

## ANALYTICKÉ METÓDY NA STANOVENIE KOFEÍNU AKO BIOLOGICKY VÝZNAMNEJ LÁTKY

ĽUBOMÍR ŠVORC<sup>a</sup>, PETER TOMČÍK<sup>b</sup>, JANA SVÍTKOVÁ<sup>a</sup>, MIROSLAV RIEVAJ<sup>a</sup> a DUŠAN BUSTIN<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,

<sup>b</sup> Katedra chémie, Pedagogická fakulta, Katolícka univerzita v Ružomberku, Hrabovská cesta 1, 034 01 Ružomberok

lubomir.svorc@stuba.sk

Došlo 11.6.12, prepracované 11.10.12, prijaté 14.10.12.

Kľúčové slová: kofeín, neurostimulant, voltampérometria, sklovitý uhlík, bórom dopovaný diamant, detekcia, spriahnuté techniky

### Obsah

1. Úvod
2. Výskyt, vlastnosti a význam kofeínu
3. Vplyv kofeínu na zdravie človeka
4. Analytické metódy na stanovenie kofeínu
  - 4.1. Separačné metódy
  - 4.2. Spektrálne a elektrochemické metódy
5. Záver

### 1. Úvod

Kofeín (teín, guaranín, podľa IUPAC terminológie: 1,3,7-trimetyl-1*H*-purín-2,6(3*H*,7*H*)-dión, v databáze CAS evidovaný pod číslom 58-08-2) je alkaloid, ktorý priaznivo stimuluje centrálnu nervovú sústavu (CNS) a srdcovú činnosť. Patrí do skupiny purínových, metylových derivátov xantínu. V dnešnej dobe je táto látka súčasťou mnohých energetických nápojov a potravín. Ide o zlúčeninu, ktorej účinky sú na jednej strane priaznivé, a na druhej strane zároveň nebezpečné, čo si často uvedomuje len veľmi málo ľudí. Kofeín je totiž návyková látka, ktorá spôsobuje pri jej nadmernej konzumácii tzv. kofeínovú intoxikáciu prejavujúcu sa v podobe zrýchlenej srdcovej činnosti, dehydratácie, nervozity a problémov s trávením, čo pre časť konzumenta môže byť vážnym problémom.

Používanie energetických nápojov obsahujúcich kofeín zažíva v poslednom desaťročí veľký rozmach. Ich obľúbenosť vyplýva predovšetkým z trendu zrýchľujúceho sa

životného štýlu, pri ktorom sa potrebuje ľudské telo občas povzbudiť. Táto skutočnosť prirodzene nastoľuje otázku rýchleho, selektívneho a citlivého stanovenia kofeínu v potravinách, nápojoch a v biologických vzorkách. V tomto prehľadnom referáte sú zhrnuté najvýznamnejšie vlastnosti a účinky kofeínu, vrátane jeho vplyvu na zdravie človeka. Druhá časť referátu sa zaoberá inštrumentálnymi analytickými metódami na jeho stanovenie.

### 2. Výskyt, vlastnosti a význam kofeínu

Kofeín je prírodná látka vyskytujúca sa v listoch, semenách alebo plodoch viac ako 100 rôznych druhov rastlín po celom svete. Z chemického hľadiska patrí do skupiny látok známych ako xantíny (Schéma 1). Čistý kofeín je biely prášok horkej chuti, pomenovaný z latinčiny podľa rastliny Kávovník arabský (*Coffea arabica*) vyskytujúcej sa v subtropickom a tropickom podnebnom pásme. Tento xantínový alkaloid sa okrem kávovníka a kakaovníka nachádza aj v iných rastlinách, ako napr. čajových listoch a guaranových plodoch. Takisto sa pridáva do špeciálne pripravených energetických nápojov a farmaceutických produktov ako sú lieky proti nádche a chrípke<sup>1,2</sup>. Na kofeín sa zvykne pozeráť aj ako na najpopulárnejšiu drogu na svete. Už po storočia každé ráno prebúdza milióny ľudí, ktorí vstávajú so svojou neodmysliteľnou šálkou kávy alebo čaju. Kofeín nemá len stimulačné účinky<sup>3–5</sup>. Vďaka kofeínu totiž môže rásť svalová vytrvalosť a môže mať aj pozitívne účinky na zmiernenie bolesti<sup>6</sup>.

Obsah kofeínu závisí od druhu produktu a jeho prípravy. Stručný prehľad obsahu kofeínu v niektorých produktoch je uvedený v tabuľke I (cit.<sup>7</sup>). Navzdory rôznym polemikám o účinku kofeínu faktom ostáva, že jeho konzumácia do 300 mg na deň nemá žiadne nepriaznivé účinky na drvivú väčšinu dospeljej populácie<sup>8,9</sup>. Práve preto je priemerná dávka troch až štyroch šálok čaju alebo kávy denne bezpečná. Navyše množstvo kofeínu, ktoré obsahujú dve šálky kávy pôsobí priaznivo na fungovanie pečene a ako prevencia pred cukrovkou a artritídou<sup>10</sup>. Avšak denná dávka presahujúca 750–1000 mg sa vo všeobecnosti už považuje za nebezpečnú<sup>3</sup> obzvlášť pre jedincov, ktorí nie sú zvyknutí na pravidelný prísun kofeínu. Smrteľ-

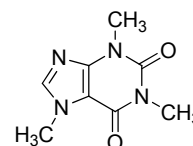


Schéma 1. Chemický vzorec kofeínu

Tabuľka I

Obsah kofeínu v niektorých nápojoch, potravinách a farmaceutických výrobkoch<sup>7</sup>

| Produkt                            | Názov        | Obsah kofeínu    |
|------------------------------------|--------------|------------------|
| Čaj                                | ľadový       | 65–75 mg/150 ml  |
|                                    | instantný    | 25–35 mg/150 ml  |
|                                    | sáčkový      | 30–50 mg/150 ml  |
| Káva                               | bezkofeínová | < 5 mg/150 ml    |
|                                    | instantná    | 50–70 mg/150 ml  |
|                                    | pražená      | 70–120 mg/150 ml |
| Osviežujúce nápoje (mg/360 ml)     | Coca-Cola    | 45 mg            |
|                                    | Pepsi-Cola   | 38 mg            |
| Farmaceutické výrobky (mg/tableta) | Coldrex      | 25 mg            |
|                                    | Cephyl       | 40 mg            |
|                                    | Ataralgin    | 70 mg            |
|                                    | Algyl        | 70 mg            |
|                                    | Acylcoffin   | 50 mg            |
|                                    | Acifein      | 50 mg            |

ná dávka kofeínu u človeka predstavuje príjem medzi 150 a 200 mg kg<sup>-1</sup> telesnej hmotnosti<sup>9</sup>. Problémy z predávkovania kofeínom môžu nastať pri vypití viacerých šálok silnej kávy za krátky čas. Vtedy namiesto očakávaného povzbudenie dochádza k nervovo-svalovej predráždenosti (búšenie srdca, zvieranie žalúdka), nervozite a traseniu, poruchám trávenia až nespavosti<sup>11–13</sup>. Dlhodobá konzumácia väčšieho množstva silnej kávy (viac ako 6 šálok denne) môže podľa niektorých medicínskych štúdií zvyšovať riziko výskytu ischemickej choroby srdca a infarktu<sup>14</sup>. Kofeín pôsobí na CNS (zlepšuje vnímanie, zrýchľuje tok myšlienok), mierne urýchľuje dýchanie, krátkodobo zvyšuje srdcovú činnosť a nevýrazne aj krvný tlak<sup>15,16</sup>. Má močopudné účinky a podporuje vylučovanie žlúdočnej kyseliny a žlče<sup>17</sup>. Zmenšuje aj svalovú únavu, lebo uvoľňuje tukové kyseliny do krvného reťazca a tým vzbudzuje schopnosť vyššieho výkonu. Triatlonisti, atléti ako aj iní športovci ho používajú k zlepšovaniu ich športového výkonu<sup>18</sup>.

Kofeín je buď biely prášok, alebo ho tvoria hodvábné lesklé, ihlicovité kryštály zvyčajne spojené do vláknitých zhlukov. Je kryštalický, horkej chuti a bez zápachu. Charakterizuje ho dobrá rozpustnosť v chloroforme a vode, zatiaľ čo v 95% etanole sa prakticky nerozpúšťa. Jeho teplota topenia sa pohybuje v rozmedzí 234–236 °C, pričom pri teplote 178 °C sublimuje.

### 3. Vplyv kofeínu na zdravie človeka

V súčasnej dobe sa syntetický kofeín používa ako terapeutická prísada do analgetických zmesí. V injekčnej forme sa aplikuje k povzbudeniu dychu a krvného obehu

pri horúčkovitých stavoch a infekčných ochoreniach. Užíva sa aj ako protijed pri otravách narkotikami, alkoholom a inými drogami<sup>19</sup>. Liečivá dávka kofeínu je udávaná hodnotou cca 0,1 g, zatiaľ čo toxická hladina sa pohybuje od 0,5 g vyššie. Ide však o kvantitatívny údaj s vysokou individuálnou variabilitou<sup>20</sup>. Kofeín sa dobre vstrebáva v žalúdku a tenkom čreve. Následne sa v pečeni metabolizuje na viac ako 25 rôznych látok. V tele sa neakumuluje, ale sa normálne vylúči do niekoľkých hodín od konzumácie. Najčastejšie dochádza k demetylácii najskôr na dime-tylxantín, potom monometylxantín, ktorý sa ďalej štiepi na močovinu a tá sa neskôr vylučuje močom<sup>21</sup>. Doba vylúčenia kofeínu sa u jednotlivcov mení, čo môže byť spôsobené genetickými faktormi ovplyvňujúcimi enzýmy zúčastňujúcich sa metabolických procesov alebo životným štýlom napr. fajčením<sup>22</sup>. Deti dokážu kofeín spracovať rýchlejšie<sup>23</sup>. V priemere sa absorbovanie kofeínu ukončí do jednej hodiny po prijatí a koncentrácia v krvnej plazme je najväčšia po 60–90 minútach. U zdravých dospelých ľudí je biologický polčas kofeínu 2,5–4,5 hodiny. Kofeín preniká cez placentárnu bariéru (tehotenstva) a preniká aj do materského mlieka. Štúdia potvrdzujú, že príjem kofeínu v rozumných medziach (max. 300 mg denne) počas tehotenstva nemá žiadny vplyv na plod, nesúvisí s neplodnosťou a ani s dobou, počas ktorej sa ženám nedarilo otehotnieť<sup>24</sup>. Nepotvrdili sa ani názory, že zvýšený príjem kofeínu zvyšuje pravdepodobnosť nádoru prsníka alebo inej formy rakoviny<sup>25</sup>. Na druhej strane na základe viacerých štúdií je známe, že zvýšená konzumácia kofeínu môže predĺžiť dobu počatia z hľadiska plodnosti mužov. U týchto mužov sa zistila znížená mobilita a hustota spermií<sup>26</sup>. Schopnosť kofeínu zvyšovať bdelosť a udržiavať pozornosť je pomerne dobre zdokumentovaná, podobne aj hlavné pôsobenie v úlohe stimulátora CNS vďaka tomu, že pôsobí opačným efektom ako adenosín<sup>27–29</sup>. Adenosín je chemická látka prirodzene sa vyskytujúca v organizme, ktorá zohráva dôležitú úlohu pri regulácii mozgovej činnosti a úprave stavu bdlosti (aktivity) a spánku (je to tzv. „signál únavy“)<sup>30,31</sup>. Kofeín blokuje špecifické receptory adenosínu v nervových tkanivách vrátane mozgu, čím sa udržiava stav aktivity<sup>32</sup>. Týmto mechanizmom kofeín môže zlepšiť duševnú a telesnú výkonnosť a oddialiť nástup únavy. Blokovanie adenosínových receptorov pravdepodobne zodpovedá aj za zúženie ciev, čo tlmí migrénu a bolesť hlavy, a preto je kofeín aj zložkou mnohých analgetík<sup>33,34</sup>. Navzdory rozličným výskumom je úloha kofeínu ako prípravku zvyšujúceho výkonnosť stále kontroverzná. Zistilo sa, že kofeín neprospeje krátkodobým a vysoko intenzívnym anaeróbnym aktivitám (napr. šprint, intenzívny krátkodobý tréning)<sup>18,35</sup>. Naproti tomu kofeín zvyšuje výkonnosť u aeróbných vytrvalostných športov, lebo dlhodobo prispieva k mobilizácii tukových zásob a spôsobuje, že pracujúci sval využije tuk ako zdroj energie oveľa skôr. To odsúva vyčerpanie zásob glykogénu a predlžuje dobu, ktorú je možno venovať tréningu<sup>36</sup>. Bohužiaľ, zatiaľ nebol dostatočne popísaný presný mechanizmus tohto procesu.

Najväčším problémom kofeínu je závislosť. Jedná sa

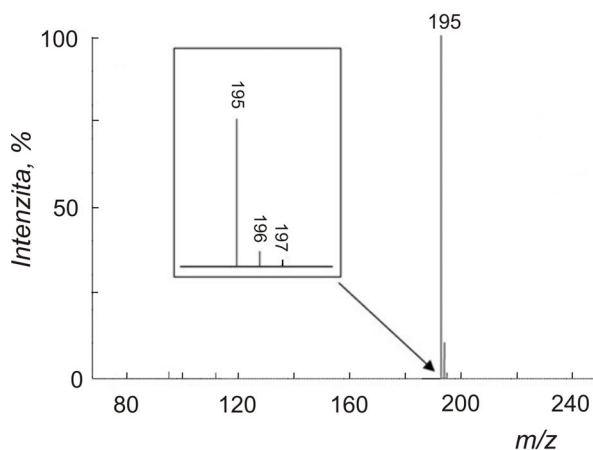
o lekársku diagnózu, tzv. kofeínom vyvolanú organickú duševnú poruchu (kofeínovú intoxikáciu), ktorej najčastejším prejavom sú abstinenčné príznaky medzi ktoré patrí: podráždenosť, nevoľnosť, paranoja, nepokoj, nervozita, úzkosť a vysoký krvný tlak<sup>37</sup>.

#### 4. Analytické metódy na stanovenie kofeínu

Káva a rôzne kofeínové nápoje patria medzi dôležité hospodárske produkty, pre ktoré sa vyžaduje najvyššia kvalita aj v rámci medzinárodného obchodu. Vzhľadom k vysokému počtu vzoriek na analýzu sú nové analytické metódy poskytujúce rýchle a spoľahlivé údaje o kvalite a kvantite nevyhnutné. Vždy je potrebné hľadať takú metódu, ktorá je najvhodnejšia pre daný účel, t.j. na stanovenie konkrétneho analytu (kofeínu), v konkrétnej matrici, v prítomnosti daných interferentov a v požadovanom koncentračnom rozsahu pri čo najnižšej ekonomickej a časovej náročnosti a minimálnej práci. Kofeín je veľmi atraktívny objekt pre analytických chemikov. V odbornej literatúre bolo publikovaných početné množstvo štúdií zameraných na analytické stanovenie kofeínu v rôznych matriciach (potraviny, nápoje, životné prostredie a biologické vzorky).

##### 4.1. Separačné metódy

Gardinali a Zhao vyvinuli metódu na stanovenie stopových množstiev kofeínu vo vzorkách povrchových vôd v oblasti Floridy spojením kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie s chemickou ionizáciou pri



Obr. 1. Hmotnostné spektrum kofeínu s molekulovým iónom pri  $m/z = 195$  vo „full scan“ móde namerané po separácii kvapalinovou chromatografiou využitím chemickej ionizácie pri atmosférickom tlaku v pozitívnom móde (metóda LC-APCI<sup>+</sup>-MS)<sup>38</sup>. Experimentálne podmienky: Luna HPLC kolóna (150 × 4,6 mm I.D.) s C18 stacionárnou fázou, mobilná fáza: metanol:voda v pomere 30:70, prietok 1 ml min<sup>-1</sup>

atmosférickom tlaku v pozitívnom móde (LC-APCI<sup>+</sup>-MS)<sup>38</sup>. Hmotnostné spektrum kofeínu pri daných podmienkach je charakterizované výrazným molekulovým píkcom pri  $m/z = 195$  (obr. 1). Táto metóda umožňuje stanoviť kofeín až na koncentračnej úrovni  $2 \cdot 10^{-11}$  mol l<sup>-1</sup>. Verenitch a spol. stanovovali kofeín spolu s inými liečivami (acylpyrín, ibuprofén) vo vzorkách povrchových a odpadových vôd z komunálnych čističiek odpadových vôd (ČOV)<sup>39</sup>. Vzorky boli pred analýzou upravované filtráciou a následne bola uskutočnená extrakcia na tuhej fáze (SPE). Na stanovenie bola použitá metóda plynovej chromatografie s iónovou pascou v tandemovom zapojení s hmotnostnou spektrometriou (GC-IT-MS/MS). Po optimalizácii experimentálnych parametrov boli dosiahnuté detekčné limity pre všetky liečivá v rozsahu  $2 \cdot 10^{-9}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup> a pomer signálu k šumu (S/N) nepresiahol hodnotu 5.

Metóda HPLC bola vyvinutá pre stanovenie teobromínu, teofylínu a kofeínu v rôznych vzorkách kakaa<sup>40</sup>. Chromatografická separácia bola vykonaná na C18 kolóne s mobilnou fázou metanol:voda v pomere 20:80 pri prietoku 1,4 ml min<sup>-1</sup>. Vzorky kakaa „Trinitario“ a „Forastero Criollo“ boli pestované v rôznych ročných obdobiach a fermentované 3 až 7 dní. Výsledky ukázali mierne zníženie obsahu teobromínu a kofeínu s rastúcim časom fermentácie. Monolitická kolóna bola navrhnutá pre jednoduché, rýchle a vysoko citlivé stanovenie kofeínu v potravinách (káva, čaj a kakao) metódou HPLC-UV s využitím mobilnej fázy vody a acetonitrilu<sup>41</sup>. Lineárny koncentračný rozsah danej metódy sa pohyboval v rozmedzí  $8,2 \cdot 10^{-7}$  až  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup> koncentrácie kofeínu. Dosiahnutá medza detekcie a stanovenia bola  $2,6 \cdot 10^{-7}$  a  $8,2 \cdot 10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>. Metóda HPLC-UV pre monitorovanie kofeínu a teofylínu v ľudskej plazme je popísaná v práci Deturmenyho a Bruguerolleho<sup>42</sup>. Jej hlavnou výhodou je linearita v širokom koncentračnom rozsahu  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>. Detekčný limit bol  $5,1 \cdot 10^{-8}$  mol l<sup>-1</sup>. Táto analytická metóda je rýchla a spoľahlivá a umožňuje rutinné kontroly koncentračnej hladiny teofylínu a kofeínu, a to najmä u predčasne narodených detí, u ktorých je objem plazmy ešte veľmi malý. Zou a Li vo svojej práci predstavili jednoduchú a rýchlu GC-MS metódu na stanovenie kofeínu v nápojoch<sup>43</sup>. 25 µl vzorky sa vždy zmiešalo s 1 ml etylacetátu a po vysušení boli získané kalibračné krivky lineárne v koncentračnom rozmedzí od  $2,5 \cdot 10^{-8}$  do  $1,5 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> s detekčným limitom  $5 \cdot 10^{-9}$  mol l<sup>-1</sup>. Vyvinutá metóda má výbornú opakovateľnosť a môže byť použitá na stanovenie stopových množstiev kofeínu v populárnych komerčných nápojoch. HPLC metóda v on-line prepojení s extrakciou na tuhej fáze (SPE) bola vyvinutá na stanovenie kofeínu v tradičných čínskych liečivých receptoch, ktoré obsahujú Theaefolium<sup>44</sup>. Mobilná fáza bola metanol s 1% kyselinou octovou v pomere 1:4 za využitia 8-chlóroteofylínu ako vnútorného štandardu pri vlnovej dĺžke 270 nm. Výťažnosti pri reálnych vzorkách čínskych nápojov sa pohybovali v rozmedzí od 88,5 do 92,3 %. Kofeín vo vzorkách mal obsah v intervale od  $7,2 \cdot 10^{-5}$  do  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>. Chen

a Jing vo svojej práci využili metódu založenú na iónovej chromatografii na stanovenie umelých sladidiel (sacharín, aspartam, acesulfam-K), konzervantov (kyselina benzoová), kofeínu, teobromínu a teofylínu v rôznych potravinách a farmaceutických prípravkoch<sup>45</sup>. Separácia bola vykonaná na anexových kolónach a celková doba analýzy nepresiahla 45 min. Detekčné limity pre všetky analyzované látky sa pohybovali na úrovni pod  $5 \cdot 10^{-6}$  mol l<sup>-1</sup>. Priemerné výťažnosti u reálnych vzoriek boli od 85 do 104 %. Koncentračné hladiny všetkých analytov stanovené touto metódou boli v dobrej zhode s výsledkami získanými HPLC. Navrhovaná metóda tak poskytuje vhodnú alternatívu k HPLC na separáciu a stanovenie týchto zlúčenín.

#### 4.2. Spektrálne a elektrochemické metódy

Singh a Sahu vyvinuli jednoduchú a citlivú spektrofotometrickú metódu na stanovenie kofeínu a teofylínu vo farmaceutických prípravkoch<sup>46</sup>. Kofeín tvoril s 3-metyl-2-benzothiazolinon hydrazón hydrochloridom (MBTH) v prostredí kyseliny octovej intenzívne modré sfarbenie a absorbanca bola meraná pri vlnovej dĺžke maxima 630 nm. Táto metóda bola použitá pre stanovenie kofeínu a teofylínu v tabletkách. Automatizovaný postup využívajúci infračervenú spektroskopiu s Fourierovou transformáciou (FT-IR) bol vyvinutý na stanovenie kofeínu v kávových vzorkách<sup>47</sup>. Metóda spočívala v extrakcii kofeínu do CHCl<sub>3</sub> pred samotnou analýzou. Dosiahnutý detekčný limit bol  $5,1 \cdot 10^{-6}$  mol l<sup>-1</sup>, relatívna smerodajná odchýlka (RSD) bola 0,6 % pre päť nezávislých meraní roztoku

obsahujúceho  $4,6 \cdot 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup> kofeínu. Výhodou metódy bola malá spotreba extrakčného činidla CHCl<sub>3</sub> (menej ako 30 ml). Využitím FT-IR v blízkej IR oblasti okolo 12 000 cm<sup>-1</sup> na stanovenie obsahu kofeínu v zelenom čaji za využitia chemometrických metód sa venovali Sinija a Mishra<sup>48</sup>. Vyvinutý postup bol ďalej overovaný UV spektroskopickými metódami. Huck a spol. vyvinuli novú analytickú metódu založenú na využití infračervenej (IR) spektrometrie na kvantifikáciu troch hlavných alkaloidov: kofeínu, teobromínu a teofylínu v praženej káve<sup>49</sup>. Táto metóda bola porovnávaná s nezávislými HPLC-UV a HPLC-MS metódami. Spojenie HPLC-MS s ionizáciou pomocou elektrospreja umožňuje citlivú identifikáciu aj kvantifikáciu týchto troch analytov. HPLC-UV metóda bola vybraná ako referenčná metóda pre kalibráciu IR systému.

Z vyššie uvedených riadkov je evidentné, že pri stanovení kofeínu v analytických laboratóriách jednoznačne dominujú separačné metódy v spojení so spektrálnymi metódami (GC-MS, HPLC-MS, HPLC-UV). Ponúkajú výbornú citlivosť a selektivitu, často sú však cenovo a časovo náročné a prácne (nutnosť predkoncentračného kroku)<sup>50</sup>. Tieto nedostatky otvárajú možnosti pre využitie elektrochemických metód. Ich hlavnými výhodami sú nízke cenové a prevádzkové náklady, dostatočná citlivosť, prijateľná selektivita, široký lineárny dynamický koncentračný rozsah, možnosti miniaturizácie, jednoduchá obsluha a časová nenáročnosť. V tab. II je uvedený prehľad elektrochemických metód stanovenia kofeínu v najznámejších kofeínových nápojoch (čaj, Coca-Cola,

Tabuľka II

Prehľad elektrochemických metód stanovenia kofeínu v rôznych nápojoch<sup>51–66</sup>

| Vzorka    | Metóda        | Elektrolyt                              | Elektróda        | LCR [mol l <sup>-1</sup> ]              | LOD [mol l <sup>-1</sup> ] | Lit. |
|-----------|---------------|---|------------------|---|----------------------------|------|
| Čaj       | EIS           | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 1,0) | Nafion/GCE       | $3 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$     | $9,6 \cdot 10^{-5}$        | 51   |
|           | EIS           | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 1,0) | Nafion/GCE       | $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$     | $8,0 \cdot 10^{-7}$        | 52   |
|           | DPV           | 0,01M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>    | MWCNT/Nafion/GCE | $6 \cdot 10^{-7} - 4 \cdot 10^{-4}$     | $2,3 \cdot 10^{-7}$        | 53   |
|           | SWV           | PBS (pH 3,0)                            | Nafion/CME       | –                                       | $1,0 \cdot 10^{-7}$        | 54   |
| Coca-cola | DPV           | 0,1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | Nafion/GO/GCE    | $4 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-5}$     | $2,0 \cdot 10^{-7}$        | 55   |
|           | DPV           | –                                       | GO/GCE           | $3 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$     | $9,1 \cdot 10^{-8}$        | 56   |
|           | DPV           | BRBS (pH 4,1)                           | MWCNT/Nafion/GCE | $2,9 \cdot 10^{-6} - 3,8 \cdot 10^{-4}$ | $5,1 \cdot 10^{-7}$        | 57   |
|           | CV            | 0,2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | Nafion/BDD       | $2 \cdot 10^{-7} - 1,2 \cdot 10^{-5}$   | $1,0 \cdot 10^{-7}$        | 58   |
|           | DPV, SWV, MIP | –                                       | CPE              | $6 \cdot 10^{-8} - 2,5 \cdot 10^{-5}$   | $1,5 \cdot 10^{-8}$        | 59   |
|           | DPV           | 0,4M HClO <sub>4</sub>                  | BDD              | $4 \cdot 10^{-7} - 2,5 \cdot 10^{-5}$   | $1,5 \cdot 10^{-7}$        | 60   |
|           | CV            | 0,04M BRBS                              | BDD              | $1 \cdot 10^{-6} - 4 \cdot 10^{-4}$     | $2,2 \cdot 10^{-5}$        | 61   |
| Káva      | DPV, SWV      | ABS (pH 4,5)                            | GCE              | $6,2 \cdot 10^{-7} - 8,3 \cdot 10^{-5}$ | $7,8 \cdot 10^{-7}$        | 62   |
|           | SWASV         | –                                       | GPE, CPE         | $2,6 \cdot 10^{-4} - 2,6 \cdot 10^{-3}$ | $4,7 \cdot 10^{-5}$        | 63   |
|           | CV            | 0,05M HClO <sub>4</sub>                 | Nafion/CME       | $5 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$     | $2,0 \cdot 10^{-6}$        | 64   |
|           | SWV           | 0,05M HClO <sub>4</sub>                 | Nafion/CME       | $1 \cdot 10^{-5} - 2,5 \cdot 10^{-4}$   | $2,2 \cdot 10^{-6}$        | 65   |
|           | DPV           | 0,1M HClO <sub>4</sub>                  | GCE              | –                                       | $8,5 \cdot 10^{-6}$        | 66   |

káva)<sup>51–66</sup>. V prípade týchto metód sa medze detekcie pohybujú na úrovni od  $1 \cdot 10^{-5}$  po  $1 \cdot 10^{-8}$  mol  $\text{l}^{-1}$ , pričom najčastejšie používanými technikami sú elektrochemická impedančná spektroskopia (EIS), cyklická voltampérometria (CV), diferenčná pulzná voltampérometria (DPV) a square-wave voltampérometria (SWV). Lineárne dynamické koncentračné rozsahy sa pohybujú minimálne cez dva koncentračné rády, čo potvrdzuje vyššie uvedené výhody elektrochemických metód. Z uvedených údajov v tab. II je zrejme, že najlepšie podmienky pre elektrochemické stanovenie kofeínu sú v kyslých, prípadne v slabokyslých prostrediach. Elektrochemicky možno kofeín stanoviť oxidáciou pri značne kladných potenciáloch ( $>1$  V vs. Ag/AgCl), čo je pri bežných elektródových materiáloch problematické, a preto musí analytický chemik tento aspekt zohľadniť pri výbere materiálu pracovnej elektródy. Ako detektory kofeínu preto najčastejšie slúžia pracovné elektródy z odolného materiálu ako napr. elektróda zo sklovitého uhlíku (GCE), buď nemodifikovaná<sup>62,66</sup> alebo chemicky modifikovaná (CME) Nafionom<sup>52,53,55,57</sup>, grafénom (GO) (cit.<sup>55,56</sup>), prípadne uhlíkovými nanotrubicami (MWCNT) (cit.<sup>53,57</sup>). Modifikácia povrchu pracovnej elektródy sa obvykle robí za účelom zvýšenia citlivosti alebo selektivity stanovenia kofeínu v rôznych matriciách. GCE má však v tomto prípade aj niektoré nevýhody, ako napr. pasivácia povrchu elektródy produktmi oxidácie kofeínu resp. zložitejšia obnoviteľnosť povrchu elektródy. Tieto problémy možno do istej miery eliminovať využitím bórom dopovanej diamantovej (BDD) elektródy, ktorá vďaka svojemu povrchu poskytuje minimálnu náchylnosť k pasivácii elektródy produktmi oxidácie kofeínu. To sa prejaví ich nízkou adsorpciou a následne výbornou opakovateľnosťou

metódy<sup>58,60</sup>. Okrem reálnych vzoriek nápojov boli elektrochemické metódy aplikované aj na farmaceutické prípravky analgetických zmesí obsahujúcich paracetamol a kofeín<sup>67</sup>. Ich vzájomné simultánne stanovenie je demonštrované na obr. 2.

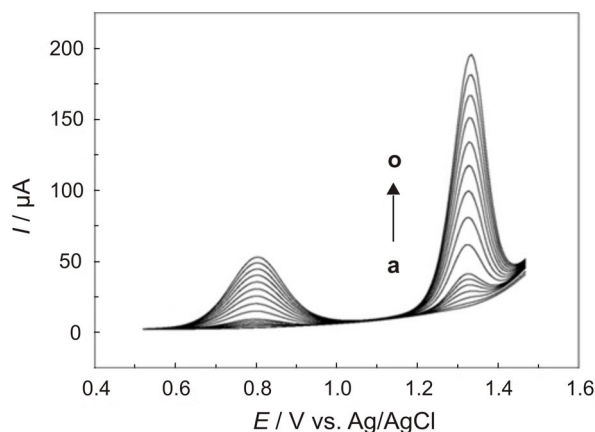
## 5. Záver

Tento prehľadný referát pojednáva o kofeíne ako biologicky významnej látke a analytických metódach použiteľných pre jeho stanovenie. Ide o xantínový alkaloid, ktorý sa pridáva do špeciálne pripravených energetických nápojov a rôznych farmaceutických produktov. Jeho najväčší význam spočíva v stimulácii CNS, s čím súvisí zvýšenie duševnej a (dlhodobej) telesnej výkonnosti a oddialenie nástupu únavy. Zvýšený príjem kofeínu môže však namiesto očakávaného povzbudenie spôsobiť nervovo-svalovú podráždenosť, nervozitu, poruchy trávenia, zrýchlenie či nepravidelnú srdcovú činnosť až nespavosť. Káva a rôzne kofeínové nápoje patria medzi dôležité produkty, pre ktoré sa vyžaduje najvyššia kontrola kvality v rámci medzinárodného obchodu. Vzhľadom k vysokému počtu kofeínových vzoriek preto dôležitú úlohu zohrávajú také analytické metódy, ktoré poskytujú rýchle a spoľahlivé údaje o kvalite a kvantite. V referáte sú zhrnuté možnosti analytického stanovenia kofeínu v rôznych matriciách. K najpoužívanejším inštrumentálnym technikám na stanovenie kofeínu v analytických laboratóriách patria separačné metódy v spojení so spektrálnymi technikami vďaka vysokej citlivosti a selektivitě.

*Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA (projektmi č. 1/0051/13 a 1/0008/12).*

## LITERATÚRA

1. Abourashed E. A., Koetter U., Brattström A.: *Phyto-medicine* 11, 633 (2004).
2. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M.: *Anal. Chim. Acta* 547, 197 (2005).
3. Kerrigan S., Lindsey T.: *Forensic Sci. Int.* 153, 67 (2005).
4. Franca A. S., Mendonca J. C. F., Oliveria S. D.: *Food Sci. Technol.* 38, 709 (2005).
5. Esquivel P., Jiménez V. M.: *Food Res. Int.* 46, 488 (2012).
6. Glade M. J.: *Nutrition* 26, 932 (2010).
7. Grundmann M.: *Interní medicína pro praxi* 4, 187 (2001).
8. Jura Y. H., Townsend M. K., Curhan G. C., Resnick N. M., Grodstein F.: *J. Urology* 185, 1775 (2011).
9. Shechter M., Shalmon G., Scheinowitz M., Koren-Morag N., Feinberg M. S., Harats D., Sela B. A., Sharabi Y., Chouraqui P.: *Am. J. Cardiol.* 107, 1255 (2011).
10. Vanattou-Saïfoudine N., Gossen A., Harkin A.: *Eur. J. Pharmacol.* 650, 220 (2011).



Obr. 2. DPV voltampérogramy paracetamolu ( $E_p = 0,8$  V vs. Ag/AgCl) a kofeínu ( $E_p = 1,3$  V vs. Ag/AgCl) v  $0,2$  mol  $\text{l}^{-1}$  ABS (pH 4,5), sledované koncentračné hladiny: (a)  $5 \cdot 10^{-7}$ , (b)  $2 \cdot 10^{-6}$ , (c)  $4 \cdot 10^{-6}$ , (d)  $5,9 \cdot 10^{-6}$ , (e)  $7,9 \cdot 10^{-6}$ , (f)  $9,8 \cdot 10^{-6}$ , (g)  $1,9 \cdot 10^{-5}$ , (h)  $2,8 \cdot 10^{-5}$ , (i)  $3,7 \cdot 10^{-5}$ , (j)  $4,5 \cdot 10^{-5}$ , (k)  $5,4 \cdot 10^{-5}$ , (l)  $6,1 \cdot 10^{-5}$ , (m)  $6,9 \cdot 10^{-5}$ , (n)  $7,6 \cdot 10^{-5}$  a (o)  $8,3 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{l}^{-1}$  na BDD elektróde. DPV parametre: modulačná amplitúda 100 mV, modulačný čas 7 ms, rýchlosť polarizácie 70 mV  $\text{s}^{-1}$  (cit.<sup>67</sup>)

11. Nehlig A.: *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 563 (1999).
12. Pelchovitz D. J., Goldberger, J. J.: *Am. J. Med.* 124, 284 (2011).
13. Sherman H., Gutman R., Chapnik N., Meylan J., le Coutre J., Froy O.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 829 (2011).
14. Masdrakis V. G., Markianos M., Vaidakis N., Papakostas Y. G., Oulis P.: *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* 33, 41 (2009).
15. Barry R. J., Clarke A. R., Johnstone S. J., Rushby J. A.: *Biol. Psychol.* 77, 304 (2008).
16. Kennedy M. D., Galloway A. V., Dickau L. J., Hudson M. K.: *Nutr. Res.* 28, 609 (2008).
17. Sawynok J.: *Drugs* 49, 37 (1995).
18. Wallman K., Dawson B., Pontifex K., Goodman C., Eastwood P.: *J. Sci. Med.* 12, S70 (2009).
19. Taylor K. C., Small C. M., Dominguez C. E., Murray L. E., Tang W., Wilson M. M., Bouzyk M., Marcus M.: *Ann. Epidemiol.* 21, 864 (2011).
20. Nehlig A., Daval J. C., Debry G.: *Brain Res. Rev.* 17, 139 (1992).
21. Cronstein, B. N.: *J. Hepatol.* 53, 207 (2010).
22. Adolfo A. B., AhnAllen C. G., Tidey J. W.: *Schizophr. Res.* 107, 192 (2009).
23. Temple J. L.: *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 793 (2009).
24. Jarosz M., Wierzejska R., Siuba M.: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 160, 156 (2012).
25. Shakeel F., Ramadan W.: *Colloids Surf., B* 75, 356 (2010).
26. Yamaguchi S., Funahashi H.: *Theriogenology* 77, 926 (2012).
27. Singh S., Singh K., Gupta S. P., Patel D. K., Singh V. K., Singh R. K., Singh M. P.: *Brain Res.* 1283, 115 (2009).
28. Sawynok J., Reid A. R.: *Eur. J. Pharmacol.* 674, 248 (2012).
29. Sawynok J., Reid A. R., Fredholm B. B.: *Neurosci. Lett.* 473, 178 (2010).
30. Basheer R., McKenna J. T., McCarley R. W.: *Encyclopedia of Neuroscience 2009*, 601.
31. Ballas C., Dinges D. F.: *Encyclopedia of Neuroscience 2009*, 419.
32. Backhouse S. H., Biddle S. J. H., Bishop N. C., Williams C.: *Appetite* 57, 247 (2011).
33. Higdon J. V., Frei B.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 101 (2006).
34. Fredholm B. B., Batig K., Holmén J., Nehlig A., Zvartau E. E.: *Pharmacol. Rev.* 51, 83 (1999).
35. Rogers N. L., Dinges D. F.: *Clin. Sport. Med* 24, E1 (2005).
36. Fukuda D. H., Smith A. E., Kendall K. L., Stout J. R.: *Nutr. Res.* 30, 607 (2010).
37. Chou T. M., Benowitz N. L.: *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 173 (1994).
38. Gardinali P. R., Zhao X.: *Environ. Int.* 28, 521 (2002).
39. Verenitch S. S., Lowe C. J., Mazumder A.: *J. Chromatogr., A* 1116, 193 (2006).
40. Brunetto M. R., Delgado, Y., Galignani M., Zambrano A., Ramos G., Romero C.: *Food Chem.* 100, 459 (2007).
41. Al-Othman Z. A., Aqel A., Alharbi K. E. M., Badjah-Hadj-Ahmed Y. A.: *Food Chem.* 132, 2217 (2012).
42. Schreiber-Deturmeny E., Bruguerolle B.: *J. Chromatogr., B* 677, 305 (1996).
43. Zou J., Li N.: *J. Chromatogr., A* 1136, 106 (2006).
44. Ku Y. R., Wen-Ting K. C., Ho L., Yuan-Shiun CH.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 351 (1999).
45. Chen Q. C., Wang J.: *J. Chromatogr., A* 937, 57 (2001).
46. Singh D. K., Sahu A.: *Anal. Biochem.* 349, 176 (2006).
47. Bouhsain Z., Garrigues M. J., Garrigues S., Guardia M.: *Vib. Spectrosc.* 21, 143 (1999).
48. Sinija V. R., Mishra H. N.: *Food Sci. Technol. Res.* 42, 998 (2009).
49. Huck C. W., Guggenbichler W., Bonn K. G.: *Anal. Chim. Acta* 538, 195 (2005).
50. Belay A.: *Food Chem.* 121, 585 (2010).
51. Guo S., Zhu Q., Yang B., Wang J., Ye B.: *Food Chem.* 129, 1311 (2011).
52. Brunetti B., Desimoni E., Casati P.: *Electroanalysis* 19, 385 (2007).
53. Yang S., Yang R., Li G., Qu L., Li J., Yu L.: *J. Electroanal. Chem.* 639, 77 (2010).
54. Zen J. M., Yu T., Shih Y.: *Talanta* 50, 635 (1999).
55. Zhao F., Wang F., Zhao W., Zhou J., Liu J., Zou L., Ye B.: *Microchim. Acta* 174, 383 (2011).
56. Sun J.-Y., Huang K.-J., Wei S.-Y.: *Can. J. Chem.* 89, 697 (2011).
57. Zhang J., Wang L. P., Guo W.: *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 6, 997 (2011).
58. Martínez-Huitle C. A., Fernandes N. S., Ferro S., De Battisti A., Quiroz M. A.: *Diamond Relat. Mater.* 19, 1188 (2010).
59. Alizadeh T., Ganjali M. R., Zare M.: *Electrochim. Acta* 55, 1568 (2010).
60. Švorc L., Tomčík P., Svitková J., Rievaj M., Bustin D.: *Food Chem.* 135, 1198 (2012).
61. Spătaru N., Sarada B. V., Tryk D. A., Fujishima A.: *Electroanalysis* 14, 721 (2002).
62. Campean A., Tertis M., Sandulescu R.: *Cent. Eur. J. Chem.* 9, 688 (2011).
63. Ly S. Y., Jung Y. S., Kim M. H.: *Microchim. Acta* 146, 207 (2004).
64. Zen J. M., Ting Y. S., Shih Y.: *Analyst* 123, 1145 (1998).
65. Zen J. M., Ting Y. S.: *Anal. Chim. Acta* 342, 175 (1997).
66. Lau O. W., Luk S. F., Cheung Y. M.: *Analyst* 114, 1047 (1989).
67. Lourenção B. C., Medeiros R. A., Rocha-Filho R. C., Mazo L. H., Fatibello-Filho O.: *Talanta* 78, 748 (2009).

**E. Švorc<sup>a</sup>, P. Tomčík<sup>b</sup>, J. Svítková<sup>a</sup>, M. Rievaj<sup>a</sup>,  
and D. Bustin<sup>a</sup>** (*<sup>a</sup>Institute of Analytical Chemistry, Faculty  
of Chemical and Food Technology, Slovak Technical  
University, Bratislava, <sup>b</sup>Department of Chemistry, Faculty  
of Education, The Catholic University, Ružomberok*):  
**Analytical Methods for Determination of Caffeine As  
Biologically Important Substance**

This review summarizes properties, health effects and analytical methods for determination of caffeine.