

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Barbora Blažíčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Kofein – jeho vlastnosti a stanovení
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Blažíčková**
Osobní číslo: **C17112**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Kofein – jeho vlastnosti a stanovení**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zabývající se vlastnostmi kofeinu a jeho působením na organismus. Dále se zaměřte na možnosti jeho stanovení včetně metabolitů ve vzorcích biologického původu.
2. Závěry kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.7.2020

Barbora Blažíčková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. Ing Petře Bajerové, Ph.D., za odborné vedení, ochotný přístup, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. Poděkování patří i mé rodině a příteli za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

ANOTACE

První část práce je věnována vlastnostem kofeinu v lidském organismu. Druhá část práce se zabývá stanovením kofeinu v biologických vzorcích, využívající plynovou chromatografii, extrakci kapalina-kapalina, extrakci a mikroextrakci tuhou fází.

KLÍČOVÁ SLOVA

kofein, HPLC, SPE, SPME, extrakce kapalina-kapalina

TITLE

Caffeine – its properties and determination in human organism

ANNOTATION

The first part of this bachelor thesis is focused on properties of caffeine in human organism. The second part describes determination of caffeine in biological samples using high performance liquid chromatography, liquid-liquid extraction, solid phase extraction or solid phase microextraction.

KEY WORDS

caffeine, HPLC, SPE, SPME, liquid-liquid extraction

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD	14
1 Kofein	15
1.1 Zdroje kofeinu	15
1.1.1 Čaj	16
1.1.2 Káva	17
1.2 Chemické složení kávy	17
1.3 Metabolismus kofeinu	18
1.4 Farmakodynamika kofeinu	20
1.4.1 Blokáda adenosinových receptorů	21
1.4.2 Blokáda fosfodiesteráz	22
1.4.3 Účinek na iontové kanály	22
1.5 Fyziologické účinky kofeinu	23
1.5.1 Obecná toxicita kofeinu	23
1.5.2 Kardiovaskulární efekty	23
1.5.3 Vliv kofeinu na těhotenství a vývoj plodu	23
1.5.4 Kofein a spánek	24
1.5.5 Kofein a <i>diabetes mellitus</i> druhého typu	24
1.5.6 Kofein a Parkinsonova choroba	25
1.6 Kofein a doping	26
1.7 Kofein v kosmetice	26
1.7.1 Anti-celulitidní vlastnosti kofeinu	27

1.7.2	Antioxidační účinky kofeinu	27
1.7.3	Efekt kofeinu na růst vlasů	28
2	Stanovení kofeinu	29
2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	29
2.2	Extrakce z kapaliny do kapaliny	30
2.2	Extrakce tuhou fází	36
2.3	Mikroextrakce tuhou fází	36
	ZÁVĚR	44
	BIBLIOGRAFIE.....	45

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorec kofeinu	15
Obrázek 2	Obsah kofeinu v potravinách [4]	16
Obrázek 3	Strukturní vzorce hlavních metabolitů kofeinu	18
Obrázek 4	Hlavní metabolická cesta kofeinu [11].....	20
Obrázek 5	Graf koncentrací po opakovaném zmražení a rozmražení [41]	34

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Souhrn přípravy vzorků jednotlivých studií	32
Tabulka 2 Aktivita vybraných enzymů ze studie Bendrisse a kol. [40]	33
Tabulka 3 Výsledky analýzy sterilního vzorku moči dle Ventury a kol. [42].....	34
Tabulka 4 Výsledky analýzy nesterilní moči dle Ventury a kol. [42]	34
Tabulka 5 Výsledky analýzy kofeinu a jeho metabolitů dle Martínez-Lópeze a kol. [43].....	35
Tabulka 6 Výsledky analýzy dle Alvi a kol. [44]	35
Tabulka 7 Souhrn přípravy vzorků	38
Tabulka 8 Získané množství extrahovaných látek pomocí SPME-Kumazavwa a kol. [49]	39
Tabulka 9 Výtěžky extrakce kofeinu a metabolitů po SPE dle Georga a kol. [50]	41
Tabulka 10 Rozdíly koncentrací v plazmě matky a novorozence-Lopez-Sanchez a kol. [51].	42
Tabulka 11 Poměr metabolitů kofeinu v prvním vzorku moči dle Caubeta a kol. [52]	43
Tabulka 12 Poměr metabolitů kofeinu v druhém vzorku moči dle Caubeta a kol. [52].....	43

SEZNAM ZKRATEK

1U	kyselina 1-methylurová
1X	1-methylxanthin
13U	kyselina 1,3-dimethylurová
13X	teofylin
17U	1,7-dimethylurová kyselina
17X	1,7-dimethylxanthin/paraxantin
37U	kyselina-3,7 dimethylurová
37X	teobromin
137X	kofein
37U	kyselina-3,7 dimethylurová
AFMU	5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCE	sloupcová chromatografická extrakce
CNS	centrální nervová soustava
DHT	dihydrotestosteron
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FID	plamenový ionizační detektor
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HSL	hormon senzitivní lipáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSL	hormonsenzitivní lipáza

IC	iontová chromatografie
L-dopa	levodopa
MS	hmotnostní spektrometr
NIR	blízká infračervená spektroskopie
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TAG	triacylglyceroly

ÚVOD

Kofein byl poprvé izolován a popsán Friedliebem Ferdinandem Rungem v roce 1820. Čistý kofein je purinový alkaloid bez zápachu s typickou hořkou chutí. Přirozeně se vyskytuje v listech, semenech a plodech několika rostlin, mezi které patří kakaové boby, čaj, káva nebo guarana. Jedná se o purinový alkaloid, který stimuluje centrální nervovou soustavu a díky velké konzumaci kávy po celém světě se označuje za jednu z nejpoužívanějších drog. Konzumace kofeinu je spjatá především s jeho psychoaktivními účinky – zvyšuje bdělost a soustředění. Kofein také může snižovat únavu svalů a povzbuzovat k lepším výkonům, proto se nachází na Monitorovacím programu Světové antidopingové agentury. Využití kofeinu je i ve farmacii, je obsažen v analgetických nebo antipyretických a běžně se používá jako sondové léčivo k hodnocení metabolické aktivity různých izoform cytochromu P450. Potenciál má také jako lék při léčbě Parkinsonovy choroby a je spojován se sníženým rizikem diabetu. Využíván je kofein i v kosmetice, a to především ve vlasové, k podpoře růstu vlasů, nebo pleťové jako anticelulitidní složka krémů.

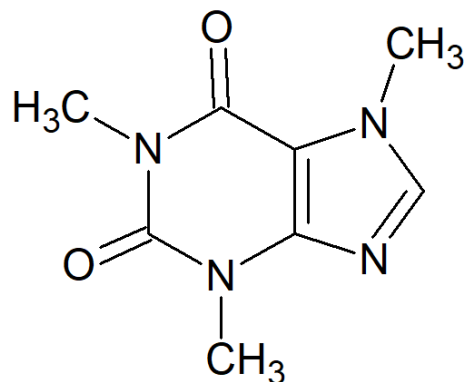
Ke kvantitativní i kvalitativní analýze kofeinu se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. K izolaci kofeinu před samotným stanovením se často využívá extrakce kapalina-kapalina a nově i extrakce nebo mikroextrakce tuhou fází. Tato bakalářská práce se věnuje použití těchto separačních metod ke stanovení kofeinu v biologických vzorcích.

1 KOFEIN

Kofein neboli 1,3,7-trimethylxanthin (viz Obrázek 1) je rostlinný purinový alkaloid, který se vyskytuje ve formě bílého prášku nebo ve formě bílých lesklých jehliček. Jedná se o látku bez zápachu, s typickou hořkou chutí. Kofein je stimulantem centrální nervové soustavy, obsažený především v kávě nebo čaji, ale i energetických nápojích nebo v čokoládě. Je velmi dobře rozpustný v horké vodě (1 g se rozpustí ve 46 ml vody při teplotě 25 °C) a méně v organických rozpouštědlech (1 g se rozpustí v 530 ml etheru). Rozpustnost ve vodě může být zvýšená alkalickými benzoáty, citráty nebo salicyláty [1].

Kofein v kávě objevil chemik Friedlieb Ferdinand Runge v roce 1820 a popsal jeho účinky na lidský organismus [2].

Kofein se vstřebává v tenkém střevě a distribuuje se rovnoměrně do všech orgánů i tělesných tekutin. Nejvyšší koncentrace v těle je dosaženo po 30 minutách. Metabolismus kofeinu probíhá v játrech a je metabolizován na více než 25 látek, které jsou vylučovány močí [2].

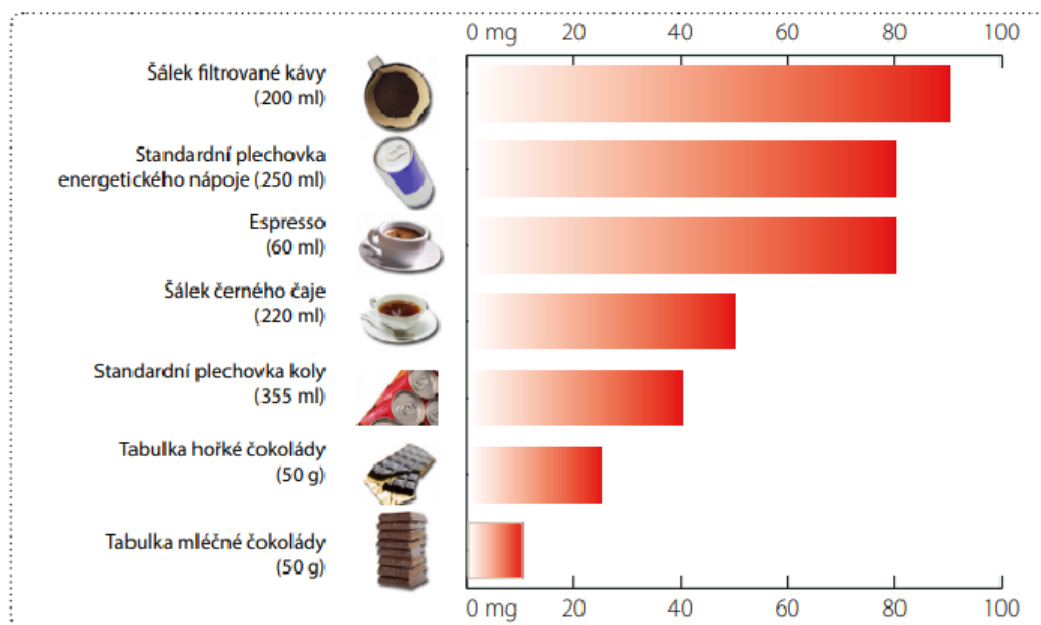


Obrázek 1 Strukturální vzorec kofeinu

1.1 Zdroje kofeinu

Kofein je přirozeně se vyskytující alkaloid, který se vyskytuje v různém množství v bobech, listech a plodech více než 60 rostlin. Mezi nejběžnější zdroje kofeinu patří kola ořech (*Cola acuminata*), kakaové boby (*Theobroma cacao*), yerba mate (*Ilex paraguarensis*) a bobule guarany (*Paullinia cupana*). Pražená kávová zrna (*Coffea arababica*, *Coffea robusta*) a čajové listy (*Camellia siniensis*) jsou primárními zdroji kofeinu po celém světě.

Koncentrace kofeinu se mezi kávou, čajem, nealkoholickými a energetickými nápoji liší (viz. Obrázek 2) [3].



Obrázek 2 Obsah kofeinu v potravinách [4]

1.1.1 Čaj

Složení čaje se liší podle typu zpracování, stáří listů, druhu, původu a klimatu. Kromě složení má každý typ čaje charakteristickou chuť, zdravotní vlastnosti a různé hladiny kofeinu. Jedna z hlavních rostlin používaná jako surovina pro čaj je *Camellia sinensis*, ze které se získávají zelené, bílé a černé čaje. Rozdíly mezi nimi jsou způsobeny různým zpracováním [5].

Zelený čaj se nefermentuje a získává se z mladých listů, kterou jsou vystaveny působení páry a vysokým teplotám za účelem inaktivace oxidujících enzymů [5].

Černý čaj je plně fermentovaný a má vysokou hladinu kofeinu. Přípravuje se dehydratací listů a čerstvých stonků, kvašením a sušením za úplného odpaření vody z listů i stonků. Následně jsou listy fermentované enzymatickým oxidačním procesem a jsou vystaveny vysokým teplotám až do zisku tvrdé a drobné konzistence čaje [5].

Bílý čaj je minimálně zpracován. Přípravuje se z mladých listů, které se sbírají dříve, než se pupeny rostliny plně otevřou. Zpracování spočívá v sušení, dehydrataci a zahřívání [5].

Yerba mate, čaj tradičně užívaný v Jižní Americe, se vyrábí namáčením větvíček a listů rostliny *Ilex paraguarensis* [3].

Průměrný šálek černého čaje obsahuje 47 mg kofeinu, ale může obsahovat až 90 mg. Zelené čaje obsahují 20-45 mg, bílé čaje obsahují 6-60 mg kofeinu. V zeleném čaji *matcha* je obsah kofeinu 35 mg na 1 čajovou lžičku v práškové podobě čaje. *Yerba mate* obvykle obsahují 85 mg kofeinu v jednom šálku. Metoda přípravy čaje velmi ovlivňuje obsah kofeinu v čaji. Čaje, které jsou déle louhovány v horké vodě, uvolní větší množství kofeinu [6]. Kofein v čaji bývá označován jako tein.

1.1.2 Káva

Kávovníky se pěstují především v tropických a subtropických oblastech Afriky, jihovýchodní Asie a Jižní Ameriky. Rod *Coffea* patří do čeledi *Rubiaceae* a obsahuje více než 90 druhů. Komerčně nejvyužívanější jsou druhy *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea Robusta* a *Coffea liberica*. Kvalita kávy je ovlivněna řadou faktorů, ale nejvýznamnější jsou faktory předsklizňového a posklizňového zpracování kávových zrn. Při sklizni procházejí kávové třešně složitou řadou kroků, aby byly ve stabilnější, přepravitelné a pražitelné formě. Tyto kroky zajišťují bezpečnou změnu kávových třešní, které podléhají rychlé zkáze, na stabilnější zelené kávové boby. Posklizňové zpracování mění chemické složení zelených kávových zrn, které může ovlivnit kvalitu konečného produktu. Zelené kávové boby se získávají buď suchou, polosuchou nebo mokrou metodou zpracování [7].

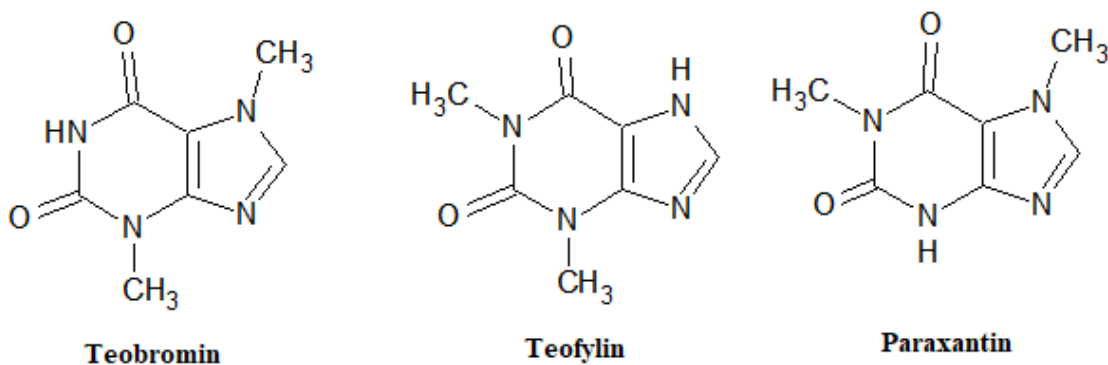
Průměrný šálek kávy obsahuje 95 mg kofeinu. Káva z tmavých pražených bobů obsahuje více kofeinu než káva, připravována ze světlých pražených bobů. Nejkoncentrovanějším zdrojem kávy je espresso, kdy v 30 ml je 58 mg kofeinu. Káva se obvykle připravuje při teplotě 90-96°C [6].

1.2 Chemické složení kávy

Chemické složení kávy je různorodé – odvíjí se od druhu a původu kávy i od způsobu pražení. Mezi nejdůležitější látky vyskytující se v kávě patří kofein (0,5-2,6 %), kyselina kávová a chinová (10 %), kyselina chlorogenová (4-6 %), polysacharidy (25-30 %), proteiny (13 %), tuky a vosky (0,1-0,8 %) a minerální látky – především draslík, hořčík, vápník, fosfor a železo (asi 4 %) [2].

1.3 Metabolismus kofeinu

V lidském organismu je kofein metabolizován na více než 25 metabolitů, z čehož největší zastoupení má paraxantin, teobromin a teofylin (viz Obrázek 3) [8]. Kofein užívaný v nápojích je rychle absorbován gastrointestinálním traktem a distribuován je vodou. Rychlejší absorpce se dá dosáhnout žvýkáním žvýkačky obsahující kofein, kdy dochází k absorpci kofeinu přes sliznici v ústech [9].



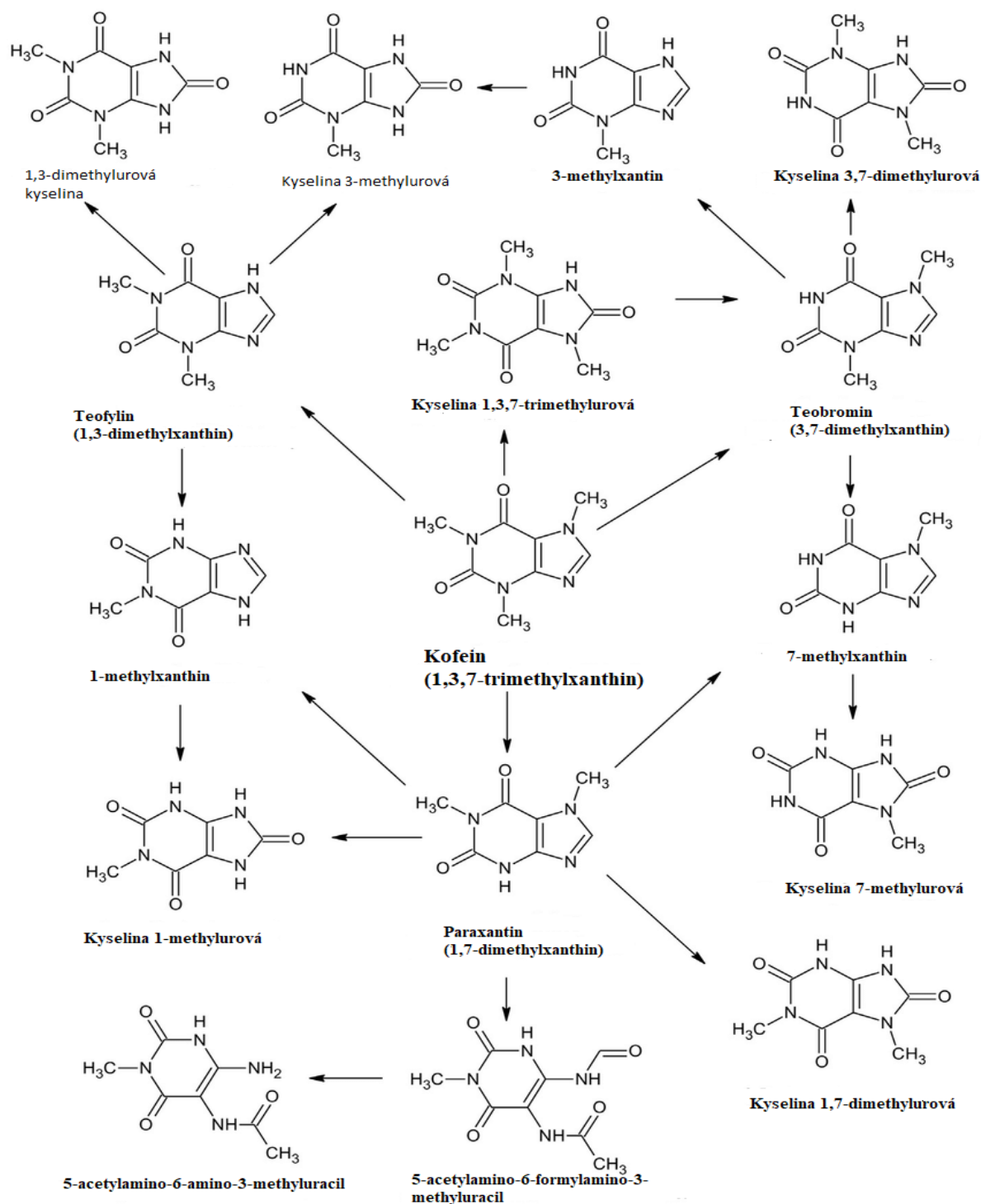
Obrázek 3 Strukturální vzorce hlavních metabolitů kofeinu

K metabolismu kofeinu dochází v játrech na dimethylxanthiny, močové kyseliny, di- a trimethylallantoin a na deriváty uracilu. Existuje pět metabolických cest kofeinu. Mezi první tři patří demethylace *N*-3 za vzniku paraxantinu, *N*-1 za vzniku teobrominu a demethylace *N*-7 na teofylin. Většinu kofeinu metabolizuje izoenzym jaterního cytochromu P450 CYP1A2, který dává 85 % paraxantinu, 10 % teobrominu a 5 % teofylinu [9].

CYP1A2 je zodpovědný za více než 95 % primárního metabolismu kofeinu. Jedná se o důležitý enzym metabolizující v játrech. Existuje více než 100 substrátů pro CYP1A2, včetně několika důležitých léků. Kofein se tedy může využít jako léčivo sloužící k hodnocení aktivity CYP1A2. CYP1A2 je možné najít v játrech, plicích, pankreatu, gastrointestinálním traktu a mozku [10].

Mezi faktory ovlivňující metabolismus kofeinu patří např. těhotenství, kouření, alkohol nebo cvičení. U kouření je metabolismus zvýšen zrychlenou demethylací. U žen v přechodu, které užívají estrogen, dochází ke sníženému metabolismu kofeinu, jelikož izoenzym CYP1A2 enzymu P450 je společný pro metabolismus kofeinu i estrogenu [10].

Kofein se reverzibilně váže na plazmatické proteiny a takto navázaný kofein představuje asi 10–30 % celkového množství plazmy. Distribuční objem je přibližně 0,7 l/kg. Tato hodnota naznačuje, že je kofein hydrofilní a volně se distribuuje do vody uvnitř buněčné tkáně. Je ovšem i dostatečně lipofilní, aby prošel hematoencefalitickou bariérou [9]. Jelikož je kofein snadno reabsorbovatelný renálními tubuly, jen velmi malé procento nezměněného kofeinu se objeví v moči [9]. Největší zastoupení v moči jako metabolit kofeinu má paraxantin. Kromě paraxantinu jsou hlavními metabolity kofeinu v moči 1-methylxanthin, kyselina 1-methylurová, 5-acetylamino-6-formylamino-3methyluracil a kyselina 1,7-dimethylurová. Tyto metabolity jsou tvořeny sekundárním metabolismem cytochromů P450, CYP2A6, *N*-acetyltransferázou 2 a xantin dehydrogenázou (viz Obrázek 4 [11]) [10]. Kofein se vylučuje rychleji než paraxantin, proto 8–10 h po požití kofeinu koncentrace paraxantinu kofein převyšuje [9].



Obrázek 4 Hlavní metabolická cesta kofeinu [11]

1.4 Farmakodynamika kofeinu

Účinek kofeinu na periferní a centrální nervový systém má tři možné cesty:

- Blokáda adenosinových receptorů,

- Blokáda fosfodiesteráz,
- Účinek na iontové kanály [12].

1.4.1 Blokáda adenosinových receptorů

Existují 4 adenosinové receptory: A_1 -, A_{2A} -, A_{2B} - a A_3 -. Lidské A_3 -adenosinové receptory jsou na kofein jen velmi málo citlivé, a proto na ně nepůsobí. Adenosin je na zbylých 3 receptorech důležitým antagonistou [12].

Adenosinový receptor A_1 - je především v mozku, míše, varlately, srdci a v nervových zakončeních autonomních nervů. Receptor A_{2A} - je přítomen hlavně v srdci, mozku, plicích a slezině. Receptor A_{2B} - se nachází v tlustém střevě a močovém měchýři. Receptor A_3 - je přítomný v plicích, játrech, mozku, varlately a v srdci [13].

Kofein je různě afinitní k různým receptorům, a tak má odlišný dopad na tkáň v závislosti na úrovni exprese a typu adenosinových receptorů [13]. A_1 - a A_{2A} - adenosinové receptory váží adenosin lépe než receptory A_{2B} - a A_3 - [14]. Ačkoliv je kofein více afinitní k receptoru A_{2A} -, významnější akutní účinky má při působení na receptor A_1 -. Chronická konzumace kofeinu ale může vést k toleranci A_1 -receptoru, takže převládá působení na receptor A_{2A} - [13]. Kofein se naváže na adenosinový receptor buňky místo adenosinu, jelikož má velmi podobnou strukturu. Jeden z projevů vazby kofeinu na adenosinové receptory místo adenosinu je, že cévy mozku působením kofeinu vazokonstrikují, jelikož je zablokována schopnost adenosinu je rozšířit. Zúžení cév může zabránit vaskulárním bolestem hlavy. Tento účinek je důvodem, proč některé léky na bolest hlavy kofein obsahují [9].

Kofein dále způsobuje zvýšené vyplavování neuronů, což hypofýza vnímá jako stav nouze. Hypofýza uvolní hormony, které způsobí produkci adrenalinu. Adrenalin má na tělo několik účinků: rozšíření dýchacích cest, zrychlená srdeční aktivita, stoupá krevní tlak, játra uvolňují cukr do krevního řečiště pro získání další energie atd [9]. V CNS má kofein stimulační účinky – zvyšuje stav bdělosti, snižuje únavu, zlepšuje náladu apod. Konzumace kofeinu v malých dávkách ovšem nevyvolává srdeční arytmie ani u zdravých, ani u nemocných pacientů. Kofein užívaný pravidelně vyvolá toleranci k většině běžných účinků. Může dojít i k závislosti, která se po vysazení projevuje abstinenčními příznaky. Mezi ně patří bolest hlavy, únava, ospalost, úzkost, neklid atd. Závažnost se odvíjí na množství konzumovaného kofeinu [15].

1.4.2 Blokáda fosfodiesteráz

Fosfodiesterázy jsou skupinou enzymů, které hydrolyzují cyklické nukleotidy. Tyto nukleotidy mají klíčovou roli při regulaci intracelulární hladiny druhého messengeru – cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) – tím regulují i buněčné funkce [12]. Např. mnoho hormonů a neurotransmiterů neprochází buněčnou membránou, a tak svou funkci vykonávají prostřednictvím druhých posílů. V případě, že kofein zastaví rozklad cAMP, jeho účinek v těle se zesílí. V srdci tato reakce vybízí noradrenalin a adrenalin ke zvýšení rychlosti a síly svalových kontrakcí. Dochází tak ke zrychlení tepové frekvence a zvýšení krevního tlaku [13]. Kofein zvyšuje koncentraci cAMP inhibicí fosfodiesterázových enzymů v kosterní a tukové tkáni. To podporuje lipolýzu prostřednictvím hormonu HSL (hormon senzitivní lipáza). Dochází k uvolnění volných mastných kyselin a glycerolu, jejichž zvýšená dostupnost v kosterním svalu působí jako úspora spotřeby svalového glykogenu [12].

Kofein je považován za slabý a neselektivní inhibitor fosfodiesterázy a vyžaduje koncentrace vyšší než 20 mM, aby došlo k významnější inhibici [12].

1.4.3 Účinek na iontové kanály

Změna intracelulární koncentrace Ca^{2+} často vyvolává účinek různých neurotransmiterů a hormonů. Zvýšení koncentrace vyžaduje aktivaci specifických kanálů. Jeden z těchto kanálů je citlivý na kofein. Mobilizace Ca^{2+} vyvolaná kofeinem způsobí kontrakci pruhovaných i hladkých svalů. Kofein také ovlivňuje Ca^{2+} v endokrinních, exogenních nebo nervových buňkách, což vede například ke zvýšené sekreci katecholaminů [16].

Kofein tedy působí na cyklický ADP-ribóza-senzitivní kanál (také zvaný ryanodin – senzitivní kanál), uvolňující vápník. Tím způsobuje uvolňování intracelulárního vápníku ze skladového místa v sarkoplazmatického retikula svalu, endoplazmatického retikula svalu i dalších buněk včetně neuronálních. Významné množství uvolněného vápníku vyžaduje koncentraci kofeinu vyšší než 1 mM [14].

Kofein blokuje také benzodiazepinové receptory – má v souvislosti s nimi slabé antagonistické receptory. Tento mechanismus vyžaduje velmi vysoké koncentrace kofeinu. Interakce mezi kofeinem a benzodiazepinovými receptory je pravděpodobně zprostředkována účinkem kofeinu na adenosinové receptory [9].

1.5 Fyziologické účinky kofeinu

1.5.1 Obecná toxicita kofeinu

Šálek kávy obsahuje asi 60–120 mg kofeinu a za přiměřené denní množství se uvádí 300 mg kofeinu (přibližně tři šálky). Vyšší denní dávka může vést k nervosvalové podrážděnosti, poruchám trávení, třesu, neklidu nebo nespavosti. Každodenní užívání dávky kofeinu vyšší než 500 mg (4–7 šálků kávy nebo 7–9 šálků čaje), představuje významné zdravotní riziko. Velká spotřeba může vést ke kofeinismu – syndrom charakterizovaný rozsahem nežádoucích účinků jako je neklid, úzkost, podrážděnost, svalový třes, nespavost, bolesti hlavy, zvýšená diuréza, gastrointestinální a kardiovaskulární potíže. Vyšší příjem kofeinu (nad 400 mg za den) u žen může vést k nestabilitě detruzoru (sval podílející se na vyprazdňování močového měchýře). Ženám, které na nestabilitu detruzoru trpí, i malý příjem kofeinu (200-400 mg za den) může působit komplikace [17].

Akutní otrava se může projevit úzkostmi, zrychleným pulsem, nespavostí, neklidem apod. K chronické otravě dochází při dlouhodobějším užívání většího množství látek s kofeinem. U chronické otravy dochází k poruchám trávení, nechutenství, trvalému neklidu nebo nesoustředěnosti [17].

Smrtná dávka kofeinu je 150 mg/kg, což je asi 10 g pro dospělého člověka při orálním požití. Smrt kvůli předávkování se kofeinem není běžná a bylo zaznamenáno jen několik málo případů [2].

1.5.2 Kardiovaskulární efekty

Dávka kofeinu nad 250 mg na osobu vyvolává zvýšení systolického tlaku (o 5–15 mmHg) anebo diastolického tlaku (o 5–10 mmHg). Nejvýraznější je efekt u starších lidí, u lidí s vysokým krevním tlakem a u lidí, kteří normálně kofein neužívají. Momentálně dostupná data uvádějí, že mírný příjem kofeinu – 4 a méně šálků kávy za den (nebo méně než 400 mg kofeinu za den) neovlivňuje kardiovaskulární zdraví [8].

1.5.3 Vliv kofeinu na těhotenství a vývoj plodu

Vliv kofeinu na průběh těhotenství a vývoj plodu do značné míry závisí na příjmu matky a také na rychlosti metabolismu kofeinu v těle matky. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a Americký lékařský institut doporučují omezení kofeinu pod 200 mg/den [18].

Běžně se proto doporučuje omezit příjem kofeinu u těhotných a kojících žen, jelikož kofein prochází placentou a je i vylučován do mateřského mléka. Účinky malého množství kofeinu na kojence a děti jsou však malé a obvykle neškodné. Epidemiologické studie prokázaly, že kofein nemá nepříznivý účinek na plodnost, předčasné narození, nízkou porodní hmotnost nebo na vrozené malformace [9].

1.5.4 Kofein a spánek

Zvýšení bdělosti je vlastnost kofeinu, kvůli které ho lidé denně konzumují. Přirozená denní spotřeba kofeinu je nejvyšší mezi 8 a 12 hodinou ranní. Vysoká citlivost spánku na kofein se odráží ve zvýšené funkční aktivitě mozku. Kofein také může snižovat dostupnost serotoninu na postsynaptických receptorových místech, což ovlivňuje spánkové a motorické funkce [19].

Kofein užívaný před spaním může tedy mít vliv na kvalitu spánku. Dávka 400 mg kofeinu užitého i 6 hodin před spaním může spánek zkrátit o více než hodinu. Pokud se tato ztráta spánku vyskytuje po více nocí, může mít škodlivé účinky na denní funkci organismu. Kofein by se tedy neměl konzumovat od 17:00 hodin [20].

Ovlivnění spánku kofeinem je velmi individuální kvůli několika faktorům, jako například – genetická variabilita, věk, obvyklý příjem kofeinu nebo čas požití [21]. Části konzumenti kofeinu tak hlásí poruchy spánku méně než jedinci, kteří kofein užívají zřídka, což naznačuje vývoj tolerance efektu kofeinu na spánek [17].

1.5.5 Kofein a *diabetes mellitus* druhého typu

Cukrovka neboli diabetes je onemocnění, ke kterému dochází, pokud slinivka břišní není schopná vyrábět inzulín nebo pokud tělo inzulín neumí využívat. V roce 2019 žilo s diabetem obou typů 463 milionů dospělých [22].

Inzulín je peptidový hormon vylučovaný β buňkami Langerhansových ostrůvků, který udržuje normální hladinu glukózy v krvi, a to pomocí usnadnění absorpce buněčné glukózy, regulací metabolismu uhlohydrátů, lipidů a proteinů [23]. Neschopnost produkovat inzulín nebo ho využívat vede k hyperglykémii – zvýšené hladiny glukózy v krvi. Dlouhodobě vysoké hladiny glukózy jsou spojené s poškozením těla a selháním různých orgánů nebo tkání [22].

Diabetes druhého typu představuje přibližně 90 % všech případů diabetu. Obvykle se vyznačuje inzulínovou rezistencí, kdy tělo na inzulín zcela nereaguje. Diabetes druhého typu je nejčastěji diagnostikován u starších dospělých, ale je stále častěji pozorován u dětí, adolescentů a mladších dospělých v důsledku rostoucí úrovně obezity, fyzické nečinnosti a špatné stravy [22].

Vysoká spotřeba kávy je spojena s lepší glukózovou tolerancí a podstatně nižším rizikem diabetu druhého typu. Konzumace pěti nebo více šálků kávy za den je trvale spojena s nižším rizikem diabetu typu 2 [24].

Káva ovlivňuje sekreci gastrointestinálního traktu peptidy glukagon-like peptid-1 a polypeptidem inhibující žaludek (GIP), které snižují glukózu vstřebáváním v tenkém střevě. Další možný mechanismus je přímá stimulace pankreatických buněk kofeinem a teofylinem [25].

1.5.6 Kofein a Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění mozku, zapříčiněné selháváním neuronů produkujících dopamin v oblasti mozku, která se nazývá *substantia nigra*. Dopamin je neurotransmiter, který je zásadní při odesílání signálu z mozku k přímému pohybu svalů a koordinaci. Parkinsonova choroba má tedy za následek progresivní ztrátu koordinace. Progrese nemoci je poměrně pomalá, symptomy jsou obvykle viditelné po ztrátě asi 70 až 80 % nervových buněk [26]. Mezi nejběžnější motorické příznaky patří třes, ztuhlost nebo rigidita svalů a zpomalení pohybu zvané bradykineze [27].

Léčba Parkinsonovy choroby se provádí pomocí medikamentů, mezi které patří i dopaminergní léky. Mezi tyto léky řadíme prekurzor dopaminu levodopa, který se označuje jako L-dopa. Tento lék se v těle metabolizuje na dopamin a nahrazuje tak jeho nedostatek. Mezi vedlejší účinky tohoto léku patří nechutenství, nevolnost nebo zvracení. L-dopa se používá až při pokročilejším stádiu nemoci, jelikož se jeho účinek po čase používání snižuje [28].

Velký potenciál v léčbě Parkinsonovy choroby mají antagonisté receptoru A_{2A}. Antagonisté nejen snižují svalovou ztuhlost, ale i zesilují účinek L-dopa, což může umožnit snížit dávky léků a tím zpomalit vedlejší účinky léčby [29].

Pití kávy proto bylo spojeno se sníženým rizikem rozvoje Parkinsonovy choroby, jelikož kofein má schopností blokovat A_{2A}- receptory – je jejich antagonistou díky podobné struktuře molekuly adenosinu a kofeinu [29].

1.6 Kofein a doping

Kofein se kromě potravin a nápojů vyskytuje uměle i v doplňcích stravy a ve volně prodejných lécích [30]. Kvůli dostupnosti je užívání kofeinu ve sportu poměrně rozšířené, a to díky jeho ergogenním účinkům. Kofein svůj ergogenní účinek projevuje pomocí několika mechanismů – jako antagonist adenosinu na adenosinových receptorech, což vede k rychlejšímu uvolňování neurotransmiterů, díky stimulaci sekrece adrenalinu, zvyšováním uvolňování buněčných iontů a snížením vnímání bolesti [31].

Zlepšení výkonu po požití kofeinu se mezi jednotlivci velice liší. Ergogenita kofeinu může být rozdílná především kvůli genetice, mikrobiomu a různým návykům na kofein [30].

Doporučuje se 3-9 mg/kg kofeinu přibližně 60 minut před cvičením. Předpokládá se, že vyšší dávky nemají větší účinek [31]. Mezi nevýhody požití kofeinu se uvádí nervozita a nespavost. Proto větší dávka než 9 mg/kg může vést k vedlejším účinkům, které převáží nad výhodami [30]. Požití kofeinu ve formě kávy je v podstatě neúčinné při porovnání dopingu čistým kofeinem. Příbuzné sloučeniny kofeinu, jako je například teofylin, jsou také ergogenními látkami [32].

Kofein byl až do roku 2004 na Seznamu zakázaných látek, nyní je v Monitorovacím programu Světové antidopingové agentury. Kontroluje se jeho koncentrace v moči po soutěži. Od roku 2004, tedy od odstranění kofeinu ze Seznamu, jsou koncentrace ve vzorcích větší – v roce 2004 byla střední koncentrace kofeinu ve vzorku moči 0,70 µg/ml, v roce 2015 se hodnota zvýšila na 0,85 µg/ml. Zároveň se zvýšilo procento vzorků s detekovatelnou hranicí 0,1 µg/ml kofeinu v moči z 70,1 % (rok 2008) na 75,7 % (rok 2015) [30].

1.7 Kofein v kosmetice

Kofein je v kosmetice čím dál častěji využíván díky vysoké biologické aktivitě a schopnosti proniknout pokožkou. Kofein je využíván jako účinná látka v přípravcích proti celulitidě, jelikož brání nadměrnému hromadění tuku v buňkách. Má také silné antioxidační účinky, pomáhá chránit buňky před UV zářením a tím zpomaluje proces předčasného stárnutí

kůže. Zvyšuje také mikrocirkulaci krve v kůži a také stimuluje růst vlasů inhibicí aktivity 5α -reduktázy [33].

1.7.1 Anti-celulitidní vlastnosti kofeinu

Celulitida je porucha zahrnující mikrocirkulační a lymfatický systém, extracelulární matrix a přítomnost nadměrného podkožního tuku, který se vyboulí do dermis. Celulitida se vyskytuje především na dolních končetinách, v pánevní oblasti nebo na břiše u žen a vyznačuje se vzhledem ‚pomarančové kůry‘. Přibližně 80 % žen ve věku nad 20 let určitým stupněm celulitidy trpí [34].

Lipázy umístěné na membráně adipocytů mohou být aktivovány nebo inhibovány katecholaminy (např. noradrenalin a adrenalin) a hormony (např. inzulín, glukagon a adrenokortikotropin) [33]. Kofein může ovlivnit vylučování katecholaminů, které aktivují HSL v procesu lipolýzy což vede k degradaci TAG a podílí se tak na redukcii celulitidy [33]. Výsledky publikované Roure a kol. [35] ukázaly, že kofein mírně stimuloval uvolňování glycerolu v milimolárních koncentracích.

Běžně dostupné kosmetické přípravky obsahují 3 % kofeinu. Přípravky s vyšší koncentrací vyžadují velké množství povrchově aktivních látek nebo alkoholu (kvůli nižší rozpustnosti ve vodě), a tak jejich použití může vést k podráždění kůže [36]. Korejská studie [36] zkoumala účinek zeštíhlujícího krému obsahujícího 3,5 % ve vodě rozpustného kofeinu, s malým obsahem povrchově aktivních látek, který vykazoval lipolytické účinky prostřednictvím inhibice fosfodiesterázy a indukci cAMP v adipocytech. Kofein tedy proniknul kožní bariérou a dosáhl dermis, ve které dochází k vyboulení tuku. U žen došlo k redukcii celulitidy bez podráždění kůže.

1.7.2 Antioxidační účinky kofeinu

Vystavování se UV záření může představovat až 80 % viditelných známek stárnutí kůže – vrásky, zhoršená pigmentace nebo suchý vzhled. Lidé jsou vystavováni UV záření především v důsledku nechráněného vystavení kůže slunečnímu záření [37].

UV paprsky urychlují stárnutí kůže, snižují syntézu prokolagenu, ovlivňují vlákno kolagenu a tím snižují pružnost pokožky, způsobují expanzi a praskání krevních cév kůže, stimulují tvorbu vrásek a skvrn a v extrémních případech mohou vést k rakovině kůže. UV záření zvyšuje produkci volných radikálů [33].

Kofein přidaný do kosmetických přípravků na ochranu proti slunci zvyšuje ochranný účinek proti UV záření, snižuje tvorbu volných radikálů v kožních buňkách a může být užitečný při prevenci rakoviny kůže vyvolané UV zářením [33].

1.7.3 Efekt kofeinu na růst vlasů

5α -reduktáza je enzym, který převádí testosteron na účinnější formu dihydrotestosteron (DHT), který je zodpovědný za plešatost. Obzvláště citlivé na DHT jsou vlasové folikuly. DHT vede ke zkrácené anagenní fázi (fáze, kdy vlasový váček produkuje vlasové vlákno) růstového cyklu vlasů. Většina vlasů přechází do telogenní fáze vlasů – fáze klidu až do vypadnutí vlasu. Nově rostoucí vlasy jsou tenčí a kratší a po několika cyklech růstu přestávají vlasy růst. Kofein inhibuje aktivitu 5α reduktázy a tím umožňuje obnovenou fázi růstu vlasů [33].

2 STANOVENÍ KOFEINU

Pro separaci a následné stanovení kofeinu ve vzorcích biologických, ale i rostlinných nebo potravinových se používají různé analytické metody. Používá se např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) vybavená různými typy kolon a detekčními systémy, plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem nebo s plamenovým ionizačním detektorem (GC – MS/FID), iontová chromatografie (IC), spektrofotometrie v UV/Vis oblasti (Uv-Vis), infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FT-IR), blízká infračervená (NIR) spektroskopie, kapilární elektroforéza, nukleární magnetická rezonance, potenciometrie nebo voltametrie. Nejpoužívanější technikou využívanou pro stanovení stopových hladin kofeinu je plynová chromatografie, zejména díky své jednoduchosti, úspoře času a činidel [38].

Ve většině metod je přímá analýza kofeinu ve vzorcích omezená kvůli nedostatečné citlivosti. K izolaci kofeinu je tedy potřeba nutný krok zakoncentrování. K separaci se používá např. extrakce rozpouštědlem, extrakce nadkritickou tekutinou (SFE), ultrazvuková extrakce, Soxhletova extrakce, extrakce tuhou fází (SPE) nebo sloupcová chromatografická extrakce (CCE) [38].

Tato práce je zaměřena především na studie, které upravují vzorek před analýzou pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny a extrakce nebo mikroextrakce tuhou fází a analyzují kofein v biologických vzorcích pomocí HPLC, popř. GC.

2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (zkráceně HPLC) je soubor metod různých mechanismů separace, pro něž je společné použití kapalně mobilní fáze, vysokotlaké techniky a účinných kolon [39]. Princip separace je založen na separaci látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie umožňuje analýzu tepelně nestabilních nebo netěkavých látek a polymerů [40].

Metody HPLC lze rozdělit na systém kapalina – tuhá látka, mezi které řadíme chromatografii na polárních i nepolárních adsorbentech, na chemicky vázaných fázích, na gelovou chromatografii a chromatografii iontově výměnnou. Další rozdělení je na systém kapalina – kapalina, který používá kapalnou stacionární fází zakotvenou na inertním nosiči [39].

Použitím kolon s jemnými částicemi, velkým průtokem mobilní fáze a použitím vysokotlakých čerpadel (které zajišťují konstantní průtok) se dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti této metody [39].

Kolony, které se pro HPLC používají, se zhotovují z materiálu, který odolává vysokým tlakům. Nejčastěji se používá borosilikátové tvrzené sklo nebo antikorozi ocel. Délka kolon bývá 5-50 cm o vnitřním průměru 2–4 mm a jsou plněny sorbenty s částicemi velikosti 3–10 μm [39].

Detektory pro HPLC musí splňovat několik požadavků:

- Vysoká citlivost – detekce látek v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$,
- Reprodukovatelnost a linearita odezvy,
- Univerzálnost – detekce všech oddělených složek vzorku. Mezi nejpoužívanější detektory se řadí – refraktometrický, konduktometrický, ultrafialový, fluorimetrický, amperometrický anebo hmotnostní spektrometrie [40].

2.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny je metoda založená na přenosu stanovované látky z jedné kapalně fáze do druhé kapalně fáze. Obě fáze jsou vzájemně nemísitelné. Složka se z analyzovaného roztoku – nejčastěji z vodné polární fáze, převádí do nepolární fáze – organického rozpouštědla. V organickém rozpouštědle se izolovaná složka stanoví přímo, např. spektrofotometricky [40].

Jako organická rozpouštědla se nejčastěji používají benzen, chloroform, butanol, isoamylalkohol apod. [39]. Nejjednodušší provedení je vytřepání v dělicí nálevce [40].

Cíle studií

Cíle analýzy kofeinu pomocí extrakce kapalina-kapalina a následné HPLC detekce v biologických vzorcích mohou být různé. Např. Bendriss a kol. [41] se ve své studii zaměřili na analýzu kofeinu a jeho metabolitů k zjištění aktivity různých izoform cytochromu P450. V této studii byly zkoumány CYP1A2, CYP2A6, xantinová oxidáza a *N*-acetyltransferáza. Studie Ventury a kol. [42] je zaměřená na stabilitu kofeinu v moči, jakožto dopingové látky. Zaměřili se na systémové hodnocení vzorku moči poté, co byla vystavena různým teplotním podmínkám, ke kterým dochází při analyzování v dopingových kontrolách. Martínez-López a kol. [43] detekovali kofein a jeho metabolity v plazmě i v moči 12 zdravých dobrovolníků

po vypití 250 ml vody obsahující 3,5 g praženého rozpustného zeleného kávového zrna. Cílem studie Alvi a kol. [44] bylo stanovení koncentrace kofeinu v plazmě s ověřením za použití syntetické plazmy, která neobsahovala žádné látky, které by s kofeinem mohly interferovat.

Experimentální objekty

Ve studii Bendrisse a kol. [41] vzorky poskytlo 10 lidí ve věku 22 až 60 let, 7 mužů a 3 ženy. Všichni účastníci studie byli pravidelní příjemci kofeinu a nekuřáci. Každý účastník byl požádán, aby odebral moč po 5 hodinách od vypití běžného šálku kávy. Moč byla okyselená koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 3-4 a skladována při -20 °C až do doby analýzy.

Martínez-López a kol. [43] ve studii použili vzorky 12 lidí – 7 mužů a 5 žen. Dobrovolníci byli ve věku 18-45 let, všichni byli zdraví, bez chronických obtíží, nekuřáci, 6 měsíců před studií nepožívali žádné doplňky stravy a žádná z žen nebyla těhotná. 3 dny před studií byli dobrovolníci požádáni, aby nekonsumovali kávu, kakao, čokoládu, čaje nebo jiné nápoje s obsahem yerba mate a kofeinu. Po nočním půstu se dobrovolníkům odebrala krev do zkumavky s EDTA. Následně bylo rozpuštěno 3,5 g rozpustného zeleného praženého kávového zrna v 250 ml horké vody. Tento obsah museli dobrovolníci vypít do 5 minut. Vzorky krve byly znovu odebrány po 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10 a 12 hodinách po požití kofeinu a byly ihned zcentrifugovány při 3000 ot/min a 4 °C po dobu 10 minut. Zároveň s odběrem krve byla odebrána i moč. První odběr byl 2 hodiny před podáním kofeinu a následně v rozmezí 2 hodin po podání, 2-5 hodin po, 5-8 hodin po, 8-12 hodin po a 12-24 hodin po podání kofeinu. Vzorky krve byly rozděleny a zmrazeny na -80 °C, vzorky moči byly rozděleny a zmrazeny na -20 °C.

Alvi a kol. [44] získali vzorky plazmy od zdravých dobrovolníků, kteří 16 h před začátkem nepožili žádný kofein a následně dostali perorální jednorázovou dávku 300 mg kofeinu. Plazma byla odebírána do heparizované polypropylenové zkumavky a centrifugována při 3500 ot/min a 20 °C po dobu 10 minut. Supernatant plazmy byl opatrně odebrán do polypropylenových zkumavek a zmrazen na -20 °C a analyzován nejpozději do 6 týdnů.

Ventura a kol. [42] tyto údaje ve studii neuvádí.

Příprava vzorků

Uvedené studie analyzující kofein používají jako biologické vzorky především plazmu a moč. Jako vnitřní standardy byly použity *N*-acetyl-*p*-aminofenol [41], 7-ethylteofylin [42] nebo antipyrin [44]. Jako extrakční směsi byly použity směsi chloroform/isopropylalkohol [41] a chloroform/2-propanol [42]. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí HPLC s UV detekcí v rozmezí vlnových délek od 274 nm do 289 nm. Tyto údaje jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 Souhrn přípravy vzorků jednotlivých studií

Studie	Typ vzorku	Vnitřní standard	Extrakční směs	Analýza
Bendriss a kol. [41]	Moč	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -aminofenol	Chloroform/isopropylalkohol	HPLC/UV
Ventura a kol. [42]	Moč bez kofeinu Sterilní moč Nesterilní moč	7-ethylteofylin	Chloroform/2-propanol	HPLC/UV
Martínez-Lopéz a kol. [43]	Plazma Moč	Neuveden	Extrakce neprovedena	HPLC/UV
Alvi a kol. [44]	Syntetická plazma Lidská plazma	Antipyrin	Extrakce neprovedena	HPLC/UV

Výsledky studií

Bendriss a kol. [41] hodnotili aktivitu enzymů CYP1A2, CYP2A6, *N*-acetyltransferázy (NAT2) a xantin oxidázy (XO) u 10 dobrovolníků. Enzymatické aktivity byly hodnoceny molárním poměrem v moči (AFMU + 1X + 1U) / 17U pro CYP1A2, 17U / (AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U) pro CYP2A6, AFMU / (AFMU + 1X + 1U) pro NAT2 a 1U / (1X + 1U) pro XO, kde AFMU je 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil, 1U je kyselina 1-methylurová, 1X je 1-methylxanthin, 17U je 1,7-dimethylurová kyselina a 17X je 1,7-dimethylxanthinu. Výsledky aktivit enzymů jsou uvedeny v Tabulce 2 [41]. Nejvyšší aktivitu vykazuje enzym CYP1A2.

Po perorální dávce kofeinu se v moči vylučuje nejméně 14 metabolitů kofeinu. Metabolity jsou systematicky extrahovány směsí chloroformu a isopropylalkoholu, které se k extrakci z kapaliny do kapaliny běžně používají. Chromatografická metoda použitá v této studii umožňuje stanovení kofeinu a jeho 14 metabolitů v jednom měření. Jelikož jsou

metabolické dráhy kofeinu na sobě navzájem závislé, může změna exprese aktivity jednoho enzymu vyžadovat současné stanovení aktivity dalších enzymů. Proto metoda Bendrisse a kol. [41] která měří enzymy CYP1A2, CYP2A6, NAT2 a XO může přispět ke zjednodušení a optimalizaci testů enzymů metabolizujících kofein.

Tabulka 2 Aktivita vybraných enzymů ze studie Bendrisse a kol. [40]

Dobrovolník	CYP1A2	CYP2A6	NAT2	XO
1	7,52	0,11	0,66	0,61
2	6,24	0,13	0,69	0,53
3	5,03	0,15	0,18	0,51
4	7,21	0,11	0,67	0,59
5	42,86	0,02	0,12	0,94
6	5,51	0,13	0,71	0,56
7	7,14	0,09	0,21	0,48
8	3,46	0,18	0,13	0,38
9	4,50	0,17	0,67	0,53
10	11,14	0,08	0,35	0,61

Ventura a kol. [42] získali údaje z různých způsobů testování stability kofeinu v moči. V Tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty koncentrace kofeinu v moči při různých teplotách skladování, kdy počáteční koncentrace kofeinu byla 14,33 µg/ml pro nesterilní vzorek a 13,84 µg/ml pro sterilní vzorek. Hodnota všech koncentrací je víceméně shodná, a to při všech různých teplotách skladování, což dokazuje stabilitu kofeinu. V Tabulce 4 jsou zaznamenány výsledky analýzy nesterilní moči. Na Obrázku 5 je znázorněna koncentrace vzorku moči po 3 cyklech rozmražení a opětovného zmražení [42].

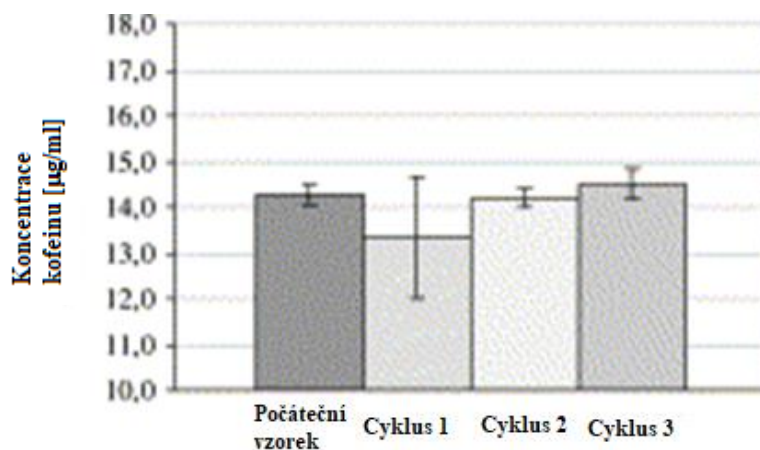
Studie prokázala, že kofein je stabilní ve sterilních i nesterilních vzorcích. Kofein je stabilní i při skladování nesterilních vzorků při -20 °C, což jsou nejběžnější podmínky skladování [42].

Tabulka 3 Výsledky analýzy sterilního vzorku moči dle Ventury a kol. [42]

Lyofilizovaná moč 4 °C	Sterilní tekutá moč				Nesterilní tekutá moč -20 °C
	4 °C	-20 °C	-40 °C	-80 °C	
Průměr [μg/ml]	Průměr [μg/ml]	Průměr [μg/ml]	Průměr [μg/ml]	Průměr [μg/ml]	Průměr [μg/ml]
13,64 ± 0,19	12,84 ± 0,30	13,59 ± 0,25	13,61 ± 0,16	13,41 ± 0,20	13,73 ± 0,09
13,01 ± 0,15	13,74 ± 0,22	13,52 ± 0,21	13,19 ± 0,14	13,39 ± 0,21	13,94 ± 0,17
13,67 ± 0,21	13,53 ± 0,51	13,98 ± 0,14	13,84 ± 0,21	13,95 ± 0,12	14,17 ± 0,80
12,83 ± 0,18	13,01 ± 0,10	13,21 ± 0,17	13,33 ± 0,13	13,30 ± 0,11	13,94 ± 0,15
13,65 ± 0,13	13,91 ± 0,13	13,80 ± 0,11	13,89 ± 0,10	14,03 ± 0,08	13,84 ± 0,29
13,05 ± 0,07	13,32 ± 0,30	13,22 ± 0,20	13,35 ± 0,13	13,00 ± 0,05	13,23 ± 0,14
13,56 ± 0,63	14,00 ± 0,03	13,49 ± 0,21	13,44 ± 0,69	13,81 ± 0,15	13,78 ± 0,39

Tabulka 4 Výsledky analýzy nesterilní moči dle Ventury a kol. [42]

Den	Průměr [μg/ml]
3	13,20 ± 0,64
7	12,89 ± 0,52



Obrázek 5 Graf koncentrací po opakovaném zmražení a rozmražení [41]

Martínez-López a kol. [43] analyzovali 11 methylxantinů pomocí HPLC-DAD s minimální přípravou vzorku. Martínez-López a kol. [43] se ve studii rozhodli pracovat s okyselenými vzorky plazmy. Proto k precipitaci proteinů využili kyselinu chloristou místo běžně používaných organických rozpouštědel. Vzorky moči nebyly před analýzou extrahovány, kvůli minimální přípravě vzorku a tím zrychlení času celkové analýzy. Hodnoty koncentrací jednotlivých metabolitů jsou uvedeny v Tabulce 5.

Kofein je rychle absorbován a primárně metabolizován paraxantinovou cestou, což vede k tvorbě paraxantinu jako hlavního metabolitu v plazmě společně s 1-methylxantinem a kyselinou 1-methylurovou. Hlavní metabolit kofeinu v moči je kyselina 1-methylurová. Po konzumaci zeleného / praženého kávového produktu byla pozorována rychlá absorpce, metabolizace a vylučování kofeinu a jeho odvozených methylxantinů a methylurových kyselin [43].

Tabulka 5 Výsledky analýzy kofeinu a jeho metabolitů dle Martínez-Lópeze a kol. [43]

	Plazma	Moč
Metabolit	c [$\mu\text{mol/l}$]	c [$\mu\text{mol/l}$]
Kofein	10,50 \pm 2,42	4,12 \pm 1,57
Paraxantin	3,36 \pm 0,55	12,56 \pm 4,39
Teobromin	0,51 \pm 0,08	9,23 \pm 4,49
Teofylin	0,39 \pm 0,21	1,16 \pm 0,80
1-methylxantin	1,27 \pm 0,35	19,47 \pm 9,61
3-methylxantin	nedetekován	7,39 \pm 5,98
7-methylxantin	0,26 \pm 0,05	11,98 \pm 6,41
Kyselina 1-methylurová	1,44 \pm 0,57	150,25 \pm 34,77
1,3-methylurová kyselina	nedetekován	1,76 \pm 0,53
1,7-methylurová kyselina	0,06 \pm 0,04	7,64 \pm 2,10
Kyselina 1,3,7-trimethylurová	nedetekován	1,30 \pm 0,71

Alvi a kol. [44] uvedli, že popsaná metoda poskytuje citlivé a přesné měření hladiny kofeinu v lidské plazmě a je tak možná pro použití v terapeutickém rozmezí. V Tabulce 6 jsou uvedeny výsledné koncentrace kofeinu v lidské i syntetické plazmě z pěti opakování v porovnání s kontrolou kvality při nízké koncentraci (0,15 $\mu\text{g/ml}$), s kontrolou kvality při střední koncentraci (10 $\mu\text{g/ml}$) a s kontrolou kvality při vysoké koncentraci (18 $\mu\text{g/ml}$).

Tabulka 6 Výsledky analýzy dle Alvi a kol. [44]

Koncentrace standardu [$\mu\text{g/ml}$]	Lidská plazma	Syntetická plazma
Opakovatelnost	Průměrná koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Průměrná koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]
0,15	0,15 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01
10,00	10,14 \pm 0,39	10,07 \pm 0,39
18,00	18,69 \pm 0,59	18,58 \pm 0,59
Reprodukovatelnost		
0,15	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01
10,00	10,22 \pm 0,36	10,15 \pm 0,36
18,00	18,48 \pm 0,62	18,38 \pm 0,62

Shrnutí

Kofein je nejčastěji stanovován v krvi nebo plazmě. Jeho analýza není rutinním vyšetřením, vyšetřuje se ale např. ke zhodnocení aktivity enzymu metabolizujícího kofein CYP1A2 nebo při dopingové kontrole. Studie uvedené v této práci se zaměřovaly na experimentální analýzu kofeinu v biologických vzorcích. Kofein byl analyzovaný buď v krvi nebo moči po příjmu běžného šálku kávy [41], po příjmu rozpuštěného zeleného kávového zrna v horké vodě [43] nebo po perorální dávce kofeinu [44]. Extrakce kapalina-kapalina před samotnou analýzou byla provedena u dvou studií buď pomocí chloroform/isopropylalkoholu [41] nebo chloroform/2-propanolu [42]. Ve studiích Martínez-Lopéz a kol. [43] a Alvi a kol. [44] byl krok extrakce vynechán. Všechny analýzy byly provedeny pomocí HPLC s UV detekcí.

2.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází byla vynalezena jako alternativa k extrakci kapalina-kapalina. Princip je založen na rozdělení analytu mezi tuhou fází a kapalnou fází. V důsledku sorpce molekul zůstává vyšetřovaný analyt na tuhé fází. Velikost částic sorbentů je mezi 10-60 μm [45]. Nejčastěji mívá podobu stříkačky, zásobní kazety, pipety nebo jako 96-jamkové destičky [46]. Nejčastějším typem sorbentu je oxid křemičitý, díky jeho vhodnosti pro modifikaci a stabilitě. Typicky je oxid křemičitý spojen nepolárními řetězci jako C18 nebo C8 [45]. Extrakce může probíhat pod vakuem, tlakem nebo s využitím centrifugace [46].

2.3 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází byla vynalezena a poprvé popsána Pawliszynem a spolupracovníky v roce 1990. Principem této metody je sorpce složky vzorku na stacionární fází pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly. V tomto jednoduchém zařízení se dá kombinovat několik kroků přípravy vzorku v jednom. Extrakce a obohacení analytu je provedena v poloze vysunutého vlákna. Uvolnění analytů z vlákna probíhá v nástřikovém zařízení plynového chromatografu při vysunutém vláknu z jehly teplem. Tento postup lze opakovat s jedním zařízením několikrát [47].

Největší výhodou SPME je jednoduchost celé extrakce. Největší využití SPME má při analýze pomocí GC v enviromentálních analýzách a při analýze potravin [47].

Metodu SPME je možné využít jak pro kvalitativní analýzy, tak i kvantitativní. Důležitým krokem před vlastní extrakcí je zvolení vhodného typu vlákna a jeho tloušťku. Silnější vrstva umožňuje extrahovat větší množství analytu, což se nejčastěji využívá při analýze těkavějších látek. Nevýhodou silnější vrstvy je pak delší desorpce analytu. Zlepšení a zkrácení extrakce je možné docílit mícháním vzorku [48].

Cíle studií

SPE, resp. SPME se začala široce využívat pro vzorky biologických materiálů ve studiích s různými zaměřenými. Např. Kumazawa a kol. [49] extrahovali kofein a jeho metabolity teobromin, paraxantin a teofylin ze vzorků plné krve a moči pomocí mikroextrakce tuhou fází s vláknem potaženým Carbowax/divinylbenzenem s následnou analýzou na plynovém chromatografu. Cílem studie Georga a kol. [50] bylo analyzovat kofein a jeho metabolity pomocí HPLC. Metabolity kofeinu byly před samotnou analýzou extrahovány pomocí SPE se sorbentem obsahující hydrofilní *N*-vinylpyrrolidinu a lipofilní divinylbenzen místo běžně používaného sorbentu C18. Lopez-Sanchez a kol. [51] měli za cíl vyvinout analytickou metodu, která bude vhodná k přesnému měření koncentrace kofeinu a jeho metabolitů v malých objemech lidské plazmy. Kofein je totiž používán jako terapeutický lék pro apnoe u předčasně narozených dětí. Dávkovací režim je 10 mg/kg jako úvodní dávka a 2,5 mg/kg jako dávka udržovací. Dosažená koncentrace v plazmě po této dávce ale není vždy terapeuticky účinná. Aby byl dosažen terapeutický účinek, musí být koncentrace v plazmě 30 nebo 35 µg/l a vyšší. Metoda vyvinutá Lopez-Sanchezem a kol. [51] by mohla být využita k zjištění, proč jsou u novorozenců tyto rozdíly a zda nějak souvisí s prenatální expozicí kofeinu. Cílem studie Caubet a kol. [52] bylo stanovení metabolických poměrů kofeinu k hodnocení aktivity enzymu CYP1A2 u 20 dobrovolníků, kteří byli kuřáci a uživatelé antikoncepce.

Experimentální údaje

Pro studii Kumazawy a kol. [49] byli vybráni zdraví mužští dobrovolníci, kteří nekonzumovali potraviny a nápoje obsahující kofein a teobromin po dobu 6 dní před začátkem studie. Před měřením jim bylo podáno 200 ml čerstvě uvařené kávy obsahující 375 mg kofeinu nebo 200 ml kakaa s obsahem 53 mg kofeinu a 315 mg teobrominu. Krev a moč byla odebrána po 60 a 120 minutách po požití. Vzorky byly skladovány při 4 °C až do doby analýzy.

Lopez-Sanchez a kol. [51] využili k analýze 1 ml vzorku krve odebraného bezprostředně po dodání pupečnickové šňůry k analýze kofeinu v plazmě novorozenců a také venózního odběru matky. Vzorky byly odebrány do heparinizovaných zkumavek a centrifugovány po dobu 10 minut při 3500 ot/min a teplotě 10 °C. Plazmatický supernatant byl opatrně přenesen do dvou polypropylenových zkumavek a zmrazen na -60 °C.

Caubet a kol. [52] ke studii použili 20 dobrovolníků ve věku 18-45 let, kteří byli rozděleni do pěti skupin. Skupina A byli muži nekuřáci, skupina B muži kuřáci, skupina C ženy nekuřačky neužívající antikoncepci, skupina D ženy nekuřačky užívající antikoncepci a skupina E ženy kuřačky užívající antikoncepci. Účastníci 7 dní před studií neužívali žádné léky. Dobrovolníkům byla podána dávka kofeinu odpovídající jejich hmotnosti, která odpovídala 3 mg/kg. Dobrovolníkům byl odebrán vzorek moči těsně před testem a poté v rozmezí do 3 hodin od testu a od 3 až 6 hodin od testu. Takto odebrané vzorky byly skladovány při -20 °C až do doby analýzy.

Georg a kol. [50] tyto údaje ve studii neuvádí.

Příprava vzorku

Uvedené studie využívaly k analýze především krev a moč. Jako SPE, resp. SPME, sorbenty byly využity buď klasické C18 [52], ale i nové sorbenty jako např. aktivované 96-jamkové destičky se sorbentem Strata-X™ [51], Carbovax/divinylbenzen [49] nebo *N*-vinylpyrrolidinu/divinylbenzen [50]. Sorbenty byly před samotnou extrakcí aktivovány, a to methanolem a vodou. Jako vnitřní standardy byly použity pentifylin [49], paracetamol [50], 7-β-hydroxyethylteofylin [51] a β-hydroxyethylteofylin [52]. Následná analýza vzorku proběhla buď pomocí GC s dusíko-fosforovým detektorem (NPD) nebo HPLC s UV-Vis nebo detektorem diodového pole. Tyto údaje jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Souhrn přípravy vzorků

Studie	Typ vzorku	Vnitřní standard	SPE sorbent	Analýza
Kumazawa a kol. [49]	Plná krev Moč	Pentifylin	Carbovax/ divinylbenzen	GC/NPD
Georga a kol. [50]	Krevní sérum Moč	Paracetamol	<i>N</i> -vinylpyrrolidin/ divinylbenzen	HPLC/ UV-Vis
Lopez-Sanchez a kol. [51]	Plazma	7-β-hydroxyethylteofylin	Strata-X™	HPLC/ DAD
Caubet a kol. [52]	Moč	β-hydroxyethylteofylin	Sorbent C18	HPLC/ DAD

Výsledky

V Tabulce 8 jsou uvedené výsledky studie Kumazawy a kol. [49]. Jsou zde uvedené účinnosti extrakce vypočtené porovnáním extrahovaného množství látek z plné krve nebo moči s hodnotou neextrahovaných látek rozpuštěných v methanolu, které byly přímo analyzovány pomocí GC. Nízká účinnost extrakce je výsledkem rozdělení sloučenin mezi stacionární fázi vlákna SPME a roztoky vzorků. Nejvyšší množství v krvi i moči měl po extrakci paraxantin a teofylin.

Studie Kumazawy a kol. [49] je první studií používající SPME, která se zabývala analýzou methylxantinů v lidských tělních tekutinách. Metoda Kumazawy a kol. [49] je díky jednoduchosti, citlivosti a díky kvantitativním schopnostem doporučena pro extrakci methylxantinů z tekutin lidského těla například pro použití v klinické farmakologii.

Tabulka 8 Získané množství extrahovaných látek pomocí SPME - Kumazawa a kol. [49]

Krev			
Složka	Neextrahované množství [μg/ml]	Extrahované množství [ng/ml]	Účinnost extrakce [%]
Kofein	5,00	2,00 ± 0,17	0,040 ± 0,004
	1,00	0,47 ± 0,04	0,047 ± 0,004
Teobromin	30,00	3,23 ± 0,19	0,011 ± 0,001
	6,00	0,57 ± 0,05	0,010 ± 0,001
Paraxantin	30,00	10,40 ± 0,62	0,035 ± 0,002
	6,00	2,08 ± 0,07	0,035 ± 0,001
Teofylin	30,00	6,73 ± 0,47	0,022 ± 0,002
	6,00	1,15 ± 0,05	0,019 ± 0,001
Moč			
Složka	Přidané množství [μg/ml]	Extrahované množství [ng/ml]	Účinnost extrakce [%]
Kofein	2,50	5,71 ± 0,15	0,229 ± 0,006
	0,50	1,12 ± 0,07	0,225 ± 0,013
Teobromin	15,00	9,56 ± 0,42	0,064 ± 0,003
	3,00	1,48 ± 0,08	0,050 ± 0,003
Paraxantin	15,00	22,80 ± 0,90	0,152 ± 0,006
	3,00	4,69 ± 0,39	0,156 ± 0,013
Teofylin	15,00	21,30 ± 0,97	0,142 ± 0,006
	3,00	4,31 ± 0,25	0,144 ± 0,084

Účinnost SPME metody použitá Georgem a kol. [50] byla získána pomocí vzorků krevního séra a moči se třemi známými koncentracemi bez úpravy pomocí SPME a jejich porovnáním se získanými výsledky ze vzorků upravených pomocí SPME, kde každá hodnota

představuje průměr ze šesti měření. Výsledky studie jsou uvedené v Tabulce 9. Hodnoty extrahovaného množství jsou u jednotlivých metabolitů po úpravě pomocí SPME podobné, jako hodnoty získané bez SPME. Sorbent tedy vykazoval vysokou výtěžnost.

Popsaný způsob analýzy kofeinu a jeho metabolitů ve studii Geoga a kol. [50] je snadno použitelný pro jakoukoliv laboratoř. Sorbent obsahující hydrofilní *N*-vinylpyrrolidinu a lipofilní divinylbenzen použitý pro SPE vykazuje větší výtěžnost než běžně používané sorbenty C18. Tato metoda pokrývá rozsah koncentrací, které jsou potřebné k monitorování metabolitů kofeinu v biologických matricích.

Tabulka 9 Výťažky extrakce kofeinu a metabolitů po SPE dle Georga a kol. [50]

Analyzovaný metabolit	Sérum			Moč		
	Bez extrakce [ng]	S extrakcí [ng]	Účinnost extrakce [%]	Bez extrakce [ng]	S extrakcí [ng]	Účinnost extrakce [%]
Kyselina 7-methylurová	2,35	2,03 ± 0,09	86,4	2,35	2,11 ± 0,13	89,9
	9,4	9,11 ± 0,29	96,9	9,4	9,34 ± 0,35	99,4
	28,2	24,56 ± 1,15	87,4	28,2	25,83 ± 0,85	91,6
Kyselina 1-methylurová	2,5	2,25 ± 0,12	90,0	2,5	2,28 ± 0,12	91,2
	10	9,44 ± 0,14	94,4	10	9,73 ± 0,25	97,3
	30	28,82 ± 0,30	96,1	30	28,62 ± 1,61	95,4
7-methylxantin	2,43	2,18 ± 0,11	89,7	2,43	2,32 ± 0,08	95,5
	9,7	9,17 ± 0,34	94,5	9,7	8,91 ± 0,13	91,9
	29,1	28,77 ± 0,89	98,9	29,1	28,30 ± 0,14	97,2
3-methylxantin	2,6	2,51 ± 0,10	96,5	2,6	2,30 ± 0,06	88,5
	10,2	9,82 ± 0,34	96,3	10,2	9,64 ± 0,11	94,5
	30,6	31,05 ± 0,42	101,5	30,6	31,53 ± 0,07	103,5
1-methylxantin	2,63	2,47 ± 0,05	93,9	2,63	2,45 ± 0,12	93,2
	10,5	9,74 ± 0,45	92,8	10,5	9,41 ± 0,18	89,6
	31,5	29,91 ± 0,74	95,0	31,5	29,61 ± 0,61	94,0
1,3-dimethylurová kyselina	2,45	2,34 ± 0,10	95,5	2,45	2,22 ± 0,04	90,6
	9,8	9,37 ± 0,32	95,6	9,8	9,27 ± 0,19	94,6
	29,4	28,42 ± 0,28	96,7	29,4	25,74 ± 0,44	87,6
Teobromin	2,6	2,38 ± 0,08	91,5	2,6	2,20 ± 0,05	84,6
	10,2	9,79 ± 0,15	96,0	10,2	9,91 ± 0,41	97,2
	30,6	28,13 ± 0,15	91,9	30,6	28,79 ± 0,74	94,1
1,7-dimethylurová kyselina	2,4	2,22 ± 0,12	92,5	2,4	2,20 ± 0,07	91,7
	9,6	9,47 ± 0,21	97,9	9,6	9,19 ± 0,19	95,7
	28,8	29,36 ± 0,18	101,9	28,8	28,93 ± 0,70	100,4
Paraxantin	2,5	2,54 ± 0,08	101,6	2,5	2,44 ± 0,11	97,6
	10	9,47 ± 0,21	94,7	10	9,48 ± 0,30	94,8
	30	26,24 ± 0,43	87,5	30	25,74 ± 0,41	85,8
Teofylin	2,53	2,49 ± 0,10	98,4	2,53	2,30 ± 0,13	90,9
	10,1	9,88 ± 0,35	97,8	10,1	9,66 ± 0,40	95,6
	30,3	26,99 ± 0,86	89,1	30,3	26,20 ± 0,53	86,5
Kofein	2,5	2,39 ± 0,03	95,6	2,5	2,17 ± 0,11	86,8
	10	9,14 ± 0,34	91,4	10	8,80 ± 0,22	88,0
	30	30,57 ± 0,69	101,9	30	25,73 ± 0,47	85,8

V Tabulce 10 jsou uvedené hodnoty koncentrací kofeinu a jeho metabolitů v plazmě matky a v plazmě novorozenceho dítěte ze studie Lopez.Sancheze a kol. [51]. Kofein u matek byl prokázán v 85,2 %, u novorozenců v 78 %. Plazmatické koncentrace kofeinu u matek a novorozenců měly lineární vztah a nebyly pozorovány žádné rozdíly v analýze.

Metoda Lopez-Sancheze a kol. [51] použitá v této studii je vhodná pro použití u jedinců, u kterých je objem krve k extrakci vzhledem k tělesné hmotnosti omezen – jako jsou například novorozenci. Zároveň může být použita pro opakované odběry vzorků. K určení, zda plazmatická koncentrace kofeinu u dětí ovlivňuje terapeutickou účinnost léku používajících se pro léčbu apnoe, by byla potřeba obsáhlejší studie.

Tabulka 10 Rozdíly koncentrací v plazmě matky a novorozence - Lopez-Sanchez a kol. [51]

Metabolit	Koncentrace v plazmě matky [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace v plazmě dítěte [$\mu\text{g/ml}$]
Teobromin	$0,27 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,08$
Paraxantin	$0,17 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,04$
Teofylin	$0,12 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$
Kofein	$0,87 \pm 0,22$	$0,89 \pm 0,24$

V Tabulce 11 a 12 jsou zaznamenány výsledky studie Caubeta a kol. [52]. V Tabulce 11 jsou uvedeny poměry různých metabolitů kofeinu po sběru moči mezi 0-3 hodinu od požití kofeinu a v Tabulce 12 jsou poměry metabolitů po sběru moči mezi 3-6 hodinami po požití kofeinu. V tabulkách jsou uvedeny zkratky metabolitů, kde 13X značí teofylin, 17X paraxantin, 37X teobromin, 137X kofein, 17U kyselinu 1,7-dimethylurovou, 13U kyselinu 1,3-dimethylurovou a 37U kyselinu-3,7 dimethylurovou. Uvedené poměry byly zvoleno proto, že nejsou ovlivněny renální klearancí a nejsou ovlivněny dalšími enzymy, které se podílejí na metabolismu kofeinu. Caubet a kol. [52] při porovnání poměru Skupiny A a B zjistili, že hodnoty od mužů nekuřáků byly o něco nižší, ale nevýznamné (s výjimkou poměru $(7X+37U+37X)/137X$). Porovnáním skupiny C a D zjistili, že příjem antikoncepce inhibuje aktivitu CYP1A2. Kombinace kouření a antikoncepce mírně zvyšuje aktivitu CYP1A2. Účinek kouření a užívání antikoncepce tedy vede k indukci CYP1A2.

Extrakci na tuhé fázi Caubet a kol. [52] zvolili místo extrakce z kapaliny do kapaliny pro její snadnější použití, nižší cenu a pro úsporu rozpouštědel. Metoda SPE navíc Caubetovi a kol. [52] umožnila získat výtěžky podobné těm, které byly získány extrakcí kapalina-kapalina.

Tabulka 11 Poměr metabolitů kofeinu v prvním vzorku moči dle Caubeta a kol. [52]

Poměr	Skupina A	Skupina B	Skupina C	Skupina D	Skupina E
$(13X+17X+37X)/137X$	2,8	3,2	3,4	2,0	2,5
$(17X+17U)/137X$	4,5	7,6	2,7	2,4	3,6
$(3X+13U+13X)/137X$	2,0	2,6	2,3	1,0	5,8
$(7X+37U+37X)/137X$	5,0	3,0	5,0	1,9	9,0

Tabulka 12 Poměr metabolitů kofeinu v druhém vzorku moči dle Caubeta a kol. [52]

Poměr	Skupina A	Skupina B	Skupina C	Skupina D	Skupina E
$(13X+17X+37X)/137X$	2,7	4,2	2,8	1,2	2,3
$(17X+17U)/137X$	3,9	8,9	2,9	1,1	3,2
$(3X+13U+13X)/137X$	1,5	3,0	1,4	0,3	1,8
$(7X+37U+37X)/137X$	4,8	3,2	3,6	0,6	3,0

Shrnutí

Kofein byl analyzovaný v biologických vzorcích – z krve a moči. K analýze došlo po příjmu buď čerstvé kávy nebo kakaa [49], nebo po podání dávky kofeinu odpovídající hmotnosti dobrovolníka [52]. Před samotnou analýzou byla provedena extrakce (resp. mikroextrakce) tuhou fází, která čím dál častěji nahrazuje extrakci kapalina-kapalina. Mezi zvolené sorbenty patřily: sorbent C18 [52], Strata-X™ [51], Carbovax/divinylbenzen [49] nebo N-vinylpyrrolidin/divinylbenzen [50]. Zatímco C18 se řadí mezi klasické sorbenty, Carbovax/divinylbenzen, Strata-X™ nebo N-vinylpyrrolidin/divinylbenzen jsou sorbenty nové, které vykazují větší výtěžnost. Všechny uvedené sorbenty byly před samotnou analýzou aktivovány methanolem a vodou. Samotná analýza byla provedena buď pomocí GC s dusíko-fosforovým detektorem nebo HPLC s detektorem diodového pole.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce je zpracování rešerše o kofeinu. Práce je rozdělena na dvě části, kde první část se zabývá účinky a vlastnostmi kofeinu v lidském organismu a druhá část je zaměřena na jeho stanovení v biologických vzorcích.

Kofein je alkaloid působící v těle na centrální nervovou soustavu, srdce nebo cévy. Je metabolizován v játrech a jeho hlavními metabolity jsou teobromin, teofylin a paraxantin. Jeho hlavním mechanismem účinku je blokáda adenosinových receptorů, jelikož má podobnou strukturu jako adenosin. Díky této vlastnosti má kofein potenciál při léčbě Parkinsonovy choroby. Kofein je považován za nejvíce užívanou drogu na světě. Závislost na kofeinu se při nedostatku projevuje neklidem, třesem, podrážděností a jinými abstinenciálními příznaky. Velká konzumace je spojena především s jeho vlastnostmi zvyšovat stav bdělosti a soustředění. Využití kofeinu ve farmacii, kromě přidávání do analgetik a antipyretik, je při hodnocení aktivity různých izoforem cytochromu P450, jako je například CYP1A2 nebo xantinová oxidáza. Kromě farmacie se kofein využívá v kosmetice, jelikož může zlepšovat projevy celulitidy, zvyšuje ochranný účinek proti UV záření v kosmetických přípravcích na ochranu proti slunci nebo podporuje růst vlasů díky inhibici enzymu 5α reduktáza, který převádí testosteron na účinnější formu dihydrotestosteron, který je zodpovědný za plešatost.

Ke stanovení kofeinu v biologických vzorcích se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která je rychlá a přesná a k analýze je potřeba jen malý objem vzorku. Jako detektor je nejčastěji používán spektrofotometrický detektor v UV/Vis oblasti. Před samotnou analýzou se kofein běžně izoluje pomocí extrakce. Běžně používaná je extrakce z kapaliny do kapaliny, ale nově i extrakce nebo mikroextrakce tuhou fází. K SPE, resp. k SPME se přechází především díky úspoře času a rozpouštědel, jednoduchosti použití a nižší ceně.

BIBLIOGRAFIE

- [1] National Center for Biotechnology Information. *Pubchem Database: Caffeine* [online]. [cit. 2020-01-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine#section=Chemical-Vendors>
- [2] STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Doba jedová*. 2012. Praha: Triton, 2011-2012. ISBN 978-80-7387-555-8.
- [3] HECKMAN, Melanie A., Jorge WEIL a Elvira Gonzalez DE MEJIA. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of Food Science* [online]. 2010, **75**(3), 77-87 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x>
- [4] Obsah kofeinu v potravinách. In: *EFSA vysvětluje hodnocení rizik: Kofein* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2017 [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/EFSA/Kofein.pdf>
- [5] TFOUNI, Silvia Amelia Verdiani, Maíra Marcuci CAMARA, Kamille KAMIKATA, Fernanda Moralez Leme GOMES a Regina Prado Zanes FURLANI. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. *Food Science and Technology* [online]. 2018, **38**(4), 661-666 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1590/1678-457x.12217. ISSN 1678-457X.
- [6] Caffeine content varies by beverage type and preparation. *Healthline* [online]. USA: Healthline media, 2019 [cit. 2020-06-16]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/nutrition/caffeine-in-tea-vs-coffee#caffeine-content>
- [7] HAILE, Mesfin a Won HEE KANG. The Harvest and Post-Harvest Management Practices' Impact on Coffee Quality. *Coffee - Production and Research* [online]. IntechOpen, 2020, , 1-18 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.5772/intechopen.89224. ISBN 978-1-83880-884-6. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/coffee-production-and-research/the-harvest-and-post-harvest-management-practices-impact-on-coffee-quality>
- [8] ETHEERTON, G. M. Coffee. Facts and controversies. *Archives of Family Medicine*

- [online]. 2(3), 317-322 [cit. 2019-11-28]. DOI: 10.1001/archfami.2.3.317. ISSN 10633987. Dostupné z: <http://archfami.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/archfami.2.3.317>
- [9] *Caffeine for the sustainment of mental task performance: formulations for military operations* [online]. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001 [cit. 2019-11-28]. ISBN 03-090-8258-7.
- [10] THORN, Caroline F., Eleni AKLILLU, Ellen M. MCDONAGH, Teri E. KLEIN a Russ B. ALTMAN. PharmGKB summary. *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. 2012 [cit. 2020-01-01]. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283505d5e. ISSN 1744-6872.
- [11] Metabolic pathway of caffeine in humans. In: *Science Direct* [online]. United Kingdom: Elsevier, 2017 [cit. 2020-07-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717319770?via%3Dihub>
- [12] BOSWELL-SMITH, Victoria, Domenico SPINA a Clive P PAGE. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2006, 147(1), 252-257 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706495. ISSN 00071188. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0706495>
- [13] SMATRESK, Niel J. How does caffeine affect the body?. *Scientific American* [online]. 1999 [cit. 2019-11-26]. Dostupné z: <https://www.scientificamerican.com/article/how-does-caffeine-affect/>
- [14] NEHLIG, Astrid. *Coffee, tea, chocolate, and the brain* [online]. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2004 [cit. 2019-11-25]. ISBN 04-153-0691-4.
- [15] DA SILVA, Rosane Souza. Caffeine. *Reproductive and Developmental Toxicology* [online]. Elsevier, 2011, s. 355-364 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/B978-0-12-382032-7.10027-X. ISBN 9780123820327. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012382032710027X>
- [16] GRUNDMANN CSC, Milan. Lékové interakce s kofeinem I. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2001, 3(4), 187-188 [cit. 2019-11-25]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/04/12.pdf>
- [17] NAWROT, P., S. JORDAN, J. EASTWOOD, J. ROTSTEIN, A. HUGENHOLTZ a M.

- FEELEY. Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2003, **20**(1), 1-30 [cit. 2020-01-01]. DOI: 10.1080/0265203021000007840. ISSN 0265-203X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0265203021000007840>
- [18] WIERZEJSKA, Regina, Mirosław JAROSZ a Barbara WOJDA. Caffeine Intake During Pregnancy and Neonatal Anthropometric Parameters. *Nutrients* [online]. 2019, **11**(4) [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.3390/nu11040806. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/4/806>
- [19] SMITH, Barry D., Uma GUPTA a B. S. GUPTA. *Caffeine and activation theory: effects on health and behavior* [online]. Boca Raton: CRC Press, 2007 [cit. 2020-04-12]. ISBN 978-084-9371-028. Dostupné z: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780429124808>
- [20] DRAKE, Christopher, Timothy ROEHRS, John SHAMBROOM a Thomas ROTH. Caffeine Effects on Sleep Taken 0, 3, or 6 Hours before Going to Bed. *Journal of Clinical Sleep Medicine* [online]. 2013, **09**(11), 1195-1200 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.5664/jcsm.3170. ISSN 1550-9389. Dostupné z: <http://jcsm.aasm.org/doi/10.5664/jcsm.3170>
- [21] Coffe&Health. *Coffe&Health: Caffeine and sleep* [online]. [cit. 2020-01-01]. Dostupné z: 10.1080/0265203021000007840
- [22] International diabetes federation. *Inernational diabetes federation: Type 2 diabetes* [online]. [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <https://idf.org/>
- [23] WILCOX, G. Insulin and Insulin resistance. *The Clinical Biochemis Reviews* [online]. 2005, **26**(2) [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/#>
- [24] VAN DAM, R. M., W. C. WILLETT, J. E. MANSON a F. B. HU. Coffee, Caffeine, and Risk of Type 2 Diabetes: A prospective cohort study in younger and middle-aged U.S. women. *Diabetes Care* [online]. 2006, **29**(2), 398-403 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.2337/diacare.29.02.06.dc05-1512. ISSN 0149-5992. Dostupné z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.29.02.06.dc05-1512>
- [25] PIMENTEL, Gustavo D, Juliane CS ZEMDEGS, Joyce A THEODORO a João F

- MOTA. *Does long-term coffee intake reduce type 2 diabetes mellitus risk?* [online]. 2009, **1**(1) [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1186/1758-5996-1-6. ISSN 1758-5996. Dostupné z: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-1-6>
- [26] BIONEWS SERVICES. Parkinson's News Today. *Parkinson's News Today: What is Parkinson's disease* [online]. 2013 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://parkinsonsnewstoday.com>
- [27] NATIONAL HEADQUARTERS. American Parkinson Disease Association. *American Parkinson Disease Association: What is Parkinson* [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.apdaparkinson.org/>
- [28] AMBLER, Zdeněk. *Základy neurologie: [učebnice pro lékařské fakulty]* [online]. 7. vyd. Praha: Galén, 2011 [cit. 2020-03-26]. ISBN 978-807-2627-073. Dostupné z: <http://kramerius-vs.nkp.cz/view/uuid:a1609ab0-96fb-11e7-82e4-005056827e52?page=uuid:2167cb80-ad0d-11e7-9b14-5ef3fc9ae867>
- [29] RIBEIRO, J.A., A.M. SEBASTIÃO a A. DE MENDONÇA. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology* [online]. 2002, **68**(6), 377-392 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/S0301-0082(02)00155-7. ISSN 03010082. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008202001557>
- [30] AGUILAR-NAVARRO, Millán, Gloria MUÑOZ, Juan SALINERO, Jesús MUÑOZ-GUERRA, María FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, María PLATA a Juan DEL COSO. Urine Caffeine Concentration in Doping Control Samples from 2004 to 2015. *Nutrients* [online]. 2019, **11**(2) [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.3390/nu11020286. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/2/286>
- [31] PICKERING, Craig a John KIELY. Are the Current Guidelines on Caffeine Use in Sport Optimal for Everyone? Inter-individual Variation in Caffeine Ergogenicity, and a Move Towards Personalised Sports Nutrition. *Sports Medicine* [online]. 2018, **48**(1), 7-16 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1007/s40279-017-0776-1. ISSN 0112-1642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40279-017-0776-1>
- [32] GRAHAM, Terry E. Caffeine and Exercise. *Sports Medicine* [online]. 2001, **31**(11), 785-807 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.2165/00007256-200131110-00002. ISSN 0112-1642.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00007256-200131110-00002>

- [33] HERMAN, A. a A.P. HERMAN. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2013, **26**(1), 8-14 [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1159/000343174. ISSN 1660-5535. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/343174>
- [34] RAWLINGS, Anthony V. Cellulite and its treatment. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2006, **28**(3), 175-190 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1111/j.1467-2494.2006.00318.x. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-2494.2006.00318.x>
- [35] ROURE, Romain, Thiery ODDOS, Ana ROSSI, Francis VIAL a Christiane BERTIN. Evaluation of the efficacy of a topical cosmetic slimming product combining tetrahydroxypropyl ethylenediamine, caffeine, carnitine, forskolin and retinol, In vitro, ex vivo and in vivo studies. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2011, **33**(6), 519-526 [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2011.00665.x. ISSN 01425463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2011.00665.x>
- [36] BYUN, Sang-Young, Soon-Hyo KWON, Su-Hak HEO, Jae-Seong SHIM, Mi-Hee DU a Jung-Im NA. Efficacy of Slimming Cream Containing 3.5% Water-Soluble Caffeine and Xanthenes for the Treatment of Cellulite: Clinical Study and Literature Review. *Annals of Dermatology* [online]. 2015, **27**(3) [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.5021/ad.2015.27.3.243. ISSN 1013-9087. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5021/ad.2015.27.3.243>
- [37] AMARO-ORTIZ, Alexandra, Betty YAN a John D'ORAZIO. Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules* [online]. 2014, **19**(5), 6202-6219 [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.3390/molecules19056202. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/5/6202>
- [38] SERESHTI, Hassan a Soheila SAMADI. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. *Food Chemistry* [online]. 2014, **158**, 8-13 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.095. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614002805>

- [39] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie* [online]. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003 [cit. 2020-03-29]. ISBN 80-715-7647-6. Dostupné z: <http://kramerius-vs.nkp.cz/view/uuid:6719bca0-a0de-11e2-9a08-005056827e52?page=uuid:79493220-b411-11e2-8c63-5ef3fc9ae867>
- [40] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty* [online]. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013 [cit. 2020-03-29]. ISBN 978-80-246-2202-6. Dostupné z: <http://kramerius-vs.nkp.cz/view/uuid:738bec70-a122-11e8-99aa-005056827e51?page=uuid:b0bc4e30-ace1-11e8-ba56-5ef3fc9bb22f>
- [41] BENDRISS, El-khalil, Nektaria MARKOGLU a Irving W. WAINER. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 2000, **746**(2), 331-338 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00325-X. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037843470000325X>
- [42] VENTURA, Rosa, Catherine JIMÉNEZ, Neus CLOSAS, Jordi SEGURA a Rafael DE LA TORRE. Stability studies of selected doping agents in urine: caffeine. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, **795**(2), 167-177 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00557-9. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023203005579>
- [43] MARTÍNEZ-LÓPEZ, Sara, Beatriz SARRIÁ, Gema BAEZA, Raquel MATEOS a Laura BRAVO-CLEMENTE. Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. *Food Research International* [online]. 2014, **64**, 125-133 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.043. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914003585>
- [44] ALVI, Syed N. a Muhammad M. HAMMAMI. Validated HPLC Method for Determination of Caffeine Level in Human Plasma using Synthetic Plasma: Application to Bioavailability Studies. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2011, **49**(4), 292-296 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1093/chrsci/49.4.292. ISSN 0021-9665. Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chrsci/49.4.292>

- [45] ÖTLES, Semih a Canan KARTAL. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* [online]. 2015, **15**(1), 5-15 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.17306/J.AFS.2016.1.1. ISSN 16440730. Dostupné z: <http://www.food.actapol.net/volume15/issue1/abstract-1.html>
- [46] WALKER, V. a G. A MILLS. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry* [online]. 2002, **39**(5), 464-477 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1258/000456302320314476. ISSN 0004-5632. Dostupné z: <http://acb.sagepub.com/lookup/doi/10.1258/000456302320314476>
- [47] ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **902**(1), 167-194 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00934-1. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300009341>
- [48] *Chemické listy: Bulletin* [online]. 2002, [cit. 2020-04-13]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin334/bulletin334.pdf>
- [49] KUMAZAWA, Takeshi, Hiroshi SENO, Xiao-Pen LEE, Akira ISHII, Kanako WATANABE-SUZUKI, Keizo SATO a Osamu SUZUKI. Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1999, **387**(1), 53-60 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00061-6. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267099000616>
- [50] GEORGA, Kalliopi A, Victoria F SAMANIDOU a Ioannis N PAPADOYANNIS. Use of novel solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 2001, **759**(2), 209-218 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00251-1. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434701002511>
- [51] LOPEZ-SANCHEZ, Rosa del Carmen, Victor Javier LARA-DIAZ, Alejandro ARANDA-GUTIERREZ, Jorge A. MARTINEZ-CARDONA a Jose A. HERNANDEZ. HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human

Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. 2018, **2018**, 1-11 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1155/2018/2085059. ISSN 2090-8865. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jamc/2018/2085059/>

- [52] CAUBET, Marie-Sophie, Walid ELBAST, Marie-Claude DUBUC a Jean-Louis BRAZIER. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, **27**(1-2), 261-270 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1016/S0731-7085(01)00546-5. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708501005465>