

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení kofeinu

Markéta Kašíčková

Bakalářská práce

2019

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Kašičková**
Osobní číslo: **C15046**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**
Název tématu: **Stanovení kofeinu**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Proveďte literární rešerši zabývající kofeinem. Popište jeho působení na lidský organismus, výskyt a zpracování. Zaměřte se na analytické stanovení kofeinu z různých matric.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 6. 2019

Markéta Kašíčková

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Aleši Eisnerovy, Ph.D. za odborné a cenné rady a za čas strávený s vypracováním mé bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na alkaloid kofein. První část popisuje chemické a fyzikální vlastnosti kofeinu, jeho výskyt v rostlinách a další zpracování. Také je zde popsán vliv kofeinu na zdraví člověka. Druhá část této práce je zaměřena na stanovení kofeinu, a to pomocí HPLC, elektroforézy a infračervené spektroskopie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kofein, HPLC, Elektroforéza, Infračervená-spektroskopie.

TITLE

Determination of caffeine.

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on alkaloid caffeine. The first part describes the chemical and physical properties of caffeine, its occurrence in plants and further processing. There is also described the effect of caffeine on human health. The second part of this thesis is focused on determination of caffeine by HPLC, electrophoresis and infrared spectroscopy.

KEYWORDS

Caffeine, HPLC, Electrophoresis, Infrared spectroscopy.

OBSAH

Seznam obrázků	9
Seznam tabulek	10
Seznam zkratk	11
Úvod	12
1 Teoretická část	13
1.1 Kofein	13
1.2 Farmakokinetika kofeinu	14
1.2.1 Absorpce	14
1.2.2 Distribuce	14
1.2.3 Metabolismus a vylučování kofeinu	14
1.3 Farmakodynamika kofeinu	17
1.3.1 Antagonismus adenosinových receptorů	17
1.3.2 Inhibice fosfodiesterázy	17
1.3.3 Mobilizace vápníku	18
1.4 Výskyt a zpracování	18
1.4.1 Guarana (<i>Paullinia cupana</i>)	18
1.4.2 Čajovník čínský (<i>Camellia sinensis</i>)	19
1.4.3 Kávovník (<i>Coffea</i>)	20
1.4.3.1 Zpracování kávových zrn	21
1.5 Účinky na zdraví člověka	22
1.5.1 Vliv kofeinu na <i>Diabetes mellitus</i> 2. typu	23
1.5.2 Vliv kofeinu na Parkinsonovu chorobu	23
1.5.3 Vliv kofeinu na Alzheimerovu chorobu	24
1.5.4 Vliv kofeinu na úzkost a spánek	24
1.5.5 Vliv kofeinu na těhotné ženy a děti	25
2 Stanovení kofeinu	26
2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	26
2.1.1 Příprava vzorků	26
2.1.2 Podmínky stanovení	28
2.1.3 Výsledky	30

2.2	Kapilární elektroforéza (CE)	32
2.2.1	Příprava vzorků.....	32
2.2.2	Podmínky stanovení.....	33
2.2.3	Výsledky	35
2.3	Infračervená spektrometrie	37
2.3.1	Příprava vzorku.....	37
2.3.2	Podmínky stanovení.....	38
2.3.3	Výsledky	38
Závěr	40
Použitá literatura	41

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura kofeinu [3]	13
Obrázek 2 Hlavní metabolity kofeinu [5]	16
Obrázek 3 Molekula kofeinu a adenosinu [8]	17
Obrázek 4 Guarana [9]	19
Obrázek 5 Čajovník čínský [13]	20
Obrázek 6 Kávovník arabský [15]	21
Obrázek 7 Množství kofeinu uvolněného ze vzorku při 5 minutách, 10 minutách a 30 minutách louhování [27]	27
Obrázek 8 Obsah kofeinu ve vzorcích zeleného čaje [27]	30
Obrázek 9 Elektroforegram standardu, bezkofeinové a normální kávy [32]	35
Obrázek 10 Vliv hodnoty pH na průběh separace (A = pH 9,3, B = pH 10,5 a C = pH 11)[35]	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Chemické a fyzikální vlastnosti kofeinu [2]	13
Tabulka 2 Podmínky separace kofeinu pomocí HPLC	29
Tabulka 3 Množství kofeinu v mg/l v analyzovaných vzorcích [29].....	31
Tabulka 4 Hodnoty podmínek stanovení kofeinu pomocí CE.....	34

SEZNAM ZKRATEK

C	Katechiny
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CE	Kapilární elektroforéza
CNS	Centrální nervová soustava
EC	Epikatechin
ECG	Epikatechin-gallát
EGC	Epigallokatechin
EGCG	Epigallokatechin -3- gallát
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
L-DOPA	Levodopa
MS	Hmotnostní spektrometrie
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ÚVOD

Kofein je alkaloid řadící se do skupiny methylových derivátů xantinu. Byl konzumován lidmi po celém světě už ve starověku. Nejčastěji se přirozeně vyskytuje v rostlinách čajovníku, kávovníku a guaraně. Dříve lidé žvýkali listy čajovníku a drtili semena guarany, aby dostali kofein do organismu. Dnes se tyto rostliny upravují do podoby čaje a kávy, které díky kofeinu mají svou specifickou hořkou chuť. Kofein je také uměle dodáván do energetických nápojů, do coca coly, do přípravků na hubnutí, a i do některých léčiv. V lidském těle působí kofein jako stimulant centrální nervové soustavy a lidé ho konzumují hlavně pro jeho psychoaktivní účinky. Kofein zvyšuje bdělost a soustředění člověka, také zvyšuje krevní tlak a zajišťuje pocit štěstí, avšak pouze na několik hodin.

Je velmi důležité i kvalitativní a kvantitativní stanovení kofeinu, a to z důvodu jak kontroly kvality potravin obsahujících kofein, tak pro přípravu farmaceutik. Mezi nejčastější metody zabývajícími se stanovením kofeinu patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. Jako další metody stanovení lze použít i infračervenou spektroskopii, plynovou chromatografii anebo voltametrii.

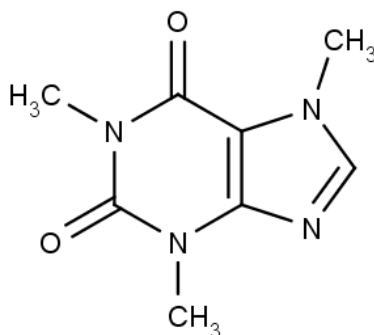
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kofein

Kofein je přírodní alkaloid, který se v čistém stavu vyskytuje jako bílý prášek nebo ve formě bílých, lesklých jehliček. Je velmi dobře rozpustný v horké vodě (1 g kofeinu se rozpustí v 46 ml vody při teplotě 25 °C nebo v 5,5 ml vody při teplotě 80 °C) a v chloroformu. V organických rozpouštědlech je kofein méně rozpustný (1 g kofeinu se rozpustí v 530 ml etheru). Kofein je bez zápachu, ale má velmi výraznou hořkou chuť. Jeho bod tání/tuhnutí je 235-238 °C a za atmosférického tlaku sublimuje při 178 °C. Patří mezi purinové báze, konkrétně je to methylový derivát xantinu (viz. Obrázek 1). Systematický název pro kofein je 1,3,7-trimetyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion (1,3,7-trimethylxanthin). [1][2] Další chemické a fyzikální vlastnosti kofeinu jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1 Chemické a fyzikální vlastnosti kofeinu [2]

Chemické a fyzikální vlastnosti	hodnoty
Molekulový vzorec	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
Molární hmotnost	194,194 g/mol
Skupenství (25°C)	pevné
Barva	bílá
Hustota	1,23 g/cm ³
Bod tání	235–238 °C
Disociační konstanta pKa	14 při 25 °C
Rozpustnost ve vodě při 25 °C	2,17 g/100 ml



Obrázek 1 Chemická struktura kofeinu [3]

Kofein se do těla dostává nejčastěji perorálně pomocí potravinových doplňků, energetických nápojů. Zároveň se vyskytuje i v některých lécích jako jsou například léky na snížení hmotnosti u obézních lidí, léky na léčbu apnoe u nedonošených novorozenců nebo léky na léčení nadměrné spavosti [4].

1.2 Farmakokinetika kofeinu

1.2.1 Absorpce

U člověka probíhá absorpce kofeinu v jeho gastrointestinálním systému. K téměř úplné absorpci kofeinu (99 %) dochází již po 45 minutách po perorálním užití dávky kofeinu. Velká část kofeinu se absorbuje v tenkém střevě a část (20 %) se absorbuje v žaludku. Kofein, který je do organismu dostáván pomocí čokolády nebo rostliny coly, se vstřebává déle, a to asi 1,5-2 hodiny. K rychlejšímu vstřebání kofeinu může dojít při požití kofeinové kapsle, kde je doba vstřebání asi 0,5 hodiny nebo při žvýkání kofeinových žvýkaček, kde se kofein do těla dostává přes ústní sliznici. [5]

Zdá se, že nezáleží na způsobu podání účinné látky, a to buď perorálně anebo intravenózně, protože křivky jejich plazmatických koncentrací kofeinu se téměř překrývají. Díky rychlému vstřebání zřejmě také nedochází k významnému účinku prvního průchodu játry a kofein tedy rovnou přechází z gastrointestinálního systému do krevního oběhu. Na absorpci také nemá vliv věk, pohlaví, genetika nebo případně užívání drog, alkoholu či nikotinu. [5]

1.2.2 Distribuce

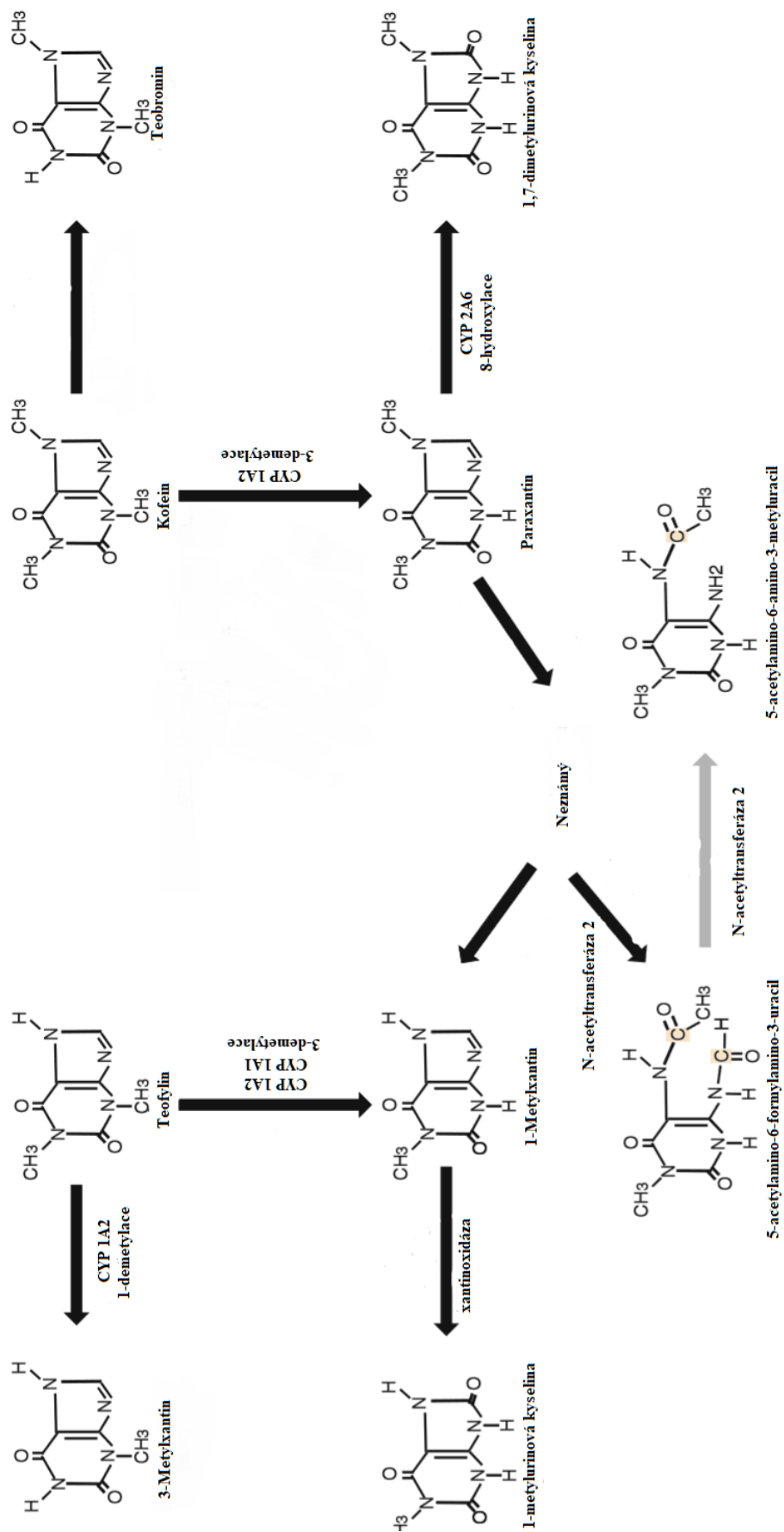
Kofein se díky svým hydrofilním vlastnostem distribuuje do intracelulární tkáňové vody. Můžeme ho také nalézt v tkáňových orgánech a ve všech tělních tekutinách, jako jsou například sliny, žluč, sperma, cerebrospinální tekutina (mozkomíšní mok a krev) či mateřské mléko. Zároveň je dostatečně lipofilní a může tak přecházet přes všechny biologické bariéry, ať už hematencefalickou bariéru nebo přes placentu. Kofein se v těle váže na proteiny a bílkoviny. [5]

1.2.3 Metabolismus a vylučování kofeinu

Kofein se v lidském organismu metabolizuje téměř všechn v játrech pomocí enzymu cytochrom P450, kde převážně působí izoenzym CYP1A2. Hlavní reakcí metabolismu je oxidační

N-demethylace, kde vznikají monodemetylované metabolity Paraxantin (80 %), Teobromin (11 %) a Teofylin (4 %). Část kofeinu podléhá C-8 hydroxylaci, kdy jako produkt vzniká 1,7-dimetyluronová kyselina. Dalšími hlavními metabolity jsou kromě paraxantinu v moči 1-metyl-xanthin, 3-metyl-xantin, 1-methylurinová kyselina a 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil, které jsou tvořeny sekundárním metabolismem paraxantinu pomocí enzymu cytochrom P450 (CYP) 1A2, (CYP) 1A1 a enzymy N-acetyltransferázou a xantinoxidázou. [6] Strukturní vzorce hlavních metabolitů kofeinu jsou znázorněny na Obrázku 2.

Poločas rozpadu kofeinu v těle je 4-5 hodin. Může být prodloužen u předčasně narozených dětí, novorozenců, těhotných žen z důvodu špatné činnosti jater nebo případně u lidí, kteří trpí jaterními onemocněními. [6] Metabolity kofeinu jsou vylučovány převážně močí (70-80 %) a asi 2,5 % je vylučováno ve stolici. Zároveň přibližně 3 % kofeinu je z lidského organismu vyloučeno močí v nezměněné podobě. [7]

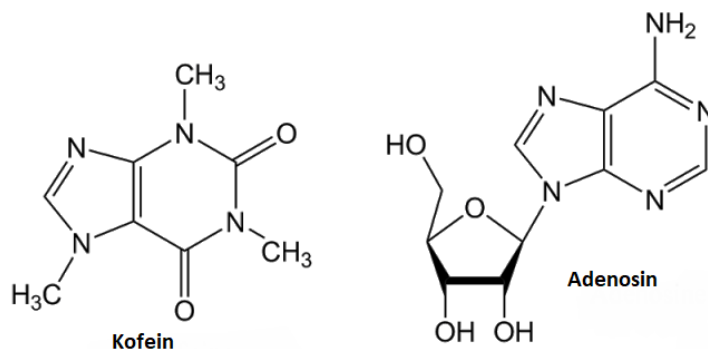


Obrázek 2 Hlavní metabolity kofeinu [5]

1.3 Farmakodynamika kofeinu

1.3.1 Antagonismus adenosinových receptorů

Molekula kofeinu má velmi podobnou strukturu jako molekula adenosinu (viz. Obrázek3). Adenosin je nukleosid, který v centrální nervové soustavě působí jako inhibiční neurotransmitter [7]. Jeho hlavní mechanismus účinku je ovlivňování kognitivních funkcí člověka a jeho chování [5]. Kofein působí jako neselektivní antagonist adenosinových receptorů A1, A2A, A2B a A3. To znamená, že se kofein dokáže navázat na povrch buněk adenosinových receptorů, aniž by je aktivoval. Tím, že se kofein naváže na adenosinové receptory, tak nepřímo ovlivňuje uvolňování norepinefrinu, dopaminu, acetylcholinu, serotoninu, kyseliny γ -aminomáselné atd. Norepinefrin (noradrenalin) dále zvyšuje fyzickou aktivitu člověka, jeho ostražitost a motorické funkce a hormony dopamin a serotonin ovlivňují emoce (zvyšují dobrou náladu). [5][7] Adenosin, který se mezitím nemá kam vázat, se hromadí v neuronální synapsi a po vyčerpání kofeinu se začne opět vázat na receptory. Navázáním adenosinu dochází opět k aktivaci receptorů a člověk ztrácí energii a opět se zvyšuje pocit ospalosti. [7]



Obrázek 3 Molekula kofeinu a adenosinu [8]

1.3.2 Inhibice fosfodiesterázy

Jako další účinek mechanismu kofeinu je inhibice enzymu fosfodiesterázy v tukových tkáních a kosterním svalstvu zvyšováním intracelulární koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu. Pomocí těchto účinků dochází k lipolýze (rozkládání tuků v tukových buňkách) aktivací lipáz na glycerol a mastné kyseliny. Díky tomu dochází k menší spotřebě svalového glykogenu. Kofein je bohužel slabým inhibítor, a tak tyto účinky nejsou tak významné jako jeho účinek antagonisty. [5]

1.3.3 Mobilizace vápníku

Mezi další účinky kofein patří jeho vliv na vápník v kosterních svalech. Při koncentracích kofeinu nad 1 mmol/l dochází k ovlivňování uvolňování a následnému ukládání vápníku v sarkoplazmatickém retikulu pruhovaného svalu a také napomáhá difúzi Ca^{2+} přes plazmatickou membránu. [5]

1.4 Výskyt a zpracování

Kofein můžeme nalézt ve spoustě přírodních, ale i umělých zdrojích. Mezi nejznámější a nejvyužívanější zdroje patří semena Guarany, listy čajovníku a kávová zrna. Mezi další přírodní zdroje můžeme zařadit kakaové boby (*Teobroma cacao*), ze kterých se vyrábí čokoláda. Mezi umělé zdroje můžeme zařadit přípravky na hubnutí, léky proti bolesti a migréně, energetické nápoje nebo sladkosti. [16]

1.4.1 Guarana (*Paullinia cupana*)

Guarana, nazývána také Paulinie nápojná, obsahuje účinné látky, které působí v lidském těle jako stimulanty CNS. Tato rostlina pochází z Jižní ameriky a to konkrétně z lesů Amazonie, která se rozkládá na území států Brazílie, Kolumbie, Venezuely, Ekvádoru či Peru. První záznamy o guaraně jsou přibližně ze 17. století, kdy jezuitská expedice zpozorovala účinky této rostliny u domorodých indiánů, kteří vytvářeli pasty ze semen a následně je žvýkali, a tak dostávali látky do organismu. Prozkoumána však byla tato látka až později německým botanikem Theodorem von Martiusem, který provedl analýzu a popsal její účinky. [10][11]

Guarana je popínavá rostlina dosahující délky až 10 m a má žlutohnědé stonky. Její listy mají oválný tvar zakončený do špičky a jejich délka je od 27-33 cm. Barva listů je lesklá, tmavě zelená a ze spodu listu je výrazné žilkování. Z guarany se spotřebovávají jen plody, které vypadají jako lidské oko. Bobule jsou uspořádané do tvaru hroznu a mají červenou barvu. Semena, která jsou uložena v červených bobulích mají tmavě hnědou barvu a jsou obklopena bílou dužinou (viz. Obrázek 4). Semena guarany obsahují methylxanthiny jako je Guarantin (kofein), Teobromin a Teofylin, které mají vliv na CNS, kardiovaskulární systém, respirační systém a diurézu. Obsah kofeinu v guaraně je až trojnásobně větší než obsah kofeinu v kávě arabica stejného množství. [11]



Obrázek 4 Guarana [9]

Zpracování semen Guarany je odlišné při strojním zpracování a při ručním zpracování. Semena se sbírají z rostlin po jejich dozrání, a to nastává při otevření červených skořápek. Při ručním sbírání se semena nechávají 3 dny fermentovat a následně jsou semena vylupována z obalu, ale při strojním sklizení jsou semena vylupována hned. Semena jsou dále za stálého míchání promývána a sušena. Po usušení se ze semen drcením dostává jemný prášek, ze kterého se může připravit hořký nápoj podobný kávě. Případně se prášek může smíchat s vodou a vytvořit tak pastu, která se tvaruje do válečků, které se nechávají sušit po dobu 1 roku. Na trzích také můžeme nalézt kofeinové kapsle z prášku Guarany. Tyto kapsle slouží k přímému požití. [11]

1.4.2 Čajovník čínský (*Camellia sinensis*)

Čajovník je keř nebo strom, který má původ v jižní části Číny. Ve velkém množství je také pěstován na plantážích v Indii a jihovýchodní Asii (Vietnam, Barma, Laos). Mezi největší vývozce čaje patří Čína, Keňa, Srí Lanka, Vietnam. [12]

Tato rostlina dorůstá výšky až 17 m, ale z důvodu lepší manipulace (ručního sklizení) se jeho výška udržuje ve velikosti keře, a to okolo 1 m (viz. Obrázek 5). Čajovník má světlezelené a masité listy, které jsou dlouhé od 2-20 cm a jako jediné se z čajovníku využívají pro jeho obsah kofeinu. Čajovník roste až do 3000 metrů nad mořem a s rostoucí nadmořskou výškou roste i kvalita čaje. Největší množství kofeinu je obsaženo v mladých listech a výhoncích. Kromě kofeinu, čajovník obsahuje také flavonoidy, sacharidy nebo třísloviny a poměr těchto látek udává výslednou chuť čaje. Čajovník má bílé květy a jeho plody jsou zeleno-hnědé tobolky. Plody se zpracovávají lisováním na olej. Dříve se lidé domnívali, že kofein, který je obsažený v kávových zrnech je jiná látka než kofein obsažený v čaji. Z tohoto důvodu ho lidé nazývali Tein. [12]

Čajové listy se na plantážích sbírají ručně a pak se dále zpracovávají na čaj. Nejprve dochází k zavadnutí, kdy se z listů odpaří přibližně 50 % vody a listy se tak stávají měkčí a křehčí. Podle způsobu zpracování čajových listů, můžeme rozdělit čaj do tří druhů. Prvním je zelený čaj, který se po zavadnutí praží na pánvích, čímž se zabrání procesu oxidace a následuje svinování a sušení. Tím, že se zabrání procesu oxidace zůstávají čajové listy zelené, a proto zelený čaj. Dalším druhem je černý čaj, který se oproti zelenému čaji nechává oxidovat až několik hodin. Oxidace probíhá na přímém slunci, kde se listy pravidelně musí otáčet. Díky tomuto procesu listy zhnědnou a také se zvýrazní chuť čaje. Oxidace se ukončuje svinováním a sušením. Třetím druhem čajů, jsou tzv. oolong čaje, které se po zavadnutí protřepou v bambusových koších, a tím se naruší okraje listů. Díky narušení okrajů, začne oxidace listů rychleji po okrajích než uprostřed a podle délky oxidace, se pak čaj podobá více zelenému nebo černému čaji. Zvláštním druhem čaje je čaj bílý, na jehož zpracování se používá jen vrcholný nerozvinutý lístek z každé větvičky. [12]



Obrázek 5 Čajovník čínský [13]

1.4.3 Kávovník (*Coffea*)

Kávovník se řadí mezi ovocné dřeviny a je pěstován v tropickém a subtropickém pásmu podél rovníku. Tato rostlina pochází z Etiopie a do Evropy se dostala na konci 16. století. Má několik druhů, avšak mezi nejznámější druhy patří Arabika a Robusta. Kávovník arabika (*Coffea arabica*) je považován za kvalitnější druh kávy a zaujímá více než 60 % světové produkce. Je pěstován ve vyšších nadmořských výškách, především v Jižní Americe, Austrálii a části Afriky. Mezitím Kávovník Robusta (*Coffea canephora*) je považován za méně kvalitní a levnější druh

kávy, který se běžně prodává v supermarketech. Roste v nižších nadmořských výškách a pěstuje se především v Asii a Africe. Robusta má výrazně hořkou chuť oproti Arabice, a to také díky rozdílné chemické struktuře. [14]

Výška kávovníku je rozdílná u každého druhu. Některé druhy kávovníků mohou dorůst výšky až 10 m, ale většinou jsou udržovány na plantážích ve výšce keřů kvůli ručnímu sklizení plodů. Kávovník má 15 cm dlouhé listy a bílé květy. Plody Kávovníku jsou dlouhé 1,5 cm a tvarem připomínají třešně (viz. Obrázek 6). Uvnitř plodu jsou dvě kávová zrna, která mají světlezelenou barvu a na sobě mají slupku a vrstvu pergamenu. Některé plody obsahují jen jedno zrno, kterému se říká perlové zrno. [14]



Obrázek 6 Kávovník arabský [15]

1.4.3.1 Zpracování kávových zrn

Nejdříve dochází ke sběru kávových zrn. Zrna se sbírají buď ručně, česáním anebo pomocí strojů. Ve vyšších nadmořských výškách, kde se vyskytují především kvalitnější druhy kávy, sbírají farmáři plody ručně. Ruční sběr je šetrnější pro rostlinu, avšak je dražší. Nevýhoda strojního sběru je, že stroj trhá i nezralé plody, které po utržení již nedozrají. Strojní sběr je levnější a využívá se hodně v Brazílii a Austrálii. Zpracování kávových zrn má vliv na cenu a chuť kávy. Jsou tři základní metody zpracování, a to mokrá, suchá a medová. [14]

Suché zpracování patří mezi nejstarší metody, které jsou finančně nenáročné a jednoduché. Po sběru jsou plody rozprostřeny na zemi nebo na roštích, kde jsou pravidelně otáčeny, aby došlo k rovnoměrnému sušení. Sušení probíhá asi jeden měsíc a na noc jsou plody zakryty, aby znovu nezvlhly. Po usušení se plody nechávají uležet po dobu 30-60 dní. Plody jsou dále tříděny dle velikosti a kvality. Po dobu sušení dochází k pronikání látek ze slupek do kávových zrn. Při

nedostatečném usušení zrn, může dojít k uhnívání zrn, a to může dále ovlivnit chuť kávy. Metoda suchého zpracování je využívána hlavně v Brazílii. [14]

Medové zpracování je proces mezi suchým a mokřím zpracování. V každé zemi je tento proces jiný. Při tomto procesu se loupají slupky z plodů a zrna se nechávají sušit s pergamenem a dužinou. Podle vrstvy dužiny, která se nechává na zrnku, má káva specifickou chuť. Tato metoda se využívá hlavně ve Střední Americe. [14]

Při mokřím zpracování se zpracovává kvalitní káva. Nejprve dochází k třídění ve vodní nádrži, kde zralá zrna klesají ke dnu a nezralá zrna plavou na hladině. Po promytí ve vodní nádrži dochází k loupání zrn. Po loupání putují zrna do kvasných nádrží, kde dochází k fermentaci. Při fermentaci enzymy uvolňují lepkavou vrstvu z povrchu zrn a zrna se tak stávají drsná. Délka fermentace je závislá na tloušťce dužiny. Trvá přibližně 36 hodin. Kdyby trvala déle, mohlo by dojít k uhnívání zrn, které by zničily celou várku. Po tomto procesu následuje sušení, které je stejné jako u suchého procesu. Zpracování mokřím způsobem je finančně náročné a většinou se nevyužívá na plantážích. [14]

Po zpracování zrn dochází k jejich třídění a loupání. Zrna obsahují přibližně 11-12 % vlhkosti. Po loupání se zrna exportují do dalších zemí, kde jsou následně praženy. Při pražení dochází k rozvíjení chutí kávy. [14]

1.5 Účinky na zdraví člověka

Kofein je stimulant centrální nervové soustavy a řadí se mezi nejpoužívanější psychoaktivní látky na světě. [2] Po hodně vysokém užití dávky kofeinu neboli předávkováním dochází u člověka k navození kóma, až následné smrti člověka. Smrtelná dávka kofeinu v těle člověka je více než 10 g kofeinu, což odpovídá asi 170 mg kofeinu/ 1 kg tělesné hmotnosti. [23] Zároveň užívání kofeinu ve vysokých dávkách může způsobovat třes, nervozitu, úzkost, tachykardii atd.[33] Kofein a jeho metabolity ovlivňují nejen fyzickou aktivitu a bdělost člověka, ale také další procesy uvnitř organismu, a to buď pozitivně či negativně. Paraxantin způsobuje lipolýzu, tedy dochází k odbourání tuků a zároveň dochází k uvolnění glycerolu a volných mastných kyselin do krevní plazmy. Teobromin ovlivňuje rozšíření cév a také zvyšuje objem moči v těle. Teofylin uvolňuje hladké svalstvo a zlepšuje dýchání člověka. [16]

1.5.1 Vliv kofeinu na *Diabetes mellitus* 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu neboli cukrovka 2. typu je velmi vážné onemocnění, které se v dnešní době nedá zcela vyléčit, ale dá se regulovat pomocí inzulínu. Inzulín je hormon, který přeměňuje glukózu v krvi na energii potřebnou pro náš organismus. Jako hlavní znak cukrovky 2. typu můžeme označit inzulínovou rezistenci. Tím, že buňky v tkáních a ve svalstvu neodpovídají na signál inzulínu, začne se zvyšovat hladina glukózy v krvi. Slinivka břišní kompenzuje tento stav tak, že začne produkovat další inzulín. Cukrovku lze diagnostikovat, pokud hodnota glukózy v krvi je více než 11 mmol/l. Tento typ cukrovky je doprovázen tzv. metabolickým syndromem, což jsou metabolické a vaskulární abnormality jako je obezita, zvýšený krevní tlak, špatné odbourávání tuků nebo zánětlivé stavy. Toto onemocnění má velmi pomalý nástup (několik let). Vyskytuje se především u starších osob ve věku přibližně 70 let, kdy cukrovka se objevuje u 10-20 % lidí, ale může se vyskytovat i u mladších lidí, kdy se diabetes objevuje asi u 1 % lidí ve věku 30 let. V dnešní době velmi rychle stoupá počet lidí, kteří trpí tímto onemocněním. [17]

Studie ukazují, že kofein a další látky přítomné v kávě snižují riziko diabetu 2. typu. U lidí, kteří pijí více než 7 šálků kávy denně, je až 50 % šance, že se u nich nevyvine toto onemocnění a u lidí, kteří vypijí 4-6 šálků kávy za den je asi 30 % šance, že se nevyvine toto onemocnění. Zároveň pravidelné užívání kávy snižuje inzulínovou rezistenci v organismu. [16][17]

1.5.2 Vliv kofeinu na Parkinsonovu chorobu

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění CNS, které vede k úbytku nervových buněk. K úbytku nervových buněk dochází v části mozku, kde je produkován neurotransmitter dopamin, který funguje jako přenašeč nervových vzruchů. Snížení hladiny dopaminu v CNS vede k třesu a oslabení motorických funkcí. [18] Toto onemocnění se projevuje většinou u starších osob a některé studie ukazují, že toto onemocněním poznamenává většinou muže, u žen by mělo být riziko onemocnění nižší, díky estrogenu. [16][20]

Kofein a jeho metabolity jsou spojovány se snížením rizika onemocnění Parkinsonovou chorobou. [16][18][20][19] Mechanismus účinku je zatím neznámý, [16][18] ale největší potenciál pro snížení rizika mají antagonisté receptoru A2A [20]. Kofein, který působí jako antagonist A2A receptorů snižuje svalovou ztuhlost a zvyšují účinek látky L-DOPA. L-DOPA se používá jako prekurzor dopaminu a dopamin má léčebné účinky při Parkinsonově chorobě.

Díky tomu lze snížit dávky L-DOPY a je tak větší šance, že nevznikne tolerance na tento lék. Zároveň kofeinový metabolit Teofylin zvyšuje motorické schopnosti člověka. [20]

1.5.3 Vliv kofeinu na Alzheimerovu chorobu

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění mozku. Řadí se mezi nejběžnější typ demence a její příznaky se dají pouze zmírnit, ne však zcela vyléčit. [17][20] Při tomto onemocnění dochází ke změnám nervových buněk v mozku a následném úbytku mozkové hmoty. Následkem tohoto onemocnění je postupná ztráta kognitivních funkcí člověka, tzn. postupná ztráta krátkodobé a později i dlouhodobé paměti, myšlení, vlastní úsudek, orientaci v prostoru, pozornost nebo řeč. [21] Alzheimerova choroba se objevuje většinou u starších lidí ve věku kolem 60 let, může se však objevit i u mladších lidí ve věku 30-40 let, kteří k tomu mají genetické predispozice. [16][21]

Některá studie naznačují, že kofein a jeho metabolity napomáhají snížit riziko Alzheimerovy choroby, a to zejména u starších osob. [17][20]. Pravidelné užívání kofeinu po celý život může také napomáhat s kvalitou paměti. [20] Kofein také pravděpodobně napomáhá zpomalit pokles kognitivních funkcí člověka, případně zpomaluje nástup demence [16][17]. Stejně jako u Parkinsonovy choroby, tak i u Alzheimerovy choroby, kofein ovlivňuje mozek prostřednictvím adenosinových receptorů. [17][20] Pokud by byly studie úspěšné, mohl by vztah mezi kofeinem a těmito nemocemi vést k vývoji nových léků, případně k prevenci Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby. [20]

1.5.4 Vliv kofeinu na úzkost a spánek

Mezi další vlastnosti kofeinu, můžeme zařadit jeho nepříznivý vliv na úzkost a spánek. Podle některých studií, může u zdravých jedinců vznikat úzkost a zároveň u lidí, kteří úzkostí již trpí, může dojít k jejímu prohloubení. [16]

Vzhledem k tomu, že kofein navyšuje stav bdělosti, tak při konzumaci kofeinu časem dochází ke zkrácení doby spánku. Člověk, který trpí nespavostí, má zkrácenou dobu spánku pod 6 hodin. Postupem času dochází u lidí k navýšení doby usínání a také dochází ke zkrácení doby hlubokého spánku. Při pravidelném užívání kofeinu se u lidí objeví taková smyčka, kdy člověk po užití kávy trpící nedostatkem spánku a zároveň denní ospalostí, řeší nespavost další konzumací kofeinu. Tato konzumace ovšem opět vyvolává nespavost. S nedostatkem spánku může

také souviset bolest hlavy, deprese, snížená pozornost anebo také psychická a fyzická únava člověka. [16][22]

1.5.5 Vliv kofeinu na těhotné ženy a děti

Většina studií se shoduje na tom, že kofein neovlivňuje plodnost ženy při spotřebě kofeinu 300 mg/den. Také zde není žádná souvislost s příjmem kofeinu a rizikem potratu. Dále neexistuje žádný důkaz o tom, že by kofein ovlivňoval vrozené vady dítěte. Doporučená denní dávka kofeinu pro těhotné a kojící ženy je 300 mg/den. [16]

Příjem kofeinu mezi 4-12 rokem života dítěte, může negativně ovlivnit jeho výživu, pokud není kofeinový nápoj doplněn zdravými nápoji, např. mlékem. Denní doporučená dávka kofeinu pro děti od 4-12 let je 2,5 mg/ kg hmotnosti dítěte. Žádná studie zatím neprokázala, že by příjem kofeinu mohl ovlivnit poruchu chování u dětí, avšak snižuje chuť k jídlu. [16]

2 STANOVENÍ KOFEINU

Kofein, Teofylin a Teobromin jsou látky, které se přirozeně vyskytují ve spoustě potravinářských výrobcích, nápojích a jsou z nich také vyráběna některá léčiva a výživové doplňky. Tyto látky mají vliv na zdravotní stav člověka. Proto je nutná jejich analýza a znalost jejich koncentrací. Před samotnou instrumentální analýzou se využívá předběžná úprava vzorku, do které je zahrnuta extrakce. Kofein lze stanovit v různých maticích pomocí různých separačních metod, mezi které můžeme zařadit vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nebo kapilární elektroforézu. Mezi další metody, dle kterých lze stanovit kofein můžeme zařadit UV-VIS spektrometrii, IČ-spektroskopie s Fourierovou transformací, nukleární magnetickou rezonanční spektrometrii nebo potenciometrii. [23]

2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

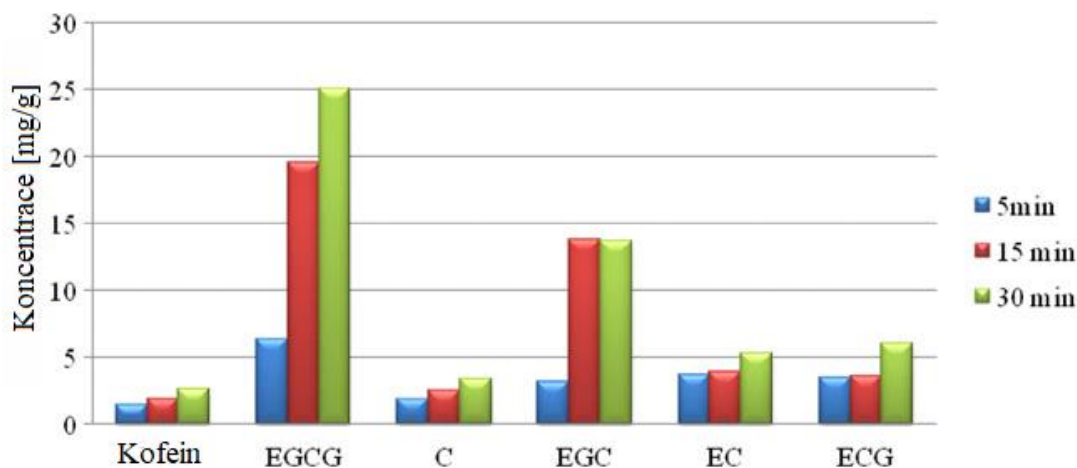
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je velmi používanou instrumentální metodou a nejvyužívanější analytickou metodou pro stanovení kofeinu. Chromatografie se řadí mezi separační techniky a pomocí chromatografie lze provést kvantitativní analýzu, ale i kvalitativní analýzu. Analyzovaný vzorek se rozděluje mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fázi. K separaci látek dochází vlivem rozdílné afinity látek k stacionární a mobilní fázi a také dochází k opakovanému ustavování sorpčních, rozpouštěcích nebo iontově výměnných rovnováh. [24][25]

Analýza kofeinu pomocí HPLC se prováděla jak z pevných, tak kapalných vzorků. K analýze byly použity různé druhy čajů (zelený, černý, bílý) [27][28][30][31], káva [28], instantní káva [29], čokoláda [28], maté [29], guarana [29] nebo energetické nápoje [29]. Spolu s kofeinem byly stanoveny i další látky, kterými jsou katechiny [27][30][31], polyfenoly [29] a metabolity kofeinu (Teobromin) [28].

2.1.1 Příprava vzorků

Všechna použitá činidla ve všech studiích byly analytické kvality a všechny vzorky byly před analýzou náležitě upraveny. Studie El-Shahawi a kol. [27] analyzovaly množství kofeinu a katechinů ve vzorcích zelených čajů. Pro analýzu si odvážili $0,25-0,26 \pm 0,01$ g zeleného čaje. Čaj vložili do 100 ml vroucí vody a nechali ho inkubovat při teplotě 90 °C po dobu 5 min, 15 minut a 30 minut. Po ochlazení byl roztok čaje přefiltrován přes filtrační papír. Filtrát spolu

s promývacím roztokem byly přelity do 100 ml odměrné baňky, ze které bylo následně odpipe-
továno 10 ml čajového extraktu. Čajový extrakt byl přefiltrován přes 0,45 µm celulózový fil-
trační papír. Tato studie ukazuje, že velký vliv na množství uvolněného kofeinu a katechinů ze
zelených čajů, má doba louhování čajových listů. Z grafu viz níže lze konstatovat, že s rostoucí
dobou louhování roste množství uvolněného kofeinu a katechinů ze zelených čajů.



Obrázek 7 Množství kofeinu uvolněného ze vzorku při 5 minutách, 10 minutách a 30 minutách louhování [27]

Studie Fernández a kol. [30] analyzovali množství kofeinu v 37 různých, komerčně dostupných
čajích. Vzorky obsahovaly instantní čaj, černý čaj a zelený čaj. Vzorky se připravovaly odmě-
řením 0,5 g vzorku čaje, který byl následně za stálého míchání extrahován ve 100 ml směsi
acetonitril a voda (1:1), při pokojové teplotě. Následně byl extrakt přefiltrován a zředěn v od-
měrné baňce na 100 ml roztoku.

Ve studii De Carmago a kol. [28] analyzovali různé vzorky obsahující kofein, kterými jsou
čokoláda, nealkoholické nápoje, maté nebo černý čaj. Vzorky nealkoholických nápojů se upra-
vovaly tak, že se nechaly odplynit v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Černý čaj (1,8 g) byl
extrahován do 150 ml vroucí vody a 8,52 g listů maté bylo extrahováno do 1 l vody. Poté co
extrakt dosáhl pokojové teploty, bylo smícháno 20 ml extraktu s 10 ml 0,1 M kyselinou chlo-
rovodíkovou a s 8 ml bazického roztoku acetátu. Následně byl roztok odstředěn po dobu 5 mi-
nut a do supernatantu (kapalina nad sedimentem) byl přidán hydrogenuhličitan sodný (0,1 g
v 10 ml roztoku) a znovu byl po dobu 5 minut odstředován. Nakonec byl výsledný roztok zře-
děn vodou do 50 ml odměrné baňky. Jako vzorky čokolády byly použity čokoládové tyčinky
(0,6 g) a čokoládový prášek (1,0 g). Tyto vzorky byly vloženy do zkumavek se šroubovacím
uzávěrem, který byl opatřen teflonovým septem. Ve zkumavkách se extrahoval tuk třepáním za
použití petroletheru (dva podíly po 30 ml) a následně byl roztok odstředěn po dobu 10 minut.

Následně byly zkumavky vloženy do vodní lázně, kde se odpařily zbytky rozpouštědla. K roztoku bylo dále přidáno 30 ml vody a 5 ml bazické roztoku acetátu a výsledný roztok byl vložen do odstředivky po dobu 5 minut. Po odstředění byl přidán do supernatantu opět hydrogenuhličitán sodný a roztok byl opět odstředěn. Nakonec se přidala 0,1 M kyselina chlorovodíková a roztok byl zředěn vodou do 100 ml odměrné baňky.

Ve studii Rostagno a kol. [29] byly použity jak kapalné, tak pevné vzorky obsahující kofein. Všechny kapalné vzorky, kterými byly energetické nápoje a nealkoholické cola nápoje byly upraveny před analýzou tak, že byly odplyněny po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni a následně přefiltrovány přes 0,2 μm nylonový filtr. Oproti tomu pevné vzorky, kterými byly různé druhy čajů, maté a instantní káva byly extrahovány metanolem. Extrakce probíhala ve více frekvenční ultrazvukové lázni (25 až 45 kHz). Vzorky byly postupně extrahovány, a to 0,5 g vzorku bylo extrahováno 15 ml 50 % metanolem, poté 75 % metanolem a následně 100 % metanolem. Extrakce probíhala po dobu 20 minut při teplotě 60 °C. Po každé extrakci byl roztok odstředěn při 4000 otáčkách za 1 minutu. Ze všech extrakcí byl shromážděn supernatant, ke kterému bylo přilito 100 ml vody a následně byl odebrán alikvotní podíl, který byl přefiltrován přes 0,2 μm nylonový filtr.

Ve studii He a kol. [31] byl stanovován kofein ve vzorcích čínského čaje. Listy čaje (50 g) byly po dobu 1 hodiny louhovány v 500 ml vody, která měla teplotu 80 °C. Směs byla po hodině zfiltrována a následně zkoncentrována na 100 ml. Roztok byl nakonec extrahován chloroformem.

2.1.2 Podmínky stanovení

Ve většině případů stanovení kofeinu pomocí HPLC, byla využita chromatografie s obrácenými fázemi a jako stacionární fáze byl všude použit oktadecylsilikagel s velikostí částic 5 μm . [27][28][30][31] a v případě studie Rostagno a kol. [29] byly použity částice o velikosti 2,6 μm . Lze také použít metodu UHPLC, která využívá speciálních kolon. Kolony jsou naplněny částicemi s pevným jádrem. Jedná se o molekuly s pevným jádrem, které je potaženo porézní vrstvou. Díky těmto kolonám je rychlejší stanovení, menší spotřeba mobilní fáze a stanovení probíhá za menších tlaků než při HPLC stanovení. [29]

Ve studii El-Shahawi a kol. [27] byly použity dvě mobilní fáze. Fáze A obsahovala 5 % (V/V) acetonitrilu s příměsí 0,035 % (V/V) kyseliny trifluoroctové a fáze B obsahovala 50 % (V/V) acetonitrilu s příměsí 0,025 % (V/V) kyseliny trifluoroctové. Přítomnost kyseliny trifluoroctové

byla pro toto stanovení nezbytná, kvůli vysokému rozlišení a účinné separaci katechinů v čaji. De Carmago a kol. [28] použili různé mobilní fáze u vzorků kofeinu. Pro nealkoholické nápoje byl použit metanol s vodou (25:75, V/V), pro čaj byl použit metanol s vodou (30:70, V/V) a pro vzorky čokolády byl použit acetonitril s vodou (10:90, V/V). Rostagno a kol. [29] použili dvě rozpouštědla. Rozpouštědlo A byla voda (1 % kyselina fosforečná) a rozpouštědlo B acetonitril (1 % kyselina fosforečná). Fernández a kol. [30] použili také dvě rozpouštědla, a to směs voda – acetonitril – kyselina mravenčí (94,7 %, 4,3 %, 1 %, V/V) a druhá mobilní fáze obsahovala směs voda – acetonitril – kyselina mravenčí (49,5 %, 49,5 %, 1 %, V/V). He a kol. [31] použili dvě mobilní fáze. Fáze A obsahovala 90 ml acetonitrilu, 20 ml kyseliny octové, 2 ml vodného roztoku EDTA (10 mg/ml) a zbytek do 1000 ml byla voda. Mobilní fáze b obsahovala 800 ml acetonitrilu, 20 ml kyseliny octové a 2 ml vodného roztoku EDTA (10 mg/ml) a zbytek do 1000 ml byla voda. Konkrétní hodnoty podmínek stanovení, jako je průtok, dávkovaný objem či doba separace a další jsou uvedeny v Tabulce 2.

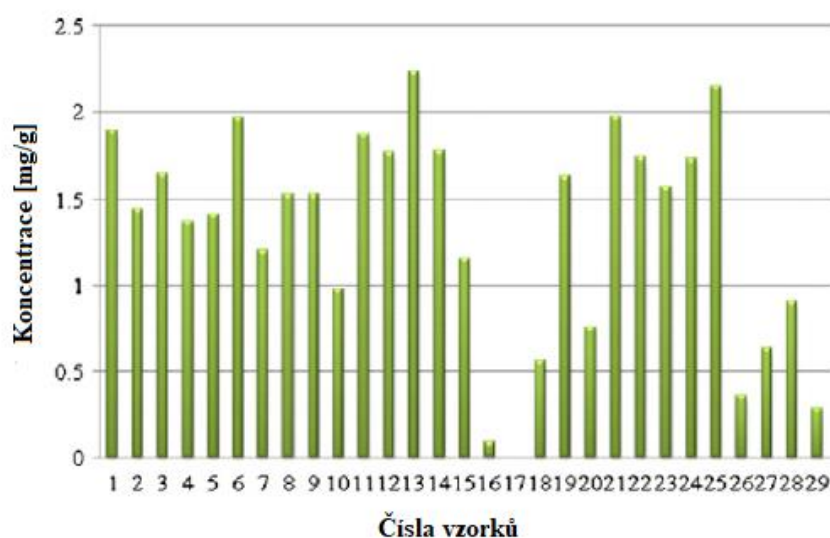
Tabulka 2 Podmínky separace kofeinu pomocí HPLC

	Průtok [ml/min]	Dávkovaný objem [μl]	Doba separace [min]	Teplota kolony [°C]	Vlnová délka [nm]
El-Shahawi a kol.[27]	1,0	20	21	32	205-280
De Carmago a kol.[28]	1,0	5	neuveďeno	neuveďeno	254
Rostagno a kol.[29]	2,2	10	5	55	260-320
Fernandéz a kol.[30]	1,0	10	20	neuveďeno	275
He a kol.[31]	1,0	20	15	25	278-380

Při analýze kofeinu se nejčastěji využívá spektrofotometrický detektor v UV nebo VIS oblasti. [27][28][30] Často se také využívá detektor diodového pole [29][31], ke kterému může být online připojený fluorescenční detektor. [29] Vlnová délka studie El-Shahawi a kol. [27] byla 205 nm, a to z důvodu použití acetonitrilu jako elučního činidla místo metanolu. Acetonitril poskytuje vyšší absorpenci při této vlnové délce, než klasicky při 275 nm, a také umožňuje lepší chromatografickou separaci.

2.1.3 Výsledky

Ve studii El-Shahawi a kol. [27] bylo analyzováno 29 komerčně dostupných zelených čajů a ve všech vzorcích, bylo za daných podmínek, nalezeno řádné množství katechinů a kofeinu (viz. Obrázek 8). Obsah kofeinu v zeleném čaji byl porovnán se standardy. Ukázalo se, že velký vliv na množství kofeinu v čaji má doba vyluhování, kdy byly vzorky ponechány louhování od 5 do 30 minut. Koncentrace uvolněného kofeinu do horké vody rostla s rostoucí dobou infuze (viz. Obrázek 7). Množství kofeinu v zeleném čaji se pohybovalo v rozmezí od $0,086 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ do $2,23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a v jednom vzorku nebylo nalezeno žádné množství kofeinu ani katechinů. Vliv na množství kofeinu v listech zeleného čaje může mít zeměpisná poloha pěstované rostliny, sklízení listů, skladování, fermentace, pražení, tepelná úprava atd.



Obrázek 8 Obsah kofeinu ve vzorcích zeleného čaje [27]

Ve studii De Carmago a kol. [28] byl analyzován kofein nejen v čaji, ale i v dalších vzorcích, kterými jsou čokoláda nebo třeba nealkoholické nápoje. V analýze kofeinu ve vzorku čokolády se jako nejúčinnější projevila mobilní fáze směs vody a acetonitrilu (90:10). Obsah kofeinu byl analyzován v mléčné, hořké i bílé čokoládě, kdy mléčná čokoláda obsahovala $0,83 \pm 0,03 - 0,95 \pm 0,07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ kofeinu, hořká čokoláda obsahovala $0,33 \pm 0,07 - 0,47 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ kofeinu a bílá čokoláda obsahovala $0,14 \pm 0,00 - 0,28 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ kofeinu. Dále byl analyzován kofein ve vzorcích čínského čaje, u něhož nejúčinnější mobilní fáze byla směs metanol s vodou (30:70). Největší množství kofeinu bylo nalezeno ve vzorcích černého čaje, který obsahoval $7,58 \pm 0,04 - 17,35 \pm 3,33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Kofein byl také nalezen v sáčcích s maté, které obsahovaly $0,70 \pm 0,06 - 7,63 \pm 0,94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ kofeinu a listy maté obsahovaly $0,88 \pm 0,37 - 5,38 \pm 0,44 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Vzorky nealkoholických nápojů byly různé druhy coly a nápoje připravené z guarany. Jelikož

je do coly přidáván kofein úmyslně, jeho obsah je daleko vyšší než v nápojích z guarany. Guarana obsahuje asi 4 % přírodního kofeinu. Obsah kofeinu ve vzorcích coly byl $0,06 \pm 0,02 - 0,131 \pm 0,003 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a obsah kofeinu v nápojích z guarany byl $0,008 \pm 0,001 - 0,21 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Rostagno a kol. [29] stanovovali kofein pomocí kolon s pevným jádrem. Studie ukázala, že při použití metody UHPLC s kolonami s pevným jádrem, probíhá analýza rychleji (méně než 5 minut), než při použití monolitických kolon a výsledné píky v chromatogramu jsou vyšší a užší. V této analýze byly použity dva různé detektory s různými vlnovými délkám, a to z důvodu rozdílných koncentrací fenolických látek a kofeinu ve vzorku. Kofein byl stanovován v rozdílných vzorcích, mezi které patří čaj (černý, bílý, zelený), nealkoholické nápoje, maté, energetické nápoje, a instantní káva. Konkrétní hodnoty množství kofeinu ve vzorcích, jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 Množství kofeinu v mg/l v analyzovaných vzorcích [29]

Vzorek	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	In-stantní káva	Maté	Energetické nápoje	Nealkoholické nápoje
Množství [mg·l ⁻¹]	89	130	140	70	40	314	108

Fernández a kol. [30] analyzovali kofein a katechiny ve vzorcích černého, zeleného a instantního čaje. Celkem bylo použito 37 vzorků čaje, přičemž 17 vzorků byl černý čaj, 18 vzorků byl zelený čaj a 2 vzorky obsahovaly instantní čaj. Největší množství kofeinu obsahoval instantní čaj, a to 3,69 - 3,83 % (m/m). Dále zelený čaj obsahoval 0,77 - 3,41 % (m/m) kofeinu a černý čaj 2,57 - 3,42 % (m/m) kofeinu. Stejně množství kofeinu bylo nalezeno ve vzorcích čaje, které byly analyzovány studií He a kol. [31] Tato studie analyzovala také kromě kofeinu i různé druhy katechinů.

2.2 Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza je separační analytická metoda a konkrétně se řadí mezi elektromigrační metody. Principem elektromigračních metod, je separace látek pomocí vloženého stejnosměrného elektrického pole. Separace látek probíhá pomocí dvou elektrod. V přítomnosti elektrického pole dochází k migraci iontů, a to tak že kladně nabitě částice (kationty) putují k záporně nabitě elektrodě (katodě) a opačně, tedy ionty nesoucí záporný náboj (anionty) putují ke kladně nabitě elektrodě (anodě). [24] U CE se jako vodivý spoj používá kapilára, která bývá nejčastěji křemenná a pro zvýšení její mechanické odolnosti, bývá z vnějšku potažena vrstvou polyimidu. Díky malému vnitřnímu průměru kapiláry, je snížena rychlost difúze látek a lze tak dobře odvádět teplo, které se vytváří při průchodu elektrického proudu. Dále díky odvodu tepla lze využít vyššího separačního napětí než při klasické elektroforéze, a to až do 30 kV a tím také zkrátit dobu analýzy. Doba separace je řádově několik minut. K separaci látek, velmi přispívá elektroosmóza, která se výrazně projevuje v roztocích, které mají $\text{pH} > 4$. Iontová síla roztoku má vliv na rychlost a orientaci elektroosmotického toku. [24][25]

Kapilární elektroforéza je další metoda, pomocí které lze stanovit obsah kofeinu ve vzorku. Kofein byl stanovován ve vzorcích kávy [32] [36], v sycených nápojích [34], v kávě bez kofeinu [33], v coca cole, v čaji [36] a ve vzorcích moči [35]. Spolu s kofeinem byly touto metodou stanoveny i jeho metabolity, kterými jsou Teobromin, Teofylin a další urinové kyseliny, [35], pyroglutamát [32], aspartám, kyselina benzoová [34].

2.2.1 Příprava vzorků

Maeso a kol. [32] analyzovali kofein ve vzorcích instantní kávy. Vzorek kávy (1 g) byl rozpuštěn ve vodě v 100 ml odměrné baňce a následně zředěn vodou v poměru 1:4. Zředěný roztok byl dále filtrován přes 0,45 μm nylonový filtr a hned poté analyzován.

Oproti tomu vzorky studie Meinhart a kol. [33] byly připraveny pomocí extrakce. Analýze bylo podrobena 8 vzorků instantní bezkofeinové kávy a 8 vzorků klasické bezkofeinové kávy, přičemž každý vzorek byl analyzován třikrát. K analýze byl použit přesně 1 g vzorku kávy, který byl vložen s 10 ml 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH a 30 ml chloroformu, do dělicí nálevky. V dělicí nálevce byl roztok protřepáván po dobu 7 minut a následně byla organická fáze oddělena do 50 ml baňky a vodná fáze ještě třikrát promyta 5 ml chloroformu. Chloroform byl ve vodní lázni zahřáté na 60 °C a následně odpařen ze vzorku. K vzorku bylo přidáno 10 ml vody a po dobu 2

minut byl vzorek míchán. Výsledný roztok byl nakonec přefiltrován přes 0,45 μm filtr. K analýze bylo použito 800 μl vzorku, ke kterému bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu, kterým byl Teobromin o koncentraci 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Walker a kol. [34] podrobili analýze vzorky sycených nealkoholických nápojů z plechovky. Vzorky byly před stanovením odplyněny ve vakuu a následně smíchány s glycinovým pufrům, který měl koncentraci 0,02 mol/l a hodnotu pH 9, v poměru 1:1. Každý roztok byl následně přefiltrován přes 0,45 μm filtr a vložen do lahvíček.

Vzorky konzervovaných čajů, coca coly a sportovních nápojů byly upraveny před stanovením tak, že 5 ml každého vzorku bylo zředěno pufrům (Borax 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v odměrné baňce na 50 ml. Vzorky čaje a kávy byly připraveny odvážením 2 g čajových lístků a 1 g mleté kávy, které byly přesypány do 100 ml baňky a zality horkou vodou (70 $^{\circ}\text{C}$). Roztoky byly následně ponechány po dobu 60 minut ve vodní lázni a poté hned zchlazeny na pokojovou teplotu. Oba roztoky byly filtrovány a filtrát byl odplyněn v ultrazvuku a znovu filtrován. Nakonec byly roztoky těsně před analýzou naředěny v poměru 1:100. [36]

Studie Peri-Okonny a kol. [35] se zabývala analýzou množství kofeinu a jeho 11 metabolitů v moči. Vzorky moči (10 ml) byly upraveny před analýzou přidáním standardů kofeinu a metabolitů o koncentraci 0,005-0,010 mg/ml. Ke vzorkům bylo dále přidáno přibližně 50 ml ledové kyseliny octové tak, aby bylo dosaženo pH nižší než 3,8.

2.2.2 Podmínky stanovení

Kapilární elektroforéza je separační metoda, kde k separaci látek dochází v kapiláře, která také slouží jako vodivé spojení dvou roztoků. Ve všech studiích byla použita křemenná kapilára, která byla dlouhá od 44-98 cm a s vnitřním průměrem kapiláry 50-75 μm . [32][33][34][35][36] Studie Li a kol. [36] testovali vliv délky kapiláry na účinnost separace látek. Jako kompromis tato studie zvolila kapiláru o délce 15 cm s průměrem 75 μm . Ve třech případech byl použit spektrofotometrický UV-VIS detektor v rozmezí vlnových délek 200-220 nm [32][34][36] a ve dvou případech byl použit detektor diodového pole [33][35]. Dávkování vzorku probíhalo tlakem.[32][33][34][35] Ve studii Li a kol. [36] byl vzorek vstříkován pomocí gravitace nebo elektrokinetiky. Hodnoty dalších podmínek jsou uvedeny v Tabulce 4.

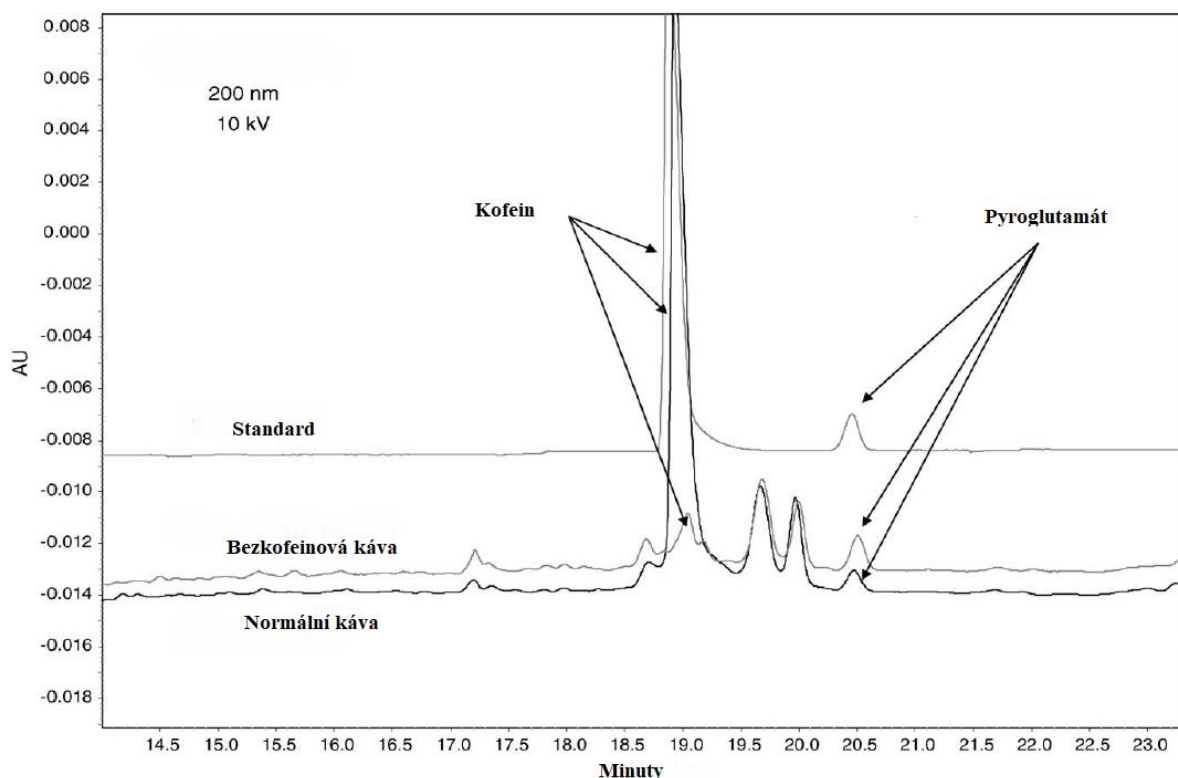
Tabulka 4 Hodnoty podmínek stanovení kofeinu pomocí CE

	Tlak dávkování [mBar]	Doba dávkování [s]	Napětí [kV]	Teplota kapiláry [°C]
Maeso a kol. [32]	35	5	10	25
Meinhart a kol. [33]	50	5	15	25
Walker a kol. [34]	neuveďeno	1	20	35
Peri-Okonny a kol. [35]	40	10	25	30
Li a kol. [36]	neuveďeno	neuveďeno	20	neuveďeno

Pro snížení elektroosmotického toku v kapiláře byla použita směs dodecylsulfátu sodného jako aniontově povrchově aktivní látka. U studie Maeso a kol. [32] byl použit jako základní elektrolyt dodecylsulfát sodný $0,13 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s přídavkem $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3BO_3 a pH roztoku bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 9,5. Stejně tak studie Meinhart a kol. [33] použili jako základní elektrolyt dodecylsulfát sodný o koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ke kterému byl přidán uhličitán sodný o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH tohoto roztoku bylo upraveno na hodnotu 11. Walker a kol. [34] použili jako základní elektrolyt glycin, který měl koncentraci $0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH tohoto roztoku bylo upraveno pomocí pH na hodnotu 9. V případě studie Peri-Okonny a kol. [35] byly použity dva základní elektrolyty, a to glycinový pufr a uhličitán amonný. Oba tyto roztoky měly koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a jejich výsledné pH bylo upraveno na hodnotu 11. Ve studii Li a kol. [36] byl jako pufr použit Borax o koncentraci $0,015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a jeho pH bylo upraveno na hodnotu 9,2. Před samotným stanovením byla kapilára ve všech studiích stabilizována promytím. Ve studii Walker a kol. [34] a Peri-Okonny a kol. [35] byla kapilára promyta roztokem NaOH o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 15 minut, poté byla promyta deionizovanou vodou po dobu 15 minut při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a před každým dávkováním byla promyta základním elektrolytem. Ve studii Maeso a kol. [32] byla kapilára propláchnuta roztokem NaOH o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 3 minut, poté vodou po dobu 3 minut, a nakonec základním elektrolytem po dobu 5 minut. Ve studii Meinhart a kol. [33] byla kapilára nejprve promyta roztokem NaOH o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 5 minut, následně byla promyta deionizovanou vodou po dobu 5 minut, a nakonec po dobu 10 minut roztokem pufru.

2.2.3 Výsledky

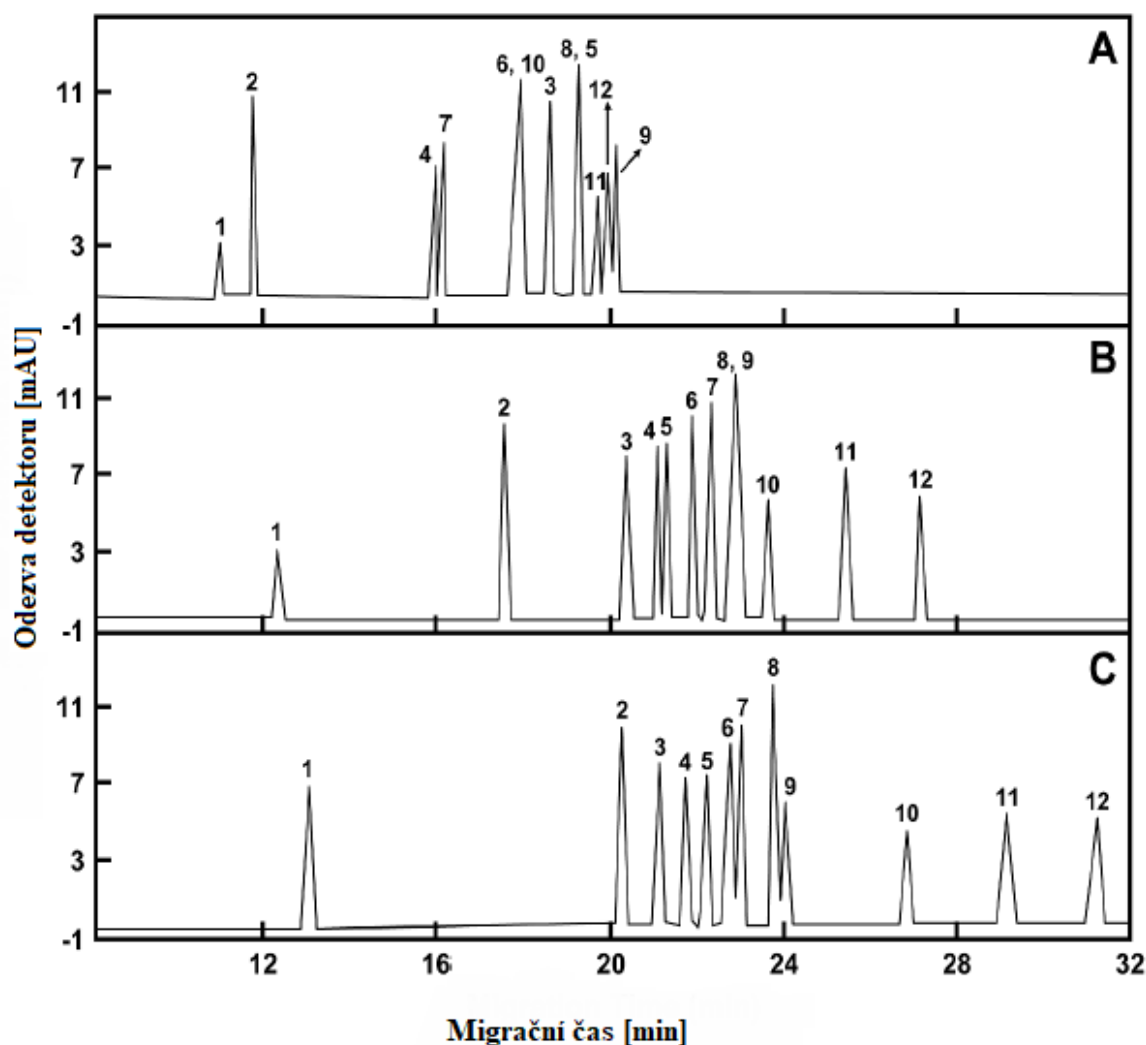
Maeso a kol. [32] stanovovali obsah kofeinu a pyroglutamátu v bezkofeinové kávě pomocí kapilární elektroforézy. Obsah kofeinu a pyroglutamátu se určilo výpočtem z plochy píků a dané elektroforegramy normální kávy a bezkofeinové kávy byly porovnány se standardy (viz. Obrázek 9). Množství kofeinu v bezkofeinové kávě se pohybovalo v rozmezí od $3,5 \pm 0,67$ - $4,7 \pm 0,42$ mg kofeinu/ g kávy a obsah kofeinu v normální kávě byl $19,8 \pm 0,32$ - $45,9 \pm 2,4$ mg kofeinu/g kávy.



Obrázek 9 Elektroforegram standardu, bezkofeinové a normální kávy [32]

Studie Meinhart a kol. [33] analyzovali kofein v bezkofeinové kávě. Zkoumali podmínky separace a jejich vliv na průběh separace. Nejúčinnější metoda se zdá být za využití následujících podmínek: pufr, který se skládá z roztoku $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dodecylsulfátu sodného a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ uhličitanu sodného, za teploty $25 \text{ }^\circ\text{C}$, napětí 15 kV , křemenná kapilára o délce 48 cm . Za těchto podmínek mohl být použit nízký proud a byly také nízké hladiny okolních rušivých šumů. V této metodě bylo velmi stabilní pH elektrolytu. Kofein byl stanoven v 8 různých vzorcích pražené a 8 vzorcích instantní kávy. Pražená káva obsahovala $12,4 \pm 0,36$ až $925,6 \pm 16,14$ mg kofeinu/ 100 g kávy a Instantní káva obsahovala $57,7 \pm 0,37$ až $414,4 \pm 4,87$ mg kofeinu/ 100 g kávy. Podle brazilských zákonů je povolený obsah kofeinu v mleté kávě $100 \text{ mg kofeinu/ } 100 \text{ g kávy}$ a v instantní kávě je povolené množství $300 \text{ mg kofeinu/ } 100 \text{ g kávy}$ u bezkofeinové kávy.

U vzorku mleté kávy došlo ve dvou případech k překročení limitu a u instantní kávy došlo také ve dvou případech k překročení povoleného limitu obsahu kofeinu v bezkofeinové kávě. Studie Walker a kol. [34] analyzovaly množství kofeinu, aspartamu a kyseliny benzoové ve vzorcích nealkoholických nápojů z plechovek, které jsou sycené oxidem uhličitým. Množství kofeinu ve vzorcích se pohybovalo v rozmezí od 33-52 mg/ 355 ml (355 ml = 1 plechovka). Studie Peri-Okonny a kol. [35] testovala množství kofeinu a jeho 11 metabolitů v moči spojením CE a MS. V této studii zkoušeli vliv několika různých pufrů na průběh stanovení. Nejprve vyzkoušeli glycin, ale ten není kompatibilní s hmotnostním spektrometrem. Jako lepší se zdá být uhličitán amonný, který měl pH 11. Dále tato studie zkoumala vliv pH elektrolytu na průběh stanovení. Zjistili, že i nepatrná změna pH, má velký vliv na selektivitu separace stanovovaných látek, což můžeme vidět na Obrázku 10. Obrázek 10 je rozdělen na tři části, kdy část A znázorňuje průběh separace při pH 9,3, část B zase při pH 10,5 a část C při pH 11.



Obrázek 10 Vliv hodnoty pH na průběh separace (A = pH 9,3, B = pH 10,5 a C = pH 11)[35]

Li a kol. [36] analyzovali obsah kofeinu, teobrominu a teofylinu v coca cole, čajových listech, čajovém nápoji a mleté kávě. V analýze testovali několik pufrů, kterými jsou hydrogenuhličitan sodný, octan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, avšak optimální při této analýze byl borax o koncentraci $0,015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako další parametr, který tato studie zkoumala, bylo pH. Zjistili, že doba migrace iontů se prodlužuje s rostoucí hodnotou pH, což zároveň vede k lepšímu rozlišení stanovovaných látek. Ideální hodnota pH s boraxovým pufrem pro stanovení kofeinu, teobrominu a teofylinu je 9,2. Množství kofeinu ve vzorku coca coly bylo 0,15 mg/ml. Čajový nápoj obsahoval 0,124 mg/ml kofeinu. Čajové listy obsahovali 34,30 mg/g kofeinu. Mletá káva obsahovala 15,58 mg/g kofeinu a tableta léčiv obsahovala 37,13 mg/g kofeinu.

2.3 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie je další metoda, dle které lze stanovit kofein. Tuto metodu lze využít pro kontrolu kvality kávy [26][37]. Také bylo stanovováno množství kofeinu v čajových listech [38].

2.3.1 Příprava vzorku

Huck a kol. [26] analyzovali 83 vzorků pražené kávy druhu Arabica a Robusta. Kávová zrna byla mletá po dobu 4 minut v mlýnku a bez další úpravy byly analyzovány. Jako vedlejší produkty byly stanoveny teobromin a teofylin.

Studie Reis a kol. [37] analyzovaly množství kofeinu v zrnech zelené kávy a kávových slupkách. Nejprve byly vzorky kávových zrn, slupek a kukuřice pečené při teplotách 200–260 °C. Vzorky byly dále rozemlety a prosety a k analýze byly použity různé velikosti vzorků. Vzorek byl smíchan s KBr a z této směsi bylo odebráno 23 mg, které byly analyzovány.

Ohnsmann a kol. [38] analyzovali vzorek čajových listů pomocí extrakce. Nejprve bylo odváženo 250 mg čajových listů a poté bylo přidáno 5 ml NH_4OH o koncentraci $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a následně byl roztok po dobu 2 minut protřepáván. Následně bylo přidáno 5 ml chloroformu a směs byla opět protřepána po dobu 2 minut. Nakonec byla směs centrifugována po dobu 10 minut.

2.3.2 Podmínky stanovení

Huck a kol. [26] použili ke stanovení kofeinu FTIR v blízké oblasti vlnových délek. U tohoto stanovení bylo použito rozpětí vlnových délek 4500-9996 cm^{-1} s rozlišením 12 cm^{-1} v režimu odrazivosti. V této metodě bylo použito 10 skenů na jedno spektrum.

Ohnsmann a kol. [38] použili také metodu FTIR, která byla vybavena teplotně stabilizovaným detektorem a dělič paprsků byl z Ge/KBr. Rozlišení bylo 4 cm^{-1} bylo použito 25 skenů pro spektrum. Délka dráhy byla 0,457 mm.

Také Reis a kol. [37] použili pro stanovení kofeinu metodu FTIR. Měření proběhlo při vlnové délce 4000 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} a 20 skeny.

2.3.3 Výsledky

Huck a kol. [26] analyzovali kofein v 83 vzorcích zelených kávových zrn, které byly z různých geografických oblastí. Zjistili, že kávu arabica a robusta lze od sebe rozeznat, a to analýzou složení těchto druhů káv. Arabica obsahuje větší podíl mastných kyselin než robusta. Vzorky obsahovaly 0,95-4,13 g kofeinu/ 100 g kávy. Tato studie také testovala nejvhodnější metodu pro stanovení kofeinu a v porovnání FTIR a HPLC, vyšla lépe HPLC.

Studie Ohnsmann a kol. [38] analyzovali kofein v čajových listech. V této analýze byly testovány různé podmínky extrakce, jako je třepání, použité extrakční činidlo atd. Byly testovány dva různé druhy třepání, kterým bylo ultrazvukové a mechanické třepání po dobu 1-5 minut. Třepání nemělo vliv na uvolňování kofeinu z čajových listů. Dále testovali vliv koncentrace extrakčního činidla, kterým byl NH_4OH , avšak tady také zjistili, že zvýšení koncentrace NH_4OH z 0,25 mol/l na 4 mol/l, neovlivňuje n extrakci kofeinu. Také zkoumali objem extrakčního činidla a určili, že 5 ml je dostačující na extrakci kofeinu. Vzorky ceylon čaje obsahovaly $2,67 \pm 0,03$ % (m/m), vzorky zeleného čaje obsahovaly $2,70 \pm 0,02$ % (m/m) a vzorky jasmínového čaje obsahovaly $2,29 \pm 0,04$ % (m/m). Jejich spektra jsou na obrázku 11.

Studie Reis a kol. [37] analyzovaly množství kofeinu v kávových zrnech, kávových slupkách a kukuřici. Tato studie porovnávala kvalitu kávy, kdy na trzích je někdy nekvalitní káva vydávána za kvalitní a jsou do ní přimíchány kousky kávových slupek či kukuřice. V kávových zrnech a kávových slupkách byl analyzován kofein, ale v kukuřici nebyl nalezen žádný kofein. Také

byly porovnány další látky v kukuřici a v kávových zrnech jako jsou třeba lipidy. Bylo analyzováno celkem 16 vzorků pražené kávy, 11 vzorků kávových slupek, 16 vzorků pražené kukuřice.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na zpracování rešerše o kofeinu. Je rozdělena na dvě části, kde první část se zabývá vlastnostmi kofeinu a jeho přirozeným výskytem v rostlinách a druhá část se zabývá jeho stanovením.

Kofein je alkaloid, který lidé nejčastěji získávají z rostlin kávovníku, čajovníku a guarany. Z těchto rostlin je získáván pro jeho psychoaktivní účinky. Jeho hlavní mechanismus účinku v těle je, že působí jako antagonistu adenosinových receptorů. Některá studie tvrdí, že podobnost struktury kofeinu a adenosinu by mohlo mít pozitivní vliv na zpomalení či zabránění Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci. Kofein má i krátkodobé pozitivní vlastnosti, mezi které patří pocit dobré nálady, bdělost, lepší soustředění a napomáhá i urychlení metabolismu. Při vysokých dávkách, může kofein způsobovat třes, úzkost, nespavost a nervozitu. Kofein je také považován za nejvíce rozšířenou drogu na světě. Může na něm vzniknout závislost a při nedostatku se projevují i abstinenční příznaky, které mají podobu podrážděnosti a únavy.

Kofein lze stanovit několika analytickými metodami. Mezi nejčastější metody stanovení patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. Tyto metody jsou velice přesné, rychlé a k analýze je potřeba jen nepatrný vzorek. U HPLC byl nejčastěji použit spektrofotometrický detektor v UV a VIS oblasti a také detektor diodového pole. Také u elektroforézy byl použit detektor diodového pole a spektrofotometrický detektor a lze použít také hmotnostní spektrometr. Kofein byl také analyzován pomocí infračervené spektroskopie. Tato metoda má výhodu v tom, že je nedestruktivní. Často je využívána k zjištění kvality kávy.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Caffeine. *Britannica academic* [online]. Chicago: encyclopaedia britannica, 2018 [cit. 2018-12-05]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/caffeine>
- [2] Caffeine. *Pubchem*. [online]. USA: National institutes of health, [2018] [cit. 2018-12-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine#section=Top>
- [3] Chemická struktura kofeinu. In: *Akademon* [online]. ČR: RNDr.Ondřej Dvořák, CSc., 2012 [cit. 2018-11-30]. Dostupné z: <https://www.akademon.cz/Article/Detail?name=Po-zitivni%20kofein&source=1112>
- [4] Lékové interakce s kofeinem I. *Klinická farmakologie* [online]. 2001, **2001**(4), 2 [cit. 2018-12-08]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2001/04/12.pdf>
- [5] *Methylxanthines* [online]. 2. New York: Springer Verlag, c2011, s. 35-45 [cit. 2019-01-10]. Handbook of experimental pharmacology, v. 200. ISBN 9783642134425.
- [6] PharmGKB summary: caffeine pathway. *NCBI* [online]. USA: National Institutes of Health, 2013 [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381939/>
- [7] *Nutraceuticals: efficacy, safety, and toxicity* [online]. Amsterdam: Elsevier, Academic Press, [2016], s. 420-423 [cit. 2019-01-09]. ISBN 978-0-12-802147-7. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Arturo_Anadon/publication/295503583_Evaluation_and_Regulation_of_Food_Supplements_European_Perspective/links/57114a4708aef315b9f77e9/Evaluation-and-Regulation-of-Food-Supplements-European-Perspective.pdf
- [8] Caffeine and adenosine. In: *Wikimedia commons* [online]. San Francisco: ClockworkSoul, 2011 [cit. 2019-01-15]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caffeine_and_adenosine.png
- [9] Guarana - Paullinia cupana. In: *Herbář bylin* [online]. Rudoltice, c2013 [cit. 2019-02-16]. Dostupné z: <https://herbarbylin.webnode.cz/products/guarana-paullinia-cupana/>

- [10] SANTANA, Ádina L. a Gabriela A. MACEDO. Health and technological aspects of methylxanthines and polyphenols from guarana: A review. *Journal of Functional Foods* [online]. 2018, **47**, 457-468 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1016/j.jff.2018.05.048. ISSN 17564646.
- [11] SCHIMPL, Flávia Camila, José Ferreira DA SILVA, José Francisco de Carvalho GONÇALVES a Paulo MAZZAFERA. Guarana. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2013, **150**(1), 14-31 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1016/j.jep.2013.08.023. ISSN 03788741.
- [12] PÖSSL, Martin. *Čaj jako životní styl*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2902-2.
- [13] *Čajovník čínský* [online]. In: . Hradec Králové: Petr Želiezko [cit. 2019-02-19]. Dostupné z: <https://www.mundo.cz/cajovnik-cinsky>
- [14] DAVIES VESELÁ, Petra. *Velká kniha o kávě*. Praha: Smart Press, 2018. ISBN 978-80-88244-05-9.
- [15] Kávovník arabský (coffea arabica). In: *IReceptář.cz* [online]. Praha 5 - Jinonice: Josef Gall, 2015 [cit. 2019-02-22]. Dostupné z: <https://www.ireceptar.cz/zahrada/pokojove-rostliny/jak-pestovat-kavovnik-doprejte-mu-vhodne-osvetleni-zalivku-a-zimovani/>
- [16] Roy, A., & Das, B. (2015). Effects of caffeine on health: A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 8(9), 1312-1319.
- [17] BIESSELS, Geert Jan, Rodrigo A. CUNHA a Alexandre DE MENDONÇA. Caffeine, Diabetes, Cognition, and Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, **20**(s1), S143-S150. DOI: 10.3233/JAD-2010-091228. ISSN 18758908.
- [18] Holden, C. (2000). Caffeine and parkinson's. *Science*, 288(5471), 1581.
- [19] SOKOL, Leonard L., Michael J. YOUNG, Alberto J. ESPAY a Ronald B. POSTUMA. Cautionary optimism: caffeine and Parkinson's disease risk. *Journal of Clinical Movement Disorders*. 2016, **3**(1), 1-3. DOI: 10.1186/s40734-016-0037-8. ISSN 2054-7072.
- [20] RIBEIRO, J.A., A.M. SEBASTIÃO a A. DE MENDONÇA. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology*. 2002, **68**(6), 377-392. DOI: 10.1016/S0301-0082(02)00155-7. ISSN 03010082.

- [21] Alzheimerova choroba. *Česká alzheimerovská společnost* [online]. Praha 8: Česká alzheimerovská společnost, c2015 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/>
- [22] CHAUDHARY, Ninad S., Michael A. GRANDNER, Nicholas J. JACKSON a Subhajit CHAKRAVORTY. Caffeine consumption, insomnia, and sleep duration: Results from a nationally representative sample. *Nutrition*. 2016, **32**(11-12), 1193-1199. DOI: 10.1016/j.nut.2016.04.005. ISSN 08999007.
- [23] SERESHTI, Hassan a Soheila SAMADI. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. *Food Chemistry*. 2014, **158**, 8-13. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.095. ISSN 03088146.
- [24] OPEKAR, František, Ivan JELÍNEK, Petr RYCHLOVSKÝ a Zbyněk PLZÁK. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. dotisk 1. vydání. Praha: Karolinum, 2005, s. 149-180. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.
- [25] VOLKA, Karel, a kol. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995, s. 154-211. ISBN 80-7080-227-8.
- [26] HUCK, C.W., W. GUGGENBICHLER a G.K. BONN. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2005, **538**(1-2), 195-203 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1016/j.aca.2005.01.064. ISSN 00032670.
- [27] EL-SHAHAWI, M.S., A. HAMZA, S.O. BAHAFFI, A.A. AL-SIBAAI a T.N. ABDULJABBAR. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2012, **134**(4), 2268-2275 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.039. ISSN 03088146.
- [28] DE CAMARGO, Monica C Rojo. HPLC determination of caffeine in tea, chocolate products and carbonated beverages. *Journal of the science of food and agriculture* [online]. 1999, 1999, **79**(13), 1861-1864 [cit. 2019-05-15]. ISSN 0022-5142.

- [29] ROSTAGNO, M.A., N. MANCHÓN, M. D'ARRIGO, E. GUILLAMÓN, A. VILLARES, A. GARCÍA-LAFUENTE, A. RAMOS a J.A. MARTÍNEZ. 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* [online]. 2011, **685**(2), 204-211 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.aca.2010.11.031. ISSN 00032670.
- [30] FERNÁNDEZ, P. L., M. J. MARTÍN, A. G. GONZÁLEZ a F. PABLOS. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *The Analyst* [online]. 2000, **125**(3), 421-425 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1039/a909219f. ISSN 00032654.
- [31] HE, Qiang, Yuanping LV, Ling ZHOU a Bi SHI. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CAFFEINE AND CATECHINS IN TEA EXTRACTS BY HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2010, **33**(4), 491-498 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1080/10826070903574469. ISSN 1082-6076.
- [32] MAESO, N., C. DEL CASTILLO, L. CORNEJO, M. GARCÍA-ACICOLLAR, L.F. ALGUACIL a C. BARBAS. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, **41**(4), 1095-1100 [cit. 2019-05-27]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.01.062. ISSN 07317085.
- [33] MEINHART, Adriana Dillenburg, Carolina Schaper BIZZOTTO, Cristiano Augusto BALLUS, Marcelo Alexandre PRADO, Roy Edward BRUNS, José Teixeira FILHO a Helena Teixeira GODOY. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. *Food Chemistry* [online]. 2010, **120**(4), 1155-1161 [cit. 2019-05-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.11.048. ISSN 03088146.
- [34] WALKER, Jeffrey C., Spencer E. ZAUGG a Edward B. WALKER. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1997, **781**(1-2), 481-485 [cit. 2019-05-27]. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00532-3. ISSN 00219673.
- [35] PERI-OKONNY, Unita L., Shao Xiong WANG, R. John STUBBS a Norberto A. GUZMAN. Determination of caffeine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2005, **26**(13), 2652-2663 [cit. 2019-05-27]. DOI: 10.1002/elps.200500231. ISSN 0173-0835.

- [36] LI, Mengjia, Junyi ZHOU, Xue GU, Yan WANG, Xiaojing HUANG a Chao YAN. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets. *Journal of Separation Science* [online]. 2009, **32**(2), 267-274 [cit. 2019-05-28]. DOI: 10.1002/jssc.200800529. ISSN 16159306.
- [37] REIS, Nádia, Adriana S. FRANCA a Leandro S. OLIVEIRA. Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(2), 715-722 [cit. 2019-05-30]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.07.016. ISSN 00236438.
- [38] OHNSMANN, Janina, Guillermo QUINTÁS, Salvador GARRIGUES a Miguel DE LA GUARDIA. Determination of caffeine in tea samples by Fourier transform infrared spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2002, **374**(3), 561-565 [cit. 2019-05-30]. DOI: 10.1007/s00216-002-1503-8. ISSN 1618-2642.