

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Fyziologické účinky kofeinu a jeho stanovení v nápojích  
pomocí separačních technik v kapalně fázi

Petra Slavíková

Bakalářská práce

2016

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Slavíková**  
Osobní číslo: **C13151**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Fyziologické účinky kofeinu a jeho stanovení v nápojích pomocí separačních technik v kapalně fázi**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

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

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na různé fyziologické účinky kofeinu. Dále se zaměřte na využití moderních separačních technik v kapalně fázi pro jeho analýzu v nápojích.
2. Diskutujte využití různých separačních systémů a technik v kapalně fázi.
3. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.
4. Sepište závěrečnou zprávu

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2016

Petra Slavíková

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, ochotný přístup, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce.

Velké poděkování patří i mé rodině za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

## **ANOTACE**

První část této práce je věnována fyziologickým účinkům kofeinu na organismus. Druhá část se zabývá stanovením kofeinu v nápojích (káva, čaj, nealkoholické a energetické nápoje) pomocí kapalinové chromatografie a elektroforézy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kofein, fyziologické účinky, nápoje, kapalinová chromatografie, elektroforéza

## **TITLE**

Physiological effects of caffeine and its determination in beverages using liquid phase separation techniques

## **ANNOTATION**

The first part of this work is devoted to the physiological effects of caffeine on the organism. The second part deals with determination of caffeine in beverages (coffee, tea, non-alcoholic and energy drinks) by liquid chromatography and electrophoresis.

## **KEYWORDS**

caffeine, physiological effects, beverages, liquid chromatography, electrophoresis

## OBSAH

ÚVOD .....	8
1 KOFEIN .....	9
1.1 Farmakokinetika kofeinu .....	10
1.2 Biologická aktivita kofeinu .....	11
1.3 Vliv kofeinu na spánek .....	12
1.4 Vliv kofeinu na stres .....	13
1.5 Vliv kofeinu na diabetes .....	15
1.6 Interakce mezi kofeinem a alkoholem .....	15
1.7 Vliv kofeinu na rakovinu .....	17
2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	19
2.1 Stanovení kofeinu v nápojích pomocí HPLC .....	20
2.1.1 Příprava vzorků .....	20
2.1.2 Zařízení a podmínky stanovení .....	22
2.1.3 Výsledky .....	24
3 ELEKTROFORÉZA .....	28
3.1 Stanovení kofeinu v nápojích pomocí elektroforézy .....	29
3.1.1 Příprava vzorků .....	29
3.1.2 Zařízení a podmínky stanovení .....	30
3.1.3 Výsledky .....	33
4 ZÁVĚR .....	36
5 POUŽITÁ LITERATURA .....	37

# ÚVOD

Kofein je pravděpodobně nejrozšířenější stimulant na světě. Byl objeven a popsán v roce 1819 německým chemikem Ferdinandem Rungem. Jeho účinky ale objevili už lidé v době kamenné. Zjistili totiž, že žvýkání semen, kůry, nebo listů určitých rostlin usnadňuje práci a zlepšuje pozornost a náladu.

Kofein se řadí mezi xantinové alkaloidy a je to hořká, bílá krystalická látka. Právě jeho hořká chuť významně přispívá k celkové chuti kávy. Mezi nejběžnější zdroje kofeinu patří kávová zrna, kakaové boby, cola ořechy, čajové lístky, lístky maté a guarana. Kofein se v určitém množství nachází také v listech a plodech některých dalších rostlin, kde slouží rostlině jako přirozený pesticid. Také se přidává do nealkoholických a energetických nápojů jako jsou Coca-cola nebo Red Bull a další. Hlavním zdrojem kofeinu v těchto nápojích je guarana.

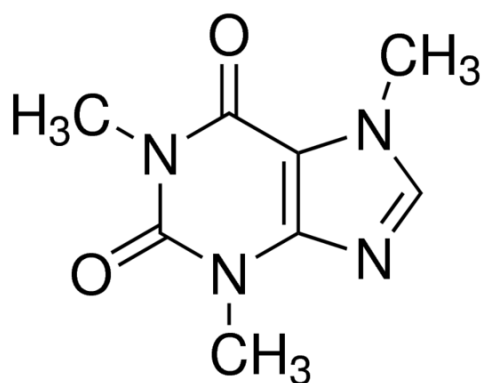
V lidském těle působí kofein jako stimulant centrální nervové soustavy, potlačuje únavu, zvyšuje bdělost a zlepšuje vnímání. Kofein zmenšuje svalovou únavu a vzbuzuje schopnost vyššího výkonu. Také má výrazné močopudné účinky. V současné době se syntetický kofein užívá jako terapeutická přísada do analgetických a antipyretických směsí. V injekční formě se aplikuje k povzbuzení dechu a krevního oběhu při horečnatých stavech a infekčních onemocněních. Užívá se i jako protijed při otravách narkotiky, alkoholem a jinými drogami.

Ke kvalitativní a kvantitativní analýze kofeinu v nápojích se nejčastěji využívají separační techniky HPLC a kapilární elektroforéza. Tato práce se věnuje použití těchto dvou technik ke stanovení kofeinu v čaji, kávě a dalších nealkoholických nápojích.



## 1 KOFEIN

Kofein (1,3,7-trimethylxantin) je dusíkatá organická sloučenina řadící se mezi alkaloidy (obrázek 1). Vyskytuje se jako bílý prášek nebo jako jemné jehličky. Bod tání této látky je 238 °C. Kofein je vysoce rozpustný v horké vodě (1 g se rozpustí ve 46 ml vody o pokojové teplotě, 5,5 ml vody o teplotě 80 °C nebo v 1,5 ml vroucí vody), méně pak v organických rozpouštědlech. Je bez zápachu, ale má hořkou chuť. Vyskytuje se v kávě, čaji, guaraně, maté, kolových oříšcích a kakau<sup>1</sup>.



Obrázek 1 – Chemický vzorec kofeinu<sup>2</sup>

Kofein je přítomen v mleté kávě v rozmezí od 0,75 do 1,5 % (m/m) Průměrný šálek kávy tak obsahuje asi 100 mg kofeinu. Obsah kofeinu v čaji se značně liší v závislosti na síle a kvalitě čaje, avšak průměrně je to kolem 40 mg v jednom šálku. Také v 355 ml kolového syceného nápoje je přibližně 40 mg kofeinu<sup>3</sup>.

Kofein má stimulační účinek na centrální nervový systém, srdce, cévy a ledviny. Také působí jako mírné diuretikum. Pozitivní účinky, které byly popsány u osob, které konzumují kofein, zahrnují lepší výkon, sníženou únavu, zvýšenou senzorickou aktivitu a zvýšenou ostražitost<sup>3</sup>. Kofein se používá při léčbě apnoe u předčasně narozených dětí. Dále se nachází i v některých lécích na bolesti hlavy nebo na snížení chuti k jídlu. Je také využíván jako prostředek proti únavě například mezi řidiči nákladních automobilů či piloty<sup>4</sup>. Příjem kofeinu však může mít negativní účinky, jako je podrážděnost, nervozita nebo úzkost, bolesti hlavy a nespavost<sup>3</sup>.

## 1.1 Farmakokinetika kofeinu

Farmakokinetika je podle definice studií absorpce, distribuce, biotransformace a vylučování látky. Farmakokinetická analýza je kritická pro hodnocení bezpečnosti látky. Lze očekávat nižší bezpečnostní riziko u látky, která je minimálně absorbována a/nebo rychle odstraněna ve srovnání s látkou, která se bioakumuluje a pomalu se odstraňuje z těla<sup>5</sup>.

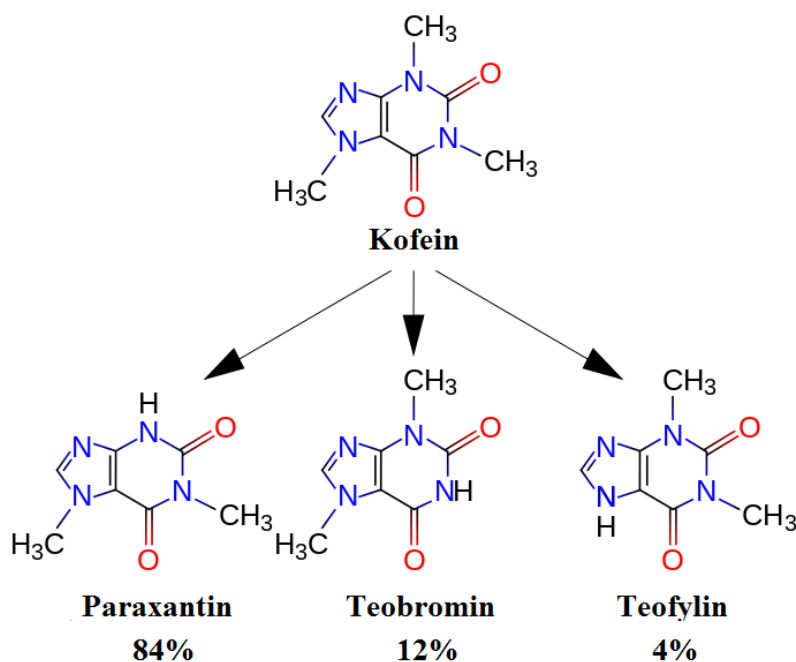
Jako jedna z nejvíce zkoumaných látek na světě byla farmakokinetika kofeinu dobře charakterizována po perorálním podání v různých dávkách a u mnoha druhů včetně lidí. Absorpce kofeinu po jeho požití je rychlá a v podstatě kompletní. Analýzy naznačují v podstatě úplnou absorpci z gastrointestinálního traktu. Rychlá a rozsáhlá absorpce kofeinu do systémového oběhu ukazuje na velmi omezený metabolismus prvního průchodu. Tato vlastnost je konzistentní u různých testovaných druhů zvířat. Pozoruhodný rys farmakokinetiky kofeinu je jeho lineární chování. Zvýšení podávaných perorálních dávek kofeinu vede k proporcionálnímu zvýšení hladiny kofeinu v krvi<sup>5</sup>.

Jakmile se kofein vstřebá do systémového oběhu, jeho část (10-30%) se váže na plazmatický albumin, zbytek se rozděluje po celém těle. Neexistují žádné důkazy o fyziologických překážkách, které by omezily distribuci kofeinu. Kofein snadno prochází hematoencefalickou bariérou i placentou, také se objevil v tělních látkách, jako je plodová tekutina a lidské mateřské mléko. Tento distribuční vzorec je v souladu s jeho výraznou lipofilitou a rozpustností ve vodě<sup>5</sup>.

Kofein je značně metabolizován v játrech enzymem cytochrom P450 (CYP450), zejména izoenzymem CYP1A2. Biotransformace se skládá z oxidační N-demethylace, což vede k metabolitům paraxantinu (>80 %), teobrominu (~11%) a teofylinu (~4%) (obrázek 2). Další metabolity byly zaznamenány v důsledku další demethylace a oxidace. Neexistují důkazy, že by kofein nebo kterýkoli z jeho metabolitů byl přeměněn na reaktivní meziprodukty schopné vyvolat toxicitu. Vzhledem k tomu, že CYP1A2 je důležitým enzymem v metabolismu kofeinu, všechny faktory jako věk, genetika nebo životního prostředí, které ovlivňují aktivitu tohoto enzymu, ovlivňují také metabolismus kofeinu. Existuje několik známých interakcí mezi léky a kofeinem spojených s metabolismem CYP1A2, protože množství léků je taktéž metabolizováno CYP1A2. Například barbituráty a nikotin, induktory CYP1A2, mohou zvýšit biotransformaci kofeinu. Kofein může také působit jako kompetitivní inhibitor pro CYP1A2, pokud se stane, že se metabolizuje pomaleji ve srovnání s daným

léčivem, což vede ke snížení clearance (množství plazmy, které se očistí od látky za jednotku času) léku s možností následné toxicity<sup>5</sup>.

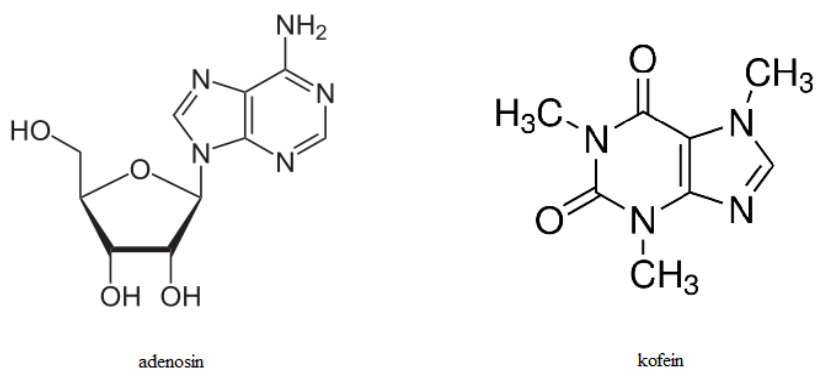
Vylučování močí je primární cestou vylučování kofeinu a jeho metabolitů. Po perorálním podání kofeinu bylo 70% podané dávky nalezeno v moči<sup>5</sup>.



Obrázek 2 – Biotransformace kofeinu<sup>6</sup>

## 1.2 Biologická aktivita kofeinu

Hlavní mechanismus účinku kofeinu v těle je antagonismus všech podtypů adenosinových receptorů. Adenosin působí jako inhibiční neurotransmiter, který potlačuje činnost CNS a jiných tkání. Například v mozku adenosin zpomaluje metabolickou aktivitu, zatímco v srdci snižuje srdeční frekvenci. Molekula kofeinu je strukturně podobná adenosinu (obrázek 3) a je schopná vázat se na adenosinové receptory na povrchu buněk bez jejich aktivace, protože aktivace adenosinových receptorů v CNS podporuje ospalost. Při konzumaci kofeinu se zabraňuje adenosinu vázat se a aktivovat jeho receptory, čímž se dočasně odstraňuje ospalost a obnovuje ostražitost jedince<sup>5</sup>.



**Obrázek 3** – Porovnání struktury adenosinu a kofeinu<sup>2,7</sup>

### 1.3 Vliv kofeinu na spánek

Účinky kofeinu na lidský spánek byly poprvé předmětem zkoumání v roce 1912, kdy H. L. Hollingworth publikoval zprávu o sérii jeho experimentů týkajících se kofeinu a jeho vlivu na kvalitu spánku. Následný výzkum potvrdil a rozšířil jeho poznatky, které se týkají souvislostí mezi dávkou a nástupem účinku, a dále individuálních rozdílů v citlivosti na kofein. Tyto subjektivní nálezy byly přezkoumány pomocí objektivních měření jako je EEG, aktigrafie a genetické testy<sup>4</sup>.

Konzumace kofeinu nemá vliv na kvalitu spánku u kojenců. Děti matek s vysokým příjmem kofeinu (>300 mg/den) během těhotenství se neprobouzely častěji než děti matek s nízkým příjmem kofeinu. Stejně výsledky se týkají i dalších tří měsíců po porodu<sup>8</sup>. Podobně nejsou významné rozdíly i v srdečním rytmu a délce spánku novorozenců. Srdeční frekvence byla pozorována u kojenců od matek, které po dobu pěti dní pily pět šálek kávy bez kofeinu a dalších pět dní jim bylo podáváno pět šálek kávy s kofeinem (100 mg/šálek)<sup>9</sup>.

U dospívajících jedinců bylo při konzumaci vysokého nebo středního množství kofeinu pozorováno krátké trvání spánku a denní ospalost. Z výzkumu 625 dětí ve věku 6 – 10 let bylo zjištěno, že jedinci, kteří pravidelně vypijí přibližně jednu polovinu kofeinového nápoje, ztrácejí až 15 minut spánku. Spánek u dětí s vyšším příjmem kofeinu (100 – 150 mg/den) byl více přerušovaný než u dětí s nižším příjmem kofeinu (0 – 50 mg/den)<sup>4</sup>.

Z výzkumu většího vzorku dospělých osob vyplývá, že se doba spánku snížila v průměru o 40 minut, když příjem kofeinu překročil 8 šálek za den (tabulka 1)<sup>4</sup>.

**Tabulka 1 - Příjem kofeinu a kvalita spánku u dospělých osob<sup>4</sup>**

Počet respondentů	Pohlaví	Věk	Zdroj kofeinu	Příjem	Měření spánku	Spánkové změny
144	m	34	Káva	805 mg/den	Kvalita spánku	Zhoršení
183	ž	20 – 29 (74%) 30 – 39 (19%)	Káva	0, 1 – 2, 3 – 4, >5 šálků/den	Schopnost usnout	Zhoršení
2 696	m, ž	20 - 45	Káva, čaj	1 – 4, >4 šálků/den	Četnost buzení, brzké buzení, spokojenost s vnímanou dobou spánku	Beze změn
170	m, ž	Univerzitní studenti	Nespecifikováno	≥ 8 šálků/den	Doba spánku, spokojenost se spánkem	Zhoršení
1 498	m, ž	44 - 58	Káva	225 mg/den	Kvalita spánku	Zhoršení

Převážná většina kontrolovaných laboratorních studií s využitím EEG či aktigrafie naznačuje, že kofein ovlivňuje kvalitu lidského spánku. Pozdější nástup spánku a čas buzení po spánku se prodloužili, kdežto doba spánku byla snížena. Účinnost spánku (tj. procentní podíl celkového času spánku na celkový čas strávený v posteli) byla snížena v 10 z 11 studií uvádějících tuto hodnotu. Denní dávky kofeinu se pohybovaly od 37,5 do 1200 mg. Ze šesti studií, tři ukázaly postupné zhoršování kvality spánku se zvyšující se dávkou kofeinu (pozdější nástup spánku, delší čas buzení po spánku, kratší trvání spánku). Dvě studie neprokázaly závislost mezi zvýšením dávky kofeinu a pozdějším nástupem spánku, jedna ze studií pak nenašla žádnou souvislost mezi zvýšením dávky kofeinu a kvalitou spánku. Ve studiích nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve farmakokinetice mezi jedinci „citlivými“ a „necitlivými“ ke kofeinu<sup>4</sup>.

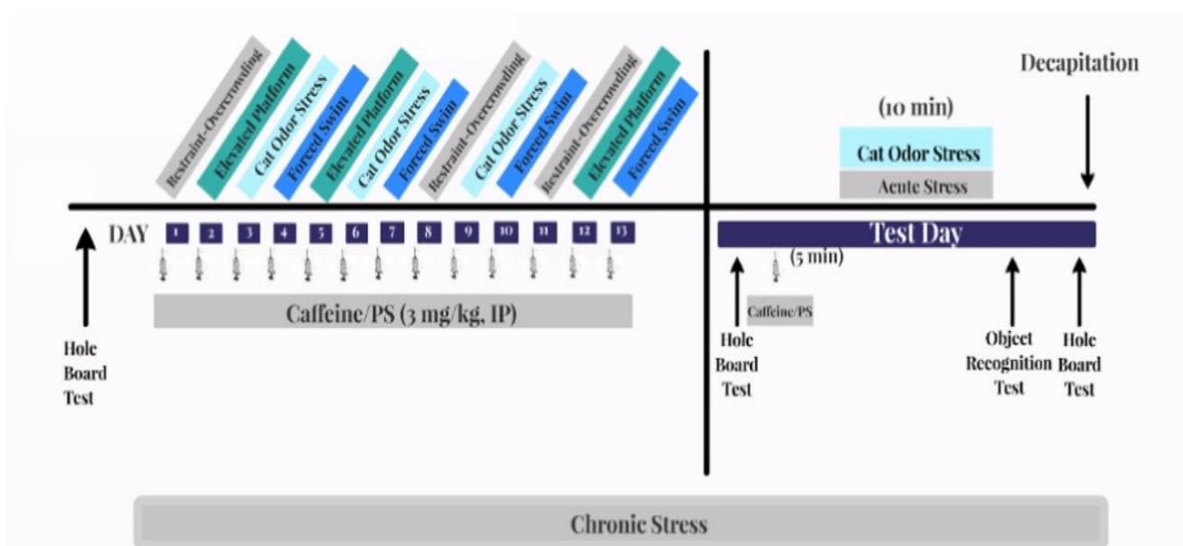
Čas konzumace kofeinu může ovlivnit jeho účinek na spánek. Jeho podání v době před spánkem má největší tendenci spánek narušit. Studie, kdy byla podávána fixní dávka kofeinu (400mg) v intervalech 0, 3 a 6 hodin před spánkem, ukázala, že tato dávka má negativní vliv na kvalitu a délku spánku už šest hodin před jeho začátkem<sup>10</sup>.

#### 1.4 Vliv kofeinu na stres

Stres je psychofyziologická reakce na skutečné nebo vnímané nebezpečí a zahrnuje interakci nervových a hormonálních reakcí s vnitřními a vnějšími podněty. Dlouhodobé vystavení

stresu může způsobit vážné zdravotní problémy<sup>11</sup>. Všechny živé organismy reagují na stimuly, obvykle pomocí neurohormonálních a neurotransmiterních systémů, které souvisejí s uvolňováním stresových hormonů, které interagují s kofeinem. Studie prokazují, že vysoké dávky kofeinu (200 mg nebo více u člověka) zvyšují stupeň úzkosti a způsobují záchvaty paniky. Vysoké dávky kofeinu rovněž snižují úroveň logického uvažování, orientaci, pozornost a vnímání<sup>12</sup>.

Byla provedena studie (obrázek 4), která zkoumala vliv nízké dávky kofeinu na stres. Studie byla provedena na 42 dospělých krysách, které byly rozděleny do sedmi skupin. Některým skupinám byl podáván kofein (3 mg/kg, intraperitoneálně) každý den po dobu 14 dnů, dalším pak byl podán kofein pouze poslední den testování, zbytku byl podán solný roztok. Tato dávka byla zvolena z důvodu napodobení nízké dávky kofeinu u lidí a byla ekvivalentní dvěma malým sklenicím (200 ml) čaje nebo 175 ml filtrované kávy. Krasy byly poté podrobeny akutní nebo chronické psychické zátěži, kromě kontrolní skupiny. Chronická psychická zátěž, která musela být kvůli adaptaci na stres proměnlivá, zahrnovala omezení pohybu ve stísněném prostoru, vyvýšené bludiště, kočičí zápach a nucené plavání, a byla náhodně aplikována na vybrané skupiny každodenně 5 minut po podání kofeinu. Poslední den, bezprostředně po vyvolání stresu u všech zkoumaných skupin, byly testovány kognitivní funkce pomocí testu rozpoznávání objektů. Dále se stanovovala úroveň úzkosti pomocí „hole – board“ testu (ten se opakoval před a po vyvolání stresu)<sup>12</sup>.



Obrázek 4 – Průběh experimentu<sup>12</sup>

Po pokusech byly krysy usmrceny a jejich vzorky mozku byly odstraněny a udržovány na teplotě -80 ° C. Byla hodnocena oxidační poškození způsobená stresem a možný ochranný účinek kofeinu<sup>12</sup>.

Výsledky ukazují, že aplikace kofeinu (jednorázová i opakovaná) zlepšila kognitivní funkci a zmírnila úzkostné chování při vystavení jedinců akutnímu a chronickému stresu. Došlo ke snížení parametrů oxidativního poškození. Jednorázová aplikace kofeinu byla účinná při chronickém stresu, nikoli však při akutním stresu. Tento výsledek může souviset s hladinou úzkosti pozorovanou u akutních stresových stavů, o nichž je známo, že jsou silnější než chronické. Výsledky studie silně naznačují, že úzkostné chování a kognitivní funkce při stresových stavech byly zlepšeny jak akutní, tak převážně opakovanou aplikací kofeinu. Tyto výsledky naznačují příznivé účinky kofeinu při akutních nebo chronických psychických stresových stavech<sup>12</sup>.

## **1.5 Vliv kofeinu na diabetes**

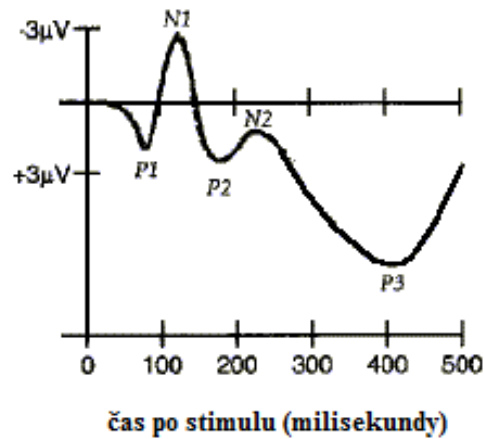
Diabetes v posledních desetiletích postihuje stále větší množství populace po celém světě. V současné době neexistuje možnost tuto nemoc vyléčit, proto je léčba zaměřena na optimalizaci kontroly hladiny glukózy v krvi, což vede k omezení komplikací. Nicméně hladina glukózy v krvi je ovlivněna mnoha faktory včetně potravy, stresu, aktivity a léků, a proto to může být obtížně zvládnutelné onemocnění. Špatná glykemická kontrola může vést k těžké hypoglykémii, což vede ke kómatu nebo ke smrti<sup>13</sup>.

Kofein a káva neobsahují sacharidy, takže je lidé s diabetem nemusí započítávat do jejich příjmu potravy při výpočtu dávek inzulínu. Nicméně, nedávný výzkum naznačil, že i když kofein neobsahuje sacharidy, může měnit hladinu glukózy v krvi. Bylo prokázáno, že hladina glukózy v krvi se zvýší více po příjmu kofeinu spolu s příjmem sacharidů, ve srovnání s příjmem samotných sacharidů. Příjem samotného kofeinu hladinu glukózy v krvi nezvyšuje. Příjem kofeinu při užívání sacharidů tedy může zvýšit hladinu glukózy v krvi a tím snížit epizody hypoglykemie<sup>13</sup>.

## **1.6 Interakce mezi kofeinem a alkoholem**

Kofein a alkohol jsou dva nejčastěji konzumované léky na světě a často jsou podávány společně. Bylo zjištěno, že při souběžném podávání, alkohol a kofein působí antagonisticky na celou řadu jevů, včetně reakčního času. Studium kombinovaných účinků kofeinu

a alkoholu na potenciál vázaný na událost (Event-Related Potentials = ERP) (obrázek 5) může pomoci určit, jaké mechanismy se podílejí na antagonismu mezi účinky těchto léků na reakční čas<sup>14</sup>.



Obrázek 5 – Obecný tvar vlny ERP<sup>15</sup>

Kofein obecně stimuluje celý kortex. Předpokládá se, že kofeinové fyziologické a psychologické účinky jsou způsobeny působením na adenosinové receptory. Na rozdíl od kofeinu působí alkohol jako tlumící prostředek centrální nervové soustavy. Jedním z hlavních mechanismů účinku alkoholu je jeho stimulace aktivity hlavního mozkového inhibičního neurotransmiteru GABA<sup>14</sup>.

V tkáni izolované z hipokampu bylo zjištěno, že antagonisté adenosinu (např. kofein) zabraňují inhibičnímu účinku alkoholu na buňky. Proto bude při vjemech zahrnujících pozornost, smyslové zpracování, vzrušení, nebo pracovní paměť kofein působit proti alkoholu<sup>14</sup>.

Ze studie vyplývá, že alkohol prodlouží reakční čas, stejně jako rozhodovací čas. Alkohol také snižuje schopnost mozku volit relevantní podněty pro další vědomé zpracování. U kofeinu bylo zjištěno, že významně zkracuje reakční čas při výběru a urychluje výběr prostorových informací souvisejících se stimuly. Kofein zvyšuje vzrušení, které zvyšuje aktivitu pro identifikaci informací. Tento jev může snižovat subjektivní obtížnost úkolu<sup>14</sup>.



## 1.7 Vliv kofeinu na rakovinu

Prostřednictvím analýzy studií bylo zjištěno, že ve srovnání s jednotlivci, kteří denně nepijí kávu, měli pravidelní konzumenti kávy nižší výskyt rakoviny, a to zejména u jedinců s vysokým příjmem kávy. Celkově bylo zvýšení spotřeby o 1 šálek kávy denně spojené s 3% snížením rizika rakoviny. Důkazy naznačují, že příjem kávy může snížit výskyt rakoviny u lidí<sup>16</sup>. Současné výzkumy naznačují, že konzumace kávy je spojena se sníženým rizikem rakoviny jater, ledvin a v menším rozsahu předmenopauzální rakoviny prsu a kolorektálního karcinomu, avšak nijak neovlivňuje rakovinu prostaty, slinivky a vaječnicků. Káva je hlavním zdrojem kofeinu a některé studie na zvířatech uvádějí, že kofein může jak stimulovat tak potlačit nádory a to v závislosti na druhu rakoviny a fázi podávání<sup>17</sup>.

Rakovina prsu je druhou hlavní příčinou úmrtí související s rakovinou u žen ve většině průmyslových zemí<sup>17</sup>. Podle norského výzkumu, ženy, které pily  $\geq 5$  šálků kávy denně, zaznamenaly statisticky významné 50% snížení rizika rakoviny prsu ve srovnání s těmi, které pily  $\leq 2$  šálky<sup>16</sup>. Další mezinárodní výzkum uvádí, že ženy před menopauzou s mutací genů BRCA1 nebo BRCA2, které obvykle vypily 6 nebo více šálků kávy denně, zaznamenaly 70% statisticky významné snížení rizika rakoviny prsu. Stejně tak byla zjištěna nezanedbatelná souvislost mezi příjmem kofeinu a výskytem rakoviny u štíhlých žen a u těch, které pily kávu ve věku 18-35 let<sup>17</sup>. Navíc vyšší příjem kofeinu a nápojů obsahujících kofein byl spojen s globulinem vázajícím pohlavní hormony a nepřímo spojen s biologicky dostupným testosteronem. Tyto hormonální změny mohou příznivě ovlivnit riziko rakoviny prsu<sup>16</sup>. Přestože údaje nejsou zcela přesvědčivé, některé důkazy naznačují, že pravidelné pití kávy (nejméně čtyři šálky denně) je spojeno s mírně sníženým rizikem rakoviny prsu v premenopauzálním věku<sup>17</sup>.

Výskyt rakoviny jater je nejvyšší v rozvojových zemích, kde se nachází přibližně 80% všech pacientů. Analýza zahrnující deset studií uváděla statisticky významné snížení rizika u konzumentů kávy o 41% ve srovnání s osobami, které kávu nikdy nepijí. Další analýza zahrnující devět studií zjistila, že zvýšená spotřeba kávy je spojena se sníženým rizikem rakoviny jater, a to jak u zdravých jedinců, tak u jedinců s onemocněním jater. Zdá se tedy, že spotřeba kávy snižuje riziko vzniku rakoviny jater<sup>17</sup>.

Spotřeba kávy může snížit riziko rakoviny ledvin, protože kofein má diuretický účinek a antioxidanty v kávě mohou zmírňovat oxidační poškození DNA, proteinů a dalších molekul.

Celkově existují dostatečné důkazy o tom, že spotřeba kávy je spojena s mírně nižším rizikem rakoviny ledvin<sup>16,17</sup>.

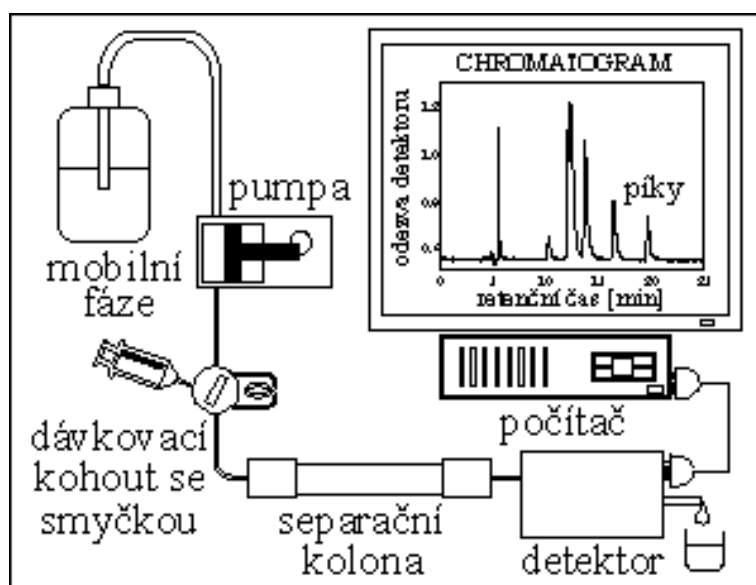
Kolorektální karcinom je jedním z nejběžnějších onemocnění na celém světě. Některé studie odhalily statisticky významné 12% snížení rizika kolorektálního karcinomu při vysoké spotřebě kávy oproti nízké spotřebě. Jiné však ukázaly nepřímou nebo žádnou asociaci mezi pitím kávy a rizikem rakoviny tlustého střeva<sup>17</sup>. Celkové výsledky naznačují, že konzumace kávy nemá žádný nebo mírně příznivý vliv na riziko kolorektálního karcinomu<sup>16</sup>.

U rakoviny prostaty a vaječnicků nebyly zjištěny žádné významné souvislosti mezi konzumací kávy a jejich výskytem<sup>17</sup>.

## 2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Jednou ze základních metod stanovení kofeinu v nápojích je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography). Princip kapalinové chromatografie spočívá v nestejném rozdělování složek směsi mezi dvě navzájem nemísitelné fáze (mobilní a stacionární)<sup>18</sup>. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdržují ty složky směsi, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tímto se od sebe složky směsi postupně separují<sup>19</sup>.

HPLC (obrázek 6) je v současnosti velmi rozšířenou separační metodou, která se používá ke kvalitativní a kvantitativní analýze organických látek v oblasti léčiv, biochemie či potravinářství. Umožňuje analýzu látek málo těkavých, tepelně labilních, polárních, nepolárních i iontových. Je vhodná pro látky nízkomolekulární i vysokomolekulární<sup>20</sup>. Další metoda, se kterou se můžeme setkat, je ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Ta využívá velmi malé velikosti částic ve stacionární fází (pod 2  $\mu\text{m}$ ). Takto malé částice nabízejí výjimečnou chromatografickou účinnost a rychlou analýzu, zatímco moderní přístroje UHPLC poskytují spolehlivost a robustnost při nepřetržitém provozu při tlacích až 150 MPa<sup>21</sup>.



Obrázek 6 – Schéma přístroje pro HPLC<sup>22</sup>

## 2.1 Stanovení kofeinu v nápojích pomocí HPLC

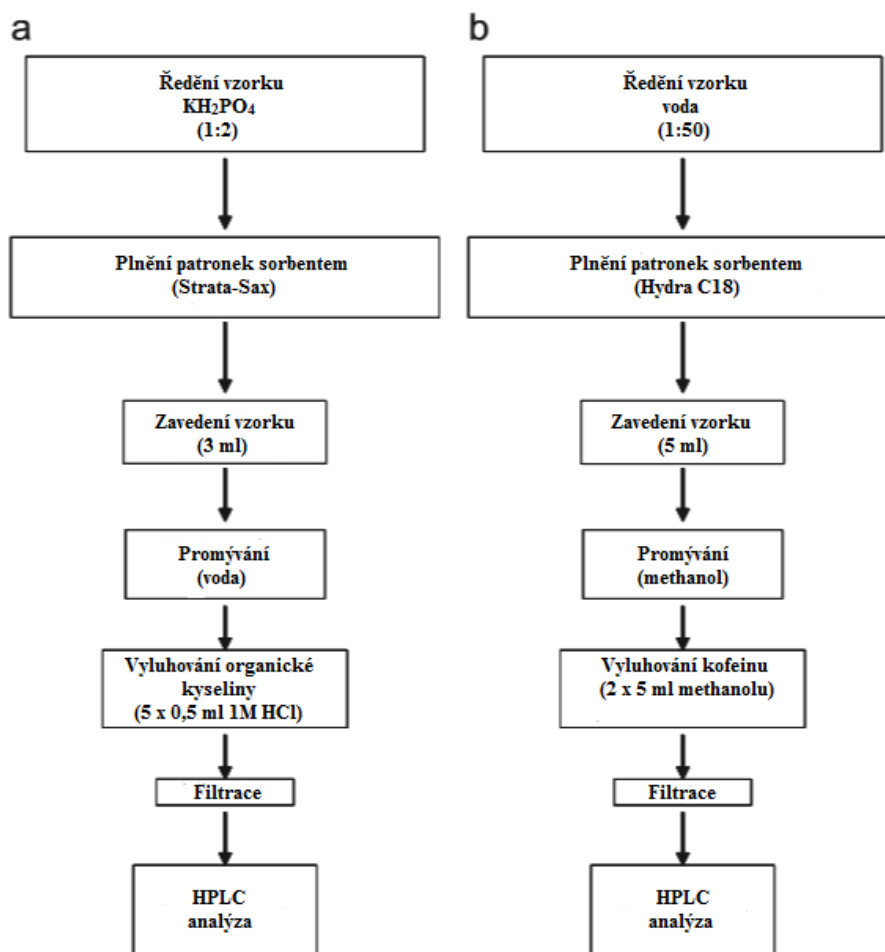
Pro analýzu kofeinu a dalších látek u různých typů vzorků byla použita metoda HPLC. Stanovení kofeinu se neprovádělo jen u kávy<sup>23-26</sup>, ale i u dalších nápojů, jako jsou různé druhy čajů (černý, zelený, bílý, oolong)<sup>21,23,27,28</sup>, maté<sup>2</sup>, energetických nápojů<sup>23,29</sup> a nealkoholických nápojů<sup>32,29</sup>. V žádné ze studií nebyl kofein stanovován samostatně, ale společně s dalšími látkami, jako jsou methylxantiny<sup>21</sup>, flavonoidy<sup>23,25</sup>, fenolové kyseliny<sup>23,25</sup>, kyselina askorbová<sup>29</sup>, katechiny<sup>27,28</sup>, organické kyseliny<sup>24</sup>, trigonelin<sup>26</sup>, kyselina nikotinová<sup>26</sup> nebo sacharóza<sup>26</sup>.

### 2.1.1 Příprava vzorků

Každý vzorek musel být před samotným stanovením upraven. Rostagno a kol. použil metodu ultrazvukové extrakce. Ta spočívala v postupné extrakci 0,5 g vzorku (čaj, maté, káva) nejprve v 15 ml 50% methanolu, poté 75% methanolu a nakonec 100% methanolu po dobu 20 minut při 60°C. Po každém extrakčním kroku byl vzorek centrifugován při 10°C po dobu 10 minut při 4000 otáčkách za minutu v odstředivce. Tekutina nad sedimentem (supernatant) byla shromážděna a pevná látka byla podrobena následujícímu kroku extrakce. Po poslední extrakci byly supernatanty spojeny se 100 ml vody a byla odebrána alikvotní část, která byla před HPLC analýzou filtrována přes nylonový filtr 0,2 µm. Vzorky kapalin (nealkoholický nápoj a energetický nápoj) byly ultrazvukem odplyňovány po dobu 10 minut a filtrovány přes 0,2 µm nylonový filtr<sup>23</sup>. Totožný postup přípravy vzorku použil ve své studii pro stanovení fenolových kyselin, flavonoidů a kofeinu ve vzorcích kávy i Belguidoum a kol.<sup>25</sup>

Naproti tomu Rahim a kol. použil pro stanovení katechinů a kofeinu v čaji mikrovlnnou extrakci. Vzorek čaje (0,5 g) byl vložen do extrakční zkumavky (100 ml) a bylo přidáno 25 ml směsi voda : acetonitril : methanol (83:6:11). Nádoba se vzorkem byla vložena do mikrovlnné jednotky a výkon byl nastaven na 600 W. Suspenze byla ozařována mikrovlnami po dobu 6 minut (zahřáta na teplotu přibližně 80°C při 2,4 MPa). Poté se směs nechala vychladnout asi 15 minut. Extrakt byl přenesen do 10 ml odměrné baňky a doplněn po značku za použití vhodného rozpouštědla. Následně byla směs filtrována. Prokázalo se, že tato metoda je časově a energeticky úsporná a vysoce účinná<sup>28</sup>. V jiné studii byla k přípravě vzorků využita metoda extrakce na pevné fázi. Princip spočívá v účinné sorpci analytu z vodného vzorku na pevný sorbent. Zachycený analyt se pak uvolní ze sorbentu zahřátím a/nebo elucí vhodným rozpouštědlem. Vzorky kávy byly ředěny (1:50) ve vodě. Šest

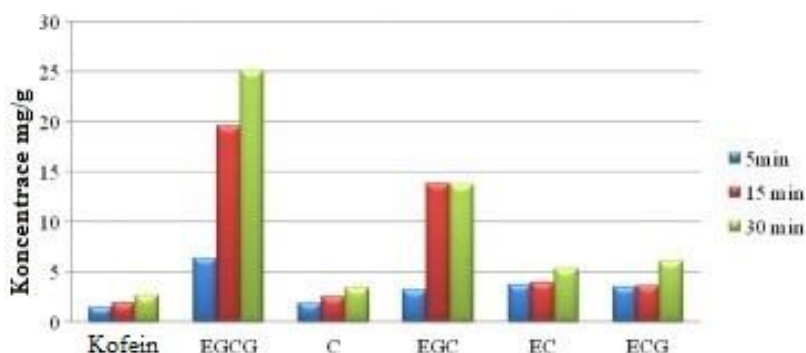
gramů sorbentu chemicky vázané oktadecylsilikagelové fáze (C18) bylo naplněno do 15 ml patronek, promýváno vodou a aktivováno 10 ml methanolu a 10 ml vody. 5,0 ml objemu zředěného vzorku vařené kávy prošlo průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. Náplň byla promyta 5 ml methanolu a kofein byl eluován 2 x 5 ml methanolu. Eluované vzorky byly filtrovány s 0,2 µm stříkačkovým filtrem a nastříknuty přímo do chromatografu (obrázek 7)<sup>24</sup>.



**Obrázek 7** – Postup přípravy vzorku pro stanovení a) kyseliny askorbové a za b) kofeinu<sup>24</sup>

Zacharis a kol. ve své studii upravil vzorky bylinných a čajových směsí jejich louhováním a následným zředěním a filtrací. Přesně zvážené množství 1000 mg čajových směsí bylo dispergováno ve 100ml vody a mícháno po dobu 30 minut při 80 až 90°C. Alikvotní část 5 ml výsledných roztoků byla zfiltrována, zředěna vodou (1:1 pro kvantifikaci teofylinu a teobrominu a 1:10 pro kofein) a nastříknuta bez dalšího předběžného zpracování<sup>21</sup>. Obdobný postup použil ve své studii i El-Shahawi a kol. Přesná hmotnost (0,25-0,26 ± 0,01 g) vzorku zeleného čaje byla jednotlivě umístěna do vařené vody (100 ml) a inkubována při teplotě 90 °C po dobu 5 minut. Tento stav byl podobný skutečnému stavu vaření pro šálek čaje.

Po ochlazení byl každý roztok přefiltrován. Filtrát a promývací roztoky byly potom přeneseny do odměrné baňky (100 ml). Následně byl vhodný objem (10 ml) extraktu filtrován přes membránový filtr na bázi celulózy o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$ . El-Shahawi a kol. se také zabýval vlivem doby louhování (5, 15 a 30 min.) na množství uvolněných katechinů a kofeinu. Údaje obecně ukazují, že rychlost uvolňování katechinů a kofeinu ze zeleného čaje do vařené vody se zvyšuje při zvyšující se době louhování (obrázek 8)<sup>27</sup>.



**Obrázek 8** – Rychlost uvolňování katechinů a kofeinu v závislosti na době louhování<sup>27</sup>

Ve studii zabývající se rozbory různých druhů káv byl postup přípravy vzorku následující: 0,2 g mleté kávy byly suspendovány v 60 ml vroucí vody a protřepávány při pokojové teplotě po dobu 15 minut při 300 ot/min. Směs se byla filtrována přes filtrační papír a promyta přibližně 30 ml vody. V případě instantní kávy bylo 0,1 g vzorku přímo zředěno v 60 ml vody při pokojové teplotě. Pro vyjasnění extraktu byly přidány 2 ml nasyceného vodného roztoku bazického octanu olovnatého a konečný objem byl doplněn vodou na 100 ml. Koloidní disperze byla potom filtrována jak filtračním papírem, tak přes membránový filtr na bázi celulózy o velikosti 0,22  $\mu\text{m}$ . Konečný extrakt byl před analýzou zředěn vodou (1:1)<sup>26</sup>.

Ve studii stanovující kofein a kyselinu askorbovou v nealkoholických a energetických nápojích byla zapotřebí jen základní úprava vzorků. Všechny vzorky byly důkladně odplyněny v ultrazvukové lázni podobu 25 minut. Přiměřený objem vzorků byl přenesen do 10 ml odměrné baňky a následně doplněn mobilní fází po rysku a znovu odplyněn po dobu 10 minut. Tato metoda je oproti ostatním časově nenáročná<sup>29</sup>.

### 2.1.2 Zařízení a podmínky stanovení

Pro analýzu kofeinu v nápojích se zpravidla využívá chromatografie v systémech s obrácenými fázemi<sup>21,23-29</sup>, kde jako stacionární fáze je nejčastěji použit oktadecylsilikagel

a jako mobilní fáze směs metanolu nebo acetonitrilu s vodou. Ve většině případů byla separace provedena s využitím klasických HPLC kolon plněných částicemi o velikosti  $5\ \mu\text{m}^{24-27}$ . Dále lze využít UHPLC, kde jsou kolony plněné částicemi o velikosti  $1,7\ \mu\text{m}^{21,29}$  nebo povrchově porézní částice, většinou s velikostí  $2,6\ \mu\text{m}$ . Povrchově porézní částice mají pevné jádro a tenkou vrstvu adsorbentu. Výhoda těchto kolon spočívá ve zlepšení rozlišení, kapacity a citlivosti a zároveň se jejím použitím sníží spotřeba rozpouštědla<sup>23</sup>. Kromě klasických částic lze použít monolitickou stacionární fázi, Monolitické kolony představují inovativní typ kolon pro rychlou chromatografickou analýzu. Na rozdíl od klasických HPLC kolon jsou monolitické kolony vytvořeny z jediného kusu porézního silikagelu, což jim dává větší pórovitost a propustnost, a to umožňuje provádět chromatografické analýzy ve zlomku dříve požadovaného času<sup>28</sup>.

Pro detekci kofeinu se nejčastěji používá spektrofotometrický detektor. Při současné analýze dalších látek se s úspěchem využívá detektor diodového pole, který může být připojený online s fluorescenčním detektorem<sup>23</sup>. Nejčastěji jsou sledovány vlnové délky v rozmezí  $260-320\ \text{nm}^{24,25,28}$ . El-Shahawi a kol. použil vlnovou délku  $205\ \text{nm}$ . To bylo umožněno použitím acetonitrilu namísto methanolu jako elučního činidla. Acetonitril poskytuje vyšší absorpci a snadnou detekci stopových koncentrací katechinů nebo kofeinu při  $205\ \text{nm}$  místo  $275\ \text{nm}^{27}$ . Perrone a kol. použil k detekci analytů hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem<sup>26</sup>.

Výběr mobilní fáze pro separaci kofeinu a dalších látek v nápojích je velmi široký. U studií Rostagna a kol. a Belguidouma a kol. se mobilní fáze skládala ze dvou rozpouštědel: vody ( $1\% \text{H}_3\text{PO}_4$ ) a acetonitrilu ( $1\% \text{H}_3\text{PO}_4$ )<sup>23,25</sup>. Zacharis a kol. použil jako mobilní fázi směs  $\text{CH}_3\text{OH}$  a vody ( $0,1\% \text{HCOOH}$ ), stejně jako Perrone a kol., který ale využil  $0,3\%$  vodný roztok  $\text{HCOOH}^{21,26}$ . Turak a kol. aplikovala mobilní fázi skládající se z  $0,2\text{M} \text{H}_3\text{PO}_4$  a acetonitrilu<sup>29</sup>. El-Shahawi a kol. využil kombinaci dvou mobilních fází sestávající z  $5\%$  acetonitrilu ( $0,035\% \text{CF}_3\text{COOH}$ ) a  $50\%$  acetonitrilu ( $0,025\% \text{CF}_3\text{COOH}$ ). Přítomnost kyseliny trifluoroctové byla nezbytná pro vysoké rozlišení a účinnou chromatografii katechinů v čaji. Dvě mobilní fáze, složené z různých poměrů acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové, pak poskytovaly vynikající chromatografické dělení při vlnové délce  $205\ \text{nm}^{27}$ . V Rahimově studii byla zkoumán poměr látek mobilní fáze skládající se ze směsi voda : acetonitril : methanol. Jako nejlepší se jevil poměr  $83:6:11$ . V případě použití ostatních poměrů fází nebyly katechiny a kofein dobře odděleny, nebo byl čas separace poměrně dlouhý<sup>28</sup>.

Další podmínky separací ve zkoumaných studiích, jako průtoková rychlost, dávkovaný objem a rychlost separace jsou uvedeny v tabulce 2. Rahim a kol. ve své studii zkoumal vliv různých průtokových rychlostí (1, 1,2 a 1,4 ml/min) na separaci analytů. Bylo zjištěno, že zvýšením průtokové rychlosti se snížila doba separace<sup>28</sup>.

**Tabulka 2** - Další separační podmínky HPLC

	Průtok (ml/min)	Injekční objem (μl)	Rychlost separace (min)
Rostagno a kol. <sup>23</sup>	2,2	10	5
Zacharis a kol. <sup>21</sup>	0,7	5	3
Turak a kol. <sup>29</sup>	0,25	1	4
El-Shahawi a kol. <sup>27</sup>	1,0	20	21
Rahim a kol. <sup>28</sup>	1,4	20	7
Rodrigues a kol. <sup>24</sup>	1	20	neuveveno
Belguidoum a kol. <sup>25</sup>	1	20	13
Perrone a kol. <sup>26</sup>	0,2	5	6

### 2.1.3 Výsledky

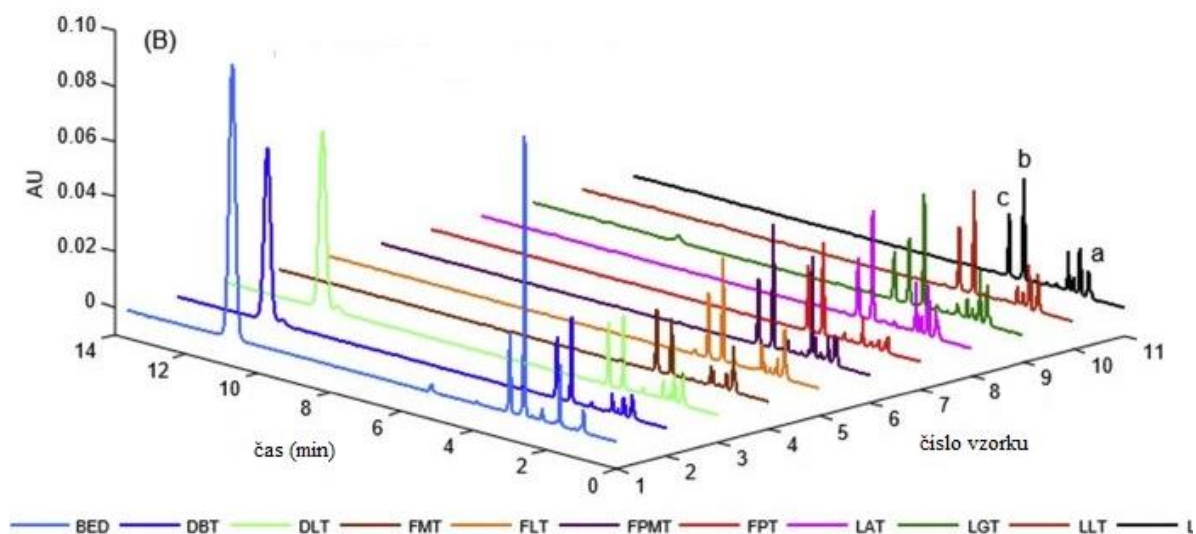
Kofein a fenolické látky byly analyzovány ve vzorcích komerčních čajů (černých, bílých a zelených), maté, instantní kávy, nealkoholických nápojů a jednoho energetického nápoje<sup>23</sup>. Kofein byl nalezen ve všech vzorcích v nejvyšší koncentraci. U bílého čaje byl kofein nalezen v mírně vyšší koncentraci než ve vzorku zeleného čaje. Celková koncentrace všech složek (včetně kofeinu) byla v černém čaji přibližně 3krát nižší než u ostatních vzorků čaje. Mnohem nižší koncentrace kofeinu byly nalezeny ve vzorku maté. Koncentrace kofeinu u instantní kávy byla vyšší než u vzorku maté, ale nižší než u čajů. Nejvyšší kofeinová koncentrace všech vzorků byla nalezena v energetickém nápoji. Koncentrace kofeinu vyskytujícího se ve vzorcích se pohybovala v rozmezí od 40 do 314 mg/l<sup>23</sup>.

Obsah tří hlavních methylxantinů v různých bylinných nápojích byl stanoven Zacharis a kol.<sup>21</sup> Jmenovitě byly zkoumány vzorky heřmánku, vzorky směsí bylin, pět různých vzorků zeleného čaje a dále vzorky černého čaje, máty a šalvěje. Výsledky ukazují, že ve vzorcích heřmánku, šalvěje, máty a směsích bylin nebyly detekovány žádné methylxantiny Kofein a teobromin byly přítomny ve všech vzorcích zeleného a černého čaje v rozmezí 18,8-27,1 mg/g a 0,6-1,9 mg/g. Teofylin byl detekován pouze ve třech vzorcích zeleného čaje ve všeobecně nižších koncentracích v rozmezí 0,7-1,7 mg/g<sup>21</sup>.

Kofein a kyselina askorbová byly analyzovány v deseti vzorcích ledového čaje a v energetickém nápoji<sup>29</sup>. Ukázka chromatografické separace je uvedena na obrázku 9.

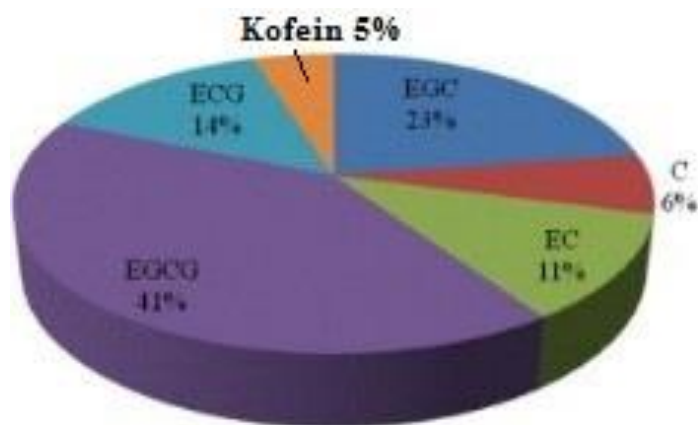


Nejvyšší množství kofeinu obsahoval energetický nápoj a to v průměru 145,41 mg/l. Ledové čaje obsahovaly od 31,88 do 63,68 mg/l kofeinu<sup>29</sup>.



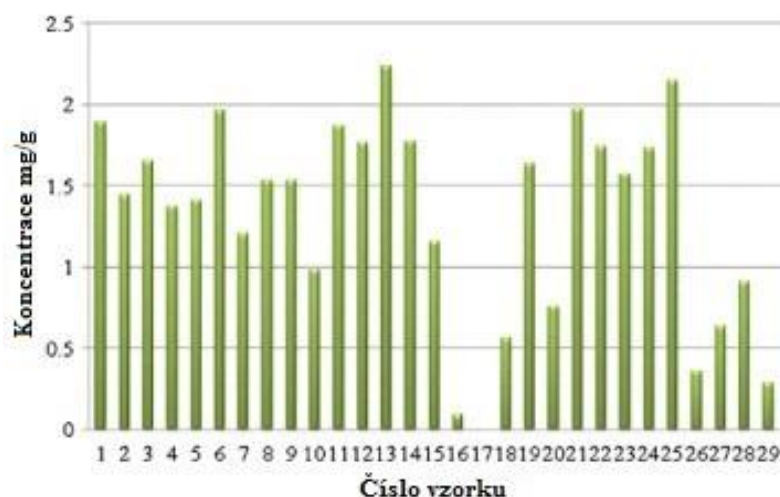
**Obrázek 9** – Chromatogram pro stanovení kofeinu a kyseliny askorbové<sup>29</sup>

El-Shahawi podrobil analýze 29 vzorků zeleného čaje. Analýza odhalila přítomnost přiměřených množství všech katechinů a kofeinu v testovaných vzorcích. Významné rozdíly mezi všemi katechiny zeleného čaje a množstvím kofeinu byly zaznamenány ve všech vzorcích čaje (obrázek 10).



**Obrázek 10** – Průměrné množství katechinů a kofeinu ve stanovovaných vzorcích<sup>27</sup>

Množství kofeinu ve vzorcích zeleného čaje se pohybovalo od 0,28 do 2,23 mg/g. V jednom ze vzorků nebyl kofein detekován (obrázek 11)<sup>27</sup>.

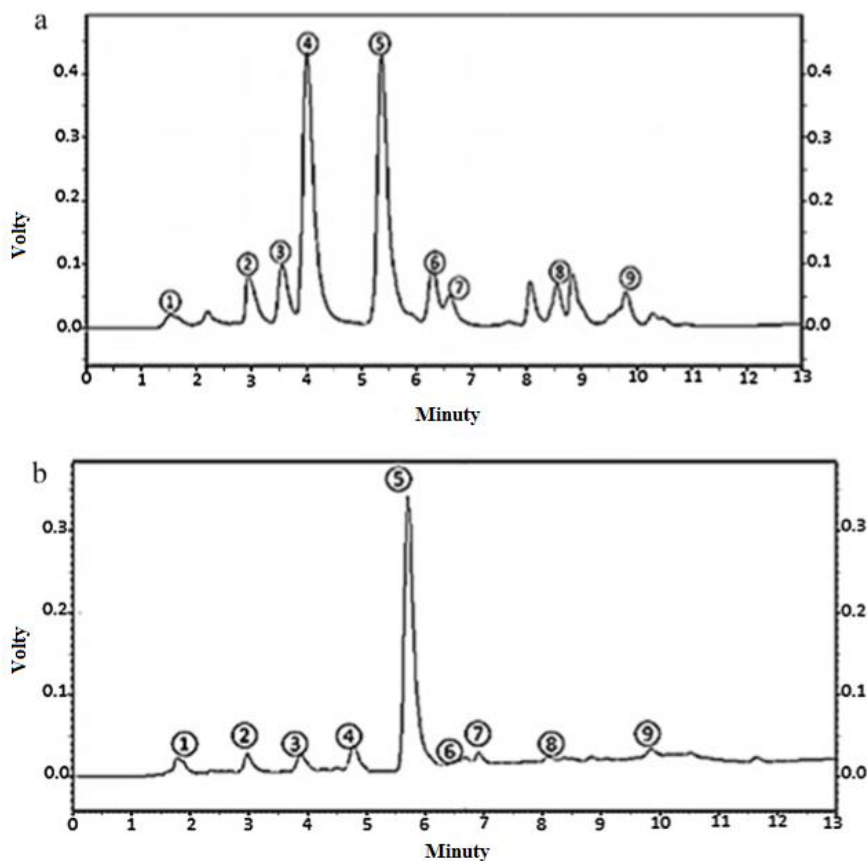


**Obrázek 11** – Množství kofeinu ve vzorcích zeleného čaje<sup>27</sup>

Podobná práce byla prezentována i Rahim a kol.<sup>28</sup> V této práci byly vedle šestivzorků zeleného čaje analyzovány 3 černé a 2 oolong čaje. Největší množství kofeinu bylo zjištěno v plně fermentovaném černém čaji. Jeho hladina byla v rozmezí 61,1-69,2 mg/g, zatímco částečně fermentovaný čaj oolong a nefermentovaný zelený čaj udávali hodnoty v rozmezí 41-43,3 a 20,4-38,7 mg/g<sup>28</sup>.

Rodrigues a kol. se věnoval stanovení kofeinu a sedmi organických kyselin ve vzorcích pražené kávy. Bylo testováno dvacet vzorků kávy z obou typů kávy (robusta vs. arabica). Káva robusta prokázala nejvyšší obsah kofeinu v rozmezí od 314 do 762 mg / l, zatímco káva arabica vykazovala nižší hladiny kofeinu od 174 do 456 mg / l<sup>24</sup>.

Analýzou kávy se zabývala i další práce<sup>25</sup>, kde byla pozornost věnována fenolovým kyselinám, flavonoidům a samozřejmě kofeinu. Celkem bylo studováno 16 různých vzorků kávy (zelené, pražené, instantní). Obsah těchto látek v komerční kávě může být značně ovlivněn nejen druhem kávy, odrůdou a zeměpisným původem, ale také podmínkami pražení (obrázek 12). Množství kofeinu se v rámci studovaných vzorků značně lišilo a pohybovalo se od 38 až do 136 mg/l. Kofein byl převládající sloučeninou ve všech vzorcích, s výjimkou bezkofeinové kávy, jejíž koncentrace kofeinu byla nejnižší (1,85 mg/l)<sup>25</sup>. Bylo také zjištěno, že obsah kofeinu v odrůdě arabica je nižší než obsah kofeinu v odrůdě robusta, což se shoduje s výsledky Rodriguese a kol.<sup>24,25</sup>



**Obrázek 12** – HPLC chromatogramy a) nepražené kávy, b) pražené kávy (vrchol č. 5 = kofein)<sup>25</sup>

Perrone a kol. se věnoval kvantifikaci kofeinu, trigonelinu, kyseliny nikotinové a sacharózy v 13 různých vzorcích kávy. Hodnoty kofeinu se pohybovaly v rozmezí od 8,43 do 9,31 mg/ g kávy v zelených a pražených vzorcích kávy arabica, zatímco obsah kofeinu v kávě robusta činil 17,01 mg/g<sup>26</sup>. Tím potvrzuje výsledky dalších studií, podle kterých je obsah kofeinu v odrůdě arabica vyšší, než v odrůdě robusta. Perrone a kol. se shoduje s výzkumy Belguidouma a Rodriguese také v tom, že obsah stanovovaných látek může být silně ovlivněn druhem kávy, odrůdou, zeměpisným původem a podmínkami pražení. A proto by mělo být současné stanovení těchto složek před a po zpracování kávy užitečným nástrojem pro kontrolu kvality surovin a pro sledování podmínek pražení kávy<sup>24-26</sup>.

### 3 ELEKTROFORÉZA

Další z metod stanovení kofeinu v nápojích je elektroforéza, která se řadí mezi elektromigrační separační metody. Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Prostředí mezi elektrodami je tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému. Vlivem odlišné rychlosti migrace složek vzorku se v průběhu separace vytváří oddělené zóny jednotlivých složek. Platí tedy, že jsou-li na začátku separace částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitě částice, které mají větší pohyblivost a opožďují se částice s menší pohyblivostí (rychlost pohybu částice závisí na její velikosti a velikosti náboje). Tím dochází k jejich oddělení<sup>19</sup>.

Z instrumentálního hlediska lze elektroforézu provádět ve dvou základních uspořádáních, v provedení plošném a kapilárním.

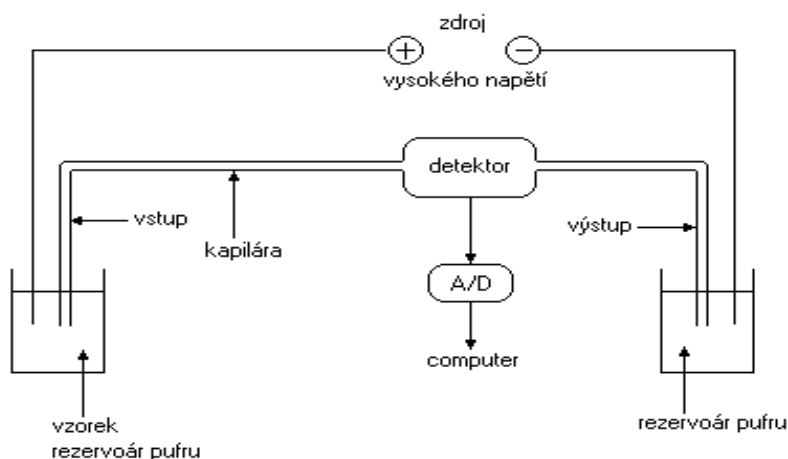
- Plošné provedení – plošný nosič (nejčastěji vrstva hydrofilního polymerního gelu) je napuštěn základním elektrolytem a je umístěn v elektroforetické komoře nasycené parami rozpouštědla (obrázek 13). Vzorek se obvykle nanáší do středu nosiče a po vložení vysokého napětí se oddělí zóny obsahující jednotlivé složky. K vyhodnocení elektroforézy slouží elektroforegram, polohy jednotlivých zón souvisí s kvalitou vzorku, kvantitativní vyhodnocení se provádí denzitometricky<sup>19,30</sup>.



Obrázek 13 - Elektroforéza v plošném uspořádání<sup>31</sup>

- Kapilární – křemenná kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami, mezi které se aplikuje vysoké napětí (obrázek 14). Definovaný

a velmi nízký objem vzorku je dávkován na jeden konec kapiláry. Ionty migrují vlivem elektroosmotického toku směrem ke katodě na druhý konec kapiláry, kde je umístěn detektor (nejčastěji fotometrický, dále může být fluorescenční nebo vodivostní). Poloha píku na elektroforegramu určuje kvalitu, plocha nebo výška píku určuje kvantitu<sup>19,30</sup>.



Obrázek 14 – Kapilární elektroforéza<sup>31</sup>

### 3.1 Stanovení kofeinu v nápojích pomocí elektroforézy

Stanovení kofeinu a dalších látek ve vzorcích nápojů bylo prováděno metodou kapilární elektroforézy. Vedle kofeinu, který byl stanovován ve všech studiích, se stanovoval teobromin a teofylin<sup>32</sup>, katechiny, theanin, kyselina askorbová<sup>33</sup> a kyselina benzoová<sup>34</sup>, aspartám<sup>34</sup> a pyroglutamát<sup>35</sup>, a to ve vzorcích kávy<sup>32,34,36,37</sup>, čaje<sup>32,33</sup> a sycených nealkoholických nápojích<sup>32,35</sup>.

#### 3.1.1 Příprava vzorků

Maeso a kol. pouze rozpustil 1g instantní kávy ve 100 ml odměrných baňkách s vodou a následně pak vzorky zředil vodou v poměru 1:4. Výsledné roztoky byly filtrovány přes nylonové filtry o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$  a poté byly analyzovány<sup>37</sup>. Nogueira a kol. použil pro přípravu vzorků 1g mleté kávy nebo 0,4 g instantní kávy. K nim bylo přidáno 10 ml deionizované vody a vše bylo za míchání zahříváno při 90°C ve vodní lázni po dobu 10 minut. Pro vzorky bezkofeinové instantní kávy byl použit odlišný postup, založený na extrakci kofeinu za použití dichlormethanu. Pomocí 1M roztoku NaOH bylo upraveno pH

vzorku kávy bez kofeinu na hodnotu 10. Ten byl následně přenesen do dělicí nálevky a extrahován třikrát 20 ml rozpouštědla. Potom se organická fáze zcela odpařila a vzorek se spojil s 1 ml deionizované vody. Všechny vzorky byly filtrovány přes membránový filtr s póry 0,22  $\mu\text{m}$ <sup>36</sup>.

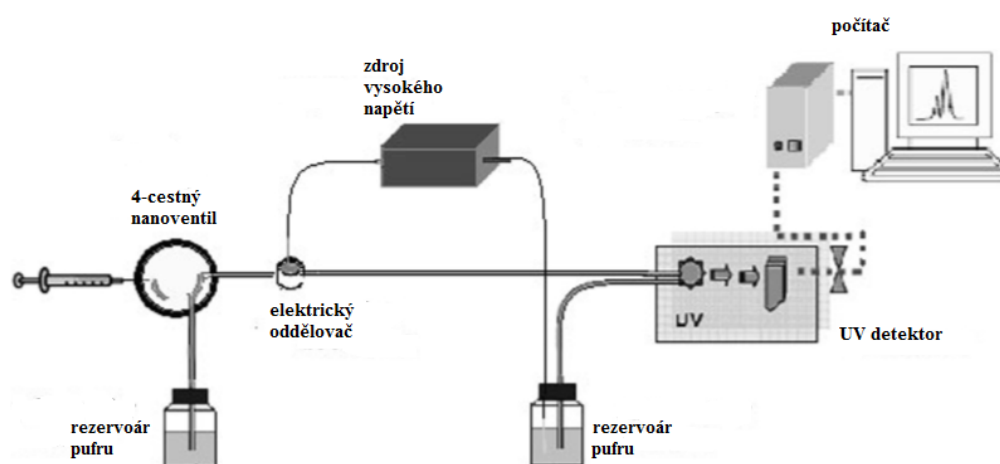
Přípravu vzorků pomocí extrakce použili ve své studii i Horie a Bizzotto. Horie a kol.<sup>33</sup> extrahoval 250 g mletého čaje 50 ml extrakčního roztoku (acetonitril : 2% kyselina metafosforečná (1:1) v ultrazvukové vodní lázni po dobu 30 minut. Extrakční roztok se následně 10x zředil vodou, a poté byl filtrován přes membránový filtr o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$ . Bizzotto a kol.<sup>36</sup> použil jako rozpouštědlo chloroform. Jeden gram kávy byl přidán do dělicí nálevky s 10 ml 0,2 M NaOH a 30 ml chloroformu. Systém byl mírně třepán po dobu 7 minut a organická fáze byla shromážděna v 50 ml baňce. Následně byl chloroform z extraktů odpařen. Do zbytku vzorku bylo přidáno 10 ml vody a filtrovalo se přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr. Po filtraci byly vzorky přeneseny do vzorkových lahvíček a odplyněny ultrazvukem po dobu 5 minut.

Li a kol. musel použít dvě různé přípravy vzorků. Z plechovkových nápojů (čajový nápoj, coca-cola, sportovní nápoj) bylo jen odebráno 5,0 ml a toto množství bylo převedeno do 50 ml odměrné baňky a zředěno na odpovídající objem puřem (15 mM borax). U vzorků čaje a kávy tomu bylo jinak. Byly odebrány 2 g přesně zvážených listů mletého čaje nebo 1 g pražené kávy a toto množství bylo přeneseno do 100 ml kuželové baňky a přidána horká voda o teplotě 70°C. Roztok byl zahříván ve vroucí vodní lázni po dobu 60 minut, poté ochlazen na teplotu místnosti a zfiltrován. Potom byl filtrát sonifikován a opět zfiltrován. Další ředění (1:100) s puřem (15 mM borax) proběhlo těsně před analýzou<sup>32</sup>. Nealkoholické sycené nápoje byly studovány rovněž Walker a kol.<sup>35</sup>, který vzorky ve vakuu odplynil a následně vzorky kvantitativně zředil s puřem v poměru 1:1. Nakonec byl každý vzorek zfiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr do vzorkové lahvičky.

### **3.1.2 Zařízení a podmínky stanovení**

Jednou ze základních částí zařízení pro kapilární elektroforézu je křemenná kapilára různé délky a průměru. Ve studiích byly použity kapiláry o vnitřních průměrech 50 a 70  $\mu\text{m}$  a délkách 40-70 cm<sup>32-37</sup>. Li a kol. ve své studii zkoumal účinnost kapiláry v závislosti na jejím vnitřním průměru. Začínal s kapilárou o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , ale zjistil, že její účinnost je špatná. Důvodem byl velký objem nano-ventilu (20 nl) vzhledem k separační koloně o velikosti 50  $\mu\text{m}$  (nebo menší). Proto byla použita kolona o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ <sup>32</sup>.

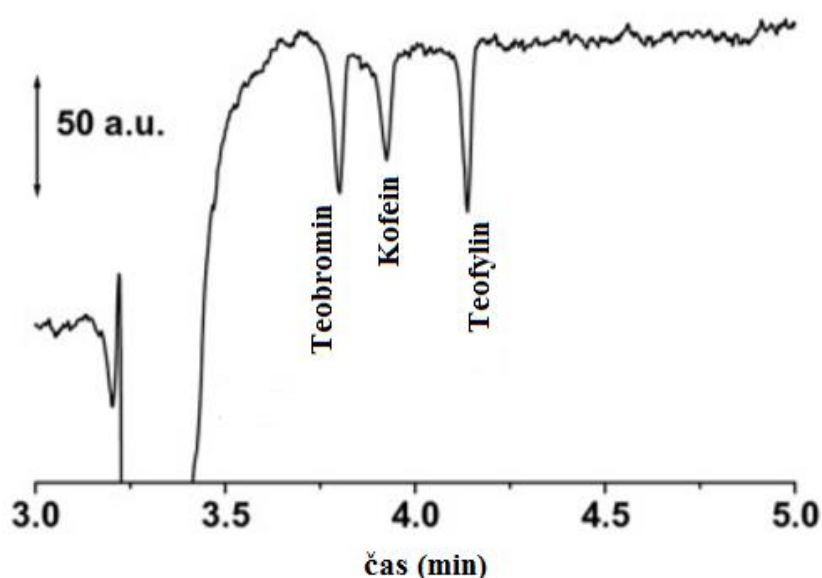
Dávkování vzorku bylo provedeno tlakem<sup>33-35,37</sup> nebo elektroforeticky<sup>36</sup>. V případě dávkování tlakem se hodnoty tlaku i doby dávkování lišily a pohybovaly se v hodnotách 0,035-0,05 baru a 1-7 sekund<sup>33-35,37</sup>. Noguiera a kol využil dávkování rozdílem hladin. Vzorky byly zavedeny zvýšením anodické nádržky o 10 cm po dobu 30 s<sup>36</sup>. U tradiční kapilární elektroforézy se začátek kapiláry vysune ze zásobní láhve s pufrům a ponoří se do vzorkové lahvičky (dip-in). Poté se kapilára přesune zpět do láhve s pufrům a použije se elektrické napětí k zahájení elektroforézy. Během tohoto procesu je však přerušeno napětí. Li a kol. využil pro zavedení vzorku komerčně dostupné 4-cestné nanoventily (20 nl). Pro izolaci injektoru z elektrického pole byl použit elektrický oddělovač (obrázek 15), který byl vyroben po domácku. Výhodou tohoto dávkování je, že nemusí být přerušeno elektrické pole, a tím se zajistí jeho stabilní stav. Také je tímto způsobem zajištěno dávkování přesného množství vzorku<sup>32</sup>.



**Obrázek 15** - Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu s elektrickým oddělovačem<sup>32</sup>

Li a kol ve své studii použil jako základní elektrolyt 15 mM boraxový pufr při pH 9,2<sup>32</sup>. Boraxový pufr o koncentraci 20 mM použil v kombinaci s 80 mM roztokem kyseliny borité (přičemž oba obsahovaly 50 mM dodecylsulfát sodný) i Horie a kol. Celý elektrolyt byl pak upraven na pH 8,4<sup>33</sup>. Dodecylsulfát sodný byl použit i v dalších dvou studiích jako aniontové povrchově aktivní činidlo ke snížení elektroosmotického toku. U studie Maesa a kol. byl použit 130 mM dodecylsulfát sodný v kombinaci s 50mM roztokem kyseliny borité a pH bylo upraveno přidáním NaOH na 9,5<sup>37</sup>. Bizzotto a kol. použil jako základní elektrolyt 50mM

dodecylsulfát sodný a 10mM uhličitan sodný a pH bylo upraveno na hodnotu 11<sup>34</sup>. Základní elektrolyt u studie Walkera a kol. sestával z 20 mM glycinu upraveného na pH 9 pomocí NaOH. Obecně glycinové pufrы nabízejí rychlejší migrační časy než borátové pufrы, ale také snižují rozlišení menších vrcholů<sup>35</sup>. Roztoky alkylxantinů ve studii Nogueiry a kol. byly analyzovány pufrem složeným z 20 mM kyseliny 3,4-dimethoxycinnamové a pH bylo upraveno na 8,5 pomocí trisaminomethanu. Kyselina 3,4-dimethoxycinnamová je schopna transformovat kofein – ve vodných roztocích neutrální sloučeninu - do aniontového stavu, a proto tato sloučenina umožňuje základní oddělení tří methylxantinů (obrázek 16)<sup>36</sup>.



**Obrázek 16** - Elektroforegram standardních roztoků kofeinu, teobrominu a teofylinu<sup>36</sup>

Tři ze studií byly provedeny pomocí kapilární elektroforézy se spektrofotometrickým detektorem. Vlnové délky pro stanovení se pohybovaly v rozmezí 200-220 nm<sup>32-35,37</sup>. Horie a kol. pracoval při vlnových délkách 194 a 270 nm. Pro kalibraci theaninu, kofeinu a katechinů byla použita vlnová délka 194 nm a pro kyselinu askorbovou 270 nm<sup>33</sup>. Bizzotto a kol. provedl detekci kyseliny benzoové, aspartámu a kofeinu při vlnové délce 206 nm<sup>34</sup>. Všechny elektroferogramy ve studii Nogueiry a kol. byly provedeny za použití domácího zařízení C<sup>4</sup>D (bezkontaktní vodivostní detekce). Detektor byl provozován na frekvenci 600 kHz a 2 Vpp<sup>36</sup>. Další údaje jsou uvedeny v tabulce 3.



**Tabulka 3** – Další separační podmínky kapilární elektroforézy<sup>32-37</sup>

	Napětí (kV)	Teplota kapiláry (°C)
Li a kol.	20	neuveďeno
Horie a kol.	25	30
Maeso a kol.	10	25
Walker a kol.	20	35
Bizzotto a kol.	15	25
Nogueira a kol.	25	neuveďeno

### 3.1.3 Výsledky

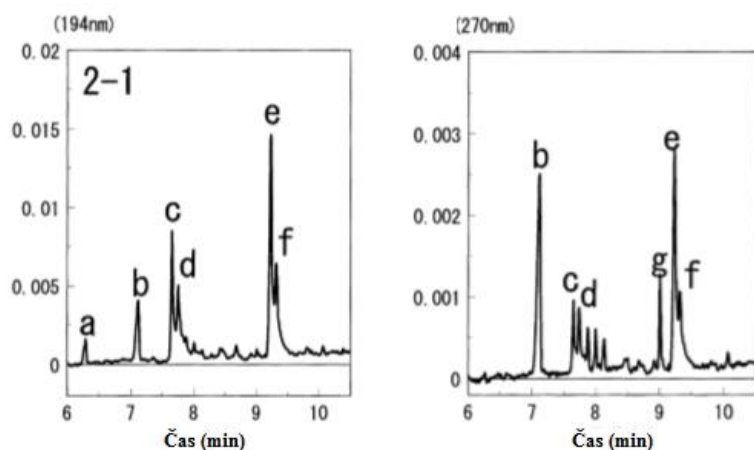
Kvalitativní analýza vzorků byla provedena porovnáním retenčních časů jednotlivých složek se standardy. Kvantitativní analýza byla provedena podle velikosti plochy píku<sup>32-37</sup>.

Kvalitativní analýza tří hlavních methylxantinů ukázala, že ve vzorcích kávy nebyl žádný teofylin. V coca-cole byl detekován pouze kofein. V ostatních vzorcích byly nalezeny všechny tři methylxantiny. Obsah kofeinu se lišil podle druhu nápoje. Coca-cola obsahovala 0,15 mg/ml, čajový nápoj 0,124 mg/ml, čajové lístky 34,3 mg/g a pražená káva 15,58 mg/g<sup>32</sup>.

Studie Walkera a kol. stanovovala kofein a další látky v komerčně dostupných sycených nápojích. V nápojích, které kofein obsahovaly, bylo jeho množství stanoveno od 0,09 do 0,15 mg/ml<sup>35</sup>. Nejvyšší hodnota 0,15 mg/ml by odpovídala coca-cole z předchozí studie<sup>32</sup>. V některých stanovovaných nápojích nebyl kofein stanoven (např. sprite, orange soda)<sup>35</sup>.

Ve studii Nogueiry a kol. se množství kofeinu v instantní kávě pohybovalo v rozmezí 29,5 až 33,1 mg/g a 14,2 a 12,7 mg/g u dvou vzorků mleté kávy<sup>36</sup>.

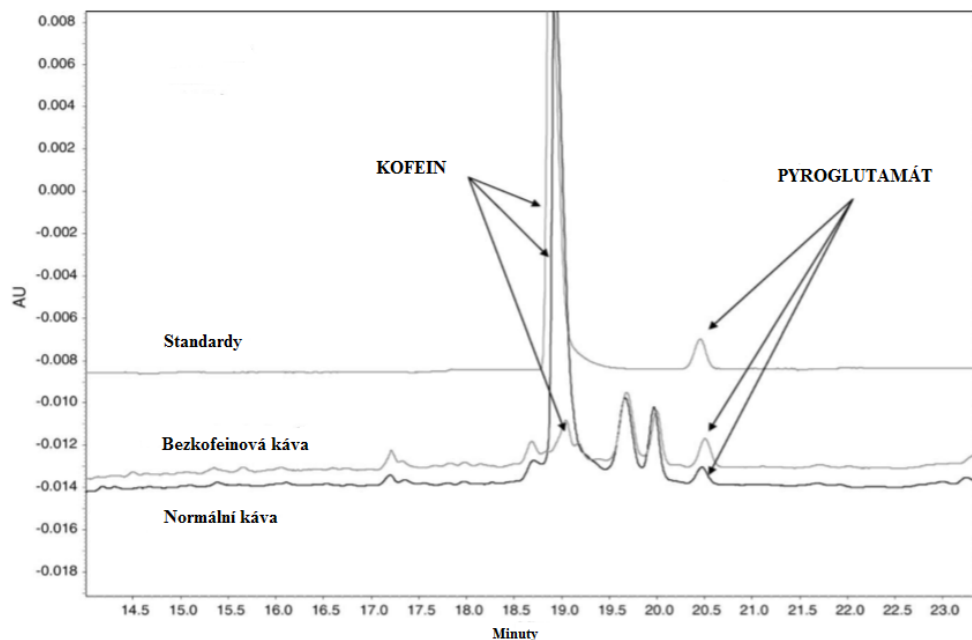
Horie a kol. porovnával množství stanovovaných látek u zeleného, černého a oolong čaje. U elektroforegramu zeleného čaje se jasně odděluje všech sedm složek (kofein, theanin, kyselina askorbová a 4 katechiny) (obrázek 17). V oolong čaji byly plochy píků katechinů menší než u zeleného čaje a píky theaninu a kyseliny askorbové byly téměř nedetekovatelné. V černém čaji byly katechiny ve stopových množstvích a theanin a kyselina askorbová nebyly detekovatelné<sup>33</sup>.



**Obrázek 17** - Elektroforegram zeleného čaje při vlnových délkách 194nm a 270 nm (b=kofein)<sup>33</sup>

Bizzotto a kol. stanovoval množství kofeinu v bezkofeinové kávě. Jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí 0,13 – 0,93 mg/g. Navíc bylo možné pozorovat, že tři z dvaceti analyzovaných vzorků měly hladiny kofeinu nad 0,1% (2,02, 2,43 a 9,31 mg/g), což je maximální limit povolený brazilským právem<sup>34</sup>.

Obě sloučeniny ve studii Maesa a kol. byly opět identifikovány časem migrace ve srovnání se standardy a kvantitativní výpočty byly provedeny z plochy píků (obrázek 18).



**Obrázek 18** - Porovnání elektroforegramů kofeinu a pyroglutamátu pro standardy, bezkofeinovou kávu a normální kávu<sup>37</sup>

Stanovené množství u bezkofeinové kávy se pohybovalo mezi 3,5 až 4,7 mg/g<sup>37</sup>, což je také vyšší množství, než je povoleno brazilským právem<sup>34</sup>. U klasické kávy se množství pohybovalo od 19,8 do 45,9 mg/g<sup>37</sup>.

## 4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce je zpracování rešerše, týkající se kofeinu. První část práce se věnuje fyziologickým účinkům kofeinu na organismus. Druhá část práce je zaměřena na jeho stanovení v nápojích

Kofein se řadí mezi alkaloidy. Má stimulační účinek na centrální nervový systém, srdce, cévy a ledviny. V těle kofein působí jako antagonist adenosinu tím, že se váže na jeho receptory. Mezi pozitivní účinky kofeinu se řadí, zlepšení výkonu, snížení únavy, zvýšení senzorické aktivity a ostražitosti. Proto je také hojně využíván jako prostředek proti únavě například mezi řidiči či studenty. Nejčastěji je přijímán v kávě, čaji nebo mezi mladou generací oblíbených energetických nápojích. Příjem kofeinu však může mít negativní účinky, jako je podrážděnost, nervozita nebo úzkost, bolesti hlavy a nespavost. Tyto symptomy souvisí s intoxikací kofeinem. Kofein má tedy vliv na spánek a stres, ale i na nemoci jako diabetes nebo rakovina.

Kvalitativní a kvantitativní analýzu kofeinu v nápojích lze provádět několika metodami. Mezi nepoužívanější však patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. V dnešní době je kladen důraz především na rychlost, přesnost, reprodukovatelnost a úsporu financí u nově vyvíjených analytických metod. Kofein v nápojích se nejčastěji určuje pomocí HPLC nebo elektroforézy z využitím detektoru diodového pole nebo UV detektoru. Dalšími možnostmi v oblasti detekce je využití hmotnostního spektrometru nebo bezkontaktní vodivostní detekce. Jeden z důležitých kroků u kapilární elektroforézy je i dávkování vzorku. Nejvíce používané je dávkování tlakem, popřípadě dávkování rozdílem hladin. V jedné ze studií byl však použit elektrický oddělovač, který umožní dávkování vzorku bez přerušení elektrického pole. Tento a další nové postupy by mohly přispět k ještě přesnější analýze látek.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Caffeine. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry 2017. Last Revised 2013 [cit. 25. 4. 2017]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m2909/caffeine?q=authorize>
- [2] Internet: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/c0750?lang=en&region=CZ> [cit. 25. 4. 2017]
- [3] "Caffeine." *Britannica Academic*, Encyclopædia Britannica. [cit. 25. 4. 2017] Dostupné z: [academic.eb.com/levels/collegiate/article/caffeine/18535](http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/caffeine/18535)
- [4] CLARK, I., LANDOLT, P. H. Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Sleep Medicine Reviews*, 2017, vol. 31, p. 70-78.
- [5] GUPTA, R. C. ed. *Nutraceuticals - efficacy, safety and toxicity*. Amsterdam: Elsevier, 2016, p. 420 – 423. [cit. 26. 4. 2017]. ISBN: 978-0-12-802147-7
- [6] Internet: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Caffeine\\_metabolites.svg](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Caffeine_metabolites.svg) [cit. 26. 4. 2017]
- [7] Internet: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Adenosin#/media/File:Adenosin.svg> [cit. 26. 4. 2017]
- [8] SANTOS, S. I., MATIJASEVICH, A., DOMINGUES, R. M. Maternal caffeine consumption and infant nighttime waking: prospective cohort study. *Pediatrics*, 2012, vol. 129(5), p. 860–868.
- [9] RYU, E. J. Effect of maternal caffeine consumption on heart rate and sleep time of breastfed infants. *Dev. Pharmacol. Ther.*, 1985, vol. 8(6), p. 355–363.
- [10] C. DRAKE, C., ROEHRS, T., SHAMBROOM, J., ROTH, T. Caffeine effects on sleep taken 0, 3, or 6 hours before going to bed. *J. Clin. Sleep Med.*, 2013, vol. 9(11), p. 1195–1200.

- [11] SCHNEIDERMAN, N., IRONSON, G., SIEGEL, S. D. Stress and health: Psychological, behavioral, and biological determinants. *Annual Review of Clinical Psychology*, 2005, vol. 1, p. 607-628.
- [12] SALEHINB, N., ÇAKIRA, K. Ö., ELLEKB, N., HAMAMCIB, R., KELEŞB, H., KAYALIC, G. D., AKAKINC, D., YÜKSELD, M., ÖZBELYIA, D. Protective effect of low dose caffeine on psychological stress and cognitive function. *Physiology & Behavior*, 2017, vol. 168, p. 1–10.
- [13] DEWAR, L., HEUBERGER, R. The effect of acute caffeine intake on insulin sensitivity and glycemic control in people with diabetes. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 2017, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2017.04.017>
- [14] MARTIN, H. F., GARFIELD, J. Combined effects of alcohol and caffeine on the late components of the event-related potential and on reaction time. *Biological Psychology*, 2006, vol. 71(1), p. 63–73.
- [15] Internet: <https://www.intechopen.com/source/html/40107/media/image2.png> [cit. 12. 5. 2017]
- [16] YU, X., BAO, Z., ZOU, J., et al. Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort. *BMC CANCER*, 2011, vol. 11, article number 96.
- [17] NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. *Cancer Letters*, 2009, vol. 277(2), p. 121-125.
- [18] RENGER, F., KALOUS, J. *Analytická chemie I.*, Pardubice, 1991, p. 184-185, ISBN:80-85113-36-8
- [19] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, Ostrava: Pavel Klouda, 2003, p. 35-35, ISBN: 80-86369-07-2
- [20] AHUJA, S., DONG, W. M. Separation Science and Technology, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Amsterdam: Elsevier, 2005, vol. 6, p. 20 - 25, [cit. 30. 5. 2017] ISBN: 0-12-088547-6
- [21] ZACHARIS, K. C., KIKA, F. S., TZANAVARAS, P. D., FYTIANOS, K. Development and validation of a rapid ultra high pressure liquid chromatographic method for the

determination of methylxanthines in herbal infusions. *Journal of Chromatography B*, 2013, vol. 927, p. 218-222.

[22] Internet: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [cit. 25. 5. 2017]

[23] ROSTAGNO, M. A., MANCHÓN, M., 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(2), p. 204-211.

[24] RODRIGUES, I. C., MARTA, L., MAIA, R., MIRANDA, M., RIBEIRINHO, M., MÁGUAS, C. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, vol. 20(5), p. 440-448.

[25] BELGUIDOUM, K., AMIRA-GUEBAILIA, H., BOULMOKH, Y., HOUACHE, O. HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014, vol. 45(4), p. 1314-1320.

[26] PERRONE, D., DONANGELO, M. C., FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2008, vol. 110(4), p. 1030-1035.

[27] EL-SHAHAWI, S. M., HAMZA, A., BAHAFFI, S. O., AL-SIBAAI, A. A., ABDULJABBAR, N. T. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 2012, vol. 134(4), p. 2268-2275.

[28] RAHIM, A. A., NOFRIZAL, S., SAAD, B. Tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Food Chemistry*, 2014, vol. 147, p. 262-268.

[29] TURAK, F., GÜZEL, R., DINÇ, E. Simultaneous determination of ascorbic acid and caffeine in commercial soft drinks using reversed-phase ultraperformance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017, vol. 25(2), p. 285–292

[30] OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. *Základní analytická chemie*, Praha: Karolinum, 2003, p. 173-178, ISBN: 80 – 246- 0553-8

[31] Internet: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm> [cit. 29. 5. 2017]

[32] LI, M., ZHOU, J., GU, X., WANG, Y., HUANG, X., YAN, CH. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets. *Journal of Separation Science*, 2009, vol. 32(2), p. 267-274.

[33] HORIE, H., KOHATA, K. Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 802(1), p. 219-223.

[34] MAESO, N., DEL CASTILLO, C., CORNEJO, L. C., GARCÍA-ACICOLLAR, M., ALGUACIL, F. L., BARBAS, C. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees: Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41(4), p. 1095-1100.

[35] WALKER, C. J., ZAUGG, E. S., WALKER, B. E. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1997, vol. 781(1-2), p. 481-485.

[36] BIZZOTTO, S. C., MEINHART, D. A., BALLUS, A. CH., et al. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee. *Food Science and Technology*, 2013, vol. 33(1), p. 186-191.

[37] NOGUEIRA, T., LUCIO DO LAGO, C. Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3,4-dimethoxycinnamate and separation by CZE. *Electrophoresis*, 2007, vol. 28(19), p. 3570–3574.