká přímým účinkem na hladkou svalovinu [9, 12]. Srovnání účinnosti kofeinu a teofylinu je součástí Tabulky 2.

Tabulka 2: Relativní účinnost kofeinu a teofylinu [12]

	kofein	teofylin
podráždění mozku	+++	++
podráždění prodloužené míchy	+++	++
stimulace srdce	+	+++
bronchodilatace	+	+++
vazokonstrikce mozkových cév	+++	+++
diuréza	+	+++

Pozn.: Význam symbolů: + slabý účinek; ++ střední účinek; +++ silný účinek

1.6.1 Nežádoucí účinky

Při chronickém příjmu kofeinu (pití čaje nebo kávy) se nedá prokázat poškození organismu. U obzvláště citlivých lidí se může objevit nervozita, anxiózní neuróza, nespavost, úzkost, neklid [9, 12].

Mnoho dětí si zvykne na pravidelný přívod kofeinu již v raném věku, protože osvěžující kolové nápoje obsahují kofein v účinném množství. Jestliže děti trpí výše uvedenými příznaky, vždy je potřebné vzít v úvahu nadměrné požívání kofeinu. Také při otravě alkoholem je třeba zvážit případnou účast kofeinu, protože nápoje s vysokým obsahem alkoholu se často požívají zředěné kolovými nápoji. Zastřeně vnímané účinky kofeinu pak modifikují charakter výsledného alkoholického opojení [12]. Při náhlém odnětí kofeinu se mohou vyvinout bolesti hlavy, únava, ospalost a podrážděnost, které po přívodu kofeinu ustanou. Jiné abstinenční příznaky se neobjeví [19].

Po několik desetiletí byl předmětem studií vliv kofeinu na kardiovaskulární nemoci, protože vládla domněnka, že kofein má vliv na krevní lipidy, tlak krve, arytmii a další poruchy činnosti srdce [11]. V současné době neexistuje žádný důkaz, že kofein může mít jakýkoli prospěch pro srdce, naopak některé výsledky naznačují, že je škodlivý za určitých podmínek. Faktory, které mohou přispět ke koronárním srdečním onemocněním, jsou určitě spojeny s životním stylem jedince. Velice podstatný vliv mají samozřejmě i zděděné genetické dispozice k tomuto onemocnění [14, 20].

Kofein je jedním s faktorů, které zvyšují vyplavování stresových hormonů, jako je adrenalin, noradrenalin a kortizol, které mohou mít vliv na zvyšování systolického i diastolického krevního tlaku a snižování srdeční frekvence [14, 21, 22].

Z údajů doložených výzkumem lze dojít k závěru, že pouze velká spotřeba více jak 6 šálek nefiltrované kávy denně poškozuje srdce. Epidemiologické studie ukazují, že mírná konzumace kofeinu není škodlivá, dokonce malé koncentrace mají pozitivní vliv na kardiovaskulární systém [14].

2 MOŽNOSTI STANOVENÍ KOFEINU

2.1 Kapalinová chromatografie

2.1.1 Princip

Mobilní fázi v kapalinové chromatografii je kapalina. O separaci složek vzorku na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují nejen interakce se stacionární fází, ale i použitá mobilní fáze. Analyt se v průběhu separace rozděluje mobilní a stacionární fází [23, 24]. Strávený čas v jedné nebo v druhé fázi závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Využitelné mechanismy jsou separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Chromatografie se rozlišuje na základě uspořádání stacionární fáze na kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii [23].

Srovnáním kapalinové a plynové chromatografii z hlediska účinnosti zjistíme, že v kapalinové chromatografii je nižší příspěvek molekulární difúze složky, protože kapalina má o hodně vyšší viskozitu než plyn. Naopak, zanedbatelný příspěvek odporu převodu hmoty v mobilní fázi je v plynové chromatografii, ale v kapalinové chromatografii se projevuje a sčítá se s příspěvkem odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi [23, 25].

2.1.2 Přístrojové vybavení

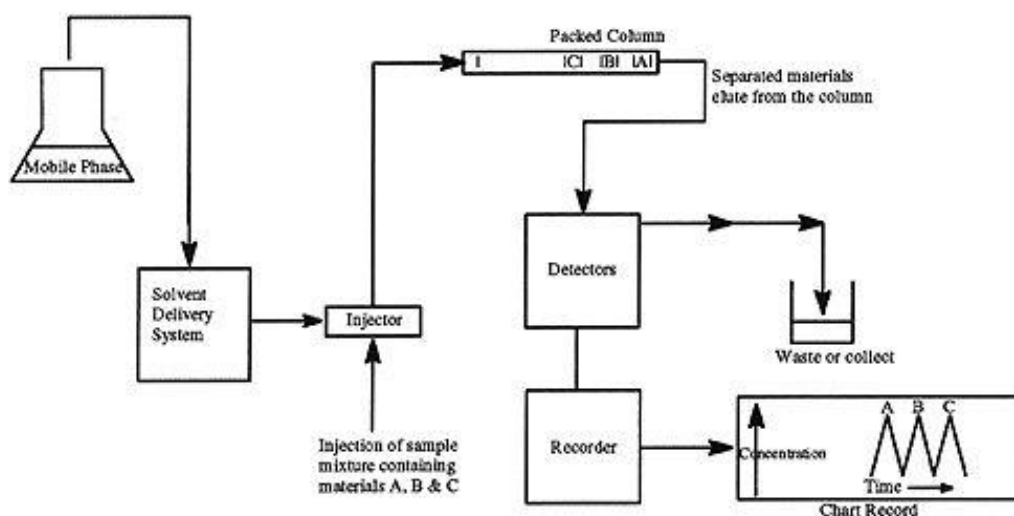
V klasické kapalinové chromatografii se skleněná trubice o délce 0,5 m a průřezu asi 2 cm, dole zakončenou fritou a kohoutem, plní zrnitým sorbentem s velkým průměrem částic (např. oxidem hlinitým). Na horní vrstvu náplně se dávkuje malé množství vzorku a pak se přidá mobilní kapalná fáze (eluent). Mobilní fáze postupuje kolonou působením gravitační síly, složky vzorku se od sebe separují a v odlišných časech opouštějí spodní část kolony [25]. Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysoce účinné kapalinové chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC). Použitím dostatečně malých zrníček, která kladou prostupující kapalině značný odpor, se zajistí účinná separace [23].

Kapalinový chromatograf (Obrázek 9) je složen z čerpadla, zásobníků mobilní fáze, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení [23].

Kapalina je čerpána do kolony pístovými nebo membránovými čerpadly. Používané materiály čerpadla jsou nerezová ocel, keramika a plast. Směšovací zařízení zajišťuje složení mobilní fáze, které může být stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Dávkovací zařízení musí být zhotoveno z inertních materiálů (nerezová ocel, titan, některé polymery) [25]. Dávkuje se injekční stříkačkou. Injekční zařízení může být ovládáno ručně i automaticky. V současné době bývají injekční systémy nahrazeny dávkovacím obtokovým kohoutem. Kolony jsou používány pouze náplňové. Pro většinu analýz jsou zhotoveny z nerezové oceli. Existuje mnoho kolon o různých délkách a vnitřních průměrech, podle využití se volí vhodné rozměry kolon [23]. Detektory by měly být selektivní pro analyt a málo citlivé pro mobilní fázi. Nejpoužívanější detektory jsou fotometrický, refraktometrický, fluorescenční a hmotnostní spektrometr. Fotometrické měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony, refraktometrický měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze a fluorescenční detektor je založen na principu schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření (fluorescence). V poslední době je často používán hmotnostní spektrometr kvůli jeho vysoké citlivosti. Je použitelný jak v kapalinové tak i v plynové chromatografii [23, 24].

2.1.3 Použití

Výhodou je možnost pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn. Kapalinová chromatografie je tedy vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Pracujeme obvykle gradientovou eluční metodou [23].



Obrázek 9: Schéma kapalinového chromatografu [26]

2.1.4 Praktické stanovení kofeinu kapalinovou chromatografií

2.1.4.1 Stanovení ve vzorku kávy

Stanovení kofeinu bylo provedeno v prvním vzorku *Coffea arabica* z Brazílie a v druhém vzorku *Coffea robusta* z Pobřeží slonoviny. Prvním krokem byla příprava vzorků procesem pražení. Pražení probíhalo po dobu 15 minut o teplotách v rozmezí 140 – 240 °C a druhé pražení po dobu 5 – 20 minut při konstantní teplotě 240 °C. Následně se 2 g pražené a namleté kávy extrahovalo ve 100 ml vroucí vody. Alikvotní podíl tohoto vzorku byl přefiltrován přes membránu, která měla velikost póru v μm a bez dalšího ředění byl nastříknut autosamplermem na kolonu [27].

Po přípravě vzorku následovala vlastní HPLC analýza. Pomocí autosamplermu byl dávkován vzorek v objemu 20 μl . Mobilní fáze u tohoto stanovení byla složena s fosfátového pufru a metanolu. Detektor použitý v této analýze byl typu fotometrického. Chromatografická separace probíhala na koloně s reverzní fází C18 o rozměrech 0,46 x 25,0 cm, velikost částic stacionární fáze byla 4 μm . Určení kvalitativního zastoupení kofeinu ve vzorcích bylo provedeno pomocí kalibrační křivky získané z analýz vzorku o známém množství kofeinu [27].

2.1.4.2 Stanovení ve vzorku čaje

Vzorky čajů zelených, černých i s přísadou jasmínu byly rozmělněny a extrahovány třikrát s 20 ml 80% metanolu po dobu 3 hodin a poté s 20 ml 80% metanolu s přidavkem 0,15% HCl extrahovány další 3 hodiny. Získané extrakty byly spojeny a následnou filtrací zbaveny hrubých částic. Filtrát byl následně přefiltrován přes filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Z tohoto konečného filtrátu bylo odebráno 50 µl, které bylo zředěno 1 ml destilované vody. Takto připravený vzorek byl následně použit pro HPLC analýzu [28].

Vzorek v množství 10 µl byl aplikován dávkovací jehlou. Předkolona měla rozměry 4,5 mm x 25 cm. Mobilní fáze byly použity dvě, první byla voda s kyselinou octovou v poměru 97:3 a druhou mobilní fází byl metanol, průtoková rychlost mobilních fází byla 1 ml za minutu. Chromatograf byl vybaven fluorescenčním detektorem, který analyzoval vzorek na principu schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření [28].

2.1.4.3 Stanovení ve vzorku kakaá

Kakaové lusky získány z geneticky modifikovaného stromu byly shromážděny ve dvou plodných cyklech v období jednoho roku a následně byly skladovány při teplotě -20 °C. Po procesu fermentace a sušení byla odstraněna obalová vrstva a odváženo 100 g bobů. Boby byly následně v rotujícím mlýnku převedeny na kakaový prášek. Dalším krokem byla extrakce v Soxhletově extraktoru petroleterem, kdy došlo k odstranění tuku ze vzorku. Vzorek zbavený tuku o hmotnosti 0,0100 g byl extrahován v 10 ml horké vody po dobu 20 minut a poté byl ochlazen a přefiltrován přes filtr s póry o průměru 45 µm [29].

Takto připravený vzorek byl vstříknut autosamplerem do kapalinového chromatografu a HPLC analýzou stanoven. Předkolonová část měla rozměry 50 x 4,6 mm. Vlastní separace probíhala na koloně s reverzní fází C18 o rozměrech 150 x 3,9 mm. Velikost částic stacionární fáze byla 4 µm. Celá analýza probíhala při pokojové teplotě 22 °C. Jako mobilní fáze byl použit 20% roztok metanolu ve vodě a průtoková rychlost byla 1,4 ml za min. Kapalinový chromatograf byl vybaven fluorescenční detektorem s UV detekcí při vlnové délce 274 nm [29].

2.1.4.4 Stanovení v nealkoholických nápojích typu Cola a v energetických nápojích

Vzorky nealkoholických a energetických nápojů byla ponechány krátkou dobu při pokojové teplotě a následně byly odplyněny ultrazvukem po dobu 10 minut.

Následovala filtrace přes mikrofiltr a takto připravený vzorek o objemu 10 μl byl vstříknut injekčně do HPLC systému [30].

Kapalinový chromatograf separoval látky na koloně s reverzní fází C18 o rozměrech 100 x 4,6 mm a velikost stacionární fáze, kterou byla kolona naplněna, byla 2,6 μm . Detekce byla umožněna fluorescenčním detektorem, který měřil absorbanci UV při 200 až 400 nm. Teplota při analýze byla udržována na teplotě 55 °C a průtoková rychlost mobilních fází byla 2,2 ml za minutu. Mobilní fáze byly složeny z vody s 1% kyselinou fosforečnou a acetonitrilu s 1% kyselinou fosforečnou. Identifikace jednotlivých sloučenin byla dosažena srovnáním retenčních časů a UV spektra [30].

2.2 Plynová chromatografie

2.2.1 Princip

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, tento plyn vzorek unáší kolonou. To je důvodem, proč se nazývá mobilní fáze nosný plyn. Podmínkou, aby mohl být vzorek transportován, je jeho okamžitá přeměna na plyn. Složky se v koloně separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky, které projdou kolonou, indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek [23, 31].

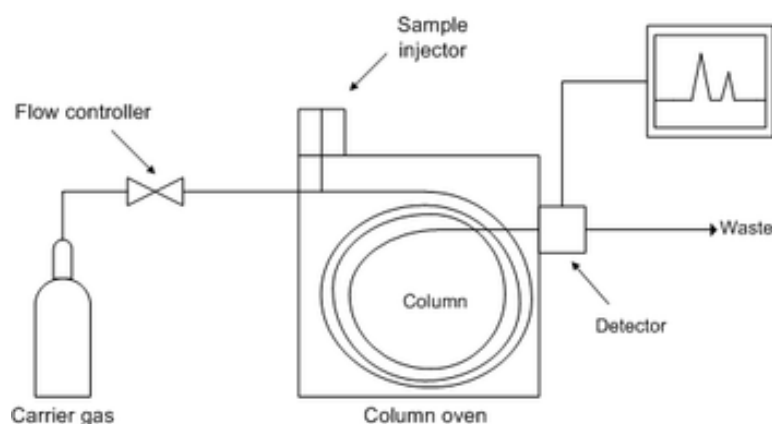
2.2.2 Přístrojové vybavení

Zařízení, ve kterém probíhá plynová chromatografie, se nazývá plynový chromatograf (Obrázek 10). Plynový chromatograf je složen ze zdroje nosného plynu, čistícího zařízení, regulačního systému, dávkovače, kolony, detektoru, vyhodnovacího zařízení a termostatu. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev, která obsahuje nejčastěji vodík, dusík, helium nebo argon. Čistící zařízení slouží k zachycování vlhkosti a nečistot v nosném plynu. Regulační systém zajišťuje stálý nebo měnící se průtok nosného plynu. Dávkovač je určen k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Roztoky se dávkují injekčními stříkačkami přes pryžové septum a plynné vzorky se dávkují plynotěsnými injekčními stříkačkami nebo obtokovými dávkovacími kohouty [23]. V koloně je umístěna stacionární fáze a probíhá v ní separace látek. Kolony jsou náplňové a kapilární [32]. Náplňové kolony jsou vyráběny z oceli nebo skla, mají vnitřní průměr 2 až 3 mm a délku 1 až 3 m. Plní se např.

silikagelem, grafitizovanými sazemi a oxidem hlinitým. Kapilární kolony jsou vyráběny zpravidla z taveného křemene. Vnitřní průměr těchto kolon je 0,1 – 0,6 mm, délka 15 – 60 m a tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 – 5 μm [23, 32]. Čím menší má průměr kapilární kolona, tím víc roste její účinnost při analýze. Detektor slouží k detekci látek v nosném plynu a vyhodnocovací zařízení zpracovává signál z detektoru a zakresluje chromatografickou křivku a provádí její analýzu. Detektory, které jsou nejčastěji používány, jsou tepelně-vodivostní, plamenový ionizační, detektor elektronového záchytu a hmotnostní spektrometr. Spojení GC-MS je důležité v identifikaci neznámých složek. Lze totiž získat pro každou složku její hmotnostní spektrum a následně ji porovnat s knihovnou spekter sloučenin, která je uložena v počítači. Součástí plynového chromatografu je i termostat, který zajišťuje vysokou teplotu pro udržení vzorku v plynném stavu. Dostatečně vysoká teplota musí být zajištěna v dávkovači, koloně a detektoru [23].

2.2.3 Použití

Plynová chromatografie může být použita k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek [23, 31]. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí. Často se provádí chemická změna analytu nevyhovujících vlastností na deriváty, které mohou být pro analýzu plynovou chromatografií použitelné. Příkladem derivatizace může být například esterifikace mastné kyseliny metanolem na metylester [23].



Obrázek 10: Schéma plynového chromatograf [33]

2.2.4 Praktické stanovení kofeinu plynovou chromatografií

2.2.4.1 Stanovení v nealkoholických nápojích

Ze vzorku nealkoholické nápoje byl odebrán 1,5 ml a k němu byl přidán 1 ml etylacetátu, směs byla protřepána pomocí ultrazvuku po dobu 2 minut. Dále byl do směsi přidán bezvodý sulfid vápenatý a takto připravený vzorek byl ponechán v klidu po dobu 3 minut [34].

Analýza proběhla v plynovém chromatografu, jehož součástí byl hmotnostní spektrometr. Separace probíhala v kapilárních kolonách o rozměrech (30 m x 0,25 mm) s velikostí částic stacionární fáze 0,25 μm . Jako nosný plyn bylo použito helium, jehož průtoková rychlost během analýzy byla 1 ml.min⁻¹. Dávkování bylo umožněno injekčně pomocí autosampleru, vzorek měl objem 1 μl . Teplota přístroje byla po dobu analýzy udržovaná na teplotu 250 °C. Kofein byl identifikován na základě retenčního času a hmotnostního spektra [34].

2.3 Infračervená spektrometrie

2.3.1 Princip

Principem je absorpce infračerveného záření molekulami látek. Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření ultrafialové a viditelné [35]. Toto záření pokrývá část elektromagnetického spektra v intervalu mezi 0,78 – 1000 μm . Místo vlnové délky se v infračervené spektrometrii používá vlnčet (převrácená hodnota vlnové délky). Oblast, která je pro infračervenou spektrometrii nejdůležitější, je 4000 – 670 cm⁻¹. Infračervenou oblast spektra rozdělujeme na blízkou infračervenou oblast (12800 – 4000 cm⁻¹), střední infračervenou oblast (4000 – 200 cm⁻¹) a vzdálenou infračervenou oblast (200 – 10 cm⁻¹). Infračervená absorpční spektra jsou spektra vibračně-rotační, protože energie infračerveného záření již nestačí na změny elektronových stavů, způsobuje pouze změny vibračních a rotačních stavů molekul [23].

2.3.2 Přístrojové vybavení

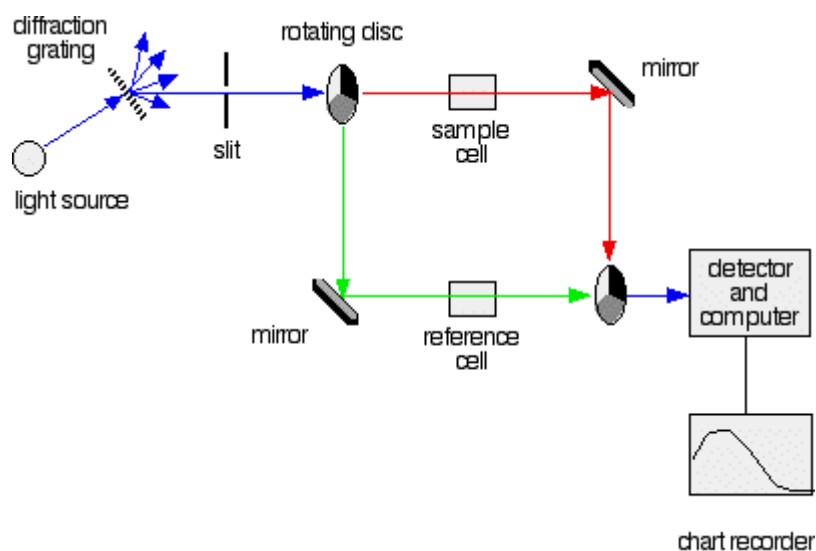
Přístroje, kterými se měří infračervená spektra, se nazývají infračervené spektrometry (Obrázek 11). Disperzní spektrometry jsou konstrukčně starší, pracují na principu rozkladu

použitého infračerveného záření v hranolovém nebo mřížkovém monochromátoru [P]. V dnešní době jsou spíše používané infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry) [35].

Spektrometry jsou složeny ze zdroje záření, kyvet, detektoru. Jako zdroj záření se využívá elektricky žhavená tyčinka z karbidu křemíku nebo z jiných materiálů (oxidy kovů vzácných zemin, keramické materiály). Kyvety jsou vyrobeny z materiálu, který propouští infračervené záření. Jsou to např. NaCl nebo KBr, pro vlhké vzorky je vhodný AgCl nebo ZnSe. Nejpoužívanějšími detektory jsou Golayův pneumatický detektor, DTGS (deuterovaný triglycerinsulfát) detektory a MCT (mercury-cadmium-telurid) detektory [23].

2.3.3 Použití

Infračervenou spektrometrii lze využít k analýze jak kvantitativní tak i kvalitativní. Nejdůležitější využití je ve strukturní analýze a identifikaci organických i anorganických sloučenin. Z praktického hlediska lze pracovat se vzorky všech skupenství [23].



Obrázek 11: Schéma infračerveného spektrometru [36]

2.3.4 Praktické stanovení kofeinu infračervenou spektrometrií

2.3.4.1 Stanovení ve vzorku kávy

Měření probíhalo na RSI-IR spektrometru. Analyzovány byly vzorky pražené a instantní kávy ze španělského trhu. 0,1 g vzorku bylo převedeno do kyvety, do které bylo přidáno pár kapek vodného roztoku $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NH}_3$. Poté byla kyveta vložena do spektrometru a injekčně byl přidán chloroform. Následovala extrakce kofeinu po dobu 6 min a po této době byl vzorek směrovým ventilem vstříknut do proudu chloroformu a transportován k měření. Měření probíhalo v oblasti 1659 až 830 cm^{-1} [37].

2.3.4.2 Stanovení ve vzorku nealkoholických nápojů

Ze vzorků nealkoholických nápojů byly připraveny vzorky o různých koncentracích. Bylo nachystáno 60 vzorků pro každý druh nealkoholického nápoje v koncentračním rozmezí 0 až $30 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ a přírůstek byl vždy po $0,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Pro kalibraci bylo použito 45 vzorků a pro validaci zbývajících 15. Vzorky byly uchovány při pokojové teplotě a poté analyzovány FTIR analýzou [38].

Měření probíhalo ve spektrometru, který se používá pro FTIR analýzu. Vzorkovací stanice byla vybavena ATR (Attenuated Total Reflection, zeslabený úplný odraz) příslušenstvím skládajícím se z převodu optiky uvnitř komory. Vzorky byly měřeny proti vzorku destilované vody. Vzorky byly měřeny v ATR krystalu a mezi každým měřením byl krystal pečlivě očištěn vodou a osušen pomocí plynného dusíku, aby bylo zajištěno co nejpřesnější měření. Každé měření bylo provedeno třikrát. Zpracovaný signál počítač upravil matematickým postupem, který se nazývá Fourierova transformace na absorpční infračervené spektrum. Měření probíhalo ve střední infračervené oblasti 400 až 4000 cm^{-1} [38].

2.3.4.3 Stanovení ve vzorku čaje

Metoda je založena na vícenásobné lineární regresi Fourierovy transformace infračervených spekter. Příprava vzorku nevyžaduje žádné složité postupy. Kofein se z čajových lístků se vyextrahuje přidáním chloroformu a přidá se i 1 ml amoniaku, vše se uzavře v lahvičce a nechá se po dobu 2 minut v ultrazvukové lázni a pak následuje filtrace. Poté se odeberou 2 ml, které se pomocí injekční stříkačky zavedou do mikrokvyvety. Měření probíhá na principu procházení infračerveného paprsku vzorkem. Měření se provádělo proti kyvetě s čistým chloroformem. Kalibrační řada byla sestavena

z připravených vzorků o známých koncentracích kofeinu vyrobených z komerčně koupeného bezvodého kofeinu. Měření probíhalo ve střední infračervené oblasti rozsahu 1300 až 1800 cm^{-1} [39].

2.4 Kapilární elektroforéza

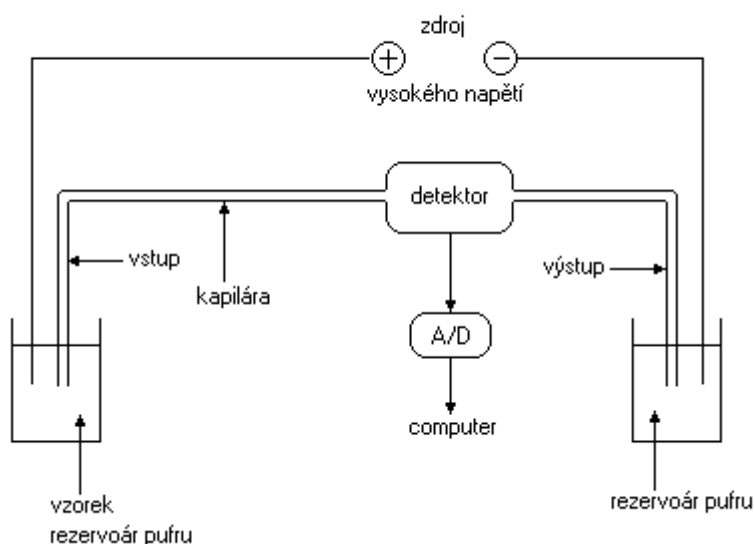
2.4.1 Princip

V kapiláře je naplněn elektrolyt, který má za úlohu vést proud. Konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníků, které obsahují elektrolyt spolu s elektrodami vyrobenými z inertního materiálu, nejčastěji jsou vyrobeny z platiny (Pt). Mezi tyto elektrody se vkládá vysoké napětí v rozmezí 10 – 30 kV. Do jednoho konce kapiláry se vstříkne malý objem vzorku. Kapilára prochází přes detekční zařízení, bývá jím nejčastěji fotometrický detektor, který sleduje absorpci ultrafialového záření. Výsledným záznamem detektoru je elektroforegram, který vyjadřuje závislost odezvy detektoru na čase. Výsledky se stanovují z polohy píku, která značí kvalitu a z plochy nebo výšky píku, která udává kvantitu. Existuje mnoho separačních technik, které doplňují kapilární elektroforézu o další možnosti. Jsou to kapilární zónová elektroforéza (CZE – Capillary Zone Electrophoresis), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC – Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography), kapilární gelová elektroforéza (CGE – Capillary Gel Electrophoresis), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF – Capillary Isoelectric Focusing) a kapilární elektrochromatografie (CEC – Capillary ElectroChromatography) [23, 40].

2.4.2 Přístrojové vybavení

Zařízení pro kapilární elektroforézu se skládá z kapilár, detektoru a elektrod (Obrázek 12.). Kapiláry mají ochranný polyimidový povlak a jsou především vyráběny z taveného křemene. Povrch uvnitř kapilár může být chemicky modifikovaný. Tato modifikace spočívá v kovalentním navázání různých látek. Tato modifikace při úpravě povrchu se využívá pro více účelů. Jedním z nich může být, např. snížení absorpce vzorku nebo změna iontového náboje na kapilární stěně. Při stanovení se musí udržovat stálá teplota, aby podmínky při separaci byly stejné. Regulace teploty je zajištěna vzduchem nebo kapalnou chladicí směsí [23]. Do konce kapiláry, který je vzdálenější od detektoru se plní vzorek

o množství 10 – 100 nL. Dávkuje se tlakem, rozdílem hladin nebo elektrokinetickým dávkováním [40, 41]. Z důvodu malého průměru kapilár musí být při stanovení použit velmi citlivý detektor. Nejčastěji používanými detektory jsou detektory založené na sledování absorpce ultrafialového záření a zpravidla používají diodové pole. Mezi další detektory patří detektory využívající fluorescenci a hmotnostní spektrometr. V poslední době se hmotnostní spektrometr začal využívat pro jeho schopnost snadno identifikovat analyt a poskytovat informace o struktuře analyzovaných látek [23].



Obrázek 12: Schéma kapilární elektroforézy [42]

2.4.3 Použití

Kapilární elektroforéza je využitelná pro roztoky vodné i nevodné. Nejčastěji využívané separační techniky v kapilární elektroforéze jsou MECC, CGE a CIEF [23, 41].

2.4.4 Praktické stanovení kofeinu kapilární elektroforézou

2.4.4.1 Stanovení ve vzorku kávy

Pro analýzu byl vzorek připraven navážením 1 g mleté kávy, který se smíchal s destilovanou vodou ve 100 ml baňce v poměru 1:4. Po té se roztok zfiltraval přes filtr s velikostí pórů 0,45 μm [43].

Vzorek byl analyzovaný kapilární elektroforézou s UV detekcí při vlnové délce 200 nm. Vzorek byl do kapiláry vpraven injekčně pod tlakem 0,035 bar. Kapilára byla vyrobena z taveného křemene a měla rozměry 57 cm x 50 μm . Mezi elektrodami bylo napětí o hodnotě 10 kV. Teplota během analýzy byla udržovaná na 25 °C [43].

2.4.4.2 Stanovení ve vzorku zeleného čaje

Nejdříve byly naváženy 3 g zeleného čaje a navážka byla poté extrahována ve 180 ml horké vody po dobu 5 minut. Po extrakci byla k roztoku přidána 0,1% metafosforečná kyselina a poté byl roztok zfiltrován na filtru o velikosti pórů 0,45 μm [44].

Takto připravený vzorek byl vstříkovan do jednoho konce kapiláry po dobu 5 s. Po každé separaci byla kapilára vypláchnuta roztoky destilované vody, 0,1 mol.dm⁻³ HCl, destilované vody, 0,1 mol.dm⁻³ NaOH a pufrem. Vyplachování probíhalo po dobu 7 minut. Vyhodnocovacím zařízením v této analýze byl UV detektor. Kapilára byla z materiálu křemene a její rozměry byly 77 cm x 50 μm . Napětí mezi elektrodami během analýzy bylo 30 kV a teplota se udržovala na 23 °C [44].

2.4.4.3 Stanovení v nealkoholických nápojích

Vzorek nealkoholického nápoje byl nejdříve odplyněn v ultrazvukovém zařízení, z důvodu obsahu oxidu uhličitého. Následně byl přefiltrován přes filtr z velikostí pórů 0,45 μm [45].

Následně byl vzorek vstříknut do kapiláry, která byla zhotovena z křemene. Vyhodnocovacím zařízením byl UV detektor, který byl připojen k počítači. Měření probíhalo v rozmezí 200 – 300 nm. Mezi elektrodami bylo napětí 30 kV. Teplota během analýzy se udržovala na 35 °C. Mezi každou analýzou byla kapilára proplachována roztoky 1 mol.dm⁻³ NaOH, 0,1 mol.dm⁻³ NaOH, destilované vody a pufrem [45].

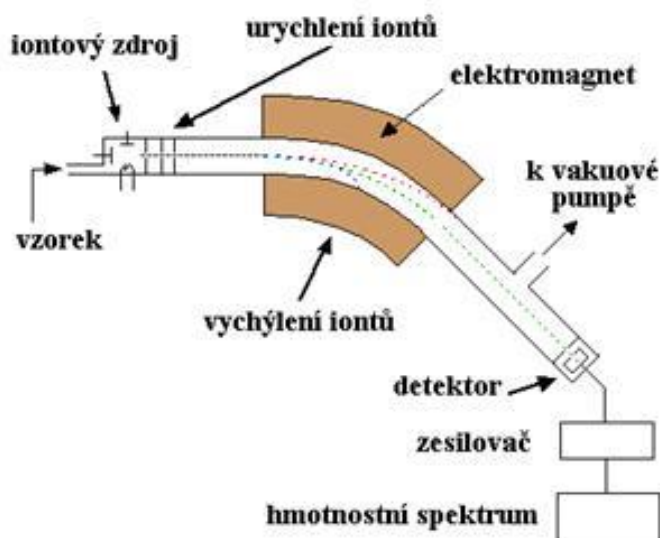
2.5 Hmotnostní spektrometrie

2.5.1 Princip

Tato metoda se řadí do separační techniky, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotností a náboje. Kroky, které v této technice probíhají, jsou odpaření vzorku, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů hmotnostním filtrem a detekce iontů [23, 46].

2.5.2 Přístrojové vybavení

Zařízení, ve kterém probíhá analýza, se nazývá hmotnostní spektrometr (Obrázek 13.). Součástí běžného spektrometru jsou vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Ionizace nastává dvěma způsoby: buď nárazem prudce letících elektronů nebo chemickou ionizací, při které ionty vznikají chemickou cestou [46]. Hmotnostní spektrometry existují v různých konstrukčních typech, kterými jsou Magnetický analyzátor, Kvadrupólový analyzátor, Kvadrupólová iontová past (QIT – Quadrupole Ion-Trap analyser), Hmotnostní analyzátor FT-ICR (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) a Hmotnostní spektrometr TOF-MS (Time of Flight). Prvním detektorem, který byl využíván, je Faradayova klec. Dalšími jsou Elektronový násobič a Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem. Díky své citlivosti při analýze je velmi oblíben Elektronový násobič, ale nevýhodou je jeho krátká živostnost, která se pohybuje kolem 1 roku [23].



Obrázek 13: Schéma hmotnostního spektrometru [47]

2.5.3 Použití

Tato metoda je využitelná jak pro kvalitativní tak i pro kvantitativní chemickou analýzu. Její přednosti jsou v její všestrannosti, rychlosti a citlivosti. Využívá se k identifikaci organických látek a k určení jejich relativních hmotností. Významné je její napojení

v chromatografických metodách jako kapalinová chromatografie (HPLC-MS) a plynová chromatografie (GC-MS), kde plní úlohu detektoru [23, 48].

2.5.4 Praktické stanovení hmotnostní spektrometrií

2.5.4.1 Stanovení v zeleném čaji

K 5 g vzorku zeleného čaje bylo přidáno 150 ml destilované vody, směs byla uvedena k varu a 4 hodiny byla udržována při teplotě 60 °C. Po extrakci byl výluh přefiltrován přes filtr a poté byly 2 ml přefiltrovány přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,2 µm. Poté byl vzorek eluován s 2 ml metanolu o průtoku 0,03 ml.min⁻¹. Metanol byl odpařen při teplotě okolí a zbytek byl rozpuštěn v 200 µl destilované vody [49].

Poté bylo odebráno 20 µl vzorku a ty byly vstříknuty do ventilu ESI-IMS (Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry; iontová mobilní spektrometrie s ionizací elektrosprejem) systému, ve kterém následně dochází k ionizaci elektrosprejem a k identifikaci na základně hmotnostních spekter [49].

2.5.4.2 Stanovení ve spojení s plynovou chromatografií ve vzorku nealkoholických napojů

Hmotnostní spektrometr se využívá nejčastěji v kombinaci s dalšími chromatografickými metodami [23]. Příklad stanovení, kde hmotnostní spektrometr má funkci detektoru v plynové chromatografii při stanovení kofeinu v nealkoholických nápojích, je podrobněji zmíněn v kapitole 2.2.4.1 [34].

2.5.4.3 Stanovení ve spojení s kapalinovou chromatografií ve vzorku kávy

Káva se extrahovala po dobu 15 minut v horké vodě a po extrakci byla přefiltrována přes filtr o velikosti póru 0,45 µm. Pro analýzu bylo odebráno 20 µl, které byly dávkovány pomocí autosampleru [50].

Chromatografická separace byla uskutečněna HPLC analýzou v kapalinovém chromatografu, jehož součástí byl hmotnostní spektrometr. Separace probíhala při 40 °C v koloně o rozměrech 150 x 2,0 mm a velikost částic stacionární fáze byla 5 µm. Mobilní fáze se skládala z kyseliny mravenčí a metanolu. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,2 ml.min⁻¹. Detekce probíhala v hmotnostním spektrometru, který vzorek ionizoval pomocí elektrospreje. Identifikace kofeinu proběhla srovnáváním retenčních časů a zjištěním relativní molekulové hmotnosti díky hmotnostnímu spektrometru [50].

2.6 Voltametrie

2.6.1 Princip

Principem voltametrie je vložení měničoho se napětí mezi dvojici elektrod, které jsou ponořeny v roztoku elektrolytu. Během analýzy se sleduje procházející proud. Elektrody jsou dvě, první je elektroda polarizovaná, která se nazývá pracovní (měrná) a druhá je nepolarizovaná a slouží jako srovnávací. Výsledek měření je ve formě voltamogramu, který sleduje závislost proudu na napětí. Z této závislosti vyhodnocujeme, o jaký druh analytu se jedná a v jakém množství se nachází ve vzorku [23, 51].

2.6.2 Přístrojové vybavení

Ve voltametrii se používají stacionární polarizované elektrody (pevné elektrody, rtuťová filmová elektroda, stacionární rtuťová kapková elektroda). Metoda, která využívá stacionární rtuťovou kapkovou elektrodu, se nazývá polarografie [23].

2.6.3 Použití

Tato elektrochemická metoda se pro stanovení kofeinu využívá jen omezeně. Většinou se používají chemicky modifikované elektrody, aby se zvýšila citlivost při stanovení [23].

2.6.4 Praktické stanovení

2.6.4.1 Stanovení ve vzorku kávy

100 mg pomleté kávy bylo přidáno spolu s 25 ml destilované vody do baňky, která byla vařena po dobu 1 hodiny. Po té se roztok zfiltroval a následně proběhla extrakce v dělicí nálevce s dichlormetanem. Postup extrakce se opakoval třikrát, poté se extrakty spojily a přidal se Na_2SO_4 pro odstranění vlhkosti. Po odstranění rozpouštědla byl zbytek rozpuštěn v elektrofilním pufru [52].

Měření probíhalo na elektrodě potažené uhlíkovou pastou pro lepší selektivitu a citlivost měření. Během analýzy se sledovala závislost proudu na napětí, z této závislosti bylo vyhodnoceno množství kofeinu ve vzorku [52].

2.7 Potenciometrie

2.7.1 Princip

Principem této elektrochemické metody je měření rovnovážného napětí galvanického článku. Tento článek je složen ze dvou elektrod – měrné (indikační) a srovnávací (referenční). U měrné elektrody potenciál závisí na koncentraci analyzované látky, ale potenciál srovnávací elektrody je konstantní. Zjištěná koncentrace látky je rozdílem potenciálu těchto elektrod [23, 53].

2.7.2 Přístrojové vybavení

Podstatou u potenciometrie je měření elektrodami. Elektrody jsou elektrochemický systém, který je tvořen alespoň dvěma fázemi. Jedna fáze je vodič první třídy a vede elektrický proud prostřednictvím elektronů a druhá fáze je vodič druhé třídy a ta vede elektrický proud prostřednictvím aniontů [23].

2.7.3 Použití

V minulosti byl kofein tímto netradičním způsobem analyzován, ale tato metoda se v dnešní době nevyužívá [23].

ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo charakterizovat a shrnout poznatky o kofeinu. Kofein se řadí mezi alkaloidy, které vykazují stimulační účinky. Vyskytuje se v řadě rostlin, z kterých se po staletí vyrábí oblíbené nápoje. Mezi tyto rostliny patří Kávovník arabský (*Coffea arabica*), Kakaovník pravý (*Theobroma cacao*), Čajovník čínský (*Thea sinensis*) a Kola pravá (*Cola vera*).

Zabývala jsem se i metabolismem kofeinu, který probíhá v játrech. Rychlost metabolismu a vylučování kofeinu močí je ovlivněno řadou faktorů. Především zdravotním stavem a životním stylem jedince. K těmto faktorům patří kouření, virová onemocnění, jaterní onemocnění, těhotenství, užívání drog a některých léků. Bylo prokázáno, že na metabolismus kofeinu má vliv i konzumace určité zeleniny.

Z lékařských výzkumů lze vyvodit, že v malých dávkách působí kofein jako stimulant centrálního nervového systému, zvyšuje výkonnost, zlepšuje náladu, zrychluje reakční dobu a působí močopudně. Při chronickém příjmu kofeinu se nedá prokázat poškození organismu, ale u obzvláště citlivých lidí se objevuje nervozita, anxiózní neuróza, nespavost, úzkost a neklid. Problematika vysokého příjmu se v současné době pojí s kardiovaskulárním onemocněním, ale toto spojení doposud nebylo potvrzeno ani vyvráceno. Z výzkumu lze pouze dojít k závěru, že káva poškozuje srdce pouze při spotřebě vyšší než 6 šálků nefiltrované kávy denně.

Poslední část práce byla zaměřena na možnosti stanovení kofeinu. Jsou zde uvedeny příklady metod, kterými lze kofein stanovit a jsou zde předloženy i příklady jednotlivých metod, které se využívají v analytické praxi. Z poznatků vyplývá, že jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení kofeinu je vysokoúčinné kapalinová chromatografie (zejména ve spojení s hmotnostní spektrometrií), kterou je možno kofein stanovit i na pracovišti našeho ústavu. Dalšími běžně využívanými metodami jsou plynová chromatografie (opět často ve spojení s hmotnostní spektrometrií), infračervená spektrometrie a elektromigrační metody (zejména kapilární elektroforéza). K méně používaným metodám patří voltametrie a potenciometrie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KLOSTERMAN, L. *The Facts about Caffeine*. New York: Marshall Cavendish, 2006. 111 s. ISBN 978-0-7614-2242-6
- [2] STANĚK, J. *Alkaloidy*. Praha: Československá akademie věd, 1957. 653 s.
- [3] ASHIHARA, H. and CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *TRENDS in Plant Science*, 2001, Vol. 6, No. 9, 407-413
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. Praha: Osis, 2002. 319 s. ISBN 80-86659-03-8
- [5] ANONYM. *Purine* [online]. [cit. 2010-23-12]. Dostupný na [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/echo/organika/trivialni-sk-heterocykly.html>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/echo/organika/trivialni-sk-heterocykly.html)
- [6] ANONYM. *Xanthine* [online]. [cit. 2011-8-2]. Dostupný na [www: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1188](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1188)
- [7] ANONYM. *Theobromine, Theophylline* [online]. [cit. 2010-22-12]. Dostupný na [www: <http://mathematik-forum.de/campus/mdm/coffein/index2.php>](http://mathematik-forum.de/campus/mdm/coffein/index2.php)
- [8] ANONYM. *Caffeine* [online]. [cit. 2010-05-01]. Dostupný na [www: <http://www.madsci.org/FAQs/caffeine.html>](http://www.madsci.org/FAQs/caffeine.html)
- [9] SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, Vol. 40, 1243-1255
- [10] GOKULAKRISHNAN, S. , CHANDRARAJ , K., GUMMADI, S. N. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, Vol. 37, 225-232
- [11] ANONYM. *Kofein a zdraví* [online]. [cit. 2010-29-11]. Dostupný na [www: <http://www.eufic.org/article/cs/artid/caffeine-health/>](http://www.eufic.org/article/cs/artid/caffeine-health/)
- [12] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2004. 725 s. ISBN 80-247-0836-1
- [13] MORAVCOVÁ, J. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Praha: VŠCHT, 2006, 107 s.
- [14] BONITA, J. S. , MANDARANO, M., SHUTA, D., VINSON, J. Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal and human studies. *Pharmacological Research*, 2007, Vol. 55, 187-198

- [15] ANONYM. *Coffea arabica* [online]. [cit. 2011-20-11]. Dostupné na www: <http://www.coffee4dummies.com/articles/coffee_species>
- [16] ANONYM. *Thea sinensis* [online]. [cit. 2010-18-12]. Dostupné na www: <<http://www.stuartxchange.org/Tsa.html>>
- [17] ANONYM. *Theobroma cacao* [online]. [cit. 2010-14-12]. Dostupné na www: <http://www.thewholechild.us/integrative_/2005/07/chocolate_food_.html>
- [18] ANDRIOT, I., LE QUÉRÉ, J., GUICHARD, E. Interactions between coffee melanoidins and flavon compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoids retention capacity. *Food Chemistry*, 2004, Vol. 85, 289-294
- [19] ROGERS, P., DERNONCOURT, C. Regular Caffeine Consumption: A Balance of Averse and Beneficial Effects for Mood and Psychomotor Performance. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 1998, Vol. 59, No. 4, 1039-1045
- [20] LI, M., WANG, M., GUO, W., WANG, J., SUN, X. The effect of caffeine on intraocular pressure: a systematic review and meta-analysis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2011, Vol. 249, 435-442
- [21] JAMES, J.E. Critical Review of Dietary Caffeine and Blood Pressure: A Relationship That Should Be Taken More Seriously. *Psychosomatic medicine*, 2004, Vol. 66, 63-71
- [22] RIKSEN, N. P., RONGEN, G. A., SMITS, P. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: Implications for coronary heart disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 2009, Vol. 121, 185-191
- [23] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 130 s. ISBN 80-86369-07-2
- [24] MEYER, V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Chichester: John Wiley and Sons, 2010. 426 s. ISBN 0-471-98372-1
- [25] SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., DOLAN, J. *Introduction to modern liquid chromatography*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2009. 912 s. ISBN 0-470-16754-8
- [26] ANONYM. *High Performance Liquid Chromatography* [online]. [cit. 2011-13-3]. Dostupný na www <<http://www.protein.iastate.edu/hplc.html>>

- [27] CASAL, S., OLIVEIRA, M. B., FERREIRA, A. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonellin, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*, 2000, Vol. 68, 481-485
- [28] ZUO, Y., CHEN, H., DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 2002, Vol. 57, 307-316
- [29] BRUNETTO, M. R., GUTIÉRREZ, L., DELGADO, Y., GALLIGNANI, M., ZAMBRANO, A., GÓMEZ, A., RAMOS, G., ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 2007, Vol. 100, 459-467
- [30] ROSTAGNO, M. A., MANCHÓN, N., D'ARRIGO, M., GUILLAMÓN, E., VILLARES, A., GARCÍA-LAFUENTE, A., RAMOS, A., MARTÍNEZ, J. A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*, 2011, Vol. 685, 204-211
- [31] MCNAIR, H.M., MILLER, J.M. *Basic Gas Chromatography*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2009. 239 s. ISBN 978-0-470-43954-8
- [32] BARRY, E.F., GROB, R.L. *Columns for gas chromatography: performance and selection*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. 298 s. ISBN 978-0-471-74043-8
- [33] ANONYM. *Mass Spectrometry* [online]. [cit. 2011-15-4]. Dostupný na www: http://www.thefullwiki.org/Proteomics/Protein_Identification_-_Mass_Spectrometry/Types_Mass_Spectrometry
- [34] ZOU, J. and LI, N. Simple and environmental friendly procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of caffeine in beverages. *Journal of Chromatography A*, 2006, Vol. 1136, 106-110
- [35] STUART, B.H. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester: John Wiley and Sons, 2004. 224 s. ISBN 0-470-85428-6
- [36] ANONYM. *Spectrometer* [online]. [cit. 2011-13-3]. Dostupný na www: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/spectrometer.html>

- [37] BOUHSAIN, Z., GARRIGUES, J. M, GARRIGUES ,S., GUARDIA, M. Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in coffee. *Vibrational Spectroscopy*, 1999, Vol. 21, 143-150
- [38] PARADKAR, M. M., IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTI-ATR spectroscopy. *Food Chemistry*, 2002, Vol. 78, 261-266
- [39] NAJAFI, N. M., HAMID, A. S., AFSHIN, R. K. Determination of caffeine in black teas leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression. *Microchemical Journal*, 2003, Vol. 75, 151-158
- [40] PHILIPPE , P. *Capillary electrophoresis: methods and protocols*. Totowa: Humana Press, 2008. 809 s. ISBN 978-1-58829-539-2
- [41] FRAZIER, R.A., AMES, J.M., NURSTEN, H.E. *Capillary electrophoresis for food analysis: method development*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 127 s. ISBN 0-85404-492-2
- [42] ANONYM. *Elektroforéza* [online]. [cit. 2011-26-5]. Dostupný na [www: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>](http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm)
- [43] MAESO, N., CASTILLO, C., CORNEJO, L., GARCÍA-ACICOLLAR, ALGUACIL, L.F., BARBAS, C. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 41, 1095-1100
- [44] HORIE, H., MUKAI, T., KOHAT, K. Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 758, 332-335
- [45] WALKER, J.C., ZAUGG, S.E., WALKER, E.B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1997, Vol. 781, 481-485
- [46] HOFFMANN, E. and STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. Chichester: John Wiley and Sons, 2007. 489 s. ISBN 978-0-470-03310-4
- [47] ANONYM. *Hmotnostní spektrometr* [online]. [cit. 2011-26-5]. Dostupný na [www: <http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/im/_private/6_ICPMS.htm>](http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/im/_private/6_ICPMS.htm)

- [48] EKMAN, R. *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2009. 371 s. ISBN 978-0-471-71395-1
- [49] JAFARI, M.T, REZAEI, B., JAHAVERI, M.A. New method based on electrospray ionisation ion mobility spectrometry (ESI-MSI) for simultaneous determination of caffeine and theophylline. *Food Chemistry*, 2011, Vol. 126, 1964-1970
- [50] PERRONE, D., DONANGELO, C.M., FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2008, Vol. 110, 1030-1035
- [51] THOMAS, F.G. and HENZE, G. *Introduction to voltammetric analysis: theory and practice*. Collingwood: Csiro Publishing, 2001. 252 s. ISBN 0-643-06593-8
- [52] AKLILU, M., TESSEMA, M., REDI-ABSHIRO, M. Indirect voltammetric determination of caffeine content in coffee using 1,4-benzoquinone modified carbon paste electrode. *Talanta*, 2008, Vol. 76, 742-746
- [53] WANG, J. *Analytical electrochemistry*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2006. 250 s. ISBN 978-0-471-67879-3

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATR	zeslabená úplná reflektance
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DTGS	detektor s deuterovaným triglicinsulfátem
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GS-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC-MS	vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MCT	mercury-cadmium-telurid detektor
QIT	kvadrupólová iontová past
UV	ultrafialové

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Vzorec purinu [5]	12
Obrázek 2 – Vzorec xantinu [6]	13
Obrázek 3 – Vzorec kofeinu [3]	13
Obrázek 4 – Vzorec teobrominu [7].....	13
Obrázek 5 – Vzorec teofylinu [7]	13
Obrázek 6 – <i>Coffea arabica</i> [15]	16
Obrázek 7 – <i>Thea sinensis</i> [16]	17
Obrázek 8 – <i>Theobroma cacao</i> [17]	18
Obrázek 9 – Schéma kapalinového chromatografu [26]	25
Obrázek 10 – Schéma plynového chromatografu [33]	28
Obrázek 11 – Schéma infračerveného spektrometru [36]	30
Obrázek 12 – Schéma kapilární elektroforézy [42].....	33
Obrázek 13 – Schéma hmotnostního spektrometru [47]	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti kofeinu [8].....	14
Tabulka 2: Relativní účinnost kofeinu a teofylinu [53]	21

