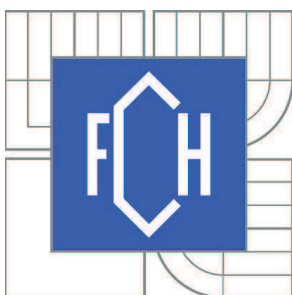


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ VSTŘEBÁVÁNÍ KOFEINU Z KOLOVÝCH NÁPOJŮ

INFLUENCING OF CAFFEIN ABSORPTION FROM COLA-TYPE BEVERAGES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

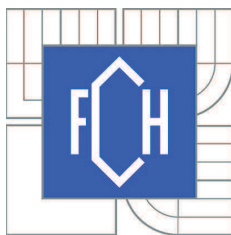
Bc. KAROLÍNA OSECKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0851/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Karolína Osecká	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Možnosti ovlivnění vstřebávání kofeinu z kolových nápojů

Zadání diplomové práce:

1. Provést rešerši na téma vlastnosti kofeinu, jejich účinek na lidský organismus, vstřebávání kofeinu v zaživacím traktu.
2. Na základě výsledků rešerše navrhnout a realizovat experimenty zkoumající fyzikálně-chemické vlastnosti kofeinu důležité pro zadanou aplikaci, zejména jeho acidobazické vlastnosti.
3. Posoudit interakce kofeinu s vybranými typy stravitelných polysacharidů, zejména v kyselém prostředí.
4. Zhodnotit získané výsledky zejména z hlediska možnosti potlačení rychlosti vstřebávání kofeinu v zaživacím traktu.

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Karolína Osecká
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

doc. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem základních fyzikálně-chemických vlastností kofeinu a interakci mezi polysacharidem hyaluronanem (HA), pektinem (PEC) nebo lignohumátem (HUM) a alkaloidem kofeinem (CAF). Důvodem, proč je tato práce zaměřena na studování vlastností vodných roztoků hyaluronanu nebo pektinu s kofeinem je ten, že systém polysacharid-kofoein by mohl být přínosem pro zpomalení vstřebávání kofeinu.

V teoretické části práce je popsána skupina alkaloidů, do které kofein patří a také polysacharidy kyselina hyaluronová a pektin. Největší pozornost byla věnována kofeinu, jeho vlastnostem a účinkům na lidský organismus. Práce se dále zabývá nealkoholickými kofeinovými nápoji, 4-methylimidazolem a kyselinou fosforečnou. Poslední kapitola teoretické části pojednává o fluorescenční spektroskopii.

Experimentální část práce se týká základních vlastností kofeinu a interakci mezi kofeinem a zvolenými polysacharidy nebo lignohumátem. Nejdříve se studovaly chemické a fyzikální vlastnosti kofeinu a na základě těchto výsledků byla studována interakce kofeinu a hyaluronanu nebo pektinu pomocí fluorescence a absorbance. Pro studium této interakce byla vybrána HA o molekulové hmotnosti 1,7 MDa a pektin z citrusových plodů, které se mísily s kofeinem o koncentraci kofeinu obsaženého v Coca-Cole. Výsledky interakci, která by vedla k ovlivnění emisních nebo absorpčních vlastností kofeinu, neprokazují.

Součástí práce bylo zjistit, jak se chová pektin v silně kyselém prostředí a sledovat pH, vodivost a rozpustnost kofeinu ve vodě pomocí termogravimetrie a vizuálních experimentů.

Získané výsledky o interakci hyaluronan-kofoein, pektin-kofoein nebo lignohumát-kofoein mohou sloužit k popisu chování kofeinu v přítomnosti zvolených polysacharidů a přírodní organické látky.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kofein, kyselina hyaluronová, pektin, alkaloidy

ABSTRACT

This diploma thesis was focused on basic physicochemical properties of caffeine and investigation of the interaction between the polysaccharide sodium hyaluronan (HA), pectin (PEC) or lignohumate (HUM) and the alkaloid caffeine (CAF). The reason why this thesis was focused on study of aqueous solutions of hyaluronan or pectin with caffeine is that the presence of polysaccharide- caffeine complex could be beneficial for slowing the absorption of caffeine.

In the theoretical part of the diploma thesis there is described a group of alkaloids, which caffeine belongs to and also polysaccharides hyaluronic acid and pectin. The most attention has been paid to caffeine, its properties and effects on the human organism. This diploma thesis also deals with non-alcoholic beverages with caffeine, 4-methylimidazole, and phosphoric acid. The last chapter of the theoretical part is dedicated to fluorescence spectroscopy.

In the experimental part of this work I deal with the basic properties of caffeine and interaction between the caffeine and selected polysaccharides or lignohumate. At first, the chemical and physical properties of caffeine were determined. Based on these results the interaction of caffeine and hyaluronan or pectin was studied by using the fluorescence and absorbance. The HA of molecular weight of 1,7 MDa and pectin from citrus fruits were chosen for the study of the interaction with the caffeine. These two substances were mixed with the caffeine of concentration contained in Coca-Cola. The results of interaction that would lead to the influence of the emission or absorption properties of caffeine, were not proved.

As a part of the work there was determined how pectin behaves in strongly acidic solution and then there was monitored the pH, conductivity and solubility of caffeine in water by using thermogravimetry and visual experiments.

The obtained results of the interaction of hyaluronan-caffeine, pectin caffeine or caffeine-lignohumate can be used for description of the behavior of caffeine in the presence of selected polysaccharides and natural organic substance.

KEYWORDS

Caffeine, hyaluronic acid, pectin, alkaloids

OSECKÁ, K. Možnosti ovlivnění vstřebávání kofeinu z kolových nápojů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 49 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Miloslavovi Pekařovi, CSc. za odborné konzultace, čas, který mi věnoval a cenné rady, kterými přispěl k vypracování mé diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3	ALKALOIDY.....	9
4	KOFEIN.....	11
4.1	Metabolismus kofeinu v těle.....	13
4.1.1	Kam kofein pronikne?.....	13
4.1.2	Metabolismus kofeinu.....	14
4.2	Obsah kofeinu.....	18
4.2.1	Čaj.....	20
4.2.2	Káva.....	21
4.2.3	Kofola.....	22
4.2.4	Coca-Cola.....	23
4.2.5	Rakovina, jiné nemoci a kofein.....	26
5	KYSELINA HYALURONOVÁ.....	29
5.1	Charakteristika.....	29
5.2	Výskyt a úloha v organismu.....	30
5.3	Dělení hyaluronanu dle molekulové hmotnosti.....	30
5.4	Syntéza.....	31
5.5	Výroba kyseliny hyaluronové.....	32
6	PEKTIN.....	33
7	FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE.....	34
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
8.1	Seznam použitých přístrojů a chemikálií.....	35
8.1.1	Použité přístroje.....	35
8.1.2	Použité chemikálie.....	35
8.1.3	Použitý kofein.....	35
8.1.4	Použitá kyselina hyaluronová.....	35
8.1.5	Použitý pektin.....	35
8.2	Příprava roztoků.....	36
8.2.1	Příprava zásobního roztoku pektinu.....	36
8.2.2	Příprava zásobního roztoku kyseliny hyaluronové.....	36
8.2.3	Příprava zásobního roztoku kofeinu.....	36
8.2.4	Příprava zásobního roztoku kyseliny chlorovodíkové.....	36
8.2.5	Příprava zásobního roztoku lignohumátu.....	36

8.2.6	Příprava zásobního roztoku polyfenolů	36
8.3	Příprava vzorků	36
8.3.1	Koncentrační řada kofeinu	36
8.3.2	Kofein s pektinem, hyaluronanem a lignohumátem v kyselém prostředí... 36	
8.3.3	Kofein s pektinem, hyaluronanem, lignohumátem a polyfenoly	36
8.3.4	Roztoky pro termogravimetrická měření	37
8.3.5	Kofein na titraci.....	37
8.3.6	Kofeinové roztoky na uv/vis spektrometrii.....	37
8.3.7	Kofein na rozpustnost.....	37
8.4	Vlastní měření	37
8.4.1	Sledování rozpustnosti kofeinu	37
8.4.2	Měření rozpustnosti kofeinu pomocí termogravimetrie	37
8.4.3	Stanovení pH a měrné vodivosti kofeinových roztoků.....	37
8.4.4	Titrace roztoku kofeinu.....	37
8.4.5	Vizuální pozorování chování hyaluronanu a pektinu v kyselém pH.....	38
8.4.6	Měření absorpčních spekter kofeinu o různých koncentracích	38
8.4.7	Měření absorpčních spekter kofeinu s HA a HUM v kyselém prostředí....	38
8.4.8	Měření absorpčních spekter CAF s POLYF a HUM ve vodném prostředí	38
8.4.9	Měření absorpčních spekter Kofoly a Coca-Coly	38
8.4.10	Měření absorpčních spekter CAF s PEC ve vodném a kyselém prostředí .	38
8.4.11	Měření emisních spekter kofeinu s PEC ve vodném a kyselém prostředí..	38
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
9.1	Sledování rozpustnosti kofeinu	39
9.2	Měření rozpustnosti kofeinu pomocí termogravimetrie	39
9.3	Stanovení pH a měrné vodivosti kofeinových roztoků.....	40
9.4	Titrace roztoku kofeinu.....	42
9.5	Vizuální pozorování chování hyaluronanu a pektinu v kyselém pH.....	45
9.6	Měření absorpčních spekter kofeinu o různých koncentracích	45
9.7	Měření absorpčních spekter kofeinu s HA a HUM v kyselém prostředí.....	47
9.8	Měření absorpčních spekter CAF s POLYF a HUM ve vodném prostředí	48
9.9	Měření absorpčních spekter Kofoly a Coca-Coly	49
9.10	Měření absorpčních spekter CAF s PEC ve vodném a kyselém prostředí.....	50
9.11	Měření emisních spekter kofeinu s PEC ve vodném a kyselém prostředí.....	50
10	ZÁVĚR	52
11	LITERATURA	53

1 ÚVOD

Proč je kofein tak oblíbený? Dnes je součástí mnoha potravin, nápojů, doplňků stravy i léčiv. Pitný režim bývá často obohacován minimálně jedním šálkem kávy denně, ať už v zaměstnání, na cestách či doma a často ani nezapomínáme na velmi oblíbený nápoj Coca-Cola. Existuje mnoho důvodů, proč pít kávu či Coca-Colu pro jejich příjemnou chuť, vůni a pro očekávané účinky jako je povzbuzení, energie, zlepšení koncentrace, nálady, zvýšení pracovní výkonnosti. Pomáhají nám překonávat únavu, pozitivně ovlivňují naši bdělost a duševní aktivitu, a především pijeme tyto nápoje pro stimulační účinky kofeinu.

Určitě každý už někdy na Vánoce viděl reklamu kamionů přivázejících Coca-Colu, která nám namlouvá, že bez tohoto nealkoholického kofeinového nápoje by vlastně skoro ani Vánoce nemohly být. Každý jistě ví, na co se všechno dá Coca-Cola použít např. na odstranění rezu a barvy, na čištění mincí, mastných skvrn, záchodů ale i motorů u auta. Teď si představme, co dělá Coca-Cola v žaludku. Už jste někdy přemýšleli o tom, z čeho přesně Coca-Cola je? Včetně obrovského množství cukru Coca-Cola obsahuje i kyselinu fosforečnou, která ve větším množství nemá příliš dobrý vliv na naše zdraví, stejně tak i 4-methylimidazol. A proto se v teoretické části zabývám z čeho se Coca-Cola skládá a jak by mohla ohrozit naše zdraví, ačkoli je pití Coca-Coly velmi slabý rizikový faktor pro onemocnění rakovinou, neuškodí vyhnout se vysoké spotřebě.

Při dlouhodobém užívání kofeinu však může dojít k toleranci na tuto látku, nebo až návyku a po vysazení k abstinenčním příznakům, tomu se říká kofeinismus. Většina z nás si den bez šálku lahodné kávy nedovede ani představit. Kofein patří mezi nejrozšířenější druhy závislostí, které známe. Sám kofein patří do skupiny, kterou nazýváme alkaloidy, kam společně i s ním řadíme například morfin, kokain, heroin a jiné silné drogy.

Kávu, čaj, čokoládu, Coca-Colu, Kofolu má každý rád, nejen protože skvěle chutnají, ale i proto, že se po nich cítíme skvěle. A za naši dobrou náladu může právě kofein. Jeho blahodárné účinky ale nevydrží věčně, šlo by je nějakým způsobem prodloužit či ovlivnit?

Cílem práce bylo získat základní informace o interakci mezi zvolenými polysacharidy hyaluronanem (HA), pektinem (PEC) nebo lignohumátem a alkaloidem kofeinem (CAF), protože systém hyaluronan-kofein, pektin-kofein nebo lignohumát-kofein by mohl být přínosem pro zpomalení vstřebávání kofeinu.

Součástí práce bylo zjistit základní vlastnosti kofeinu, protože se nikde neuvádějí, bylo potřeba studovat fyzikálně-chemické vlastnosti kofeinu jako je pH, vodivost, rozpustnost. Je dobře známo, že hyaluronan a pektin v kyselém prostředí geluje. V žaludku by tak mohly vytvořit gelové částice uzavírající kofein.

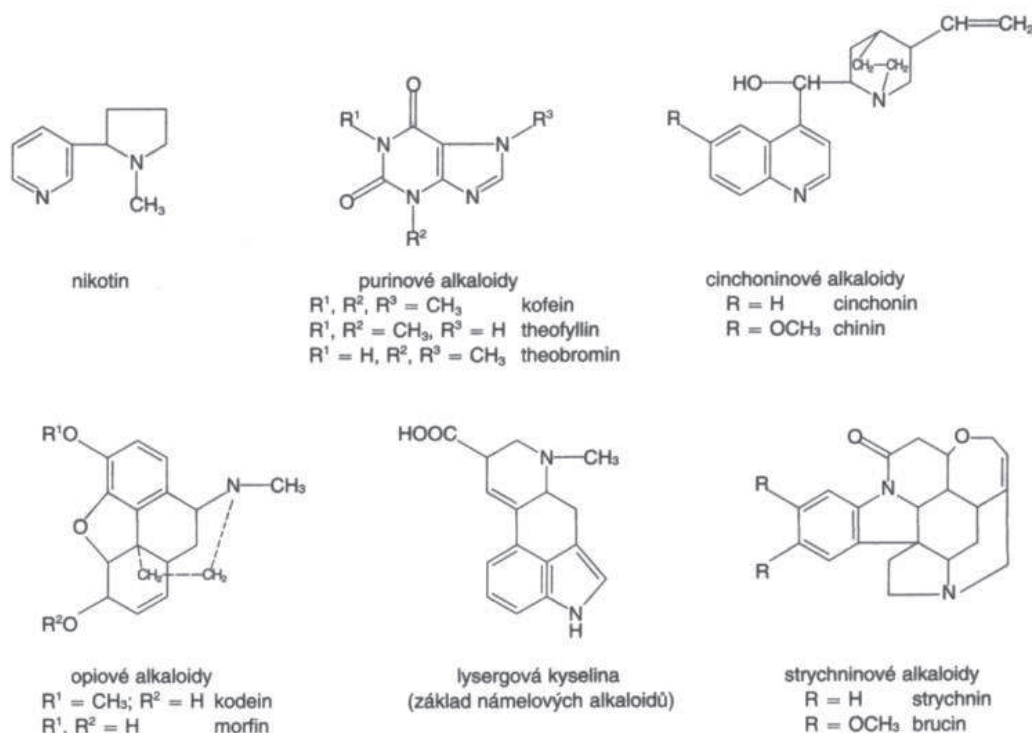
Získané výsledky o interakci hyaluronan-kofein nebo pektin-kofein či lignohumát-kofein mohou sloužit k popisu chování kofeinu v přítomnosti zvolených polysacharidů a přírodní organické látky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

3 ALKALOIDY

Alkaloidy v rostlinné říši tvoří jednu z nejpočetnějších skupin; bylo jich dosud izolováno kolem 7 000. Německý lékárník C. F. W. Meissner pojmenoval tuto skupinu alkaloidy v roce 1819 [1]. Není žádné hodnotící hledisko, které by charakterizovalo alkaloidy jako jednotnou homogenní skupinu přírodních látek. Alkaloid je bazická organická sloučenina s jedním nebo více heterocyklickými dusíkovými atomy v molekule, vyskytující se v přírodě ve formě solí s organickými kyselinami [2].

Alkaloidy se nejčastěji vyskytují v různých částech vyšších rostlin (především v semenech, listech, kořenech a kůře stromů aj.). Rostliny obvykle obsahují různé směsi alkaloidů. Alkaloidy se nacházejí také u určitých druhů mechů, hub a bakterií. U nezralých makovic v mléčné šťávě se nachází 20-30 % alkaloidů benzylochinolinového typu. Skupiny alkaloidů bývají označovány podle rostlinných druhů, v nichž se vyskytují (např. opiové, koniové, cinchonové, strychnové, akonitové, katarantové alkaloidy), nebo podle základu jejich struktury (benzylochinolinové, tropanové, steroidní alkaloidy aj.). Alkaloidy mají převážně triviální názvy, vycházejí obvykle z názvu rostliny, v níž byly objeveny. Většina alkaloidových rostlin je známa velice dlouho v lidové medicíně pro jejich toxicitu nebo užitečné farmakologické vlastnosti. V roce 1806 německý lékárník F. N. Sertürner izoloval první alkaloid-morfin jako "uspávací prostředek z máku". První umělou syntésu alkaloidu koniinu z α -pikolinu v roce 1886 provedl A. Ladenburg [3].



Obr. 1. Struktura některých alkaloidů [4].

K dělení alkaloidů lze použít různých hledisek. Mohou se klasifikovat na tři hlavní základní skupiny:

- pravé alkaloidy, kam patří například nikotin v tabáku
- pseudoalkaloidy, zde je zástupcem kofein v kávě a solanin v bramborech
- protoalkaloidy, kde příkladem je kapsacin vyskytující se v pálivých paprikách

Běžná klasifikace se používá podle heterocyklických systémů přítomných v molekule alkaloidu. Alkaloidy se rozlišují s jádrem pyrrolidinovým, pyridinovým, piperidinovým, peperazinovým, isochinolinovým atd. Pravým alkaloidem s pyridinovým jádrem je nikotin a řada jiných alkaloidů tabáku. V molekule některých alkaloidů se může vyskytovat kombinace různých heterocyklů, např. nikotin lze řadit mezi pyridinové i pyrrolidinové alkaloidy. Dnes se začíná prosazovat klasifikace alkaloidů na základě jejich biogeneze, tj. syntetického původu [2].

Alkaloidy jsou konečnými produkty sekundárního metabolismu a vykazují různé biologické účinky, nepodléhají výrazné degradaci. Většinou vznikají z aminokyselin, které poskytují heterocyklické atomy dusíku. V syntéze alkaloidů mohou být dále zahrnuty octová a mevalonová kyselina a donory jednouhlíkových jednotek. Společnou vlastností téměř všech alkaloidů je, že jsou to látky fyziologicky neobyčejně aktivní. Mají silný a specifický účinek na organismus, některé alkaloidy jsou silně jedovaté. Alkaloidy mají různé, často specifické účinky na centra nervového systému. Využívají se v medicíně ve formě čistých látek, extraktů obsahujících směsi alkaloidů i jako synteticky vyrobené. V malých dávkách mají příznivé, většinou povzbuzující účinky, ve vyšších dávkách působí opačně. Terapeutické použití alkaloidů je často doprovázeno vedlejšími účinky, hlavně toxickými a narkotickými. Často jde o návykové látky [1].

Nejdůležitější alkaloidy používané v lékařství jako léčebné prostředky jsou např. morfin, získaný z vysušené mléčné šťávy nezralých makovic, opium, jako utišující prostředek k tlumení bolesti. Kodein vyráběný metylací morfinu, heroin acetylací dvou hydroxylových skupin morfinu acetylchloridem. Dále atropin, kokain z koky, tropanový alkaloid skopolamin, cinchonový alkaloid chinin, rauwolfiový alkaloid reserpin, snižující krevní tlak a tepajmalina serpentín, terpenový alkaloid akonitin, ricinin, strychnin a brucin, katarantové alkaloidy vinblastin a vinkristin a ze zrnek kávy, listů čaje a kakaových bobů kofein, který povzbuzuje centrální nervovou soustavu a srdeční činnost a podporuje činnost ledvin a zvyšuje tvorbu moči. Močopudný prostředek je též theobromin [1, 3].

4 KOFEIN

Alkaloidy odvozené od purinu, resp. od produktu jeho oxidace xanthinu, jsou nejrozšířenějšími alkaloidy v potravinách. Purinové alkaloidy jsou methylderiváty xanthinu. 1,3,7-trimethylxanthin, triviálně zvaný kofein, je nejrozšířenější z purinových alkaloidů. Je doprovázen dimethylxanthiny theobrominem, theofyllinem aparaxanthinem a rovněž monomethylxanthinem heteroxanthinem a methylmočovými kyselinami, které jsou s výjimkou kakaa a čokolády minoritními alkaloidy, záleží na počtu nahrazených methylových skupin vodíky. Theofyllin, 1,3-dimethylxanthin, má podobně jako theobromin, 3,7-dimethylxantin,

o jednu metylovou skupinu v molekule méně. Theobromin je hlavním methylxanthinem v kakau, neobsahuje brom, a je to diuretikum (zvyšuje produkci moči). Čokoláda obsahuje 2,2% theobrominu a 0,1% kofeinu, ale kofein je sedmkrát silnější než theobromin [2, 5, 15].

Kofein je bílá, krystalická, hydrofobní látka bez zápachu, která má sumární vzorec $C_8H_{10}N_4O_2$ a chemický vzorec 1,3,7-trimethylxanthine. Molekula xanthinu má vodíky vázané na dusíky a nahrazením těchto vodíků methylovými skupinami, vznikne kofein. Vyskytuje se např. v kávových semenech, kakaových bobech, v listech čajovníku, v bobulích guarany, v cesmínu a maté. Povzbuzuje srdeční činnost, a proto se hojně používá v lékařství. Další názvy pro kofein jsou 7-methyltheobromin, 3,7-dihydro- 1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6-dion, Coffeinum [6, 7].



Obr. 2. Molekula kofeinu [8].

Tab. č. 1: Obecné informace o kofeinu [7, 9].

Chemický název	1,3,7-trimethylxanthin
Sumární vzorec	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
Molární hmotnost	194,19 g/mol
Rozpustnost ve vodě (20 °C)	20 g/l
Relativní hustota (20 °C)	1,23 g/cm ³
Hodnota pH (10 g/l H ₂ O, 20 °C)	5,5-6,5
Teplota varu	178 °C (sublimuje)
Bod tání /bod tuhnutí	235-239 °C
Tenze par (20 °C)	20 kPa

Methylxanthiny jsou velmi stabilní sloučeniny a až na výjimku reakcí při fermentaci čajových listů a kakaových bobů k dalším reakcím během technologického zpracování surovin a skladování prakticky nedochází. Při výrobě zeleného a černého čaje vznikají dimethylxanthiny a další puriny jakožto produkty katabolismu kofeinu. Při pražení kávy zůstává obsah kofeinu prakticky na stejných hodnotách. Kofein získaný extrakcí z kávy a syntetický kofein se užívají ve farmaceutickém průmyslu a jako přísada do nealkoholických nápojů. Syntetický kofein se vyrábí metylací xanthinu, který je syntetizován z kyseliny močové. Trigonellin, který doprovází alkaloidy kávy, se však rozkládá na nikotinovou kyselinu a na těkavé sensoricky aktivní pyridiny. Poměr obsahů trigonellinu a kofeinu se využívá jako indikátor stupně pražení kávy. Kofein působí výrazně na lidské chuťové buňky a přispívá k celkové chuti kávy. I ve velmi nízkých koncentracích ovlivňuje chuť sladkých, hořkých a slaných přísad limonád. Také proto se do nich přidává. Z hlediska farmakologického působení patří mezi stimulanty (látky povzbudivé) [2,10].

Kofein má centrální i periferní účinky, které závisí na velikosti dávky. V denních malých dávkách (<3 mg.kg⁻¹) působí kofein jako stimulant centrálního nervového systému. Vyšší dávky mají různé neuroendokrinní účinky a velmi vysoké dávky působí teratogenně. Theobromin a theofyllin vykazují slabší stimulační účinky než kofein, mohou působit abnormality spermatogenních buněk [2].

Více než 99% přijatého kofeinu např. vypitím kávy se vstřebává okamžitě a nejsilnější účinek, kdy je v krvi nejvyšší koncentrace kofeinu, se dostavuje již za 15-45 minut. Potom začíná jeho hladina klesat a biologický poločas kofeinu je 3-5 hodin[11]. Účinky jsou vysoce individuální jako u všech návykových látek a rychle se vyvíjí tolerance. Po požití nadměrného množství kofeinu dochází k intoxikaci, projevující se nervozitou, neklidem, bušením srdce, nespavostí, bolestmi hlavy a podrážděním. Srdeční tep je zrychlený s nepravidelným rytmem. Smrtelná dávka bývá odhadována nad 5 gramů kofeinu, i když 37-letá žena po požití přibližně 27 g kofeinu v pokusu o sebevraždu přežila [12], ale 39-letá žena s obsahem 192 mg / l kofeinu v krvi a 29-letý muž s 567 mg/l kofeinu v krvi zemřeli. V obou případech byla příčinou smrti intoxikace kofeinem [13]. Otravy vyššími dávkami mohou být při podání methylxanthinů jako léků, zvláště nitrožilně. Příznaky jsou podobné těm, které zde byly uvedeny, přistupuje zvracení, bolest hlavy, mohou se objevit i křeče [5].

4.1 Metabolismus kofeinu v těle

4.1.1 Kam kofein pronikne?

Nežádoucí vlastností kofeinu je jeho snadné proniknutí biologickými ochrannými bariérami např. přes placentu do krve plodu. To znamená, že z kávy vypité matkou se kofein dostává do krevního oběhu plodu a to někdy ve značném množství. V jednom případě se našlo v krvi předčasně narozeného dítěte 0,1 mg/ml kofeinu v krevní plazmě, toto u dospělých už vyvolává toxické příznaky, matka totiž pila během těhotenství 24 šálků kávy denně. Kofein se také snadno dostává do mateřského mléka [14].

Mozek, centrální nervový systém

Pro psychické působení kofeinu je důležitá jeho schopnost dostat se do mozku, řada látek do mozku nepronikne, kofein však ano [10].

Kofein je populární jako psychoaktivní droga vzhledem k jeho stimulačním účinkům. Snižuje přenos adenosinu v mozku a tím podporuje funkce jako je bdělost, pozornost, nálada a vzrušení. Adenosin se obvykle hromadí v extracelulárním prostoru [10, 15].

Kofein má mírný stimulační, povzbudivý účinek jako teofylin. Teobromin tyto účinky nemá [5].

Dýchání

Theofylin uvolňuje hladké svalstvo průdušek a byl používán pro tento účel v léčbě astmatu. Spolu s kofeinem povzbuzuje ve vyšších dávkách dýchání. Působením v nervových centrech v horní části míchy, která intenzitu dechu řídí, se zvyšuje účinek plynu oxidu uhličitého, který tato centra dráždí při rychlejším dýchání za účelu odbourání CO₂ v krvi [5, 23].

Srdce, cévy

Theobromin rozšiřuje cévy a snižuje krevní tlak. Jde o snížení či zvýšení tepu a může dojít i k poruchám pravidelné činnosti srdce. Kofein může zvýšit i srdeční výkon tím, že se do krevního oběhu dostane větší množství krve. Kofein i teofylin rozšiřují cévy téměř v celém těle včetně koronárních tepen v srdci. Uvolňují do krve adrenalin a renin, proto dojde ke zvýšení krevního tlaku [15, 16, 20, 21]. Opakovaný příjem kofeinu se nazývá tolerance, to znamená snášenlivost organismu vůči nějaké látce. Tělo se naučí kofein snášet a přestane se zvyšovat krevní tlak [17, 31].

Ledviny

Kofein má močopudné účinky, zvyšuje vylučování vody ledvinami poměrně krátkodobě. Při dostatečném přísunu tekutin není 24hodinová rovnováha příjmu a výdeje narušena. Diuretický účinek kofeinu má vliv na vápník v těle, zvyšuje se riziko osteoporózy u starších lidí při nízkém příjmu vápníku. Také theofylin je silné diuretikum [2, 5].

Žaludek, žlučník, trávení

Důležitý je účinek kávy a čaje na žaludeční sliznici. Kofein zvyšuje vylučování žaludeční kyseliny i enzymu pepsinu. Kladný vliv na naše trávení mají látky, na které se při pražení přemění kyselina chlorogenová, především pyrokatechol, hydrochinon a pyrogalol, a které dráždí žaludeční sliznici. Kofein povzbuzuje stahy žlučníku a tok žluči, působí proti tvorbě žlučových kamenů [22, 23].

Yukihiko Hara z japonského výzkumného potravinářského ústavu provedl výzkum s koncentrátem katechinů ze zeleného čaje. U kuřat a prasat bylo zjištěno zlepšení složení střevní bakteriální flóry, které se projevilo snížením hnilobných produktů, i u lidí byly objeveny kladné účinky. Byly užívány tablety s 500 mg katechinů denně v třech měsících. Katechiny zvýšily podíl bakterií produkujících kyselinu mléčnou a potlačily působení bakterií hnilobných. Dále bylo zjištěno, že katechiny z čaje tlumí růst bakterií *Helicobacter pylori*, které se podílejí na vzniku žaludečních a duodenálních vředů [24].

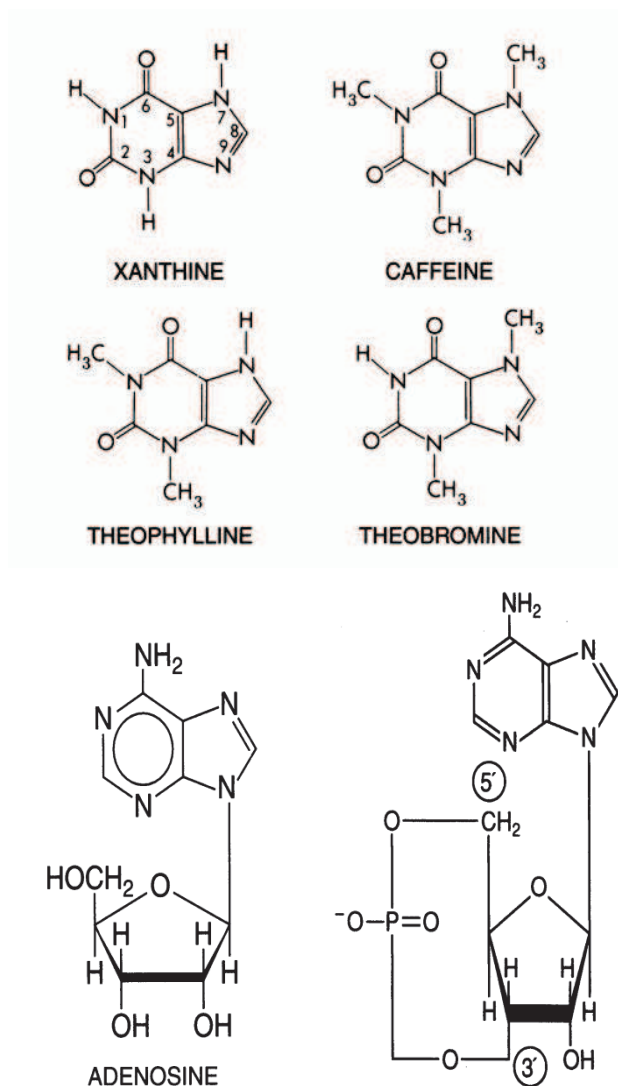
Japonští vědci z Univerzity v Osace zjistili, že extrakt nebo izolované polyfenoly z oolong čaje, tedy z částečně fermentovaných listů, působí na kmeny streptokoka v ústech, kde jsou tyto bakterie primární příčinou zubního kazu. Výsledky naznačují, že zkoušené látky tlumí jejich schopnost přilnout k zubnímu povrchu a snižují produkci kyseliny [25].

4.1.2 Metabolismus kofeinu

Po požití se kofein dostane do žaludku, kde se musí vstřebat z našeho trávicího ústrojí, proniknout žaludeční a střevní stěnou do krevních vlásečnic a s krví pak pronikat dál do těla. Kofein se v játrech chemicky přemění díky enzymům, které molekulu kofeinu pozměňují a to tak, že z ní odštěpí methylové skupiny, vznikají látky, které mají dvě methylové skupiny. Z molekul kofeinu vzniká více než 25 různých látek – metabolitů bez kofeinových účinků. Ty pak z krve odfiltrují ledviny. Kombinace kofeinu s nikotinem přeměnu kofeinu urychlí a hladina kofeinu v krevní plazmě klesá u kuřáků efektivněji. U žen v těhotenství se metabolismus kofeinu významně zpomaluje [14].

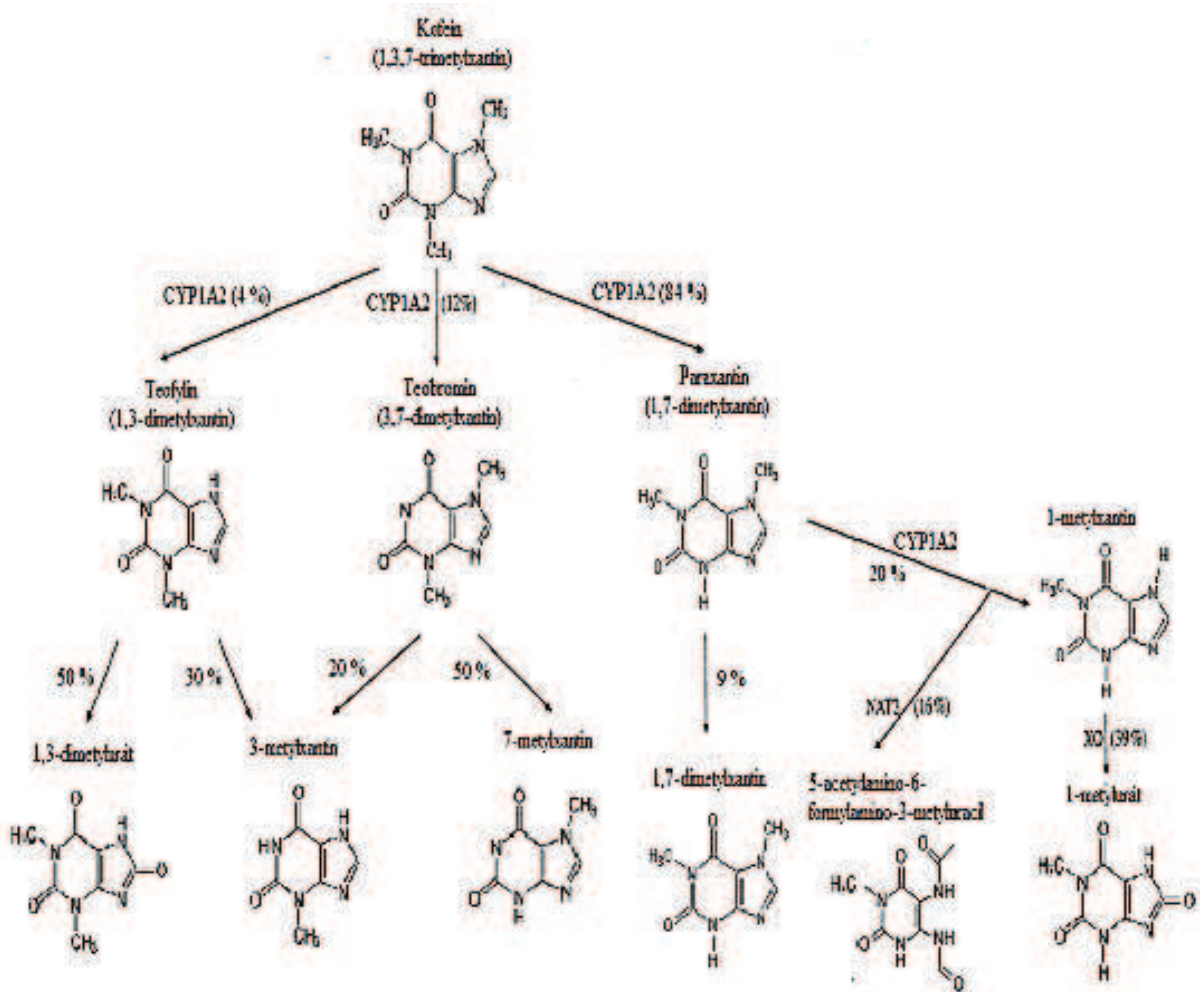
Kofein a theofylin využívají receptor adenosin k tomu, aby zabránily adenosinu v jeho činnosti, protože v těle ovlivňuje řadu funkcí: v mozku, cévách, ledvinách, plicích, trávicím ústrojí, imunitním systému, řídí aktivitu tělesných tkání. Jsou jeho antagonistou a působí proti němu, blokují ho. V řadě funkcí působí adenosin a kofein opačně, například hlavní účinek adenosinu v mozku je zastavit nervovou aktivitu, zatímco hlavní účinek kofeinu je naopak zvýšit nervovou aktivitu. Adenosin je adeninová molekula připojena k molekulám cukru ribóze nebo deoxyribóze. Podobnost v chemické struktuře mezi adeninovou částí adenosinu a kofeinové molekuly je klíčem k tomu, jak kofein funguje. Adenosin se akumuluje v extracelulární tekutině v důsledku buněčné fyziologie - a proto je propuštěn z obou neuronů a gliových buněk. Adenosin vzniká jako vedlejší produkt, který je produkován při využívání ATP (adenosin trifosfát, zdroj energie pro buněčný metabolismus). Adenin může být v těle deaminován na hypoxanthin, oxidován na xantin a opakovaně oxidován na kyselinu močovou pro vylučování. Cyklický AMP působí jako buněčná signalizační molekula, která přenáší signály z buněčné membrány do nitra buňky a jádra. Kofein působí jako inhibitor enzymu fosfodiesterázy, která způsobuje rozklad cyklického adenosinmonofosfátu. Prakticky tento jev nastane jen mírně v těle, protože množství potřebné k výraznému efektu je vyšší, než je množství k v plazmě pitím kávy. Vyžaduje 20krát tolik kofeinu k inhibici fosfodiesterázy, 40krát tolik kofeinu na zablokování GABAA receptorů a 100krát více kofeinu k mobilizaci

intracelulárního vápníku. Kofein působí především přímo na blokování adenosinových receptorů a nepřímo pro receptory neurotransmiteru [15].



Obr. 3. Vzorec xanthinu, kofeinu, theofylinu, theobrominu a adenosinu a cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) [15].

Xanthin je produkt rozpadu-vznikne adenin a guanin, dvě purinové báze, které jsou klíčové složky DNA a RNA. Kofein je metabolizován v játrech enzymem cytochromem P450, především formou *N*-demethylace nebo aromatické hydroxylace. Nejdůležitějším enzymem je 1A2 isoforma cytochromu P450 (CYP1A2), která zajišťuje *N*-demethylaci. Na biotransformaci kofeinu se podílí další enzymy jako *N*-acetyltransferáza (NAT) a xanthinoxidáza (XO). První produkty metabolismu jsou všechny dimethylxanthiny jak je tomu vidět na **Obr. 4.**: paraxanthin (84% 1, 7-dimethylxanthin), theobromin (12% 3, 7-dimethylxanthin) a theofylin (4% 1, 3-dimethylxanthin). Biologický poločas kofeinu u dospělého jedince je cca 5 hodin. Následně je kofein i jeho metabolity vyloučen z těla močí [15].



Obr. 4. Metabolismus kofeinu v játrech [15].

Stres

Kombinace kofeinu, který působí na krevní tlak a jeho současné zvýšení vyvolané stresem je rizikové. Pokud se káva pije ve zvýšené míře například při stresu z neúměrného pracovního zatížení nebo v konfliktních či emocionálně vypjatých situacích, tak kofein samotný zvyšuje hladiny dvou hormonů, které se stresem uvolňují do krve, adrenokortikotropní hormon a kortizol. Kofein může zhoršit působení stresu na duševní rovnováhu, atd. [5].

Kofein a theofylin jako léky

Kofein povzbuzuje naše dýchání a srdeční činnost. V injekční formě se používá k povzbuzení dechu a krevního oběhu, zejména při horečnatých stavech a infekčních onemocněních [5].

Léky, které si smějí koupit v lékárně ať na recept nebo bez předpisu, jako přípravky proti bolesti či k potlačení příznaků nachlazení také obsahují kofein, např. aspirin. Je to syntetická chemická sloučenina nesoucí název kyselina acetylsalicylová (ASA) a patří mezi nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID). Používá se jako cenný lék na zmírnění bolesti, zánětu či horečky. Ze všech NSAID je kyselina acetylsalicylová nejrozšířenější, protože je levná, dostupná a účinná při bolesti hlavy a nachlazení. Kofein (CAF) v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou se používá jako analgetikum pro úlevu od bolesti, ačkoliv nemá analgetický účinek. Kofein v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou nebo paracetamolem zvyšuje aktivitu až o 40% v závislosti na konkrétním typu bolesti. Vysoké dávky kofeinu – více než 1g, mohou naopak vyvolat bolesti hlavy. Kofein způsobuje zúžení mozkových cév a usnadňuje vstřebávání jiných léků [26].

Migrény

Kofein vyvolává zúžení průsvitu, vazokonstrikci, mozkových cév, to může přispět k jeho účinku při některých bolestech. Adenosinu A2A receptory jsou v endoteliálních buňkách, to má za následek vazodilataci účinku adenosinu (vazokonstriktivní účinek kofeinu na mozkové cévy se někdy využívají k léčbě migrény) [15].

Americký lékař F. C. Strong se domnívá, že jeho migrény patří k tomu typu, kdy dochází k povolení stěn cév v mozku, takže se zvětší jejich pulzace (vlivem srdečních stahů), a ty pak dráždí přilehlé nervy. Uvolnění cévní stěny mohou vyvolat některé složky potravy. Sám si na sobě vyzkoušel některé látky. Glykosol (glutamát sodný), známý z čínské kuchyně, ale také biogenní amin tyramin, jejímž bohatým zdrojem jsou některé sýry. Pak požil řadu analgetik a jejich kombinace, které obsahovaly kofein v dostatečném množství, například Excedrin, kde doporučená dávka pro dospělé obsahuje 130 mg kofeinu. Také když si vzal 100 mg kofeinu samotného, bolesti zmizely po dobu pěti hodin a to je doba, kdy už se z jeho krve podstatná část kofeinu vyloučila. Prof. Strong se domnívá, že bolest ustala díky stažení cév, vazokonstrikci. Tato zkušenost ovšem může platit jenom pro určitý typ migrény [5, 22].

Závislost

Žádost organismu po kofeinu je něco podobného, jako je tomu u kouření nebo dokonce s alkoholem či drogami. Kofein je považován za psychoaktivní látku. Dokonce je to nejrozšířenější psychoaktivní látka naší doby. Termín psychoaktivní shrnuje účinky léků, drog, substancí různého původu, které nějakým způsobem ovlivňují, pozměňují naše pocity, vnímání, myšlení, chování. Některé z psychoaktivních látek působí vzrušivě, stimulačně, např. amfetamin, jeho blízký derivát metamfetamin, také kokain. Jiné jsou tlumivé: sedativa, hypnotika jako pentobarbital. Psychoaktivita je základní součástí definice návykovosti, závislosti. Základní psychoaktivní účinek kofeinu je působení mírně stimulačně, budivě či povzbudivě. Všechny psychoaktivní látky ovšem nevyvolávají závislost. Na rozdíl od kokainu, amfetaminu, morfin, alkohol a nikotin, kofein neaktivuje uvolnění dopaminu (k D2 receptorů), který je spojován se závislostí. Návykové vlastnosti kofeinu se zdají být téměř úplně spojeny s abstinenčními příznaky. K tomu je potřeba, aby jejich účinky byly žádoucí, vyvolaly touhu po opakování. Teprve potom dojde k tomu, že se užívání látky – drogy – stane nebezpečným návykem, potřebou, náruživostí. Důsledky jsou známé: narkomanie. Každé užití drogy posiluje, upevňuje její potřebu, touhu po další dávce [5, 10, 15].

Kofeinismus je návyk nadměrného požívání kofeinu. V pochutinách s vyšším obsahem kofeinu vedoucí často k otravě. Nejčastějším příznakem abstinence kávy bývá bolest hlavy nebo únava. Projevuje se utlumení myšlení, pocitem slabosti, apatií, ospalostí, zívání, nechutí k práci, malou činorodostí, ale také nervozitou, podrážděností. Bolest hlavy u citlivých jedinců může být pronikavá, že vyžaduje analgetika. Abstinence se objevují obvykle za 12 až 24 hodin po poslední kávě a vrcholí po 20 až 48 hodinách. Příznaky mohou přetrvávat až jeden týden [5, 6].

4.2 Obsah kofeinu

Z hořkých látek jako přísady do potravin se nejvíce uplatňují sloučeniny ze skupiny alkaloidů, chmelových pryskyřic, oktaacetylsacharosy a některé heteroglykosidy. Z alkaloidů se hlavně využívá chinin při výrobě alkoholických i nealkoholických nápojů (*Tonicwater*). Vedle chininu se uplatňují i alkaloidy kávy a čaje, kofein a theobromin. Z flavonoidů vykazují hořkou chuť pouze flavanové glykosidy, jakou jsou neohesperidin, naringin a poncirin. Pro výrobu piva a některých nealkoholických nápojů se používá chmel, který je zdrojem řady hořkých látek [1].

Množství kofeinu je závislé na způsobu přípravy nálevu (teplotě vody, době extrakce aj.). Průměrný obsah kofeinu v jednom šálku kávy je asi 80 mg, v dekofeinované kávě 1-6 mg, v instantní kávě 29 až 91 mg, překapávané 37-132 mg a filtrované 93 až 127 mg. Káva bez kofeinu se vyrábí extrakcí kofeinu organickými rozpouštědly, zejména dichlormethanem, nověji superkritickým oxidem uhličitým. Získaný kofein se využívá k obohacování kolových nealkoholických nápojů a ve farmacii.

Listy čajovníku čínské (*Camelliasinensis*) obsahují asi 2% kofeinu a méně než 0,2% theobrominu v sušině (směs alkaloidů se dříve nazývala thein). Běžný šálek čaje obsahuje asi polovinu až třetinu kofeinu ve srovnání se šálkem kávy stejné velikosti.

Listy jihoamerického keře yerba maté (*cesmina paraguajská, Ilex paraguayensis*) z čeledi *Aquifoliaceae* obsahují 1,4 až 2,7% kofeinu v sušině a šálek nálevu maté má obsah kofeinu 18-50 mg. Z nízkého stromu se mačetami odsekovávají větve, které se suší a pak praží horkým vzduchem a drtí [2, 5].

Celkový obsah alkaloidů kakaových bobů (*Theobromacacao*) bývá v rozmezí 0,7-3,2% v sušině. Kakaovníky jsou stromy z rodu *Theobroma*, čeleď *Sterculiaceae*, původem v tropických pralesích Ameriky. Hlavního alkaloidu tedy theobrominu je 0,6-3,1%, kofeinu 0,02-0,5%. Hořká čokoláda obsahuje 0,3 až 0,7% theobrominu a 0,02-0,03% kofeinu, mléčná čokoláda 0,1-0,4% theobrominu a 0,01-0,02% kofeinu. Čokoládové nápoje obsahují 260-440 mg.dm⁻³theobrominu a 10-12,5mg.dm⁻³ kofeinu.

V současných kolových nápojích (např. Coca-Cola) bývá obvykle část kofeinu pocházejícího z ořechů některých druhů koly, pěstují se hlavně čtyři druhy: *C. acuminata*, *C. anomala*, *C. nitida*, *C. verticillata*, kde je jeho obsah 1,5-2,5%. Zbytek je doplňován kofeinem, který pochází z jiných zdrojů (např. získaným při výrobě bezkofeinové kávy). Celkový obsah kofeinu v nealkoholických nápojích se zpravidla pohybuje v rozmezí 50-250 mg.dm⁻³[5].

Kofein v množství 2,5-7,5% (resp. směs alkaloidů zvaných dříve guaranin) obsahují také guaranové oříšky, semena liany rodu *Paulinia* (*Paulliniacupana*) z čeledi *Sapindaceae*, pocházejí z tropů Jižní Ameriky. Po upražení se zpracovávají na hmotu připomínající chuť čokoládu. Slouží také k přípravě osvěžujícího nápoje [2].

Tab. č. 2: Obsah kofeinu v nápojích [2, 5, 33].

Potravina nebo nápoj	Porce (ml)	Obsah kofeinu [mg]
Vařená káva	150–190	111–177
Filtrovaná káva	50–190	28–161
Espresso	50–150	74–99
Překapávaná káva	150–190	55–88
Instantní káva	250	40-160
Káva bez kofeinu	250	1-6
Černý čaj	250	50
Zelený čaj	250	13-50
Bílý čaj	200	15
Porcovaný čaj	250	55
Sypaný čaj	250	57
Kakao	250	4
Horká čokoláda	250	5-10
Semtex	300	50
Redbull	100	32
BitShock	100	32
Kamikaze	275	70
Monster Energy	500	160
Kofola	100	15
Coca-cola/ Colalight	300	47
Cherrycola	300	47
Pepsi cola	300	39
RC cola	300	36
Ledový čaj	200	30

4.2.1 Čaj

Jaké látky čaj obsahuje?

Při fermentaci působí enzymy, obsah vody se snižuje na polovinu. Theobrominu je v čaji podstatně méně než kofeinu. Barvu zeleného čaje obstarávají chlorofyly a karotenoidy. Černý fermentovaný čaj tvoří oxidované chlorofyly. Tyto pigmenty mají výrazný vliv na chuťovou kvalitu zelených i černých čajů. Největší podíl tvoří katechiny, spojované s léčivými účinky zeleného čaje. V šálku silného čaje vypijeme asi 180-240 mg různých katechinů. Polyfenolické látky patrně slouží rostlinám jako chemická obrana proti hmyzu a býložravcům. Bílkoviny v našich slinách však na sebe polyfenoly vážou a zmírňují tak jejich obranný účinek, takže je na jazyku pociťujeme jako mírně svíravou chuť, typickou pro čaj. Známé jsou však fermentací vyprodukované polyfenoly skupiny teaflavinů, které dodávají nálevům černého čaje červenooranžovou barvu a jsou jeho ceněnou složkou. Fermentací nezměněné zůstávají flavonoly kvercetin, kempferol a myricetin, které se dávají do souvislosti s antioxidantními účinky čaje černého. V malém množství jsou v čaji bílkoviny, sacharidy, lipidy, karotenoidy, organické kyseliny, minerály. Aminokyselina teanin, přítomná v zeleném i v černém čaji se podílí příznivě na vytváření chuti a která ovlivňuje stimulační účinek kofeinu [4].

Antioxidanty

Vitamín E, C, selen jsou součástí vitamínových směsí a různých dietetických doplňků. Jejich úlohou je tlumit aktivitu volných kyslíkových radikálů, které mají důležitou funkci v organismu, především v imunitním systému. Pokud se však vymknou kontrole regulačních mechanismů těla, mohou působit destruktivně na bílkoviny a nukleové kyseliny a podílet se na vzniku některých onemocnění. Regulačním mechanismům pomáhají udržet optimální hladinu volných radikálů také další antioxidanty, které si tělo samo nevytváří. Antioxidační účinky mají však i další látky v potravinách, hlavně v zelenině a ovoci z nich známějších je například beta-karoten [5].

Flavonoidy

Z látek s antioxidačními účinky je důležitá skupina polyfenolických látek skupina flavonoidů. Nacházejí se v zelenině a ovoci, ale i ve víně z hroznů a jsou také významnou složkou čaje. Bylo jich objeveno v přírodních zdrojích přes 4 000. Největší podíl flavonoidů v čajových listech zaujímá podskupina katechinů, který mají hlavního zástupce epigalokatechingalát. Když se u zeleného čaje voda odpaří do sucha, vznikne sušina, která obsahuje 30% katechinů. Fermentací se přemění na složitější molekuly a v černém čaji zůstane 6% katechinů. Po fermentaci čaj obsahuje více flavonolů jako kvercetin, kempferol a myricetin, které mají rovněž antioxidantní účinky [29].

Jak mohou flavonoidy ovlivnit stav cévní stěny? Souvislost mezi cholesterolem a aterosklerózou je taková, že cholesterol putuje v krvi a je vázán na bílkoviny, a tyto kulovité molekuly složené z lipidu a proteinu se nazývají lipoproteiny. Cholesterol oxidovaný v nich s nízkou hustotou působením reaktivního kyslíku tvoří významnou součást aterosklerotických plátů na cévních stěnách. Oxidace lipoproteinu se dá zpomalit přidáním flavonoidů. Účinné jsou nejen katechiny, ale i ostatní polyfenolické látky [5].

Čaj černý

V Holandsku skupina vědců v rámci širšího výzkumu rizikových faktorů pro chronická onemocnění provedla zutphenskou studii, nazývá se podle města Zutphenu. Od roku 1985 bylo sledováno po pět let celkem 805 mužů ve věku 65-84 let, kvůli flavonoidům, množství, které jejich získají z potravin a nápojů. Zjišťoval se jejich obsah ve 28 druzích zeleniny, 12 druzích ovoce a 6 nápojích obvyklých v Holandsku. Byl sledován i celkový příjem energie, vitamínů C, E, beta-karotenu, vlákniny, kávy, alkoholu, tělesné aktivity, věk, krevní lipidy, obezita. Důležitý byl vztah těchto faktorů k výskytu ischemické choroby srdce a srdečního infarktu. Průměrné denní množství flavonoidů bylo získáno z potravy 26 mg, nejvíce kvercetin. Největší zdroj byl černý čaj, 60 procent celkového množství odpovídalo přibližně 3 šálkům. Dále z cibule, 13 procent, z jablka 10 procent celkových flavonoidů [30].

4.2.2 Káva

Obsahové látky

Při pražení kávy se tvoří jak pigmenty tak melanoidiny, začnou se ztrácet organické látky s uvolněním oxidu uhličitého. Vytváří se sedm set těkavých látek, které společně vytvářejí charakteristické aroma pražené kávy. Extrakty obsahují i malá množství tuků a sacharidů jako je sacharóza, glukóza a fruktóza. Sacharidy zbylé po pražení jsou z diabetického hlediska zanedbatelné. Obsah tuků v zelené kávě kávovníku je dost vysoký 10-20 % záleží na druhu kávovníku více je v arabice, méně v robustě, ale kofeinu naopak arabice 1,3%, v robustě 2,4%, tedy téměř dvojnásobek. Kávový olej je tvořen triglyceridy kyselin linoleové a palmitové. Káva také obsahuje kafestolu a kahweolu, draslík, méně vápníku, hořčíku, fosfátů [4].

Káva nebo čaj?

Nositel účinků kávy, čaje a dalších kofeinových nápojů je právě kofein, ale ostatní látky obsažené v kávě či čaji se výrazně liší. Byla zjišťována rychlost vstřebávání kofeinu z kávy a čaje a nebyly nalezeny žádné podstatné rozdíly. Dále byly srovnávány účinky čaje, kávy a ochucené vody s kofeinem mezi sebou s vodou. Šálek čaje obsahuje méně kofeinu než káva, tak bylo upraveno množství černého fermentovaného čaje na 100 mg kofeinu jako v kávě a ochucené vodě. Nápoje se podávaly třikrát denně horké. Výsledky ukázaly zlepšení subjektivních pocitů bdělosti a sílící útlum. Účinek se dostavil už po 10 minutách. U čaje byly pozorovány během dne pocity a schopnosti na vyšší úrovni než u kávy či samotného kofeinu [31].

Káva a alkohol

Další využití kávy je působení proti účinkům alkoholu. Byl proveden výzkum s osobami, které byly pod vlivem obou drog objektivními metodami například měření vizuálních a sluchových reakčních časů nebo schopnosti stát zpříma. Vše bylo zkoušeno před pitím alkoholu, po něm, s kofeinem a bez kofeinu. Byl použit 1 decilitr alkoholu a 300 mg kofeinu. Z hodnocení výsledků bylo jednoznačné, že alkohol má nepříznivý účinek, zhoršil výkon ve všech použitých testech, i když se hladina alkoholu v krvi pohybovala mezi 0,05-0,09 procenty. Zhoršení rovnováhy se objevilo i po samotném kofeinu. Kofein zlepšil některé psychomotorické schopnosti poškozené alkoholem, ale jistěná náprava byla nedostatečná [27, 28].

4.2.3 Kofola

Složení dle etikety:

voda, sirup KOFO (ovocný sirup, cukr, glukózový sirup, voda, karamel - pálený cukr, barvivo E150d, kyselina citrónová, chlorid sodný, esence pro KOFO - aroma, bylinný extrakt - přírodní aroma, lékořičový extrakt - přírodní aroma, konzervant E211, kofein), oxid uhličitý (min. 3g/l). Obsahuje kofein max. 15mg/100ml.



Obr. 5. Etiketa Kofoly.

Historie

V roce 1959 doc. RNDr. PhMr. Zdeněk Blažka, CSc. přišel na správnou formuli pro sirup KOFO. Dal dohromady čtrnáct bylinných a ovocných látek doplněných o kofein a roku 1960 byla Kofola na světě. Spotřeba po celá šedesátá léta narůstala tak, že v Československu došly byliny a bylo potřeba je začít dovážet ze zahraničí. V roce 1996 došlo k založení dceřiné společnosti SANTA - NÁPOJE KRNOV. Tento rok je také považován za oficiální vznik společnosti Kofola, tak jak ji známe již dnes. V roce 2000 firma poprvé spojila svůj výrobní program s nápojem Kofola, když s opavskou farmaceutickou společností Ivax, tehdejším vlastníkem značky, uzavřela licenční smlouvu na její stáčení. Rok expanzí a strategických investic byl rok 2002 - nákup registrované obchodní známky a originální receptury tradičního nápoje Kofola od společnosti Ivax za 215 milionů korun. Obchodní jméno společnosti v České republice a její dceřiné společnosti na Slovensku bylo změněno na Kofola, a.s.. První inovace československého tradičního nápoje Kofola, po 40 letech existence, byla představena značka Kofola Citrus v roce 2004. V roce 2007 se Kofola umístila na osmém místě v žebříčku 100 obdivovaných firem České republiky. V první polovině roku 2009 vykázala skupina Kofola konsolidovaný čistý zisk ve výši 2,498 mil. EUR. V roce 2011 se objevila Kofola po několika letech znovu v plechovce. Od roku 2012 Kofola jako první v České a Slovenské republice začala vyrábět produkty slazené výtažky z tropické rostliny stévie [50].

4.2.4 Coca-Cola

Složení dle etikety:

voda, cukr, oxid uhličitý, barvivo karamel E150d, regulátor kyselosti: kyselina fosforečná, aroma, kofein.



Obr. 6. Etiketa Coca-Coly.

Historie

Coca-Cola se poprvé objevila roku **1945** a to v Československu, ale až za **23** let roku **1968** byla vyrobená první láhev v Čechách. Závod Modřice vyrábí první nápoj Coca-Cola v roce **1971**. V letech **1971 – 1989** se v Československu vyrábí několik značkových výrobků The Coca-Cola Company (Coca-Cola a Cappy). Dne **1. září 1991** Coca-Cola Amatil Limited získává licenci na nápoje značky Coca-Cola pro celé Československo. V březnu **1993** se zahájil provoz v rekonstruovaném závodě, vybaveném novou linkou na stáčení nápoje do dvoulitrových PET láhví. V roce **1996** vzniká v Praze zastoupení The Coca-Cola Company v podobě Coca-Cola ČR spol. s r. o. a v letech **1996 – 1998** vznikla nová kombinovaná linka na stáčení do PET láhví a plechovek. Zavádí se balení PET láhví do smršťovací fólie. Od roku **1998** je v České republice vybudována obchodní síť, která je provozována prostřednictvím obchodních a distribučních center, které jsou regionálně rozdělené na Prahu, střední Čechy, jižní a západní Čechy, severní a východní Čechy a oblast Moravy. V roce **1999** byl závod v Kyjích rozšířen o výrobní a skladovací prostory.

Výroba

Výrobní proces začíná ve výrobním závodě v Praze Kyjích. Základní výrobní proces je založen na několika elementárních krocích:

1) čistá voda

- výroba nápoje Coca-Cola začíná filtrací, změkčováním a dezinfekcí vody
- jsou eliminovány veškeré nečistoty

2) cukr

- smíchá se s přečištěnou vodou a kontinuálně se rozpouští
- k rozpuštěnému cukru se přidává nápojový koncentrát
- vzniká sirup, který je základní surovinou pro výrobu nápoje
- přečištěná voda a sirup se smíchají v přesném stanoveném poměru
- ke směsi se dodává oxid uhličitý v příslušném zařízení při nízkých teplotách a pod vysokým tlakem
- tyto podmínky zaručují odpovídající množství bublinek a správnou míru tzv. perlení

- plnění
- hotový nápoj se plní do skleněných nebo plastových láhví, které se rovnají a řadí na běžícím páse



Obr. 7. Plastové láhve na běžícím páse.

- naplněné láhve se uzavřou kovovým nebo plastovým uzávěrem
- 3) balení
- etiketa s nápisem Coca-Cola se lepí na láhve a vyznačí se i kód produktu



Obr. 8. Etikety Coca-Coly.

- láhve, plechovky putují k balicímu stroji, kde jsou skládány do beden nebo na palety
- zabalené nápoje se transportují do skladů, odkud se rozvázejí na pulty obchodů



Obr. 9. Zabalené nápoje ve smršťovací folii [51].



Obr. 10. Produkce Coca-Coly ve světě [52].

Procentuální porovnání všech balených nápojů Coca-Cola vyrobených v roce 2012 dle barevných oblastí na obrázku. V severní Americe se nejvíce spotřebovalo Coca-Coly ve Spojených státech amerických až 94% a v Kanadě 6%. V jižní Americe se vypije Coca-Coly 44% v Mexiku. V Evropě se nejvíce pije Coca-Cola ve východní Evropě přibližně 19%, dále v Německu 17%, Španělsku 14%, Velké Británii 13%, Turecku 12%, Francii 9%, Rusku 9%, Itálii 8%. Ve středovýchodní a severní Africe se nejvíce vypije 27% a středozápadní Afrika zahrnuje 18%. V Asii má největší spotřebu Coca-Coly Čína 42%, pak Japonsko 19%, Indie 15% a Austrálie pouze 6% [52].

Tab. č. 3: Čisté provozní výnosy v procentech pro mezinárodní stáčení Coca-Coly [52].

31. prosinec	2010	2011	2012
Eurasie a Afrika	6,9	5,8	5,9
Evropa	12,6	10,3	9,3
Jižní Amerika	11,0	9,4	9,5
Severní Amerika	31,7	44,2	45,1
Pacifik	14,1	11,7	11,6
Investice stáčení	23,4	18,3	18,3
Celkem	100%	100%	100%

4.2.5 Rakovina, jiné nemoci a kofein

Kofein je obsažen jak v kávě (v max. rozsahu 800mg/l), čaji tak i v nejoblíbenějších nápojích jako je Kofola nebo Coca-Cola (v max. rozsahu 150mg/l). Rizikem pitím kávy či nápoje Coca-Cola mohou být nádorová onemocnění, kterými se vědci zabývají již delší dobu. Dnes je k dispozici mnoho epidemiologických studií sledujících výskyt zhoubných nádorů, které způsobily, u obyvatel různých zemí a geografických oblastí, příslušníků odlišných ras, etnických skupin, úmrtí. Nejčastější rakovinové onemocnění je onemocnění močového měchýře, pankreas a tlustého střeva.

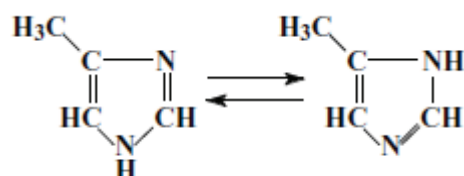
Pochybnosti a neškodnosti kávy při vzniku nádorů močového měchýře a močových cest vyplynuly z rozboru dvaceti dvou studií zaměřených na toto onemocnění, která vypracovala skupina odborníků z Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) a uveřejnila je v roce 1990. Podle této analýzy se v šesti studiích vztah mezi kávou a nádorovým onemocněním močových cest neprokázal, ale na základě výsledků těch ostatních studií se však nedal vyloučit. Určité mírné riziko podle závěrů studií tedy u močového měchýře existuje. Některé nálezy však naznačují vztah k vysoké spotřebě kávy [5]. Carlo La Vecchia z Ústavu Mario Negri v Miláně zařadil do svého přehledu z roku 1993 ještě další více než 30 studií. Závěr se neliší od shrnutí v monografii IARC. Vztah mezi kávou a rakovinou močového měchýře není jednoznačně prokázán, určité riziko však pitím kávy stále zůstává [53].

V roce 1981 publikoval B. Mac Mahon se spolupracovníky výsledky studie, která vykazovala zvýšené riziko onemocnění rakovinou slinivky břišní se stoupající spotřebou kávy. Pozitivní výsledky však další výzkum nepotvrdil. Ve studiích analyzovaných autory C. La Vecchia a V. Ernster a několika dalšími se vztah mezi pitím kávy a tímto nádorovým onemocněním ukázal jako velmi slabý, naproti tomu kouření se prokázalo jako silný rizikový faktor na nádorová onemocnění.[5, 53, 54, 55, 56, 57].

U jiných zhoubných nádorů jako je rakovina prsu, tlustého střeva, vaječníků, žaludku, jícnu a dalších nádorových onemocnění většina výzkumných projektů spojitost s pitím kávy neprokázala. Několik autorů sice uvádí určité zvýšení rizika těchto onemocnění, většina však nikoli. Dokonce se v některých průzkumech objevil náznak protektivního působení kávy. Ani ten však není považován za průkazný. V roce 1997 vyšla zpráva nazvaná „Strava, výživa a prevence zhoubných nádorů. Globální perspektiva“, založena na vyhodnocení více než 4 500 studií a na jejím vzniku se podílel Americký ústav pro výzkum rakoviny a Světová nadace pro výzkum rakoviny, a pod jejich patronací pracovalo více než sto odborníků různých profesí. Mezi faktory, které mohou zvýšit nebo naopak snížit riziko nádorového onemocnění, byla uvedena také káva a čaj. U kávy se znovu objevilo podezření u nádoru močového měchýře, definované jako „možné zvýšené riziko“. U ostatních zhoubných nádorů se spojitost s kávou neprokázala. Naopak vliv čaje na rakovinu žaludku byl zařazen jako „možné snížené riziko“ [5, 56].

4-methylimidazol

Dále se v Coca-Cole vyskytuje 4-methylimidazol znám jako 4-MEI, který údajně způsobuje rakovinu. 4-methylimidazol je světle žlutá krystalická pevná látka, která je rozpustná ve vodě a alkoholu s bodem tání v rozmezí od 46 °C do 48 °C a s bodem varu 263 °C. 4-methylimidazol je složka různých chemických produktů, včetně léčiv, fotografických chemikálií, barviv, pigmentů, pryže, dezinfekčních a čistících prostředků. Vyskytuje se v celé řadě nápojů, potravin, včetně karamelových barviv, sojové a worcesterové omáčky, víně a také v tabákovém kouři. Příprava 4-MEI zahrnuje cyklokondenzaci aldehydu a amoniaku s methylglyoxalem nebo katalytickou dehydrogenaci imidazolinových derivátů nebo může být syntetizován z propanolu a formamidu, katalytickou cyklizací bisformamidipropanu nebo fotolýzou alkenyltetrazolu odvozené od alkenů. 4-MEI vytvořený interakcí amoniaku s redukujícími cukry, byl identifikován jako toxický vedlejší produkt fermentace v čpavkovaného krmiva pro hospodářské zvířata, u telat způsobil abnormální neurologické poruchy a záchvaty [58].



Obr. 11. 4-methylimidazol [58].

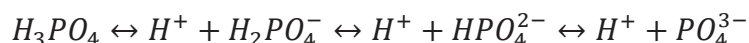
Výkonný ředitel Michael F. Jacobson strany Centra pro vědu ve veřejném zájmu v Americkém ministerstvu zdravotnictví a sociálních služeb potravin a léčiv ve Washingtonu podal žalobu o zakázání používání karamelových barviv vyrábějící se s amoniakem obsahující karcinogeny 2-MEI a 4-MEI. Jako odpověď od obchodní americké asociace nápojů, která reprezentuje nelihový průmysl a Úřad zprávy o karcinogenech, bylo vydáno prohlášení o 4-MEI. Neexistují žádné lidské studie týkající se karcinogenity 4-MEI, a že není členem dobře definovatelné strukturálně příbuzné skupiny látek, jejíž členové jsou uvedeny ve zprávě seznamu chemických látek způsobující rakovinu [59]. Byla provedena standardní biologická zkouška karcinogenity u hlodavců Národním toxikologickým programem. Studovali se účinky 4-MEI na samcích, samicích potkanů a myši a identifikovat potenciální toxické nebo karcinogenní riziko pro člověka. U myši byl 4-MEI podáván v potravě o koncentracích 0, 40, 80 a 170 mg / kg denně po dobu 106 týdnů. Za těchto podmínek došli k závěru, že 4-MEI způsobil rakovinu plic u samců a samic myši a 4-MEI může být také spojen s rozvojem leukemie u samic potkanů [58, 60, 61, 62, 63, 64].

Studie zveřejněná v časopise *Respirology* ukazuje, že konzumace (více než půl litru denně) nealkoholických nápojů jako je Coca-Cola, je spojena s poruchami dýchání, včetně astmatu a chronických obstrukčních plicních nemocí (CHOPN) [65].

Vztah mezi kávou, Coca-Colou a rakovinou není jednoznačně prokázán, ale před rokem 1923 německý vědec, držitel Nobelovy ceny, Otto Heinrich Warburg objevil příčinu rakoviny z překyselení organismu. Kofein je řazen dle německého vědce do kyselinotvorných potravin tzn., že rakovinové onemocnění můžeme ovlivnit stravou [66, 67, 68, 69, 70].

Kyselina fosforečná

Bezvodá kyselina fosforečná je bezbarvá, krystalická látka s bodem tání 42 °C, je neomezeně mísitelná s vodou. S rostoucí koncentrací kyseliny se zvyšuje viskozita roztoku. Kyselina fosforečná je komerčně dostupná ve třech koncentracích, a to jako 75% roztok s bodem tání - 20 °C, 80% roztok tající při 0 °C a 85% roztok s bodem tání 21 °C. Je to trojsytná kyselina, která ve vodném roztoku disociuje podle rovnice:



Rozlišujeme dva způsoby přípravy kyseliny fosforečné a to výrobu termickou a extrakční. Termická příprava vychází z elementárního fosforu a produkuje se koncentrovaná a velmi čistá kyselina. Extrakční příprava je založená na rozkladu přírodního fosforečnanu minerální kyselinou (nejčastěji kyselinou sírovou), výsledkem je zředěná a znečištěná kyselina. Z 95% je kyselina fosforečná vyráběna extrakčním způsobem.

Tvoří celkem tři druhy solí - fosforečnany (PO_4)³⁻, hydrogenfosforečnany (HPO_4)²⁻ a dihydrogenfosforečnany (H_2PO_4)⁻. Kyselina fosforečná není toxická, dráždí oči a dýchací cesty. Fosforečnany, pokud neobsahují toxické kationty, také nejsou toxické až na výjimku kondenzovaného fosforečnanu, tzv. hexametafosfátu sodného, který po požití může způsobit i smrtelnou otravu. Za bezpečnou orální dávku se považují 4 g denně.

Čtvrtina z celkové hmotnosti všech kyselin, které se používají v potravinách, připadá na kyselinu fosforečnou. Kyselina fosforečná se často používá jako okyselující látka pro nealkoholické nápoje (např. Coca-Colu, dodává jí charakteristickou štiplavou chuť) s obsahem 0,5 až 1 g kyseliny fosforečné (E 338) v 1 litru k dosažení kyselé chuti, povolená maximální dávka je však 0,7 g/l kyseliny fosforečné pro ochucení nealkoholického nápoje.

Tato nejlevnější a zároveň nejsilnější okyselující látka, má i jiná využití např. brání nežádoucím reakcím kovů v potravinách, umocňuje účinek antioxidantů v rostlinných tucích, působí jako zdroj fosforu a udržuje kyselé prostředí při výrobě droždí. Používá se tedy při výrobě nápojů, sýrů, tuků, margarínů a mnoha dalších potravin. V malém množství je kyselina fosforečná bezpečná pro lidský organismus, ale dnes se nacházíme v době, kdy se Coca-Cola a jí podobné limonády stávají národním nápojem. Co se může stát, konzumujeme-li nadměrná množství kyseliny fosforečné a fosforečnanů?

Kyselina fosforečná je zdroj fosforu v našem těle, ten je druhým minerálním prvkem po vápníku a podílí se na mnoha různých pochodech lidského organismu. Dostatek fosforu je nezbytný pro pevné a zdravé zuby a kosti. Většina lidí přijímá dostatečné množství fosforu v potravě a jeho nedostatek není častý. Spíše velké nebezpečí představuje přebytek fosforu. Fosforečnany se vylučují z těla jako fosforečnany vápenaté. Vysoké dávky fosforečnanů mohou narušit rovnováhu mezi vápníkem a fosforem v těle a zapříčinit nedostatek vápníku, a tím například i úbytek kostní hmoty.

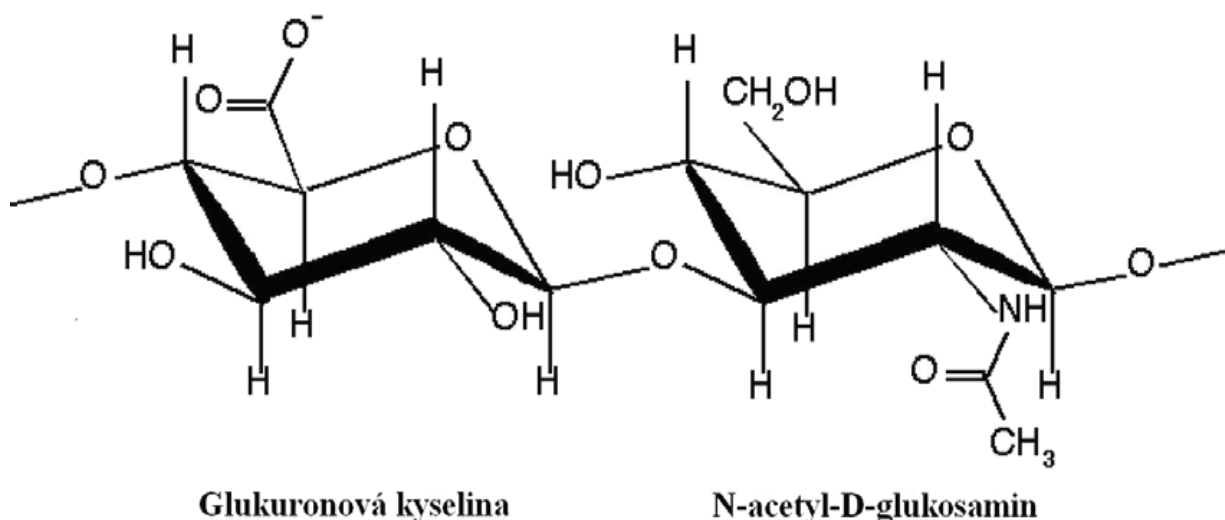
Ve studii Spojených států se sledovaly dívky konzumující pravidelně vysoké množství Coca-Colových nápojů (které obsahují kyselinu fosforečnou). Výsledky ukázaly, že dívky byly více náchylné k nejrůznějším zlomeninám právě kvůli nedostatku vápníku, který je způsoben nerovnováhou mezi vápníkem a fosforem. Většina dlouhodobých studií na zvířatech potvrdila zpoždění růstu, ukládání vápníku ve tkáních a orgánech, poškození ledvin a srdce právě při vyšších dávkách kyseliny fosforečné nebo fosforečnanů v potravě (více než 0,5%).

V České republice se kyselina fosforečná smí použít při výrobě některých potravin a k úpravě pH všech druhů dětských příkrmů. Nejčastěji používané fosforečnany jsou sodné (E 339) a draselné (E 340), zejména dihydrogendifosforečnan disodný, difosforečnan tetrasodný, trifosforečnan sodný [2, 71, 72, 73].

5 KYSELINA HYALURONOVÁ

5.1 Charakteristika

První klinické použití kyseliny hyaluronové se datuje již od roku 1968, kdy byly popáleniny léčeny čištěnou kyselinou hyaluronovou. Kyselinu hyaluronovou objevili v roce 1934 Karl Meyer a John Palmer [37]. Izolovali ji z hovězího očního sklivce. Název vznikl ze slov hyaloid (sklivec) a uronová kyselina. Nejčastěji je tato látka označována jako hyaluronan [1, 2]. Kyselina hyaluronová, jakož to produkt, je bílá práškovitá látka bez zápachu, silně hydrofilní, která se nevyskytuje v živém organismu jako kyselina, protože glukuronová kyselina, kterou obsahuje, má ve své struktuře karboxylovou skupinu o pK 3 – 4. Karboxylová skupina je při neutrálním pH disociovaná. Vyskytuje se převážně tedy ve formě sodné a draselné soli. Proto se od roku 1996 začal užívat název hyaluronan. Je to nerozvětvený polymer složený z disacharidových jednotek, z nichž každá se skládá z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou střídavě propojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou. Řadíme ho do skupiny glukosaminoglykanů [38, 39].



Obr. 12. Hyaluronan sodný, strukturní vzorec [38].

Přítomnost negativního náboje na řetězci představuje potenciální interakce s kladně nabitými molekulami. Počet opakujících se disacharidových jednotek od několika stovek do deseti miliónů může dosáhnout molekulové hmotnosti až 4 milióny daltonů (jedna disacharidová jednotka má přibližně hmotnost 400 Da, kde 1 Da \approx 1 g/mol). Průměrná délka řetězce závisí tedy na molekulové hmotnosti. Nejčastěji dosahuje hodnoty okolo 1 nm, ale při blízké se hodnotě 10 000 disacharidových jednotek může řetězec dosáhnout délky 10 μ m [40, 41].

5.2 Výskyt a úloha v organismu

Nejvýznamnějším místem výskytu hyaluronanu jsou tkáně obratlovců (hlavní zdroje jsou uvedeny v tabulce č. 1) a extracelulární matrix, kde se diferencuje většina tkání, ale je také nepostradatelnou součástí tkání dospělých. U sedmdesátikilového lidského jedince je v těle přibližně přítomno 15g hyaluronanu. Největší množství (7 – 8 g) je obsaženo pokožce (epidermis) i ve škáře (dermis), což je koncentrace až 2,5 g/l. Dále se nachází ve sklivci lidského oka, v pupeční šňůře, v chrupavce nebo oocytech, kde ovlivňuje ovulaci. V synoviálních tekutinách se vyskytuje vysokomolekulární hyaluronan o vysokých koncentracích, kde jako nezbytný lubrikant slouží k absorbování nárazů. Když klesne koncentrace hyaluronanu v kloubních prostorách, dochází k poškození kloubů, nesnižuje se tření a netlumí se nárazy. Řešením jsou opakovatelné lékařské zákroky. Pokud dojde ke zjištění obsahu nízkomolekulárního hyaluronanu v krvi, obvykle to znamená přítomnost nádorového bujení. Rakovinné buňky produkují nízkomolekulární hyaluronan, aby unikly imunitnímu systému [39, 41, 42].

Tab. č. 4: Koncentrace hyaluronanu v tkáních a tkáňových tekutinách [43]

tkáň, tekutina	g	koncentrace [mg/l]
kohoutí hřebínek		7500
lidská pupeční šňůra		4100
lidská kloubní tekutina		1420 – 3600
hovězí nosní chrupavka		1200
lidský sklivec		140 – 338
lidská škára		200

5.3 Dělení hyaluronanu dle molekulové hmotnosti

- Vysokomolekulární hyaluronová kyselina, nad 1000 kDa nemá přílišnou biologickou funkci. Používá se jako kloubní lubrikant, k léčbě hojení ran, při očních operacích a pro svůj protizánětlivý účinek.
- Hyaluronan o 200-1000 kDa, chrání před UV zářením a je nosičem biologicky aktivních látek.
- Hyaluronan o 10-200 kDa, podporuje produkci melaninu, hojí diabetické defekty a aktivuje imunitní buňky.
- Hyaluronan pod 10 kDa je signální molekula doprovázející chorobný proces [41, 46].

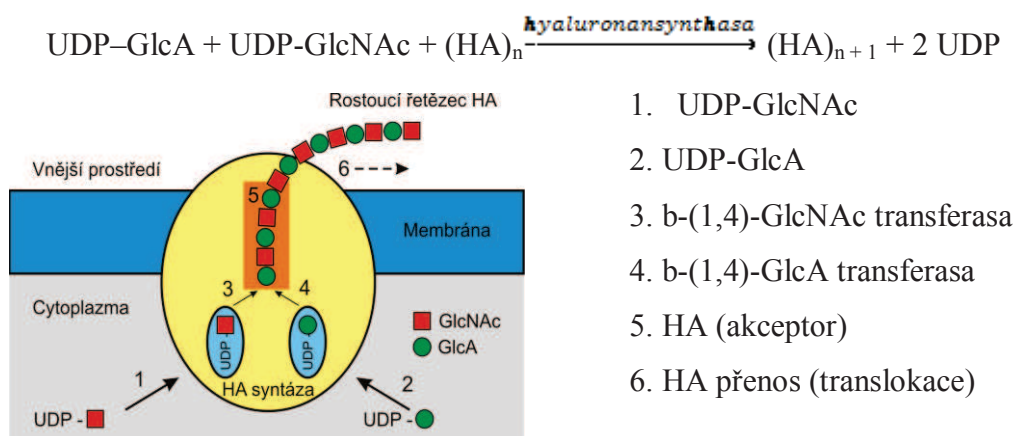
5.4 Syntéza

Syntéza hyaluronanu je obvykle vyvážena katabolismem, který zajišťuje konstantní koncentraci v tkáních. Syntéza probíhá díky specifickým transmembránovým enzymům tzv. hyaluronansyntázám, které mají více funkcí:

- HYAL1 – objeven v séru, je to lysozomální enzym, který štěpí hyaluronan na malé fragmenty (2-10 disacharidových jednotek) [44, 45].
- HYAL2 – je nejznámější a velmi důležitý v katabolismu hyaluronanu. Tvoří fragmenty o velikosti kolem 50 disacharidových jednotek. Tento enzym se může spolu s molekulou CD44 vázat na buněčný povrch i na hyaluronan o vysokomolekulární hmotnosti.
- SPAM1 – enzym důležitý při fertilizaci [45].

Důležitým kontrolním mechanismem jsou inhibitory těchto enzymů. Navazují se díky konstantní inhibici enzymů. Uvolnění inhibitorů způsobí velmi rychlé zvýšení hladiny kyseliny hyaluronové. Syntéza průměrného řetězce hyaluronanu, který obsahuje deset tisíc disacharidových jednotek, je pro buňku energeticky náročná, proto je ve většině buněk pevně regulována. Hyaluronan jako takový se ve tkáních nevyskytuje samotný, ale je obklopen řadou dalších molekul, např. proteiny, nukleovými kyselinami, bakteriálními endotoxiny, chondroitinem sulfátem atd.

Většina glykosaminoglykanů je v živém organismu syntetizována v Golgiho aparátu a uvnitř buňky následně připojena k jaderným proteinům. Naopak hyaluronan je syntetizován v plazmatické membráně a není spojen s žádným jaderným proteinem. Molekula je prodlužována na redukujícím konci střídavým přenosem UDP-hyaluronanu k substrátům UDP-GlcNAc a UDP-GlcA při současném uvolnění UDP. Ostatní glykosaminoglykany rostou na neredukujícím konci [46].



Obr. 13. Model syntézy HA [47].

Další způsob, jak získat čistý hyaluronan, je izolovat jej z některých mikroorganismů. Některé bakterie mohou produkovat hyaluronan stejně jako savci, například *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes* nebo *Pasteurella multocida*. Zároveň jsou to lidské i zvířecí patogeny, schopné skrýt se před imunitním systémem svých hostitelů. A to tak, že se obklopí tenkou vrstvou hyaluronanu. Umožňuje jim to snadněji napadat hostitelské savčí organismy, protože jimi syntetizovaný hyaluronan produkuje na jejich povrchu ochrannou vrstvu. Ta má

stejnou strukturu jako hyaluronan v savčích tkáních. Bakterie nejsou tedy snadno rozpoznatelné imunitním systémem a organismus není schopen se účinně bránit [47].

5.5 Výroba kyseliny hyaluronové

Dříve byla kyselina hyaluronová získávána z lidské pupeční šňůry nebo se vyráběla z kohoutích hřebínků. Někteří výrobci tento způsob stále využívají. Nyní se takto získaná kyselina prodává pod komerčním jménem Healon či Opegan. V dnešní době převažuje biotechnologická výroba využívající některé kmeny *Streptokoků* obsahující polysacharid, který má shodnou strukturu s hyaluronanem savců. Jedním z výhod této technologie je příprava velmi čistého polymeru [46].

Hyaluronan je hygroskopickou látkou, kterou je třeba připravit do roztoků v přesné koncentraci. Proto je nelehké ho dlouhodobě skladovat. Hyaluronan je velmi náchylný na přítomnost mikroorganismů a degraduje už při kontaktu se vzdušným kyslíkem [48].

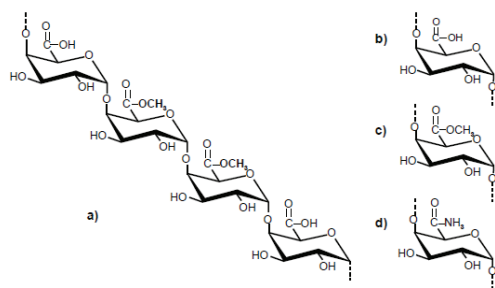
Dr. Endre A. Balazs jako první objevil použitelnou extrakční metodu izolaci kyseliny hyaluronové pro farmaceutické účely. Pupeční šňůra či kohoutí hřebínky byly zmrazeny, aby došlo k porušení buněčné membrány. Poté rozřezány na malé kousky. Dále byla kyselina hyaluronová extrahována ethanolem s cetylpyridinium chloridem, chloroformem a vodou. Extrakt byl čištěn, bylo upraveno pH a iontová síla. Tímto způsobem se získal produkt s obsahem bílkovin a malou výtěžností. Další způsob izolace byl proveden K. Kuběnou, A. Galatikem a A. Blažejem, kdy preparát obsahoval menší podíl bílkovin a větší podíl kyseliny hyaluronové. Podstatou jsou některé modifikace polárních a thiolových skupin při kovalentní vazbě za pomoci alkylačních činidel [49].

Praktičtější je příprava kyseliny hyaluronové pomocí bakterií *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*, která přináší největší výtěžnost. Kultivace se provádí v roztocích glukosy s obsahem kvasinek (při 33°C) a pH = 8,5.

Ke genetické modifikaci se využívá například bakterie *Bacillus subtilis*. Výhodou tohoto mikroorganismu je rychlé množení a produkce v malých množstvích endo a exotoxinů. V České republice je kyselina hyaluronová vyráběna společností Contipro Group v Dolní Dobrouči [41].

6 PEKTIN

Pektin, rostlinný lineární polysacharid, skládající se převážně z jednotek D - galakturonové kyseliny navzájem spojené prostřednictvím α -(1→4) glykosidickou vazbou.



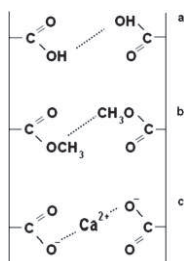
Obr.14. (a) opakující se úsek molekuly pektinu a funkčních skupin: (b) karboxylová skupina; (c) ester; (d) amid v pektinovém řetězci.

Pektiny jsou typické želírující látky, tradičně používané v želé a džemech, ale dají se také použít i v ostatních potravinářských výrobcích jako jsou nealkoholické nápoje nebo mléčné výrobky (zahušťovadla, želatinové činidla a koloidní stabilizátory). Mezi nejběžnější typy patří pektiny izolované z citrusových plodů nebo jablek. Jablečné výlisky obsahují 10 až 15 % sušiny pektinu a kůra citrusových plodů obsahuje 20-30% sušiny.

Schopnost pektinů tvořit gel závisí na molekulární hmotnosti a stupni esterifikace, pektin z různého zdroje nemá stejnou gelující schopnost, a proto se jeho gelové vlastnosti liší v závislosti na počtu metylovaných karboxylových skupin (tedy stupně metylace) a jejich distribuce v polygalakturonovém řetězci. Pektin metylovaný nad 50% se označuje jako vysoce metylovaný pektin (HMP) a struktura pektinu metylovaná pod 50% se označují jako nízko metylovaný (LMP). Typický stupeň metylace pro komerční použití je asi 60-77% pro HMP a 25-40% pro LMP. Proces gelování pektinů je poměrně složitý. Nejdůležitější faktory jsou pH, Ca^{2+} a rozpustné pevné látky (např. cukr). Tyto faktory mají různé a částečně opačné účinky na gelový proces různých typů pektinů. Vysoko metylovaný pektin (HMP) tvoří gel v přítomnosti vyšší jak 55% rozpustného pevného podílu (většinou 65% cukru) a při nižším pH než 3,5. Nízko metylovaný pektin (LMP) tvoří gel v přítomnosti Ca^{2+} a při vyšším pH než je u HMP.

V zásadě lze rozlišit tři možné typy spojovacích oblastí u LMP:

1. hydrofobní interakce mezi methylesterovými skupinami
2. hydrofilní interakce mezi nedisociovanou karboxylovou skupinou nebo hydroxylovou skupinou pomocí vodíkových vazeb
3. iontové interakce mezi disociovanými karboxylovými skupinami pomocí vápenatých můstků (Obr. 15).



Obr.15. Mechanismy gelování pektinu, a: vodíkové vazby mezi nedisociovanými karboxylovými skupinami, b: hydrofobní interakce, c: náhodné iontové interakce (můstky) mezi disociovanými karboxylovými skupinami [74, 75, 76].

7 FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Luminiscence se dělí na:

- Chemiluminiscence
- Termoluminiscence
- Fotoluminiscence:
 - Fosforescence
 - Fluorescence

Definice fluorescence:

FLUORESCENCE = fotofyzikální jev, při kterém dochází k přechodu mezi tzv. povolenými stavy atomu, je to emise fotonu při přechodu z S_1 (S_2) do základního stavu S_0 vyzářením energie ve formě světla ve velmi krátkém čase.

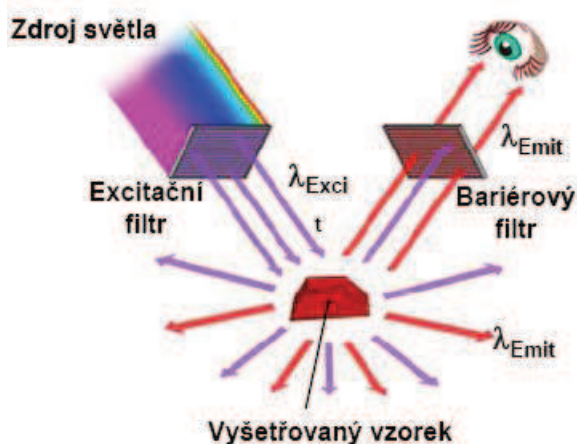
Emisní spektrum: je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitačního záření.

Excitační spektrum: je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Fluorofor je látka, která je schopná absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o delší vlnové délce.

Princip fluorimetru:

Fluorescence je z pravidla pozorována v kolmém směru ke směru paprsku. Na obrázku lze vidět jednotlivé součásti obecného fluorimetru: vysokotlaká xenonová lampa jako zdroj záření, dvojnásobný monochromátor, který vybírá záření o určité vlnové délce, fotonásobič jako detektor a vyhodnocovací zařízení obvykle počítač. Kyvety se používají křemenné o 1 cm a rozpouštědla nesmí fluoreskovat [34, 35].



Obr. 16. Schéma fluorimetru [36].

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

8.1.1 Použité přístroje

- fluorimetr FLUOROLOG
- spektrometr UV/VIS Hitachi
- termogravimetr
- automatický titrátor
- pH metr
- odstředivka
- Pure Lab Watter Elga
- vortex
- analytické váhy DENVER INSTRUMENT
- třepačka Heidolph VIBRAMAX 100

8.1.2 Použité chemikálie

- kofein
- kyselina hyaluronová
- pektin
- lignohumát Amagro
- polyfenoly (Reflex Nutrition Green Tea 100 kapslí)
- rozpouštědlo: deionizovaná voda, destilovaná voda
- kyselina chlorovodíková
- Kofola (běžně dostupná)
- Coca-Cola (běžně dostupná)

8.1.3 Použitý kofein

Výrobce: SIGMA - ALDRICH

Výrobní číslo: 1001099469

Číslo šarže: Lot# 021M0092V

Číslo CAS: 58-08-2

Indexové číslo: 613-086-00-5

8.1.4 Použitá kyselina hyaluronová

Výrobce: Contipro Group s.r.o.

M_w = 1,7 MDa

Číslo šarže: 211-180

8.1.5 Použitý pektin

Citrusový pektin (d.e.= 67 %) obsah polyuronidů 81,6 % limitní viskozitní číslo n=338ml/g (Genu Pectin Copenhagen Dánsko)

8.2 Příprava roztoků

8.2.1 Příprava zásobního roztoku pektinu

Roztok o koncentraci 200 mg/l pektinu byl připraven rozpuštěním 20 mg pektinu ve 100 ml deionizované vody.

8.2.2 Příprava zásobního roztoku kyseliny hyaluronové

Roztok o koncentraci 200 mg/l kyseliny hyaluronové o $M_r=1,7MDa$ byl připraven rozpuštěním 20 mg hyaluronanu sodného ve 100 ml deionizované vody.

8.2.3 Příprava zásobního roztoku kofeinu

Roztok o koncentraci 150 mg/l byl připraven rozpuštěním 15 mg kofeinu ve 100 ml deionizované vody. Roztok kofeinu o koncentraci 0,1M byl připraven rozpuštěním kofeinu o hmotnosti 1,9419 g ve 100 ml deionizované vody.

8.2.4 Příprava zásobního roztoku kyseliny chlorovodíkové

Roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 a 0,01M byl připraven v odměrné baňce: na litr destilované vody jeden normanál HCl o přesné koncentraci 0,1 a 0,01M.

8.2.5 Příprava zásobního roztoku lignohumátu

Roztok o koncentraci 50 mg/l lignohumátu byl připraven rozpuštěním 5 mg lignohumátu ve 100 ml deionizované vody.

8.2.6 Příprava zásobního roztoku polyfenolů

Roztok polyfenolů o koncentraci 200 mg/l byl připraven rozpuštěním 20 mg polyfenolů ve 100 ml deionizované vody.

8.3 Příprava vzorků

8.3.1 Koncentrační řada kofeinu

Do osmnácti vialek bylo přidáno tolik kofeinu, ze zásobního roztoku kofeinu o koncentraci 0,1M, a deionizované vody, aby vznikla koncentrační řada kofeinu od 0,008 do 0,1 M. Vše bylo promícháno na vortexu.

8.3.2 Kofein s pektinem, hyaluronanem a lignohumátem v kyselém prostředí

Ze zásobního roztoku pektinu o koncentraci 200 mg/l bylo odebráno 10 ml a přidáno k naváženému kofeinu 1,5 mg a byla přidávána kyselina chlorovodíková do $pH=1$. Stejně byl připraven roztok kofeinu s HA při $pH=1$ a roztok kofeinu s HUM při $pH=1$.

8.3.3 Kofein s pektinem, hyaluronanem, lignohumátem a polyfenoly

Ze zásobního roztoku lignohumátu o koncentraci 50 mg/l bylo odebráno 10 ml a přidáno k naváženému kofeinu 1,5 mg. Stejně byl připraven roztok polyfenolů s kofeinem, PEC s kofeinem, HA s kofeinem.

8.3.4 Roztoky pro termogravimetrická měření

Roztok kofeinu o koncentraci 15 mg/ml byl připraven rozpuštěním 0,015 g kofeinu v 1 ml deionizované vody. Roztok nerozpuštěného kofeinu byl připraven do 1 ml deionizované vody, tak aby se kofein nerozpustil a zůstal usazený na dně zkumavky.

8.3.5 Kofein na titraci

Ze zásobního roztoku kofeinu o koncentraci 0,1M bylo odebráno 50 ml do titrační kádinky.

8.3.6 Kofeinové roztoky na uv/vis spektrometrii

Do patnácti vialek bylo přidáno tolik kofeinu, ze zásobního roztoku kofeinu o koncentraci 150 mg/l, a deionizované vody, aby vznikla koncentrační řada kofeinu od 10-150 mg/l. Vše bylo promícháno na vortexu. Dále byl připraven vzorek Kofoly a Coca-Coly. Do dvou vialek byl dán čistý roztok Kofoly a Coca-Coly a následně byly tyto roztoky desetkrát zředěny. Všechny experimenty měřeny v uv/vis oblasti byly proměřeny v mikrokyvetě s průměrem 2 mm.

8.3.7 Kofein na rozpustnost

Do pěti vialek bylo naváženo 10, 15, 16, 18 a 20 mg a přidán 1 ml deionizované vody.

8.4 Vlastní měření

8.4.1 Sledování rozpustnosti kofeinu

Vizuálně byla sledována rozpustnost kofeinu v připravených roztocích o koncentraci 10, 15, 16, 18 a 20 mg/ml zda se kofein rozpustí. Všechny roztoky byly krátce pětkrát ručně promíchány.

8.4.2 Měření rozpustnosti kofeinu pomocí termogravimetrie

Po třech dnech stání při laboratorní teplotě byly připravené roztoky odstředěny a bylo odebráno 30 mg roztoku supernatantu do platinové pánvičky termogravimetru. Termogravimetr roztok odpařoval v rozmezí od 5°C do 200°C. Rozpustnost byla vypočtena na základě takto zjištěného obsahu vody a kofeinu v supernatantu, o němž bylo předpokládáno, že je nasyceným roztokem kofeinu.

8.4.3 Stanovení pH a měrné vodivosti kofeinových roztoků

Do osmnácti roztoků kofeinu o koncentracích od $0,08 \cdot 10^{-6}$ do 0,1M byla vložena pH a vodivostní elektroda a bylo měřeno pH a měrná vodivost. Postup byl 4krát opakován.

8.4.4 Titrace roztoku kofeinu

50 ml roztoku kofeinu připravené v deionizované vodě nebo destilované vodě bylo titrováno kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 0,1M a 0,01M v automatickém titrátoru po 30 sekundách a 50 μ l příslušné kyseliny. Byla titrována i samotná voda příslušnou kyselinou.

8.4.5 Vizuální pozorování chování hyaluronanu a pektinu v kyselém pH

Do roztoku kyseliny chlorovodíkové o $\text{pH} = 2,3$ byla přikapávána HA nebo pektin. Následně do roztoku HA nebo pektinu byla přikapávána HCl. Bylo pozorováno chování kyseliny hyaluronové a pektinu v kyselém prostředí při pH Kofoly či Coca-Coly.

8.4.6 Měření absorpčních spekter kofeinu o různých koncentracích

Z připravených roztoků kofeinu o koncentraci 10-150 mg/l byly proměřovány absorpční spektra kofeinu až do koncentrace 150 mg/l jako je obsaženo v kofeinovém nápoji Coca-Cola, opakováno 4krát.

8.4.7 Měření absorpčních spekter kofeinu s HA a HUM v kyselém prostředí

Z předcházejícího měření bylo možné použít koncentraci kofeinu 150 mg/l. Byly proměřeny absorpční spektra HA+CAF při $\text{pH} = 1$ a HUM+CAF při $\text{pH}=1$. Byly studovány interakce mezi kofeinem a hyaluronanem popř. lignohumátem.

8.4.8 Měření absorpčních spekter CAF s POLYF a HUM ve vodném prostředí

Z předcházejícího měření bylo možné použít koncentraci kofeinu 150 mg/l. Byly proměřeny absorpční spektra kofeinu s lignohumátem a polyfenoly. Byly studovány interakce kofeinu mezi lignohumátem a polyfenoly.

8.4.9 Měření absorpčních spekter Kofoly a Coca-Coly

Kofola a Coca-Colou obsahují max. 150 mg/l kofeinu, proto mohly být proměřeny jejich absorpční spektra čistých roztoků a zředěných roztoků.

8.4.10 Měření absorpčních spekter CAF s PEC ve vodném a kyselém prostředí

Z předcházejícího měření bylo možné použít koncentraci kofeinu 150 mg/l. Byly proměřeny absorpční spektra PEC+CAF ve vodě a při $\text{pH} = 1$. Byly studovány interakce kofeinu a pektinu.

8.4.11 Měření emisních spekter kofeinu s PEC ve vodném a kyselém prostředí

Na fluorimetru bylo měřeno emisní spektrum kofeinu při emisní vlnové délce 330 nm a excitační vlnové délce 320 nm v rozsahu vlnových délek od 330 nm do 500 nm. Bylo studováno emisní maximum kofeinu v roztoku směsi PEC+CAF ve vodném prostředí. Stejně byly měřeny roztoky PEC+CAF při $\text{pH}=1$. Byly studovány interakce kofeinu a pektinu.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentální práce bylo stanovit, zda kofein s pektinem popř. kyselinou hyaluronovou nebo lignohumátem interaguje. Následně určit základní charakteristiky kyseliny hyaluronové a pektinu v kyselém prostředí. V bakalářské práci se zjistilo, že základní fyzikálně-chemické vlastnosti kofeinu se nikde neuvádějí. Bylo tedy potřeba jimi začít.

Všechny získané hodnoty jsou zpracovány dále ve formě grafů a tabulek.

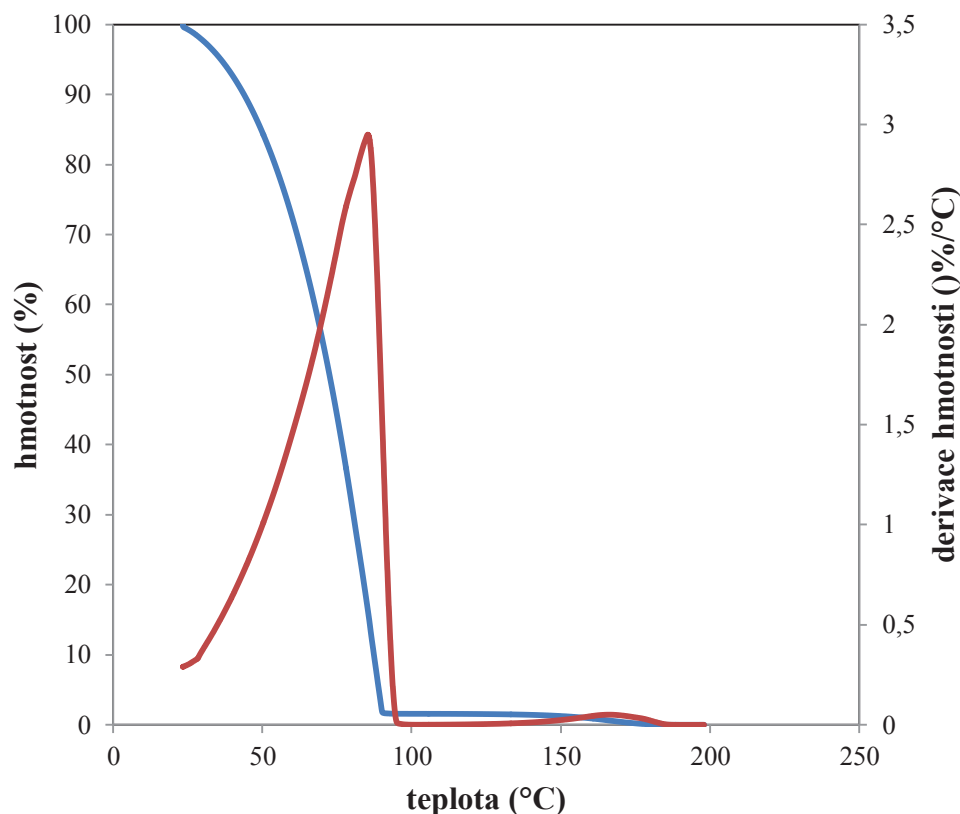
9.1 Sledování rozpustnosti kofeinu

Výše popsaným postupem byla sledována rozpustnost kofeinu. Kofein se rozpustil po 10 minutách v roztocích o koncentraci 10 a 15 mg/ml a po 30 minutách se kofein rozpustil v ostatních roztocích (16, 18 a 20 mg/ml).

Výrobce uvádí rozpustnost kofeinu 16 mg/l ($c=0,08M$), pouhým okem bylo vidět, že i 20 mg/l kofeinu se v deionizované vodě rozpustilo, dokonce se na titraci použila koncentrace 0,1M kofeinu.

9.2 Měření rozpustnosti kofeinu pomocí termogravimetrie

Dále byla sledována rozpustnost kofeinu ze změny hmotnosti kofeinu při odpařování vlastního roztoku. Z *Grafu 1. a Tab. 5. a 6.* s výsledky vyplývá, že kofein má daleko vyšší rozpustnost než uvádí výrobce a to v rozmezí 0,08239 - 0,1393M. To potvrzuje, že bylo možné pracovat s koncentrací 0,1M při dalších experimentech.



Graf 1. Ukázka grafu úbytku hmotnosti kofeinu v závislosti na teplotě

Tab. č. 5: Odečtení rozpuštěného a nerozpuštěného kofeinu z grafu v 1. zlomu

	m (mg)	T °C	% ve zlomu	g ve 100 g	m (M)	m (mM)
rozpuštěný	15	90°C	1,7	1,7	0,09	87,54
		87°C	1,6	1,6	0,08	82,39
nerozpuštěný a neodstředěný	130	88,57	2,59	2,43	0,12	124,96
		85,47				
	275	81,67				
		84,82				
nerozpuštěný a odstředěný	130	83,91	2,71	0,14	139,30	
		79,09				
	275	90,46				
		87				

Tab. č. 6: Odečtení rozpuštěného a nerozpuštěného kofeinu z grafu v 2. zlomu při 160°C

	m (mg)	T °C	% ve zlomu	g ve 100 g	m (M)	m (mM)
rozpuštěný	15	160,39	0,91	0,91	0,05	47,04
		160,37	1,35	1,35	0,07	69,38
nerozpuštěný a neodstředěný	130	160,37	1,22	0,99	0,05	51,10
		160,39				
	275	160,39				
		160,38				
nerozpuštěný a odstředěný	130	160,39	1,38	0,07	71,25	
		160,37				
	275	160,40				
		160,38				

V první tabulce byla odečtena hmotnost v procentech v prvním zlomu z grafu mezi teplotami přibližně 80-90°C, kdy se odpařovala voda volná. Dále byla hodnota přepočítaná na gramy, moly a milimoly.

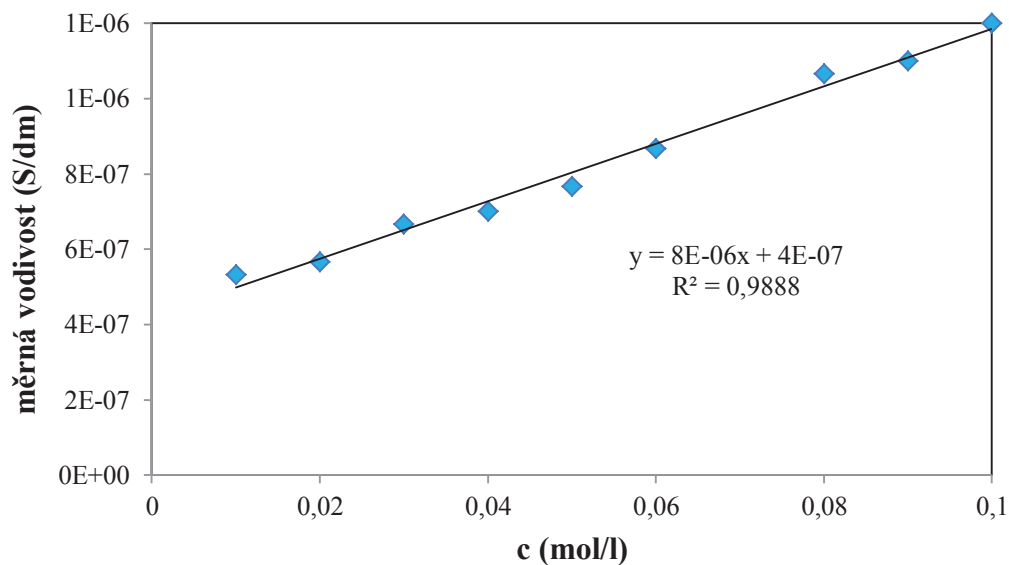
V druhé tabulce byla odečtena hmotnost v procentech v druhém zlomu z grafu při teplotě 160°C, kdy se odpařovala voda vázaná. Dále byla hodnota přepočítaná na gramy, moly a milimoly.

9.3 Stanovení pH a měrné vodivosti kofeinových roztoků

Výše popsáním postupem bylo měřeno pH a měrná vodivost roztoků kofeinu. Z *Grafu 2* vyplývá patrný nárůst měrné vodivosti roztoků kofeinu. Naopak z *Grafu 3* lze vidět exponenciální pokles molární vodivosti. Z toho vyplývá, že kofein se nechová jako elektrolyt, nebo jako jen hodně slabý elektrolyt. Z *Tab. č. 7* je patrné, že roztoky kofeinu o koncentraci $0,08 \cdot 10^{-6}$ - 0,1M mají pH= 4,54 - 5,79, z toho vyplývá že kofein má nízké pH.

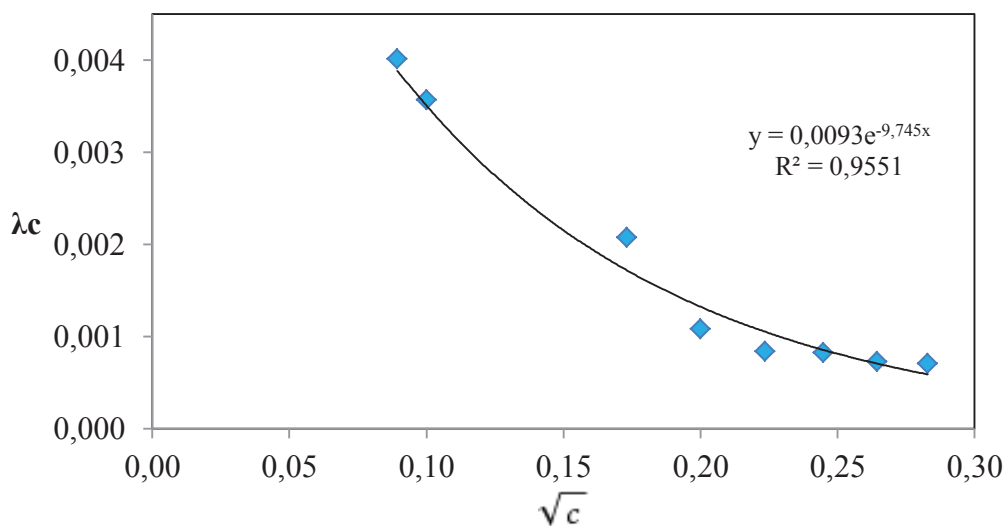
Tab. č. 7: hodnoty pH při různých koncentracích roztoků kofeinu ve vodném prostředí

c (mol/l)	8E-08	4E-07	8E-07	4E-06	8E-06	8E-05	8E-04	8E-03	1E-02
pH	5,49	5,38	5,52	4,69	4,54	5,31	5,10	5,71	5,79
c (mol/l)	2E-02	3E-02	4E-02	5E-02	6E-02	7E-02	8E-02	9E-02	1E-01
pH	5,52	5,68	5,81	5,68	5,67	5,76	5,66	5,73	5,71



Graf 2. Závislost měrné vodivosti na koncentraci

Z **Grafu 2.** s výsledky je patrné, že měrná vodivost kofeinu lineárně roste od koncentrace 0,01M do 0,1M

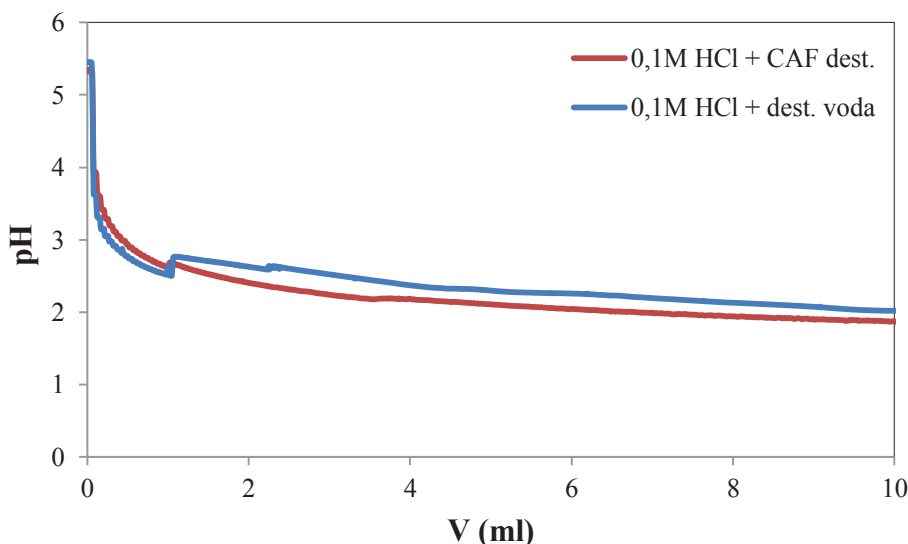


Graf 3. Závislost molární vodivosti ($S \cdot dm^2/mol$) na odmocnině z koncentrace

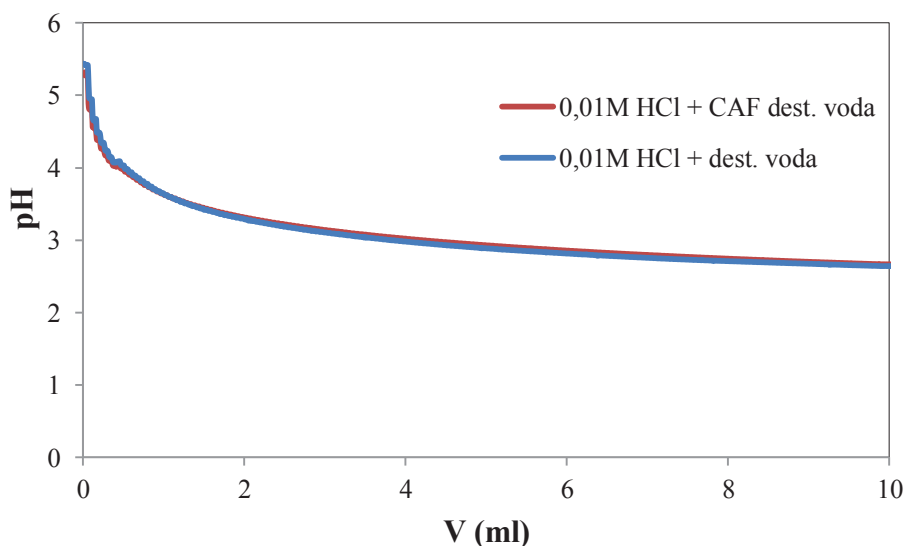
Z **Grafu 3.** s výsledky je patrné, že molární vodivost exponenciálně klesá od koncentrace 0,08M do 0,008M kofeinu.

9.4 Titrace roztoku kofeinu

Výše popsaným postupem byl titrován roztok kofeinu o koncentraci 0,1M v destilované vodě nebo deionizované vodě příslušnou kyselinou. Smyslem bylo zjistit chování kofeinu ve vodném roztoku při okyselování-model situace, která je v kolových nápojích.

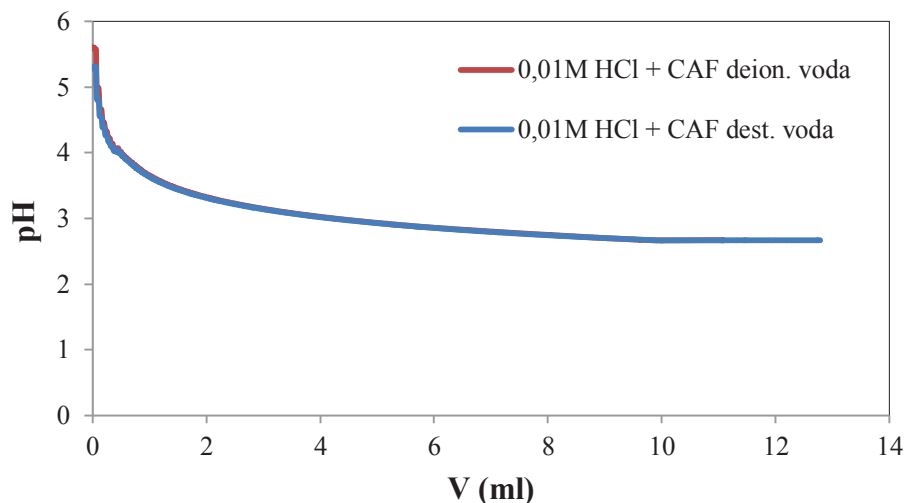


Graf 4. Závislost pH na objemu roztoku kofeinu při 0,1M HCl

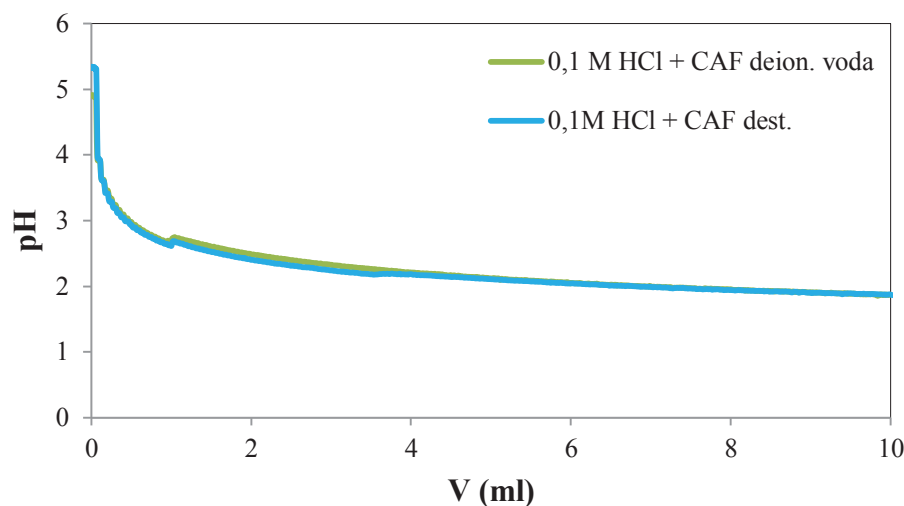


Graf 5. Závislost pH na objemu roztoku kofeinu při 0,01M HCl

Z **Grafu 4.** a **Grafu 5.** lze porovnat titrovaný roztok kofeinu v destilované vodě kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 0,1M a 0,01M. V **Grafu 4.** je titrován kofein silnější kyselinou, a proto se pH ke konci titrace dostává na nižší hodnoty než v **Grafu 5.** Zlom v **Grafu 4.** je při pH=4-2, zatímco v **Grafu 5.** je zlom v pH od 5 do 3.

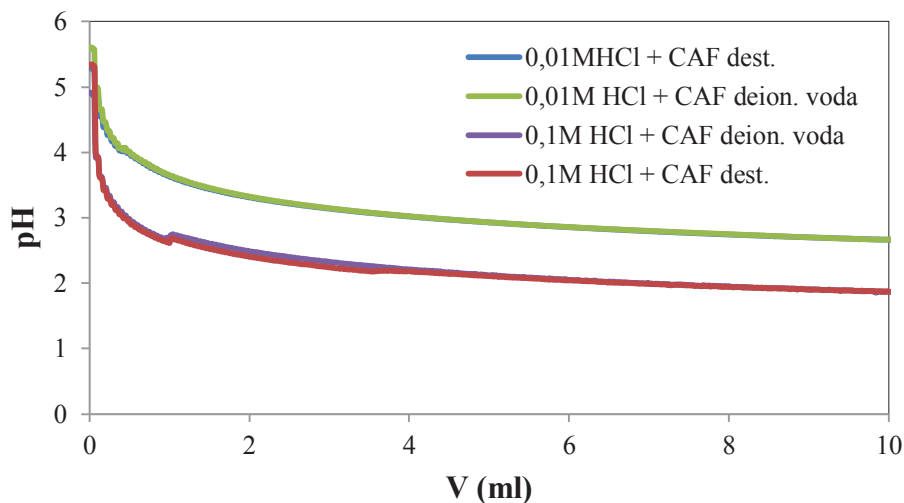


Graf 6. Závislost pH na objemu roztoku kofeinu při 0,01M HCl



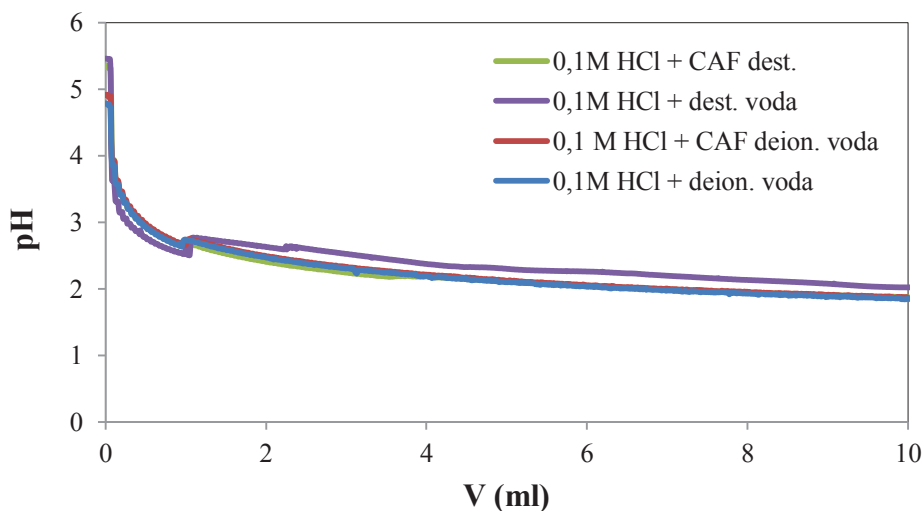
Graf 7. Závislost pH na objemu roztoku kofeinu při 0,1M HCl

Z **Grafu 6.** a **Grafu 7.** lze porovnat titrovaný roztok kofeinu v destilované vodě a deionizované vodě při HCl o koncentraci 0,01M a 0,1M. Co se týká zlomu, tak je stejný v obou případech jako v **Grafu 4.** a **Grafu 5.**, protože kofein připraven v destilované vodě má stejnou titrační křivku jako kofein připravován v deionizované vodě. Lépe vidět viz **Graf 8.**



Graf 8. Závislost pH na objemu roztoku kofeinu při 0,1M a 0,01M HCl

Z **Grafu 8.** s výsledky je patrné, že roztoky kofeinu titrované příslušnou kyselinou mají stejnou titrační křivku, ať jsou připravovány v deionizované vodě nebo destilované vodě.



Graf 9. Závislost pH na objemu roztoku kofeinu při 0,1M a 0,01M HCl

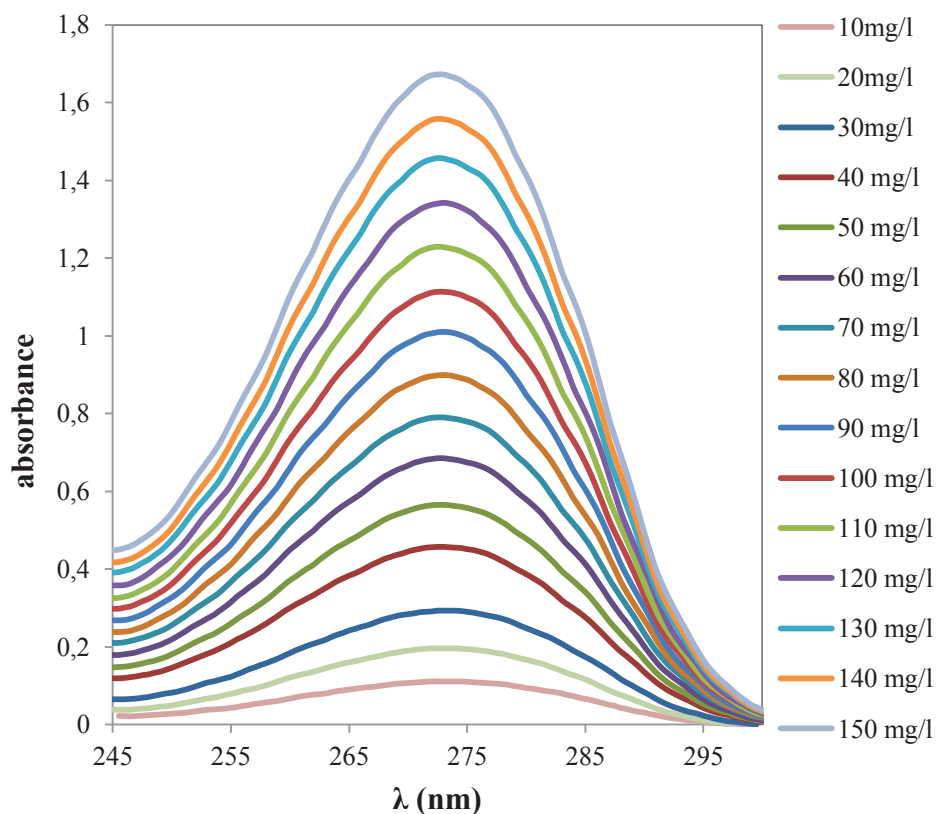
Z **Grafu 9.** s výsledky je patrné, že jde stále o stejné titrační křivky, z toho vyplývá, že kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,1M a 0,01M nemá žádný vliv na roztok kofeinu o koncentraci 0,1M. Titrace kyselinou ukázaly, že z hlediska pH-metrie není kofein přítomností kyseliny ve vodném roztoku ovlivněn, zejména tedy, že nevykazuje protonizační (zásadité) vlastnosti.

9.5 Vizuální pozorování chování hyaluronanu a pektinu v kyselém pH

Do roztoku kyseliny chlorovodíkové o $\text{pH} = 2,3$ byla přikapávána HA nebo pektin. Následně do roztoku HA nebo pektinu byla přikapávána HCl. V bakalářské práci bylo stanoveno pH Coca-Coly na 2,45 a Kofoly na 2,95 [77]. Při přikapávání kyseliny hyaluronové a pektinu do kyselého roztoků nebo do Coca-Coly či Kofoly, které mají nízké pH bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová nebo pektin netvoří žádné viditelné dlouhotrvající částice, které by spotřebitel mohl v Kofole či Coca-Cole pozorovat, nedocházelo by tedy ke snížení kvality nápoje.

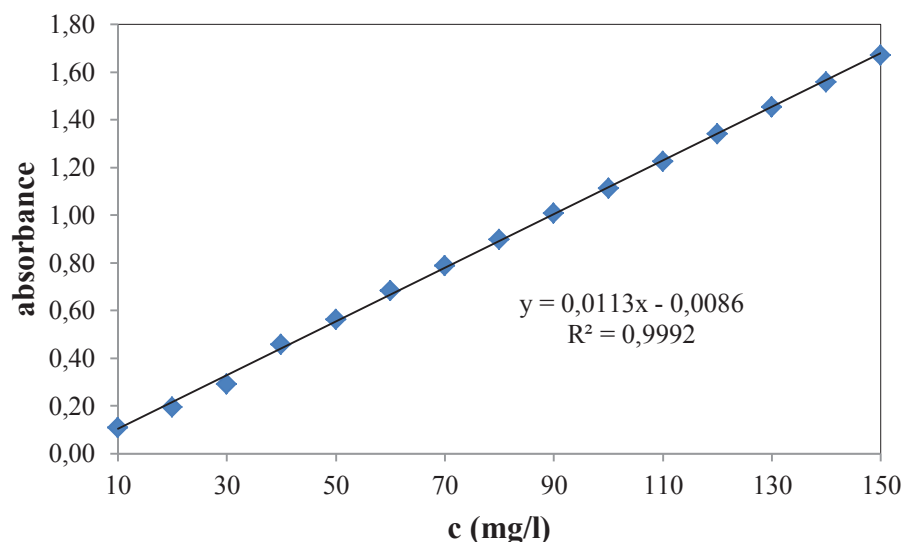
9.6 Měření absorpčních spekter kofeinu o různých koncentracích

Z připravených roztoků kofeinu o koncentraci 10-150 mg/l byly proměřovány absorpční spektra kofeinu až do koncentrace 150 mg/l jako je obsaženo v kofeinovém nápoji Coca-Cola, opakováno 4krát. Bylo zjišťováno zda lze změřit absorpční spektra nejvyšší měřené koncentrace kofeinu jako je právě v Kofole či Coca-Cole.



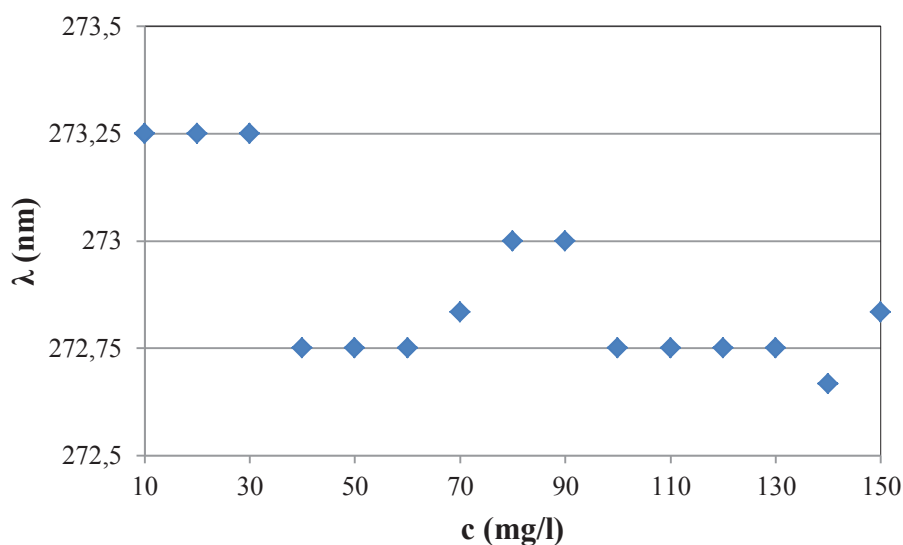
Graf 10. Absorpční spektrum kofeinu od koncentrace 10-150 mg/l

Z Grafu 10. s výsledky je patrné, že roztoky kofeinu od koncentrace 10 mg/l a vyšší lze změřit, i roztok 150 mg/l kofeinu. Tato koncentrace je požita v dalších měření.



Graf 11. Závislost koncentrace na absorbanci

Z **Grafu 11.** s výsledky je patrné, že roztoky kofeinu o koncentraci 10-150 mg/l mají lineární závislost.



Graf 12. Závislost vlnové délky v maximu absorbance na koncentraci

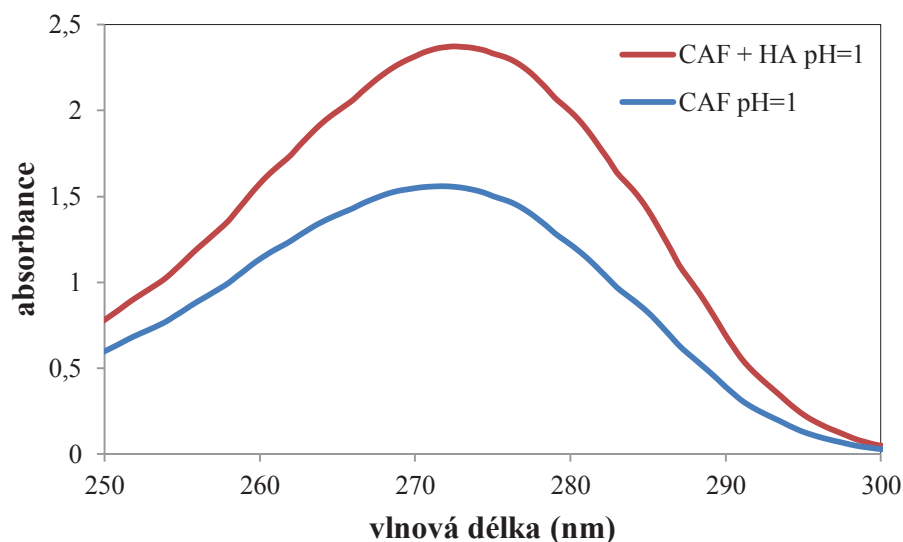
Z **Grafu 12.** s výsledky a **Tab. č. 8** vyplývá, že roztoky kofeinu od koncentrace 10 mg/l a vyšší mají vlnovou délku v rozmezí 272,5 - 273,25 nm. To znamená, že se absorpční maxima kofeinu výrazněji neposouvají s koncentrací. UV spektroskopie nevykazuje na vzájemné interakci molekul kofeinu (zejména „stohovacího“ – „stacking“ – typu), které by mohly ovlivňovat vstřebání kofeinu v zažívacím traktu.

Tab. č. 8: koncentrace roztoků kofeinu jejich vlnová délka a příslušná absorbance

mg/l	λ_{\max}	abs.
10	273,25	0,11
20	273,25	0,20
30	273,25	0,29
40	272,75	0,46
50	272,75	0,56
60	272,75	0,69
70	272,8	0,79
80	273	0,90
90	273	1,01
100	272,75	1,11
110	272,75	1,23
120	272,75	1,34
130	272,75	1,46
140	272,67	1,56
150	272,83	1,67

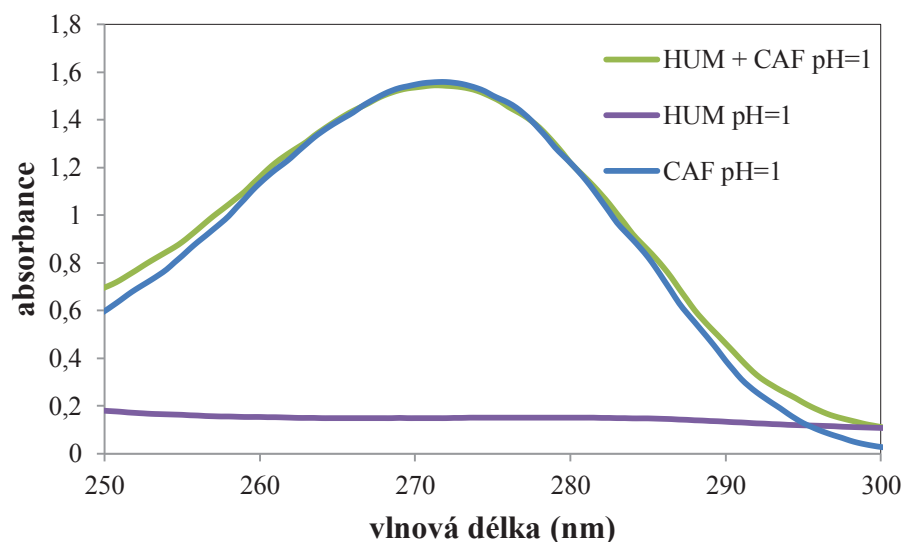
9.7 Měření absorpčních spekter kofeinu s HA a HUM v kyselém prostředí

Byly proměřeny absorpční spektra HA+CAF při pH = 1 a HUM+CAF při pH=1. Byly studovány interakce mezi kofeinem a hyaluronanem popř. lignohumátem.



Graf 13. Absorpční spektrum hyaluronanu a kofeinu při pH=1

Z **Grafu 13.** s výsledky je patrné, že nebyl zjištěn žádný posun absorpčních maxim, z toho vyplývá, že nedošlo k interakci mezi kofeinem a kyselinou hyaluronovou, protože absorpční maxima kofeinu při pH=1 i v kyselině hyaluronové se téměř rovnají.

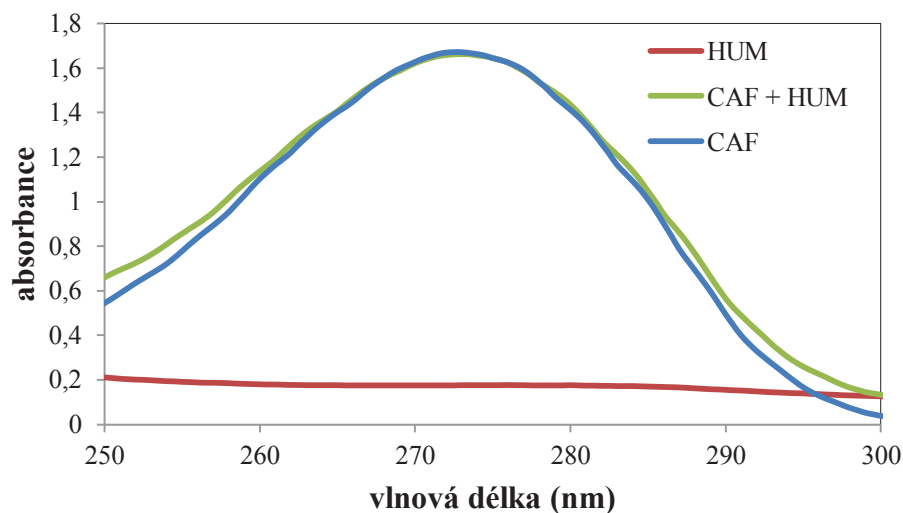


Graf 14. Absorpční spektrum lignohumátu a kofeinu při pH=1

Z **Grafu 14.** je patrné, že λ_{\max} kofeinu se nemění a nedochází k žádnému posunu absorpčních maxim kofeinu a tedy k žádné interakci mezi kofeinem a lignohumátem.

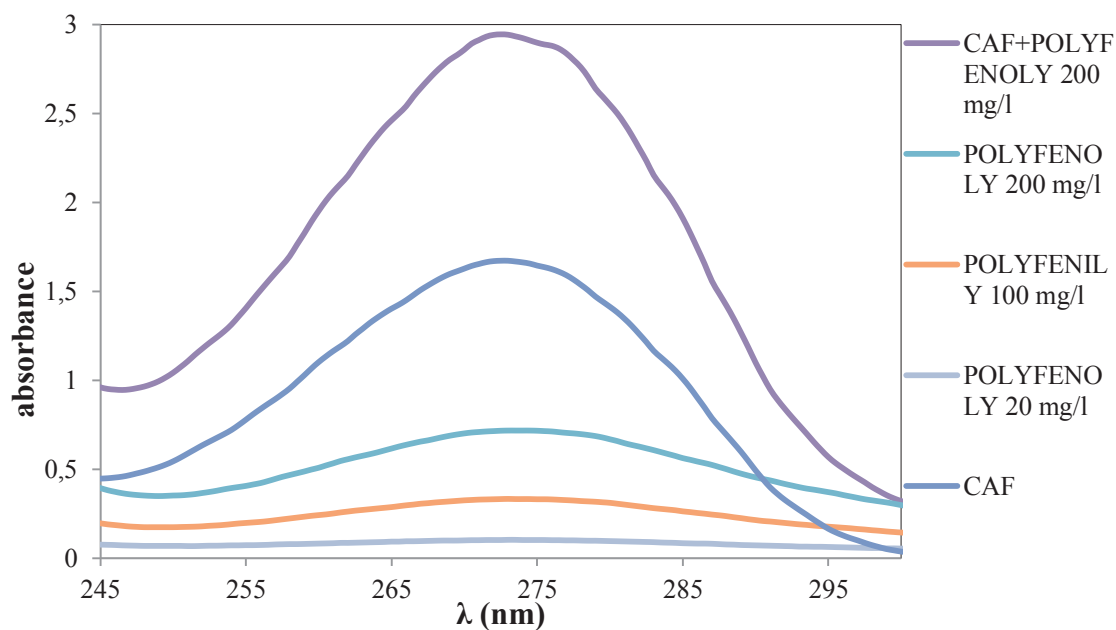
9.8 Měření absorpčních spekter CAF s POLYF a HUM ve vodném prostředí

Byly proměřeny absorpční spektra kofeinu s lignohumátem a polyfenoly. Byly studovány interakce kofeinu mezi lignohumátem.



Graf 15. Absorpční spektrum lignohumátu a kofeinu ve vodném prostředí

Z **Grafu 15.** je patrné, že λ_{\max} kofeinu se nemění a nedochází k žádnému posunu absorpčních maxim kofeinu a tedy k žádné interakci mezi kofeinem a lignohumátem ve vodném prostředí.

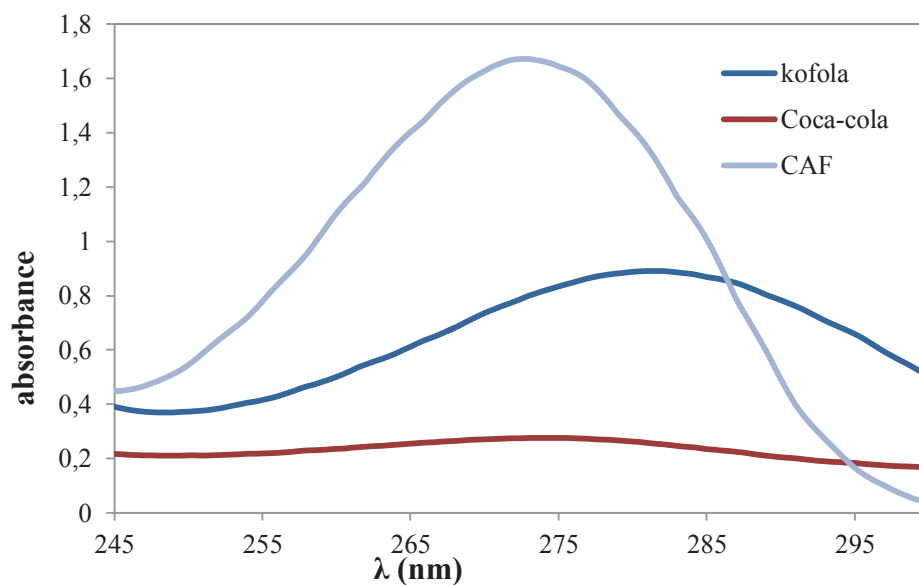


Graf 16. Absorpční spektrum kofeinu a polyfenolů ve vodném prostředí

Z **Grafu 16.** je patrné, že absorbance směsi je o polovinu vyšší než samotného kofeinu, ale absorpční maxima se neposouvají z toho vyplývá, že nejsou prokázány žádné interakce. Součtové spektrum má nižší absorbance než spektrum směsi z toho vyplývá, změna molárního extinkčního koeficientu a případné interakce.

9.9 Měření absorpčních spekter Kofoly a Coca-Coly

Kofola a Coca-Colou obsahují max. 150 mg/l kofeinu, proto mohly být proměřeny jejich absorpční spektra čistých roztoků a zředěných roztoků.

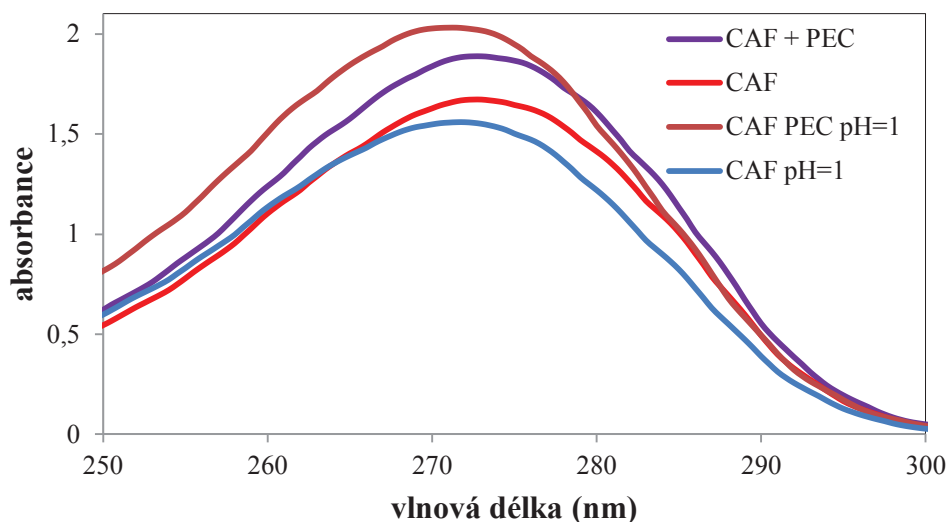


Graf 17. Absorpční spektrum nápoje Kofola a Coca-Cola desetkrát zředěné

Z **Grafu 17.** je patrné, že absorpční maximum Kofoly je 281,5 nm, Coca-Coly 275 nm z toho vyplývá, že lze pozorovat případný posun, znamená to, že ostatní složky nápoje interagují s kofeinem a ovlivňují jeho chování.

9.10 Měření absorpčních spekter CAF s PEC ve vodném a kyselém prostředí

Byly proměřeny absorpční spektra PEC+CAF ve vodě a při pH = 1. Kyselé prostředí simuluje snížení pH po požití nápoje a vyloučení žaludečních šťáv. Pektin by se tak mohl navázat na kofein a zpomalit tak jeho vstřebávání. Byly studovány interakce kofeinu a pektinu.



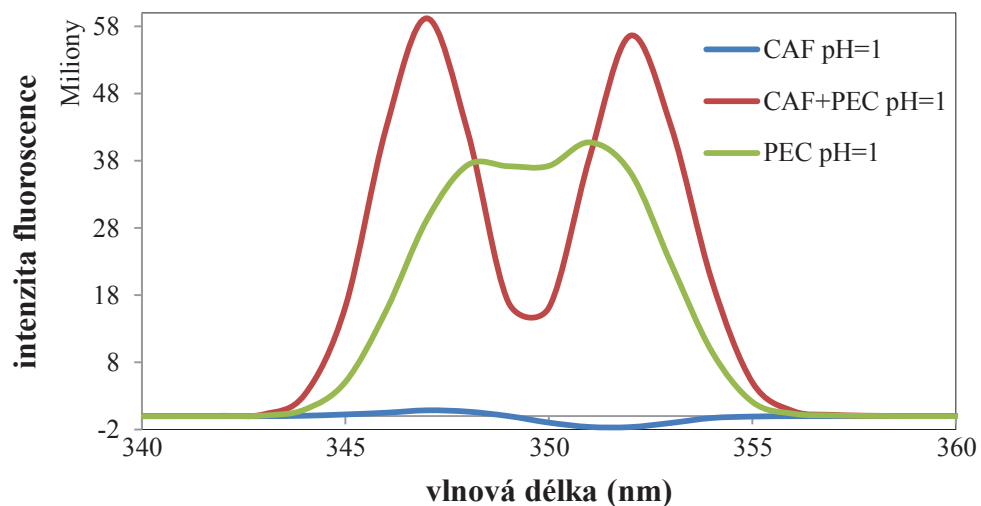
Graf 18. Absorpční spektrum kofeinu a pektinu ve vodném prostředí i při pH=1

Z **Grafu 18.** s výsledky vyplývá, že byl zjištěn patrný posun absorpčních maxim kofeinu, z toho vyplývá, že došlo k náznaku žádané interakce mezi kofeinem a pektinem, protože maxima kofeinu ve vodném prostředí i při pH=1 se téměř nerovnají, to potvrzují emisní spektra kofein-pektin v **Grafu 19. a 20.**

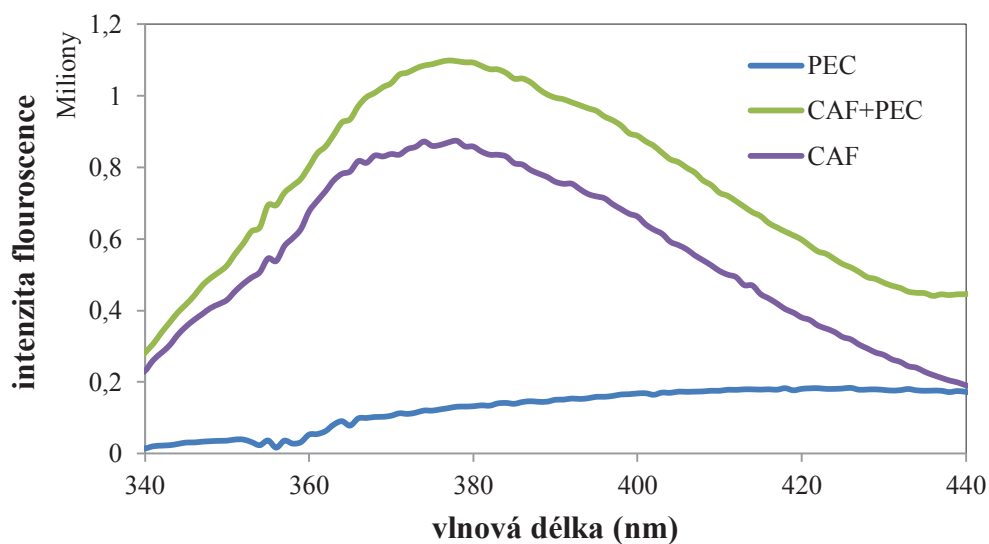
9.11 Měření emisních spekter kofeinu s PEC ve vodném a kyselém prostředí

Bylo studováno emisní maximum kofeinu v roztoku směsi PEC+CAF ve vodném a kyselém prostředí. Byly studovány interakce kofeinu a pektinu. Bylo nutné odečíst emisní spektrum blanku od emisního spektra kofein-pektin.

Z **Grafu 19. a 20.** s výsledky je patrné, že byl zjištěn žádaný posun emisních maxim, z toho vyplývá, že došlo k interakci mezi kofeinem a pektinem, protože maxima kofeinu ve vodě i v kyselém pH nejsou stejné a posouvají se.



Graf 19. Emisní spektrum kofeinu a pektinu při pH=1



Graf 20. Emisní spektrum kofeinu a pektinu ve vodném prostředí

Z Grafu 19. a 20. s výsledky vyplývá, že byl zjištěn posun emisních maxim, to znamená, že došlo k žádané interakci mezi kofeinem a pektinem, protože maxima kofeinu ve vodném prostředí i při pH=1 se nerovnají. Z toho vyplývá, že emisní spektra potvrzují náznak pozitivní interakce mezi kofeinem a pektinem v silně kyselém prostředí.

10 ZÁVĚR

Teoretická část byla zaměřena především na alkaloid kofein, jeho vstřebávání, cesty v těle, čaj, kávu, Kofolu a Coca-Colu, na polysacharidy kyselinu hyaluronovou, pektin a fluorescenční spektroskopii. Rešeršní část byla zaměřena na poznatky o pektinu, vstřebávání kofeinu, žádoucích a nežádoucích účincích nápoje Coca-Cola.

Cílem práce bylo získat základní informace o fyzikálně-chemických vlastnostech kofeinu a interakci mezi zvolenými polysacharidy hyaluronanem (HA), pektinem nebo lignohumátem a alkaloidem kofeinem (CAF). Zjistit, jak se chová pektin v silně kyselém prostředí.

Nejdříve se studovaly chemické a fyzikální vlastnosti kofeinu a na základě těchto výsledků byla studována interakce kofeinu a hyaluronanu nebo pektinu pomocí fluorescence a absorbance.

Rozpustnost kofeinu byla stanovena pomocí termogravimetrie v rozmezí 0,082 - 0,14M a pouhým okem bylo vidět, že i 20 mg/l kofeinu se v deionizované vodě rozpustilo.

Při měření pH bylo zjištěno, že roztoky kofeinu mají slabě kyselé pH. Roztoky kofeinu o koncentraci $0,08 \cdot 10^{-6}$ - 0,1M mají pH v rozmezí 4,54 - 5,79.

Při měření vodivosti roztoků kofeinu byl naměřen jistý nárůst měrné vodivosti. Z toho vyplývá, že kofein se nechová jako elektrolyt, nebo jako jen hodně slabý elektrolyt.

Roztok kofeinu o koncentraci 0,1M, připravován v deionizované vodě nebo destilované vodě, byl titrován 0,1M a 0,01M HCl a má stejnou titrační křivku jako voda titrovaná příslušnou kyselinou. Titrace kyselinou ukázaly, že z hlediska pH-metrie není kofein přítomností kyseliny ve vodném roztoku ovlivněn, zejména tedy, že nevykazuje protonizační (zásadité) vlastnosti.

Při přikapávání kyseliny hyaluronové a pektinu do kyselého roztoku nebo do Coca-Coly či Kofoly, které mají nízké pH, bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová nebo pektin netvoří žádné viditelné dlouhotrvající částice, které by spotřebitel mohl v Kofole či Coca-Cole pozorovat, nedocházelo by tedy ke snížení kvality nápoje.

Roztoky kofeinu o koncentraci 10-150 mg/l mají lineární závislost absorbance na koncentraci a vlnovou délku v maximum absorbance v rozmezí 272,5 - 273,25 nm. To znamená, že se absorpční maxima kofeinu výrazněji neposouvají s koncentrací. UV spektroskopie neukazuje na vzájemné interakce molekul kofeinu (zejména „stohovacího“ – „stacking“ – typu), které by mohly ovlivňovat jeho vstřebávání v zažívacím traktu.

Při měření absorpčních spekter kofeinu s lignohumátem ve vodném, kyselém prostředí a hyaluronanem při pH=1, nebyl zjištěn žádný posun absorpčních maxim, z toho vyplývá, že nedošlo k interakci mezi kofeinem a kyselinou hyaluronovou nebo lignohumátem.

V emisních spektrech roztoků kofeinu spolu s pektinem ve vodném i kyselém prostředí byl zjištěn posun emisních maxim to znamená, že došlo k náznaku žádané pozitivní interakce mezi kofeinem a polysacharidem pektinem v silně kyselém prostředí. Potvrzuje to i měření absorpčních spekter kofeinu a pektinu.

Dále bylo změřeno absorpční spektrum nápoje Kofola a Coca-Cola, došlo k případnému posunu, znamená to, že ostatní složky nápoje interagují s kofeinem a ovlivňují jeho chování.

U polyfenolů byla prokázána případná interakce změnou molárního extinkčního koeficientu.

Studium fyzikálně-chemických vlastností kofeinu pouze naznačilo možnosti prodloužení vstřebávání kofeinu z kolových nápojů. Návrh dalších experimentů v této problematice by byl, zaměřit se na testy s konzumenty těchto nápojů a stanovit CAF v tělních tekutinách.

11 LITERATURA

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie III: Od objevu genu ke genovému inženýrství. Rostliny - důležitý zdroj přírodních látek. Mikroorganismy - producenti důležitých látek. Biochemie cizorodých látek. Aplikov. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 191 s. ISBN 80-200-0471-8.
- [2] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 3. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [3] Alkaloids isolated from south african menispermaceae. Chapter 5. [cit. 28. 4. 2012]. Dostupné z: <https://ujdigispace.uj.ac.za/bitstream/handle/10210/233/Chapter5.pdf>
- [4] Vlas, T.: Alkaloidy. [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: <http://projektaalfa.ic.cz/alkaloidy.htm>
- [5] KREJČÍ, Ivan. O kávě a čaji, aneb, Víme proč je pijeme?. Vyd. 1. Praha: Grada, 2000, 100 s. Zdraví, sv. 15. ISBN 80-716-9535-1.
- [6] PROCHÁZKA, Vladimír. Příruční slovník naučný II. (G-L). 1. vyd. Praha: NČAV, 1963, 919 s.
- [7] Bezpečnostní list pro kofein. Ing. Petr Švec – PENTA, 1.2.2012. [cit. 4. 4. 2012]. Dostupné z: http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/c/bezplist_662.pdf
- [8] UCUN, Fatih, Adnan SAĞLAM a Vesile GÜÇLÜ. Molecular structures and vibrational frequencies of xanthine and its methyl derivatives (caffeine and theobromine) by ab initio Hartree-Fock and density functional theory calculations. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2007, roč. 67, è. 2, s. 342-349. ISSN 13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2006.07.029. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142506004203>
- [9] EMEL'YANENKO, Vladimir N. a Sergey P. VEREVKIN. Thermodynamic properties of caffeine: Reconciliation of available experimental data. The Journal of Chemical Thermodynamics. 2008, roč. 40, è. 12, s. 1661-1665. ISSN 00219614. DOI: 10.1016/j.jct.2008.07.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021961408001493>
- [10] FISONE, G., A. BORGKVIST a A. USIELLO. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS). 2004-4-1, roč. 61, è. 7-8, s. 857-872. ISSN 1420-682x. DOI: 10.1007/s00018-003-3269-3. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>
- [11] LIGUORI, A., HUGHES, R. J., GRASS, A. J. Absorption and Subjective Effects of Caffeine from Coffee, Cola and Capsules. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 1997-1-27, roč. 58, s. 721-726. ISSN 0091-3057. DOI: 10.1016/S0091-3057(97)00003-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305797000038>
- [12] MICHAEL ZIMMERMAN, P, J PULLIAM, J SCHWENGELS a S MACDONALD. Caffeine intoxication: A near fatality. Annals of Emergency Medicine. 1985, roč. 14, è. 12, s. 1227-1229. ISSN 01960644. DOI: 10.1016/S0196-0644(85)81035-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064485810350>
- [13] KERRIGAN, Sarah a Tania LINDSEY. Fatal caffeine overdose: Two case reports. Forensic Science International. 2005-5-4, roč. 153, è. 1, s. 67-69. ISSN 0379-0738. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.04.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073805002057>
- [14] KUCZKOWSKI, K.M. Caffeine in pregnancy: A cause for concern?. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. 2009, roč. 28, è. 6, s. 605-607. DOI:

- 10.1016/j.annfar.2009.04.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0750765809002196>
- [15] Best, B.: Is Caffeine a Health Hazard? [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: <http://www.benbest.com/health/caffeine.html>
- [16] Sun Ha Jee; Jiang He; Paul K. Whelton; IISuh; Michael J. Klag. TheEffect of ChronicCoffeeDrinking on BloodPressure A Meta-Analysis of ControlledClinicalTrials. Hypertension. 1999, roč. 33, s. 647-652. ISSN 0194-911X. DOI: 10.1161/01.HYP.33.2.647. Dostupné z: <http://hyper.ahajournals.org/content/33/2/647.short>
- [17] EVANS, Suzette M. a Roland R. GRIFFITHS. Caffeine tolerance and choice in humans. Psychopharmacology. 1992, roč. 108, č. 1-2, s. 51-59. DOI: 10.1007/BF02245285. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02245285>
- [18] MICHAEL F. LEITZMANN, WALTER C. WILLETT, ERIC B. RIMM, MEIR J. STAMPFE, DONNA SPIEGELMAN, GRAHAM A. COLDITZ, EDWARD GIOVANNUCCI. A Prospective Study of CoffeeConsumption and the Risk of SymptomaticGallstoneDisease in Men. Journal of theamericanmedicalassociation. 1999, č. 22, s. 2106-2112. ISSN 0002-9262. DOI: 10.1001/jama.281.22.2106. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=N1Fc7E73llAk8njBJhC&page=1&doc=1
- [19] EHRLICH, A., S., LUCKER, P., W., SCHAEFER, A. Effect of processed and non-processedcoffeesamples on gastricpotentialdifference - Study withhealthy male helicobacterpylori-positive and helicobacterpylori-negative volunteers. Arzneimittel-forschung-drugresearch. 1999, roč. 49, č. 7, s. 626-630. ISSN 0004-4172. DOI: 10.1055/s-0031-1300473. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=21&SID=N1Fc7E73llAk8njBJhC&page=1&doc=1
- [20] CHOU, Tony M. a Neal L. BENOWITZ. Caffeine and coffee: effects on health and cardiovascularisease. ComparativeBiochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 2003, roč. 109, s. 173–189. DOI: 10.1016/0742-8413(94)00048-F. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/074284139400048F>
- [21] SMITH, Barry D., David CRANFORD a Lee GREEN. Hostility and caffeine: cardiovasculareffectsduring stress and recovery. Personality and IndividualDifferences. 2001, roč. 30, č. 7, s. 1125–1137. ISSN 0191-8869. DOI: 10.1016/S0191-8869(00)00097-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0191886900000970>
- [22] STRONG, F., C.Itmaybethcaffeine in Extra StrengthExcedrinthatiseffectiveformigraine. PharmPharmacol. 1997, roč. 49, s. 1260. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06082.x. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466355>
- [23] VIANNA, E.O. a R.J. MARTÍN. Bronchodilators and corticosteroids in thetreatment of asthma. Drugs of Today. 1998, roč. 34, s. 203. ISSN 1699-3993. DOI: 10.1358/dot.1998.34.3.485166. Dostupné z: http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=4
- [24] Hara Y. Influence of teacatechins on the digestive tract. Journal of cellularbiochemistry. Supplement. 1997, roč. 27, s. 52-58. ISSN 0733-1959. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(1997)27+<52::AID-JCB10>3.0.CO;2-N. Dostupné z: <http://www.mendeley.com/research/influence-tea-catechins-digestive-tract/#>

- [25] Miyagawa C, Wu C, Kennedy DO, Nakatani T, Ohtani K, Sakanaka S, Kim M, Matsui-Yuasa I. Protective effect of green tea extract and tea polyphenols against the cytotoxicity of 1,4-naphthoquinone in isolated rat hepatocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1997, roč. 61, č. 11, s. 1901-1905. ISSN 0916-8451. DOI:10.1271/bbb.61.1901. Dostupné z: http://www.journalarchive.jst.go.jp/english/jnlabstract_en.php?cdjournal=bbb1992&cdvol=61&noissue=11&startpage=1901
- [26] KARIM, Mohammad Mainul, Chi Wan JEON, Hyun Sook LEE, Seikh Mafiz ALAM, Sang Hak LEE, Jong Ha CHOI, Seung Oh JIN a Ajoy Kumar DAS. Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulation by First Derivative Synchronous Fluorimetric Method. *Journal of Fluorescence*. 2006-9-29, roč. 16, č. 5, s. 713-721. ISSN 1053-0509. DOI: 10.1007/s10895-006-0115-7. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10895-006-0115-7>
- [27] FRANKS, H. M., H. HAGEDORN, V. R. HENSLEY, W. J. HENSLEY a G. A. STARMER. The effect of caffeine on human performance, alone and in combination with ethanol. *Psychopharmacology*. 1975, roč. 45, č. 2, s. 177-181. DOI: 10.1007/BF00429058. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00429058>
- [28] HASENFRATZ, M., A. BUNGE, G. DAL PRÁ a K. BÄTTIG. Antagonistic effects of caffeine and alcohol on mental performance parameters. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993, roč. 46, č. 2, s. 463-465. ISSN 0091-3057. DOI: 10.1016/0091-3057(93)90380-C. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009130579390380C>
- [29] ARTS, Ilja CW, Peter CH HOLLMAN a Daan KROMHOUT. Chocolate as a source of tea flavonoids. *The Lancet*. 1999, roč. 354, č. 9177, s. 488. ISSN 0140-6736. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)02267-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673699022679>
- [30] HERTOOG, M.G.L, E.J.M FESKENS, D KROMHOUT, M.G.L HERTOOG, P.C.H HOLLMAN, M.G.L HERTOOG a M.B KATAN. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*. 1993-10-23, roč. 342, č. 8878, s. 1007-1011. ISSN 0140-6736. DOI: 10.1016/0140-6736(93)92876-U. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369392876U>
- [31] QUINLAN, P., Joan LANE a Laurence ASPINALL. Effects of hot tea, coffee and water ingestion on physiological responses and mood: the role of caffeine, water and beverage type. *Psychopharmacology*. 1997-5-23, roč. 134, č. 2, s. 164-173. ISSN 0033-3158. DOI: 10.1007/s002130050438. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>
- [32] KATAN Martijn B ; SCHOUTEN Evert. Caffeine and arrhythmia. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005, roč. 81, č. 3, s. 539-540. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <http://www.ajcn.org/content/81/3/539.full#FN2>
- [33] Caffeine Content of Drinks. [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: <http://www.energyfiend.com/the-caffeine-database>
- [34] Klementová, Š. Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti. 2005, poslední revize 1.8.2005 [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm

- [35] Základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [36] Fluorescence. [cit. 24. 4. 2012]. Dostupné z: <<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence>>.
- [37] MEYER, K., PALMER, J. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*, 1934, roč. 107, s. 629-634. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/107/3/629.full.pdf>
- [38] PRICE, R. D., BERRY, M. G., NAVSARIA, H. A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2007, roč. 60, č. 10 s. 1110-1119. ISSN 1748-6815. DOI: 10.1016/j.bjps.2007.03.005. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748681507001805>
- [39] VOET, Donald. Biochemie. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.
- [40] COWMAN, K. M., MATSUOKA, S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, 2005, roč. 340, č. 5, s. 791-809. ISSN 0008-6215. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621505000534>
- [41] KOGAN, G., ŠOLTÉS, S., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, roč. 29, č. 1, s. 17-25. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/content/wr1138754j2665u1/>
- [42] DAY, A. J., SHEENAN, J. K. Hyaluronan: Polysaccharide chaos to protein organisation. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001, roč. 11, č. 5, s. 617-622. DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00256-6. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X00002566>
- [43] LAURENT, T. C., FRASER, J. R. E. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992, roč. 6, s. 2397-2404. ISSN 0892-6638. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/6/7/2397.short>
- [44] SLEVIN, M., et al.: Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*, 2007, roč. 26, č. 1, s. 58-68. ISSN 0945-053X. DOI: 10.1016/j.matbio.2006.08.261. Dostupné z: <http://e-space.mmu.ac.uk/e-space/handle/2173/13181>
- [45] Chemistry and biology of hyaluronan [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 605 s. [cit. 2012-04-27]. ISBN 00-804-4382-6. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=WCjv3-q2ggC&oi=fnd&pg=PA71&dq=related:vdtDAMpE6eAJ:scholar.google.com/&ots=FQo2W8HHuv&sig=7ebHVbQl3Lx4QLLc_nDuEH1cGk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [46] LAPČIK, L., et al. Hyaluronan: Structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 1998, roč. 98, č. 8, s. 2663-2684. ISSN 15206890. DOI: 10.1021/cr941199z. Dostupné z: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/11848975>
- [47] WEIGEL P. H., HASCALL V. C., TAMMI M. Hyaluronan synthases. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, roč. 272, č. 22, s. 13997-14000. ISSN 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.272.22.13997. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/272/22/13997.short>
- [48] HERSLÖV, K., SUNDELÖF, L., EDSMAN, K. Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/Sodium Chloride/Water

- System. *J. Phys. Chem.*, 1992, roč. 96, č. 5, s. 2345-2348. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100184a061. Dostupné z: <http://3249238492kljf-pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100184a061>
- [49] BALAZS, E. A.: Ultrapurehyaluronic acid and the use thereof. *US-Patent*, 1979, 4, 141, 193. [cit. 2012-04-27]. Dostupné z: <http://www.google.cz/patents?hl=cs&lr=&vid=USPAT4141973&id=4cwxAAAEBAJ&oi=fnd&printsec=abstract#v=onepage&q&f=false>
- [50] Firma Kofola. Kofola a.s CZ. . [online]. 16.4.2014 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://firma.kofola.cz>
- [51] The Coca-Cola Company. Coca-Cola. . [online]. 16.4.2014 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.coca-cola.cz>
- [52] The Coca-Cola Company. Coca-Cola Journey Homepage: The Coca-Cola Company. . [online]. 16.4.2014 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.coca-cola.com>
- [53] LA VECCHIA, C. Coffee and cancer epidemiology. GARATTINI, Silvio. Caffeine, coffee, and health. New York: Raven Press, c1993, s. 379-398. ISBN 0881679615.
- [54] MACMAHON, Brian, Stella YEN, Dimitrios TRICHOPOULOS, Kenneth WARREN a George NARDI. Coffee and Cancer of the Pancreas. *New England Journal of Medicine*. 1981-03-12, vol. 304, issue 11, s. 630-633. DOI: 10.1056/NEJM198103123041102. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198103123041102>
- [55] ERNSTER, V.A. Epidemiologic studies of caffeine and human health. SPILLER, Gene A. The Methylxanthine beverages and foods: chemistry, consumption, and health effects. New York: Liss, c1984, s. 377-400. ISBN 0845150081.
- [56] MARWICK, Charles. Shrnutí poznatků o vztazích mezi stravou a nádory. *JAMA*, 1998, Roč. 6, č. 1, s. 6-7. ISSN: 1210-4132.
- [57] SHI, X., N.S. DALAL a A.C. JAIN. Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology*. 1991, vol. 29, issue 1, s. 1-6. DOI: 10.1016/0278-6915(91)90056-D. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/027869159190056D>
- [58] CHAN, P. C., G. D. HILLS, G. E. KISSLING a A. NYSKA. Toxicity and carcinogenicity studies of 4-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Archives of Toxicology*. 2008, vol. 82, issue 1, s. 45-53. DOI: 10.1007/s00204-007-0222-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-007-0222-5>
- [59] NTP. 2011. *Report on Carcinogens, Twelfth Edition*. Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. 499 pp. [online]. [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=035E57E7-BDD9-2D9B-AFB9D1CAD8D09C1>
- [60] JACOBSON, Michael F. Petition to Bar the Use of Caramel Colorings Produced With Ammonia and Containing the Carcinogens 2-Methylimidazole and 4-Methylimidazole. In: *Center for Science in the Public Interest* [online]. Washington, D.C. 20005: UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 16.02.2011 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: http://cspinet.org/new/pdf/caramel_coloring_petition.pdf
- [61] RODRICKS, Joseph V. et al Information on 4-Methylimidazole Submitted to the National Toxicology Program (NTP): Office of the Report on Carcinogens (ORoC). In: *National Toxicology Program: U.S. Department of Health and Human Services* [online]. Washington, DC 20036-4803: American Beverage Association,

- 18.10.2013 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/nominations/2013/publiccomm/rodricks20131018_508.pdf
- [62] CUNHA, S.C., A.I. BARRADO, M.A. FARIA a J.O. FERNANDES. Assessment of 4-(5-)methylimidazole in soft drinks and dark beer. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011, vol. 24, 4-5, s. 609-614. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.08.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088915751000298X>
- [63] LEE, Kwang-Geun, Haewon JANG a Takayuki SHIBAMOTO. Formation of carcinogenic 4(5)-methylimidazole in caramel model systems: A role of sulphite. *Food Chemistry*. 2013, vol. 136, 3-4, s. 1165-1168. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612014276>
- [64] SCHLEE, Claudia, Mariya MARKOVA, Julia SCHRANK, Fanette LAPLAGNE, Rüdiger SCHNEIDER a Dirk W. LACHENMEIER. Determination of 2-methylimidazole, 4-methylimidazole and 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole in caramel colours and cola using LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2013, vol. 927, s. 223-226. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.10.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023212006058>
- [65] SHI, ZUMIN, ELEONORA DAL GRANDE, ANNE W. TAYLOR, TIFFANY K. GILL, ROBERT ADAMS a GARY A. WITTERT. Association between soft drink consumption and asthma and chronic obstructive pulmonary disease among adults in Australia. *Respirology*. 2012, vol. 17, issue 2, s. 363-369. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2011.02115.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1843.2011.02115.x>
- [66] KIM, J.-w. Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Research*. 2006-09-15, vol. 66, issue 18, s. 8927-8930. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1501. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-1501>
- [67] PEDERSEN, Peter L. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2007-10-20, vol. 39, issue 3, s. 211-222. DOI: 10.1007/s10863-007-9094-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10863-007-9094-x>
- [68] WEINHOUSE, S. The Warburg hypothesis fifty years later. *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie*. 1976, vol. 87, issue 2, s. -. DOI: 10.1007/BF00284370. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00284370>
- [69] JHSU, Peggy P. a David M. SABATINI. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*. 2008, vol. 134, issue 5, s. 703-707. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408010660>
- [70] VAZQUEZ, Alexei, Jiangxia LIU, Yi ZHOU a Zoltán N OLTVAI. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. *BMC Systems Biology*. 2010, vol. 4, issue 1, s. 58-. DOI: 10.1186/1752-0509-4-58. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/4/58>
- [71] VRBOVÁ, Tereza. *Víme, co jíme?: aneb: průvodce "Ěčky" v potravinách*. EcoHouse, 268 s. ISBN 80-238-7504-3.
- [72] Bezpečnostní list pro kyselinu fosforečnou 85%. Ing. Petr Švec – PENTA, 27.2.2014. [cit. 17. 4. 2014]. Dostupné z: http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/k/bezplist_55.pdf
- [73] Richter, Miroslav. Chemie a technologie sloučenin fosforu. In: *Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem Fakulta životního prostředí* [online]. Ústí nad

- Labem, 23.02.2007 [cit. 2014-04-17]. Dostupné z: http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/pt1/Chemie_a_technologie_sloucenin_fosforu.pdf
- [74] SUNDAR RAJ, Allwyn, S. RUBILA, R. JAYABALAN a T. V. RANGANATHAN. A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Department of Food Processing and Engineering School of Food Sciences and Technology Karunya University Coimbatore-641 114, India*. 2012, vol.1, issue 12. DOI: 10.4172/scientificreports.550. Dostupné z: <http://omicsonline.org/scientific-reports/srep550.php>
- [75] KASTNER, H., U. EINHORN-STOLL a B. SENGE. Structure formation in sugar containing pectin gels – Influence of Ca² on the gelation of low-methoxylated pectin at acidic pH. *Food Hydrocolloids*. 2012, vol. 27, issue 1, s. 42-49. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X11002578>
- [76] EVAGELIOU, V. Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high-methoxy pectin gels. *Carbohydrate Polymers*. 1999, vol. 42, issue 3, s. 245-259. DOI: 10.1016/S0144-8617(99)00191-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861799001915>
- [77] OSECKÁ, K. Vliv polysacharidů na vstřebávání kofeinu z nápojů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 49 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CAF	kofein
PEC	pektin
HA	kyselina hyaluronová
HUM	lignohumát
POLYF	polyfenoly
DV	deionizovaná voda