Toksikološki i forenzični značaj kofeina- određivanje koncentacije kofeina u raznim napicima

Bardić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department for Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:114750

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU

SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department for Forensic Sciences

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

TOKSIKOLOŠKI I FORENZIČNI ZNAČAJ KOFEINA – ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KOFEINA U RAZNIM NAPITCIMA

LUCIJA BARDIĆ

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

TOKSIKOLOŠKI I FORENZIČNI ZNAČAJ KOFEINA – ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KOFEINA U RAZNIM NAPITCIMA

Mentorica:

izv. prof. dr. sc. RENATA ODŽAK

LUCIJA BARDIĆ

427/2017

Split, rujan 2020.

Rad je izrađen na Odjelu za kemiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod nadzorom mentorice izv. prof. dr. sc. Renate Odžak i neposrednog voditelja dr. sc. Nenada Vuletića u vremenskom razdoblju od studenog 2019. do rujna 2020. godine.

Pečat:

Datum predaje diplomskog rada: 17. rujna 2020.
Datum prihvaćanja rada: 22. rujna 2020.
Datum usmenog polaganja: 28. rujna 2020.

Povjerenstvo:

1. izv. prof. dr. sc. Željana Bašić
2. dr. sc. Ivan Jerković
3. izv. prof. dr. sc. Renata Odžak

SADRŽAJ

1. Uvod 1

1.1. Toksikološki i forenzični značaj kofeina 5

2. Cilj rada 10

3. Materijali i metode 11

3.1. Prekristalizacija kofeina i određivanje tališta 12

3.2. Priprema standardnih otopina kofeina 13

3.3. Izolacija kofeina iz čaja 14

3.4. Izolacija kofeina iz osvježavajućih bezalkoholnih napitaka 16

4. Rezultati 18

5. Rasprava 20

5.1. Uzorci čajeva 20

5.2. Uzorci osvježavajućih bezalkoholnih napitaka 22

5.3. Uzorci energetskih pića 23

5.4. Usporedba rezultata s deklariranim i zakonom predviđenim koncentracijama kofeina u napitcima 23

6. Zaključci 26

7. Literatura 27

8. Sažetak 30

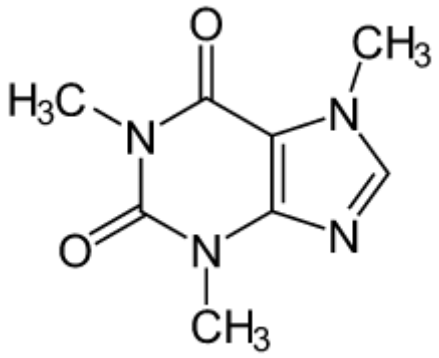
9. Summary 32

10. Životopis 34

11. Izjava o akademskoj čestitosti 35

1. Uvod

Kofein je alkaloid biljnog porijekla kojega pronalazimo u dijelovima preko 60 biljaka (1). Ovaj spoj pripada u skupinu metilksantina, a prema IUPAC-ovoj nomenklaturi naziva se 1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion (2). Struktura molekule kofeina prikazana je na Slici 1. Molarna masa mu je 194,19 g/mol.



Slika 1. Strukturna formula molekule kofeina (preuzeto s *https://hr.wikipedia.org/wiki/Kofein*)

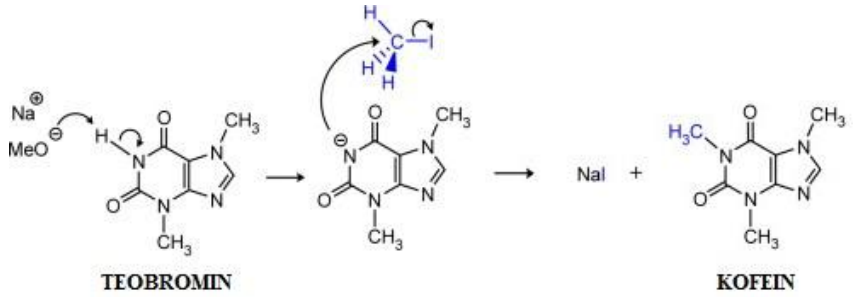
Čisti kofein se pojavljuje u obliku igličastih kristala i bijelog praha. Njegovo talište je na 235-238°C, a gustoća iznosi 1,23 g/cm^3 (2). Kada se zagrijava iznad temperature tališta, raspada se i razvijaju se toksične pare dušikovih oksida (2). Pri atmosferskom tlaku, kofein sublimira na 178°C (3). Dobro se otapa u kloroformu, eteru, benzenu i petroleju, slabije u acetonu, pirolu, pirimidinu i etil-acetatu, dok je slabo topljiv u vodi (1). Topljivost u vodi povećava mu se povećanjem temperature (1). pH vrijednost 1%-tne vodene otopine kofeina je 6,9 (3).

Prirodni izvori kofeina su dijelovi različitih biljaka, a najpoznatiji su zrna biljke kave (*Coffea arabica* L., *Coffea robusta* (L.) Linden) i listovi i pupovi čaja (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). Maseni udio kofeina u zrnima kave iznosi 1,1-2,2%, a u listovima čaja oko 3,5% (4). Uz njih, učestalo korišteni izvori kofeina su sjemenke kakaovca (*Theobroma cacao* L., w = 0,03%), kola orasi (*Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott & Endl., *Cola nitida* (Vent.) A. Chev., $w \sim 1{,}5\%$), sjemenke iz bobica guarane (*Paullinia cupana* Kunth, $w > 4\%$) i lišće biljaka iz roda *Ilex* L., odnosno različitih vrsta božikovina rasprostranjenih uglavnom na prostoru Sjeverne i Južne Amerike ($w \sim 1\%$) (4). Kofein kod biljaka ima ulogu obrane organizma. On suzbija pojavu bakterija i gljivica na biljkama te izazivar sterilnost kod kukaca koji se hrane dijelovima

biljke koji sadrže kofein. Također, biljke kofein luče u okolno tlo čime spriječavaju rast drugih biljnih vrsta i štite svoj areal. Može se reći da je kofein prirodni pesticid (4).

Ekstrakcija kofeina iz biljnih dijelova jednostavan je proces koji se koristio u industriji hrane te farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Koliko je ova ekstrakcija jednostavna govori i činjenica da se često pojavljuje u programima vježbi iz kemije na različitim obrazovnim razinama. Ipak, u današnje vrijeme je ovaj način dobivanja kofeina napušten jer je proces skup i zahtjeva dosta vremena. Uz navedeno, tijekom ekstrakcije koriste se različita organska otapala čija se uporaba pokušava smanjiti zbog njihovog štetnog utjecaja na okoliš. Industrije su se okrenule sintezi kofeina kao njegovom glavnom izvoru. Procesi sinteze su jeftiniji, brži i dodatnom modernizacijom smanjen je njihov negativan utjecaj na okoliš. Procjenjuje se da ukupna globalna potrošnja kofeina iznosi 10 000 t godišnje (5). Jedna trećina potreba zadovoljena je prirodnim izvorima kofeina, dok se dvije trećine odnose na sintetski dobiveni kofein.

Početak sinteze kofeina zabilježen je 1895. godine kada je Emil Fischer predstavio metodu sinteze kofeina iz mokraćne kiseline (6) što je prva opisana metoda njegove sinteze. Tijekom prošlog stoljeća opisano je nekoliko postupaka dobivanja kofeina koji se temelje na reakciji *N*-metilacije teobromina (6). Mehanizam reakcije *N*-metilacije teobromina prikazan je na Slici 2, a razlika između varijanti ove reakcije je u različitim reagensima koji se koriste u pojedinim stupnjevima reakcije. Zajac i suradnici 2003. g. su opisali reakciju dobivanja kofeina u kojoj je početni spoj uracil. Nizom reakcija iz uracila dobiva se teofilin, a njegovom metilacijom nastaje konačni produkt, odnosno kofein (7).



Slika 2. Prikaz reakcije *N*-metilacije teobromina (prilagođeno prema *https://www.researchgate.net/figure/Reaction-mechanism-N-Methylation-of-theobromine-occurs-via-SN2_fig2_275672051*)

Iako je uporaba kofeina poznata već nekoliko stoljeća u svim velikim kulturama svijeta, u današnjici je njegova rasprostranjenost i konzumacija najveća do sada (8). Razlog tome su upravo tehnološki procesi kojima se kofein dodaje u različite, možda i neočekivane, prehrambene, kozmetičke i farmaceutske proizvode. Hrana i pića koja sadrže kofein najčešće se na tržištu predstavljaju kao „energetski“ pripravci, a zastupljenost i konzumacija takvih proizvoda raste iz godine u godinu. Procjenjuje se da danas ova „energetska industrija“ doseže vrijednosti i preko nekoliko milijardi dolara (8).

Najčešći izvor kofeina u svakodnevnoj prehrani su kava, čaj, sokovi (različite vrste kole) i energetska pića (9). Gledajući geografski, konzumacija čaja i različitih sokova raširenija je na području Afrike, Azije i pacifičkih zemalja, dok je konzumacija kave i energetskih pića povezana s Europom, te Sjevernom i Južnom Amerikom (9). Prema istraživanju provedenom 2018. g., Hrvatska prati europski trend pa su tako kod nas najčešći izvor kofeina sokovi iz kategorije kola i kava, a slijede ih crni čaj, različite vrste gotovih čajeva (npr. ledeni čaj) te sportska i energetska pića (9).

Dobna skupina koja je cilj ovog tržišta nije jasno definirana jer su potrošači ovih proizvoda osobe svih dobnih kategorija. Upravo to i zabrinjava znanstvenu zajednicu. Naime, poznato je da umjerena konzumacija kofeina ima pozitivne učinke na organizam odraslih osoba (o tome će biti više riječi u nastavku rada), ali je i dalje nejasno kako konzumacija kofeina utječe na osobe u razvoju, odnosno djecu i adolescente (8). Zato je potrebno provoditi različita istraživanja i usavršavati metode detekcije u različitim proizvodima i medijima kako bi se na temelju ustanovljenih znanstvenih činjenica mogla uvesti potrebna zakonska podloga za regulaciju ovog tržišta.

Međunarodna udruga koja promiče suradnju analitičkih laboratorija i provodi normiranje analitičkih metoda (engl. *Association of Official Analytical Collaboration International - AOAC*) na svojoj mrežnoj platformi *The Official Methods of Analysis* navodi 23 službene metode analize kofeina u različitim pripravcima (10). Metode obuhvaćaju detekciju i određivanje koncentracije kofeina u lijekovima, različitim napitcima, obrađenoj i neobrađenoj kavi, čaju i proizvodima od kakaovca. S obzirom na temu ovog rada, detaljnije će biti obrazložene metode određivanja sadržaja kofeina u čaju i bezalkoholnim napitcima.

Na spomenutoj platformi navedene su tri kvantitativne metode analize kofeina u bezalkoholnim pićima (službeni brojevi metoda: 979.08, 962.13, 967.11) (10). Metoda pod brojem 979.08 bazira se na tekućinskoj kromatografiji u svrhu određivanja sadržaja kofeina,

benzoata i saharina u napitcima. Idućim dvijema metodama analit je samo kofein. Pod brojem 962.13 je metoda analize kofeina pomoću ultraljubičaste (UV) spektrometrije, a metoda 967.11 za analizu koristi kromatografiju u koloni uz spektrofotometar kao detektor.

Kada je riječ o kvantitativnoj analizi kofeina u čaju, na mrežnoj platformi *The Official Methods of Analysis* navedene su tri službene metode (10). Metoda pod brojem 925.16 je Power-Chesnutov postupak analize kofeina u čaju. Riječ je o gravimetrijskoj metodi koja uključuje ekstrakciju alkoholom, digestiju magnezijevim oksidom, otapanje topivih ostataka magnezijevog oksida, ekstrakciju kloroformom te određivanje kofeina u čaju (11). Iduća metoda, pod brojem 925.17, je modificirana Bailey-Adrewsova metoda. Ovo je također gravimetrijska metoda, a od prethodne se razlikuje u spajanju ekstrakcije i digestije u jedan korak te se nadalje zakiseljeni ekstrakt koncentrira i ekstrahira u kloroformu, a kofein se određuje gravimetrijski (11). Treća metoda navedena je pod brojem 969.15 i obuhvaća analizu plinskom kromatografijom uz UV spektrofotometar kao detektor (10).

Uz navedene službene metode AOAC Internationala, u literaturi se spominju i koriste i brojne druge, kako instrumentalne, tako i klasične, metode. Pregledni članak *Analytical methods for caffeine* (12) pruža detaljan uvid u instrumentalne metode korištene u analizi kofeina. Problem predstavlja činjenica da većina ovih metoda nije prošla višelaboratorijsku validaciju (12). Uz to, javlja se i problem skupe i često nedostupne opreme potrebne za provođenje analiza. Kao metode koje su se pokazale optimalne svojim performansama, ali i dostupnošću i cijenom, autor ističe tekućinsku kormatografiju visoke djelotvornosti uz maseni spektrometar kao detektor (HPLC-MS), kapilarnu elektroforezu, plinsku kromtografiju te infracrvenu (IR) spektrometriju u kombinaciji s kemometrijskim metodama. Za HPLC-MS posebno je naglašena primjena u sudskoj medicini s obzirom na to da ova metoda daje jednoznačan rezultat bez mogućnosti postojanja interferencija pri određivanju koncentracije kofeina u različitim matricama (12). Kada je riječ o biološkim i kliničkim uzorcima, uporaba HPLC-a ponovno prevladava (13). Uz navedenu, učestale su i metode plinske kromatografije uz detektore kao što su maseni spektrometar ili plamen-ionizirajući detektor (FID), tankoslojna kromatografija koja se koristi za pročišćavanje uzoraka ili pak elektrokemijske metode analize (13).

Naravno, performanse i dostupnost analitičke opreme uvjetovane su razvojem tehnologije i znanosti. Povećanim razvojem tehnologije, performanse analitičkih uređaja i metoda bit će povećane, a dostupnost veća (12). Metoda analize uzoraka biosenzorima upravo je jedna od metoda u razvoju koje puno obećavaju. Jedno od istraživanja koje se bavilo

analizom kofeina metodom biosenzora je istraživanje koje su proveli Sarath Babu i suradnici (14). Kao biološki element u ovoj analizi korišten je mikroorganizam *Pseudomonas alcaligenes* (Monias 1928.) koji pokazuje sposobnost razgradnje kofeina. Ovakav način analize pokazao se kao visoko specifičan, brz i interferencije koje pokazuje s kofeinom sličnim spojevima su minimalne. Također, usporedbom rezultata dobivenih ovim biosenzorom i HPLC-om, metoda biosenzora pokazala je odlične rezultate (14).

Zakonski okviri u Republici Hrvatskoj predviđaju mogućnost dodavanja kofeina isključivo u „osvježavajuća bezalkoholna pića od biljnih ekstrakata“ (15). Pravilnikom o temeljnim zahtjevima za osvježavajuća bezalkoholna pića i soda vodu dopuštena količina kofeina u osvježavajućim bezalkoholnim pićima od biljnih ekstrakata je 150 mg/L, a podaci o količini obavezno moraju biti navedeni na deklaraciji. Kao primjeri za ovu vrstu pića navode se pića tipa „kola“ ili „tonik“. Energetska pića se ne spominju u navedenom pravilniku, ali Hrvatski zavod za javno zdravstvo navodi kako takva vrsta pića može sadržavati do 320 mg/L (16). Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority - EFSA*) je na zahtjev Europske komisije 2015. godine objavila „Znanstveno mišljenje o sigurnosti kofeina“ (17). U ovoj publikaciji objedinjeno je 39 istraživanja iz 22 države članice EU-a. Navedena istraživanja bavila su se različitim pogledima na konzumaciju i utjecaj kofeina na ljudski organizam. Između ostaloga, iznesen je stav znanstvene zajednice kako dnevni unos kofeina od 400 mg (odnosno 5,7 mg po kilogramu tjelesne mase) ne predstavlja rizik za zdravlje odraslih osoba. Kada je riječ o jednokratnom unosu, zdravstveno sigurna doza je procjenjena na 200 mg, odnosno 3 mg /kg (17).

1.1. Toksikološki i forenzični značaj kofeina

Gledano s toksikološke strane, kofein kao psihoaktivna tvar pripada skupini stimulansa (18). Prema ATK klasifikaciji (engl. *Anatomical Therapeutic Chemical Classification System*) Svjetske zdravstvene organizacije, pripada u skupinu tvari koje djeluju na živčani sustav. Navedena klasifikacija ga nadalje svrstava redom u psihoanaleptike, psihostimulanse i derivate ksantina (19). Kada je riječ o lijekovima, čest je u lijekovima za ublažavanje boli ili respiratornim stimulansima (19, 20).

Kofein se najčešće uzima oralno, bilo kao komponenta lijeka ili dodatak prehrambenim proizvodima (18). Njegova apsorpcija u potpunosti se odvija u tankom crijevu odakle se

difuzijom u krv širi na ostale organe i tkiva. Budući da je riječ o relativno maloj molekuli topljivoj u vodi i u lipidima, brzo i lako prolazi sve biološke membrane, pa tako i krvno moždanu barijeru (20). Dva sata nakon ingestije doseže se maksimalna koncentracija u serumu, a u slini već 45 minuta nakon konzumacije. Poluvrijeme eliminacije kofeina iz organskog sustava je 3-7 sati (20).

Kako bi se ubrzala resorpcija, ali i produžilo djelovanje konzumiranog kofeina, u prehrambene proizvode najčešće se dodaju čisti, sintetski kofein u kombinaciji s ekstraktima iz prirodnih izvora. Naime, čisti kofein se brže apsorbira i brže doseže maksimalnu koncentraciju u krvi, dok je resorpcija prirodnih ekstrakata sporija pa je i djelovanje produljeno (16).

Metabolizam kofeina najvećim dijelom odvija se u jetri gdje se pod utjecajem gena CYP1A2 aktivira citokrom P450 oksidaza. Budući da je ovaj biokemijski sustav prisutan i u drugim organima, na primjer mozgu, manji dio metabolizma se događa izvan jetre (20). Dominantni metabolit kofeina kod ljudi je paraksantin (21). Formiranjem paraksantina i njegovim izlučivanjem u urin izlučuje se 75-80% konzumiranog kofeina. Ostatak se metabolizira u teofilin, teobromin, dimetilksantin, mokraćnu kiselinu, te derivate uracila, a izlučuje se trakođer mokraćnim sustavom.

U literaturi je opisano nekoliko načina na koje kofein utječe na fiziološke procese u organizmu (21). Oni su sljedeći:

- inhibicija adenozinskih receptora,
- inhibicija enzima fosfodiesteraze,
- mobilizacija iona kalcija iz unutarstaničnih struktura,
- antagonističko djelovanje na benzodiazepinske receptore.

Navedeni načini djelovanja kofeina ispoljavaju se kao promjene u radu pojedinih organa i organskih sustava. Kofein ima jak utjecaj na živčani, kardiovaskularni, te nešto slabiji na ostale sustave u organizmu (20).

Povećanje budnosti i koncentracije, skraćivanje vremena reakcije na podražaje iz okoline te poboljšanje pamćenja neki su od utjecaja konzumiranja zdravstveno ispravnih doza kofeina na kognitivne funkcije (20). Uz navedeno, kofein pozitivno utječe na motoričke funkcije kao i olakšavanje boli (21). Ipak, u većim koncentracijama može uzrokovati glavobolje, tremor, deprivaciju sna te na taj način ometati kognitivno funkcioniranje pojedinca.

Stimulacijom kardiovaskularnog sustava kofein uzrokuje povećanje krvnog tlaka, broja otkucaja srca te opuštanje krvnih žila. Iako kod zdravih pojedinaca to ne uzrokuje značajne probleme, kod kroničnih srčanih bolesnika može uzrokovati određene poteškoće (20). Kofein također djeluje kao diuretik i potpomaže otpuštanje masnih stanica iz adipoznog tkiva (21).

Letalna doza kofeina iznosi 80-100 mg/L (22), dok simptomi trovanja nastupaju pri koncentracijama od 15 mg/L u krvnoj plazmi (23). Do trovanja rijetko dolazi konzumacijom hrane ili pića koja sadrže kofein, već su ovakvi slučajevi povezani s unosom lijekova na bazi kofeina. Uz to, razvojem internetskog tržišta različiti pripravci koji sadrže kofein postali su lako dostupni, a isto vrijedi i za čisti kofein (23).

Znakovi trovanja kofeinom uključuju povišenu tjelesnu temperaturu, srčane probleme (tahikardiju, bradikardiju, hipertenziju, a kasnije nagli pad krvnog tlaka, aritmiju), mučninu i povraćanje, te neurološke smetnje (izmijenjena svijest, deluzijske misli, zbunjenost, dezorijentiranost, napadaji). Također, u ovim slučajevima primjećeni su poremećaji tonusa mišića, odnosno ukrućenost mišića popraćena naglim i nekontroliranim trzajima (22, 24). Smrtni ishodi kod trovanja kofeinom su rijetki (20), ali zabilježeni pa će o njima biti više riječi u nastavku rada.

Budući da su navedeni simptomi nespecifični, najbolji dijagnostički alat svakako su laboratorijske analize tjelesnih tekućina (22). Kao biološki uzorci u ovim slučajevima mogu poslužiti slina u kojoj koncentracija kofeina najprije doseže svoj maksimum, zatim krvni serum i mokraća. Kako kofein i njegovi metaboliti uglavnom nisu predmet standardnih toksikoloških pretraga, moguće je da se previde kao uzrok trovanja (23).

Iako nije dokazano da se učestalom konzumacijom razvija ovisnost ili tolerancija, svakodnevni unos 500-600 mg kofeina smatra se njegovom zlouporabom. Stanje razvijeno dugotrajnom intoksikacijom kofeina poznato je pod nazivom „kofeinizam“ (engl. *caffeinism*) (24). To je sindrom kod kojega osoba dulji vremenski period ima simptome slične onima koji se razvijaju kod afektivnih poremećaja, kao što su anksioznost, depresija i slični (23). Kod tih osoba prisutna je stalna glavobolja, nesanica, kronični umor, iritabilnost, anksioznost, zbunjenost, tremor, te kardiovaskularne i gastrointestinalne smetnje (24).

S prestankom svakodnevne konzumacije većih količina kofeina povezuju se blaže fizičke i psihičke smetnje (24). Često se javljaju stalna pospanost, opći osjećaj slabosti, letargija, depresija i smanjena mogućnost koncentracije. Takvo stanje prestaje nakon nekoliko dana kada se u organizmu ponovno uspostavi ravnoteža bez prisustva kofeina (24).

S forenzičnog i sudskomedicinskog stajališta, kofein nije uobičajeno sredstvo počinjenja kaznenih djela protiv života i tijela (23). Ipak, u literaturi postoje zabilježeni slučajevi samoubojstva ili namjernog trovanja kofeinom.

U 2018. godini objavljen je opsežan pregledni rad na temu slučajeva kod kojih je jedini utvrđeni uzrok smrti predoziranje kofeinom (23). U ovom članku opisana su ukupno 92 slučaja smrti, od kojih je 36 klasificirano kao samoubojstvo, 27 nenamjerno trovanje, dva namjerno trovanje, a za preostale slučajeve povod nije poznat. Kod onih slučajeva za koje je naveden oblik u kojemu je smrtonosna doza kofeina unijeta u organizam, radi se o oralnom uzimanju tableta ili praška kofeina ili intravenoznom unosu.

Najmanja smrtonosna doza utvrđena u krvi povezana je sa slučajem samoubojstva dvadesetjednogodišnje muške osobe, a iznosi 62 mg/L. U slučaju smrti dvadesetdvogodišnjakinje uslijed nenamjernog trovanja kofeinom utvrđena je najveća koncentracija kofeina u krvi i ona je iznosila 1560 mg/L. U oba slučaja letalna doza kofeina u organizam je unijeta oralno tabletama.

Za predoziranje kofeinom sa smrtnim ishodom autori navode tri najrizičnije skupine, a to su: sportaši, osobe s potvrđenim psihijatrijskim oboljenjima i djeca (23). Kada je riječ o sportašima, uzimanje kofeina u ovoj populaciji je često zbog njegovog stimulativnog djelovanja i poboljšanja performansi sportaša. Kofein je upravo zbog takvog djelovanja u razdoblju od 1984. do 2004. bio uvršten na popis nedozvoljenih supstanci Svjetske antidopinške agencije (engl. *World Anti-Doping Agency - WADA*) te je njegova uporaba bila zabranjena na svim službenim sportskim natjecanjima. Iako uporaba kofeina više nije zabranjena za vrijeme održavanja natjecanja, trenutno je uvršten u program praćenja ove organizacije (25). To znači da će njegov učinak na performanse sportaša i regularnost njegove primjene u narednom periodu biti razmatrani, a primjena kod sportaša praćena u sklopu redovitih antidopinških testiranja. U ovoj populaciji najčešće se radi o nenamjernom predoziranju kofeinom, a njegov izvor su različiti suplementi, tablete za mršavljenje ili čisti kofein u obliku tableta ili praha (23).

Čak 39% obrađenih slučajeva smrti u ranije navedenom istraživanju povezani su s osobama s poviješću psihijatrijskih oboljenja ili ovisničkog ponašanja (23), a najveći broj njih ima dijagnozu depresivnog poremećaja. Kod ove populacije, najčešće se radi o samoubojstvu ili pokušaju istoga uzimanjem letalne doze kofeina. Također, posebnu opasnost predstavlja slučajno trovanje, moguće komplikacije pa čak i smrtni ishod uzrokovan interakcijom kofeina i psihijatrijskih lijekova ili sredstava ovisnosti (23).

Kod djece najčešća su slučajna trovanja, ali postoji nekoliko zabilježenih slučajeva zlostavljanja, zanemarivanja i namjernog trovanja sa smrtnim ishodom uslijed intoksikacije kofeinom (23). Kada se kod djece utvrdi trovanje bilo kojom supstancom, pa tako i kofeinom, bitno je odmah otkloniti (ili potvrditi) mogućnost namjernog trovanja i zlostavljanja djeteta angažiranjem socijalnih službi i ostalih tijela koja moraju sudjelovati u ovakvim istragama.

2. Cilj rada

Ciljevi ovog rada su:

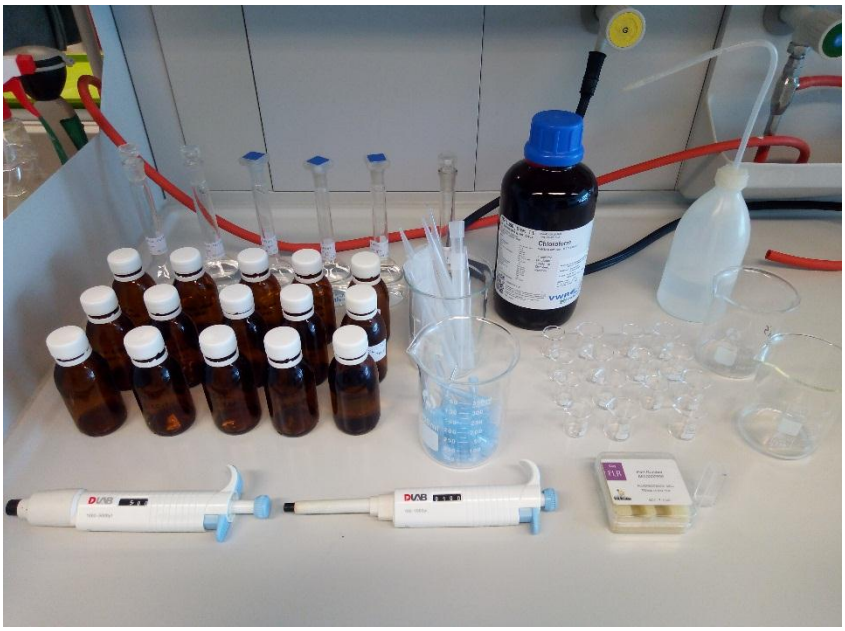
- istražiti i predstaviti kemijska svojstva, te toksikološki i forenzični značaj kofeina,
- odrediti koncentracije kofeina u odabranim uzorcima napitaka metodom UV-VIS spektrometrije,
- usporediti dobivene rezultate sa zakonski dozvoljenim koncentracijama kofeina u odabranim skupinama napitaka,
- testirati svojstva odabrane metode.

Hipoteze ovog rada su:

- koncentracije kofeina u odabranim napitcima bit će u granicama koje su zakonski određene,
- koncentracije kofeina u odabranim uzorcima čajeva bit će veće nego u uzorcima bezalkoholnih osvježavajućih i energetskih pića.

3. Materijali i metode

Ovo istraživanje provedeno je u znanstveno-istraživačkom laboratoriju Odjela za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (Sveučilište u Splitu) u periodu studeni, 2019. – siječanj, 2020. godine. Tijekom rada, korišteno je stakleno laboratorijsko posuđe, odmjerno posuđe i pribor, staklene bočice za skladištenje uzoraka, analitička vaga i pribor za vaganje te aparature za vakuum i vruću filtraciju (Slika 3). Sve stakleno posuđe prije i nakon korištenja oprano je deterdžentom i vodom, a potom isprano destiliranom vodom ili kloroformom te osušeno. Korištene kemikalije su destilirana voda, prekristalizirani kruti kofein, kloroform ($CHCl_3$), bezvodni natrijev karbonat (Na_2CO_3) i 96%-tni etanol (C_2H_5OH).



Slika 3. Korišteno laboratorijsko posuđe i pribor

Apsorbancija standardnih otopina kofeina i kofeina u uzorcima različitih pića mjerena je spektrofotometrom UVi Light (model XTD5, Secomam, Francuska, Slika 4). Uređaj koristi pripadajući software na kojem je za potrebe ovog istraživanja korišten „Absorbance mode“, odnosno način rada za mjerenje apsorbancije. Mjerenja su provedena pri valnoj duljini 274 nm (1). Uzorci su u uređaj umetani u kiveti od kvarcnog stakla širine 10 mm.

Za obradu rezultata korišten je Microsoft Office Excel 2013.

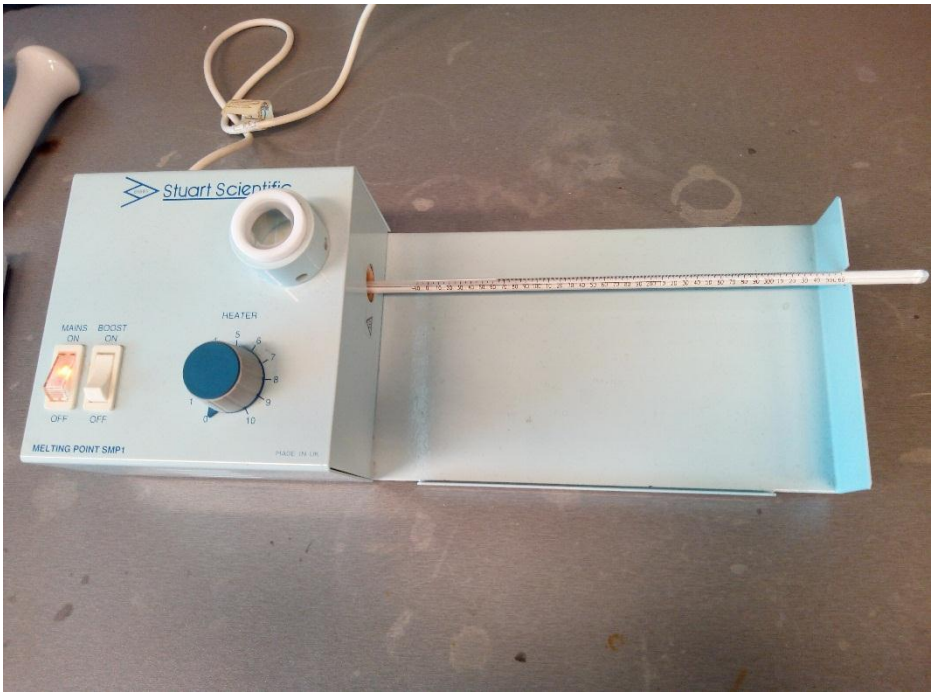


Slika 4. Spektrofotometar UVi Light (model XTD5, Secomam, Francuska)

3.1. Prekristalizacija kofeina i određivanje tališta

Kofein je pročišćen prekristalizacijom. Iz prekristaliziranog kofeina napravljene su otopine standarda koje su korištene za izradu baždarnog pravca. U tu svrhu je 1,0045 g krutog kofeina otopljen u staklenoj laboratorijskoj čašici u 10 mL 96%-tnog etanola. Ova je otopina zagrijana do vrenja i filtrirana postupkom vruće filtracije. Filtrat je ohlađen na sobnu temperaturu, a potom i u ledenoj kupelji sve do kristalizacije kofeina. Kristali su profiltrirani vakuumskom filtracijom i stavljeni u eksikator na sušenje. Nakon sušenja, dobiveno je 0,5279 g prekristaliziranog kofeina.

Njegova čistoća određena je mjerenjem tališta dobivenih kristala pomoću uređaja prikazanog na Slici 5. Izmjerena temperatura tališta je u intervalu 235-240°C, a literaturna temperatura tališta kofeina je 235-238°C. Čistoća prekristaliziranog kofeina je ocijenjena kao zadovoljavajuća za daljnje korištenje.



Slika 5. Određivanje tališta prekristaliziranog kofeina

3.2. Priprema standardnih otopina kofeina

Otopine kofeina za izradu baždarnog pravca napravljene su razrjeđivanjem početne otopine kofeina koncentracije 100 ppm. Početna otopina pripremljena je otapanjem 0,0100 g prekristaliziranog krutog kofeina u kloroformu u odmjernoj tikvici volumena 100 mL.

Zadane koncentracije standardnih otopina iznosile su 1, 5, 10, 15, 20 i 25 ppm, a pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajućeg volumena početne otopine kloroformom u označenim staklenim odmjernim tikvicama od 100 mL. Odgovarajući volumen početne otopine izračunat je pomoću formule za razrjeđenje otopina (a), a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 1. Nakon ulijevanja izmjerenog volumena početne otopine, tikvice su nadopunjene otapalom do oznake, začepljene i sadržaj je dobro promućkan. Tako pripremljenim otopinama spektrofotometrom je izmjerena apsorbancija kofeina pri 274 nm.

$$V\,(\text{početna otopina}) = \frac{\gamma\,(\text{standardna otopina}) \times V\,(\text{standardna otopina})}{\gamma\,(\text{početna otopina})} \qquad \text{(a)}$$

Tablica 1. Volumen početne otopine potreban za dobivanje zadanih koncentracija kofeina u standardnim otopinama

Koncentracija kofeina (ppm)	Volumen početne otopine kofeina (mL)
1	1
5	5
10	10
15	15
20	20
25	25

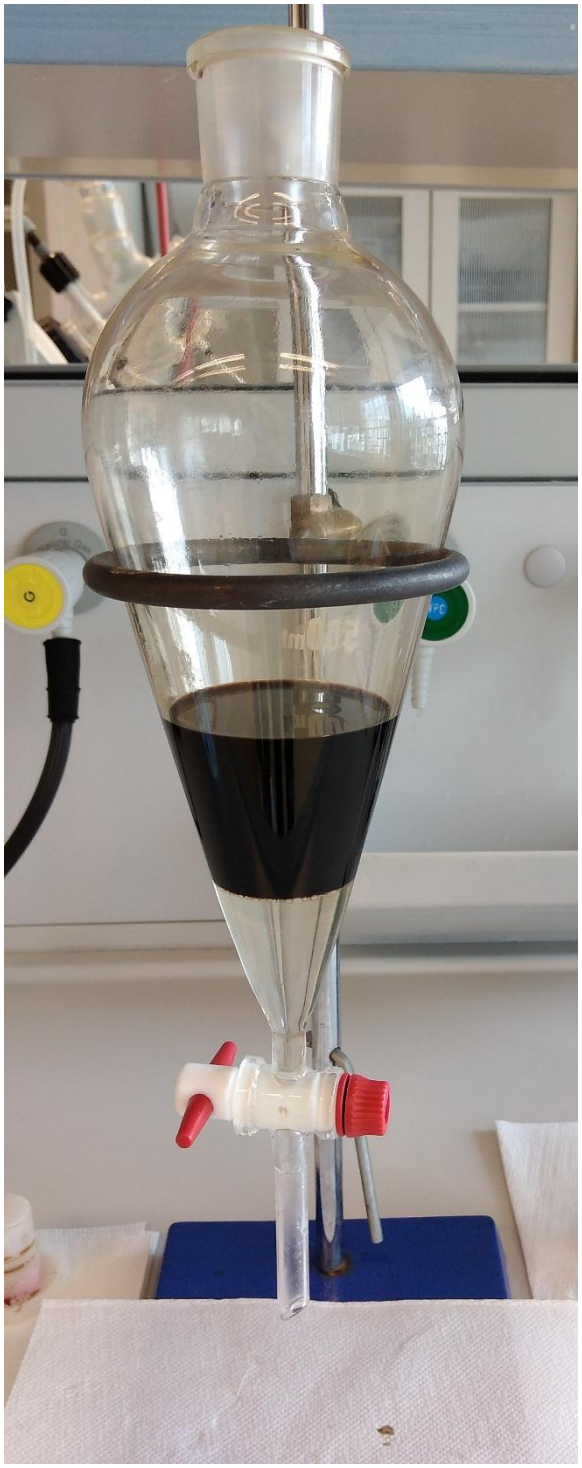
Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini 274 nm u kiveti od kvarcnog stakla. Prvo je u uređaj umetnuta kiveta sa čistim otapalom i odabrana funkcija „autozero“ kako bi se uklonio utjecaj otapala na vrijednost apsorbancije standardnih otopina. Standardnim otopinama kofeina izmjerena je apsorbancija kofeina tako da su napravljena tri mjerenja za svaku otopinu, a rezultati su unijeti u Microsoft Office Excel tablicu. Izračunata je srednja vrijednost apsorbnacije kofeina za svaku otopinu. Iz točno poznatih koncentracija standardnih otopina kofeina (Tablica 1) i očitane apsorbancije pomoću UVi LIGHT spektrofotometra dobiven je baždarni pravac. Izmjerene su apsorbancije uzoraka te su pomoću baždarnog pravca određene koncentracije kofeina u uzorcima.

3.3. Izolacija kofeina iz čaja

U svrhu izolacije i određivanja koncentracije kofeina u čajevima odabrane su sljedeće vrste čajeva: Agristar – zeleni čaj, Agristar – crni čaj i naranča, Darvitalis – eko zeleni čaj, Franck – zeleni čaj, Franck – crni čaj, Naturavita – zeleni čaj s đumbirom i Naturavita – zeleni čaj. Izolacija je napravljenana prema proceduri preuzetoj iz istraživanja Rehman i Ashraf, 2017 (1).

Na analitičkoj vagi odvaganio je 2,0000 g svakog uzorka čaja u laboratorijskoj staklenoj čaši volumena 50 mL. Čaše su obilježene odgovarajućom oznakom uzorka i u svaku čašu dodano je 20 mL destilirane vode. Uzorci su zagrijavani na električnom rešou do vrenja i potom kuhani 5 minuta. Nakon kuhanja, u svaku čašu je dodano 2,0000 g bezvodnog natrijevog karbonata kako bi se istaložili tanini. Uzorci su profiltrirani vakuumskom filtracijom, a filtrati su zagrijavanjem upareni do volumena 5 mL. Uparene otopine su ohlađene na sobnu temperaturu i prebačene u stakleni lijevak za odjeljivanje. U lijevak je zatim dodano 5 mL kloroforma i sadržaj je lagano miješan uz povremeno izjednačavanje tlaka otvaranjem ispusta

lijevka za odjeljivanje. Lijevak je zatim stavljen na stalak kako bi se jasno odijelili slojevi kao što je vidljivo na Slici 6. Donji, kloroformski sloj je prenesen u čiste, suhe bočice za skladištenje uzoraka obilježene odgovarajućom oznakom uzorka.



Slika 6. Odvojeni kloroformski (dolje) i vodeni (gore) sloj u lijevku za odjeljivanje (autorica fotografije: Renata Odžak)

Neposredno nakon ekstrakcije, napravljene su razrijeđene otopine ekstrakata u kloroformu u omjeru 1:100 tako da je automatskom pipetom u staklenu čašicu prenesen 0,1 mL ekstrakta i razrijeđen s 10 mL kloroforma. Dobivenim otopinama ekstrakata mjerena je apsorbancija kofeina na valnoj duljini 274 nm u kiveti od kvarcnog stakla širine 10 mm. Mjerenja su ponovljena tri puta za svaki uzorak, a rezultati unijeti u Microsoft Office Excel tablicu.

3.4. Izolacija kofeina iz osvježavajućih bezalkoholnih napitaka

U svrhu izolacije i određivanja koncentracije kofeina u bezalkoholnim pićima odabrana su pića iz skupine kola i energetskih pića, a postupak je preuzet iz rada Rehman i Ashraf, 2017 (1). Odabrani uzorci su: Coca Cola, Coca Cola Zero, Sky Cola, Pepsi, Fresh Cola, Fresh Cola Light, Cockta, Monster, Hell, Red Bull, Burn i Coca Cola Energy.

Prvo je proveden postupak uklanjanja mjehurića otopljenog CO_2 iz pića. U tu svrhu, u staklene laboratorijske čaše (obilježene odgovarajućom oznakom uzorka) uliven je uzorak svakog pića. Uzorci su zagrijavani na električnom rešou do vrenja (Slika 7).



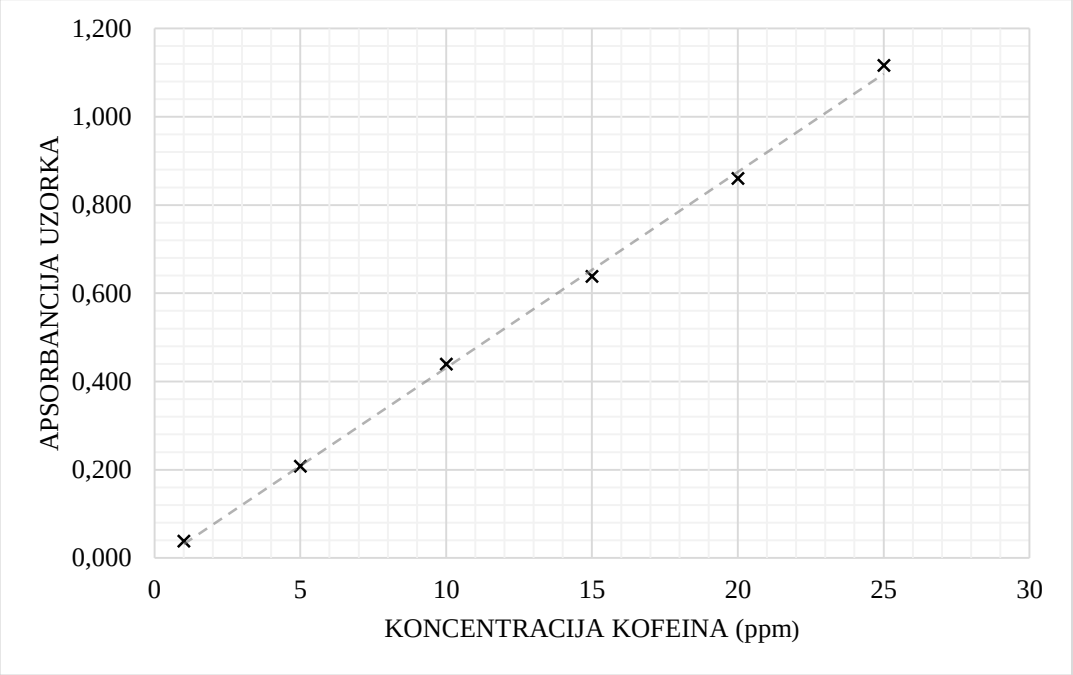
Slika 7. Uklanjanje ugljikovog dioksida iz uzoraka pića

Nakon što su uzorci pića ohlađeni, napravljena je ekstrakcija kofeina iz uzoraka. U stakleni lijevak za odjeljivanje uliveno je 10 mL uzorka i dodan 1 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata. Sadržaj je dobro promiješan i dodano mu je 5 mL kloroforma. Sadržaj je lagano miješan uz povremeno izjednačavanje tlaka otvaranjem ispusta lijevka za odijeljivanje. Lijevak je zatim stavljen na stalak kako bi se slojevi jasno odijelili. Donji, kloroformski sloj je ispušten u čiste, suhe bočice za skladištenje uzoraka obilježene odgovarajućom oznakom uzorka.

Neposredno nakon ekstrakcije, napravljene su otopine ekstrakata u kloroformu u omjeru 1:50 tako da je automatskom pipetom 0,1 mL ekstrakta prenesen u laboratorijsku čašicu i dodano mu je 5 mL kloroforma. Dobivenim otopinama je mjerena apsorbancija na valnoj duljini 274 nm u kiveti od kvarcnog stakla širine 10 mm. Mjerenja su ponovljena po tri puta za svaki uzorak, a rezultati unijeti u Microsoft Office Excel tablicu.

4. Rezultati

Prema izračunatim srednjim vrijednostima izmjerenih apsorbancija i poznatim koncentracijama pripremljenih standardnih otopina, u Microsoft Office Excelu je napravljen baždarni pravac (Slika 8).



Slika 8. Prikaz ovisnosti srednjih vrijednosti izmjerenih apsorbancija o koncentraciji kofeina u standardnim otopinama

U istom programu određena je jednadžba baždarnog pravca (b), te koeficijent determinacije (R^2) koji iznosi 0,9989.

$$\bar{A} = 0{,}0444 \times c\ (\text{kofein}) - 0{,}0128 \qquad (b)$$

Koncentracije kofeina u uzorcima različitih pića izračunate su tako da je srednja vrijednost apsorbancije triju mjerenja uvrštena u jednadžbu baždarnog pravca (b). Dobivena koncentracija pomnožena je faktorom razrjeđenja uzorka (za čajeve 100, za ostala pića 50) i dobivena je realna koncentracija kofeina u uzorku izražena u dijelovima na milijun (ppm). Rezultati su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Koncentracija kofeina (ppm) u uzorcima pića

Tip uzorka	Oznaka uzorka	Uzorak	Kofein (ppm/uzorak)
Čaj	AGR CN	Agristar crni čaj s narančom	1413,964
	AGR Z	Agristar zeleni čaj	1423,724
	EKO Z	Darvitalis eko zeleni čaj	625,676
	FRA C	Franck crni čaj	1471,021
	FRA Z	Franck zeleni čaj	1209,760
	NV Z	Naturavita zeleni čaj	904,204
	NV ZĐ	Naturavita zeleni čaj sa đumbirom	588,138
Kola	CC 1	Coca Cola	102,252
	CC 2	Coca Cola	75,225
	CC 1.2	Coca Cola	100,375
	CC Z	Coca Cola Zero	95,120
	COC	Cockta	0,000
	FC	Fresh Cola	136,036
	FCL	Fresh Cola Light	49,700
	PEP	Pepsi	86,486
	SKY	Sky Cola	48,198
Energetsko piće	BURN	Burn	252,778
	CC EN	Coca Cola Energy	173,574
	HELL	Hell	394,670
	MON	Monster	317,342
	RB	Red Bull	350,751

Kao što je vidljivo iz Tablice 2, uzorci su prema utvrđenim koncentracijama kofeina grupirani u tri skupine koje odgovaraju tipovima uzoraka. Najveće koncentracije kofeina određene su za uzorke čajeva, slijede energetska pića, a najmanji sadržaj kofeina utvrđen je u bezalkoholnim pićima tipa kola.

U svrhu testiranja metode, ekstrakcija i mjerenje apsorbancije, te izračunavanje koncentracije kofeina napravljene su na dva uzorka Coca Cole. Mjerenje apsorbancije kofeina u ekstraktu „CC 1“ ponovljeno je 24 sata nakon ekstrakcije i rezultat tog mjerenja nalazi se pod oznakom „CC 1.2“. Ovom ponavljanju cilj je bio utvrditi utjecaj isparavanja otapala na izmjerenu apsorbanciju uzorka. Za uzorak „CC 2“ napravljen je novi ekstrakt kako bi se utvrdila ponovljivost postupka ekstrakcije.

5. Rasprava

Kao što je vidljivo iz baždarnog pravca (Slika 8), srednje vrijednosti izmjerenih apsorbancija i koncentracije kofeina u standardnim otopinama pokazuju pozitivnu nepotpunu korelaciju s izvrsnom povezanosti. Uz pretpostavku da u ekstraktima analiziranih uzoraka ne postoje interferencije, odnosno spojevi koji apsorbiraju na istoj valnoj duljini kao i kofein (274 nm), jednadžba baždarnog pravca (b) može se koristiti za izračunavanje koncentracije kofeina u uzorcima.

Ovu pretpostavku moguće je potvrditi (ili opovrgnuti) snimanjem spektra analiziranih uzoraka u određenom rasponu valnih duljina oko valne duljine na kojoj kofein pokazuje maksimalnu apsorbanciju. U ranije provedenim istraživanjima, snimanje spektra povezano je isključivo za određivanje valne duljine maksimalne apsorbancije kofeina (1, 26), a postojanje interferencija nije ispitano ni u jednom. Ipak, u svim radovima (1, 26 - 28) autori su primjenjivali jednadžbu baždarnog pravca za izračunavanje koncentracije kofeina u uzorcima bez korekcija, stoga je takav pristup preuzet i u ovom radu.

Rezultati do sada provedenih istraživanja na temu određivanja koncentracija kofeina u uzorcima čajeva, bezalkoholnih gaziranih osvježavajućih pića i energetskih pića UV spektrometrijom (1, 26 - 28) pokazala su kako zeleni i crni čajevi pokazuju najveću prosječnu koncentraciju. Zatim slijede energetska pića, a najmanji sadržaj kofeina utvrđen je u uzorcima bezalkoholnih osvježavajućih pića. Isti trend utvrđen je i kod uzoraka analiziranih u ovom istraživanju.

5.1. Uzorci čajeva

U ovom radu analizirano je ukupno 7 uzoraka čajeva. Od ukupnog broja, 5 uzoraka su bili zeleni čajevi, a 2 crni. Jedan uzorak zelenog čaja i jedan uzorak crnog čaja bili su s dodatkom drugih sastojaka, a preostali su čisti uzorci. Za uzorke zelenih čajeva dobivene su koncentracije kofeina u rasponu od 588 ppm (Naturavita zeleni čaj s đumbirom) do 1424 ppm (Agristar zeleni čaj), a za crne 1414 ppm (Agristar crni čaj s narančom) i 1471 ppm (Franck crni čaj). Vidljivo je da crni čajevi pokazuju veću koncentraciju kofeina što je u skladu s očekivanjima i literaturom. Ipak, koncentracije u obje vrste čaja su bitno veće od literaturnih. Naime, literatura navodi kako je uobičajena koncentracija kofeina u pripremljenom čaju 118 – 412 ppm, ovisno o vrsti čaja i vremenu infuzije (29). Razlog zabilježenim većim koncentracijama kofeina mogu biti ranije spomenute interferencije.

Pregledom sastava čaja, uočljivo je da se u njemu pojavljuje teofilin, kemijski vrlo sličan spoj kofeinu. On je, kao i kofein, topljiv u kloroformu, a valna duljina pri kojoj mu je apsorbancija maksimalna iznosi 270 – 274 nm (30). Stoga, postoji mogućnost da je došlo do preklapanja spektara ove dvije komponente pa su rezultati ispali viši od očekivanih. Uz to, u čaju se nalazi nekoliko stotina različitih spojeva pa nije isključena mogućnost postojanja još interferirajućih spojeva. U budućim istraživanjima trebalo bi ispitati ovaj navod.

Usporedbom rezultata ovog rada s rezultatima ostala dva rada koja se bave određivanjem koncentracije kofeina u čaju pomoću UV-VIS spektrometrije (1, 26), također se mogu uočiti različiti trendovi. Rad iz kojega je preuzet postupak pripreme uzoraka čajeva (1) pokazuje raspon koncentracija od 251 ppm do 16111 ppm, dok je u idućem radu ovaj raspon od 52 ppm do 111 ppm (26). Kao mogući razlog zamjetnih razlika u dobivenim koncentracijama kofeina, autori navode različita mjesta provođenja istraživanja, različite laboratorijske uvjete i različit način pripreme uzoraka čaja (1).

Za razliku od rada iz kojeg je postupak preuzet (1), korak infuzije čaja u destiliranoj vodi u ovome radu ima definirano trajanje i ono je 5 minuta, nakon čega slijedi hlađenje uzorka. U drugom radu (26) ovaj korak je drukčiji i sastoji se od polijevanja 2 g čaja kipućom destiliranom vodom i hlađenja što bitno skraćuje vrijeme infuzije čaja. Nakon toga slijedi filtriranje uzorka, razrjeđenje filtrata i ponovno filtriranja kroz filter za šprice. Tako pripremljenom uzorku je mjerena apsorbancija UV spektrometrom. Uočljivo je da je u ovom postupku izostao korak ekstrakcije u kloroformu što smanjuje broj koraka u postupku, a samim time i mogućnost pogreške. Pokazano je da su vremena i uvjeti pri kojima se obavljala infuzija čaja u destiliranoj vodi različiti između navedena tri rada što posljedično može dovesti do nesukladnosti konačnih rezultata.

Na prelazak kofeina i ostalih spojeva iz listića čaja u vodenu fazu prilikom infuzije čaja utječe i granulacija uzorka sirovog čaja. To znači da će ekstrakcija spojeva biti potpunija i veća što je uzorak sitnije mljeven jer se mljevenjem povećava površina uzorka koja je u kontaktu s otapalom, odnosno vrućom vodom. Primjer za ovu tvrdnju su ispitivani zeleni čajevi. Naime, među uzorcima zelenog čaja bez dodanih aroma i drugih sastojaka, najmanju izmjerenu koncentraciju pokazao je Darvitalis eko zeleni čaj. Mogući razlog tome je što se ovaj čaj nalazi u obliku grubo usitnjenih suhih listova čaja. Ostali uzorci bili su mljeveni na granule manje od 1 mm u promjeru.

Uz navedeno, na izračunatu koncentraciju kofeina u uzorcima Agristar crni čaj s narančom i Naturavita zeleni čaj s đumbirom utjecali su sastojci dodani čaju. Naime, u oba uzorka nalazile su se, uz granule mljevenog čaja, i granule dodane naranče, odnosno đumbira. Budući da se radi o heterogenoj smjesi, da nije naveden točan udio dodanih sastojaka i da su odvagana 2 g uzorka kao i u slučaju čistih uzoraka, nije korektno uspoređivati ove koncentracije s koncentracijama dobivenim za čiste čajeve.

5.2. Uzorci osvježavajućih bezalkoholnih napitaka

Ovo istraživanje analiziralo je koncentraciju kofeina u 7 uzoraka bezalkoholnih pića tipa „kola“. Izmjereni raspon koncentracija je od 0 ppm do 136 ppm. U uzorku Cockte nije detektiran kofein, dok je najveća koncentracija zabilježena u uzorku Fresh Cole.

Primjetna je razlika između uobičajenih i „light“ inačica istog pića. Naime, Coca Cola i Fresh Cola sadrže veću koncentraciju kofeina (Coca Cola = 102 ppm, Fresh Cola = 136 ppm) od svojih dijetalnih inačica (Coca Cola Zero = 95 ppm, Fresh Cola Light = 50 ppm).

Kao što je ranije spomenuto, metoda je testirana ponavljanjem ekstrakcije i mjerenja apsorbancije kofeina na dva uzorka Coca Cole. Ponavljanje mjerenja apsorbancije na prvom uzorku nakon 24 sata nije pokazalo značajnu razliku (CC 1 = 102 pmm, CC 1.2 = 100 ppm). Iz toga se može zaključiti da isparavanje otapala iz ekstrakta u periodu od 24 sata nema utjecaja na konačni rezultat. Razlika između dva uzorka za koje je zasebno provedena ekstrakcije je nešto veća (CC 1 = 102 ppm, CC 2 = 75 ppm). Budući da je ekstrakciju na oba uzorka provodila ista osoba u istom laboratoriju i prema protokolu koji je ranije opisan, kao razlog mogu se isključiti različiti uvjeti i protokoli ekstrakcije. Ipak, kako metoda ekstrakcije nije automatizirana nego ju provodi istraživač pomoću klasičnih kemijskih metoda, nemoguće je u potpunosti isključiti ljudski faktor. Kako bi se mogućnost ovakvih pogrešaka smanjila u budućim sličnim istraživanjima, protokol bi trebalo prilagoditi na način da se smanji broj koraka i mogući utjecaj istraživača u postupku.

Za uzorke Coca Cole i Coca Cole Zero dostupne na pakistanskom tržištu u istraživanju koje su proveli Rehman i Ashraf (1) određene su koncentracije od 96 i 81 ppm, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Idući uzorak koji je obrađen u oba istraživanja je Pepsi. U uzorku Pepsija kod Rehmana i Ashrafa (1) izmjerena je koncentracija od 20 ppm, što je bitno drugačije od 86 ppm u ovom radu. Budući da se radi o različitim tržištima, objašnjenje za ovu razliku ne treba tražiti u postupcima provedenim u istraživanjima.

Ista tri uzorka, Coca Cola, Coca Cola Zero i Pepsi, analizirana su u još dva istraživanja (26, 28). Shar i suradnici (26) u svojim rezultatima zabilježili su sljedeće koncentracije: 6 ppm (Coca Cola), 13 ppm (Coca Cola Zero) i 19 ppm (Pepsi), a uzorci su s pakistanskog tržišta. Kod Tautue i suradnika (28) riječ je o istraživanju pića dostupnih na nigerijskom tržištu, a koncentracije iznose: 44 ppm (Coca Cola), 46 ppm (Coca Cola Zero) i 44 ppm (Pepsi). Ponovno je uočljiva razlika između uzoraka s različitih tržišta, ali i ona između uzoraka iz pakistanskih trgovina. Navedena dva istraživanja iz Pakistana provedena su različitim metodama i u različitim uvjetima (1, 26) što u konačnici može biti uzrok različitim zabilježenim koncentracijama.

5.3. Uzorci energetskih pića

U ovom radu analizirano je 5 uzoraka energetskih pića. Raspon utvrđenih koncentracija je od 174 ppm (Coca Cola Energy) do 395 ppm (Hell). Preostala tri uzorka sadrže 253 ppm (Burn), 317 ppm (Monster) i 351 ppm (Red Bull). Dobivene koncentracije su veće od onih u uzorcima bezalkoholnih pića tipa „kola“, što je u skladu s očekivanjima.

U usporedbi s rezultatima koje su dobili Rehman i Ashraf (1), u ovom istraživanju zabilježene su veće koncentracije kofeina u energetskim pićima. Naime, raspon koncentracija u navedenom radu je 130 – 222 ppm, a izmjerena koncentracija kofeina u uzorku Red Bulla je 191 ppm (1). U preostala tri rada (26, 27, 28) utvrđene su još manje koncentracije kofeina u analiziranim energetskim pićima, od kojih je najveća 102 ppm (27). Za uzorak Red Bulla u spomenutim radovima zabilježene su sljedeće koncentracije: 36 ppm (26) i 58 ppm (28). Razlozi ovim razlikama vjerojatno su isti kao i oni opisani kod uzoraka bezalkoholnih osvježavajućih pića tipa „kola“.

5.4. Usporedba rezultata s deklariranim i zakonom predviđenim koncentracijama kofeina u napitcima

U Tablici 3 nalaze se deklarirane i zakonski dozvoljene koncentracije kofeina u analiziranim proizvodima, odnosno skupini proizvoda. Budući da je čaj prirodni izvor kofeina, zakonom nije određena dozvoljena koncentracija kofeina u ovoj skupini proizvoda niti je potrebno na deklaraciji napominjati da sadrži kofein (31). Ipak, analiziranim uzorcima Franck crni i zeleni čaj na deklaracijama piše kako proizvod sadrži kofein.

Tablica 3. Deklarirane i zakonski dozvoljene koncentracije kofeina u analiziranim napitcima

Tip uzorka	Oznaka uzorka	Deklarirana koncentracije kofeina [3]	Zakonski dozvoljena koncentracija kofeina
Čaj	AGR CN	N.N. [1]	N.N. [1]
	AGR Z	N.N. [1]	
	EKO Z	N.N. [1]	
	FRA C	Sadrži kofein	
	FRA Z	Sadrži kofein	
	NV Z	N.N. [1]	
	NV ZĐ	N.N. [1]	
Kola	CC	Sadrži kofein	150 mg/L
	CC Z	Sadrži kofein	
	COC	N.N. [1]	
	FC	Sadrži kofein	
	FCL	0,01%	
	PEP	Sadrži kofein	
	SKY	Sadrži kofein	
Energetsko piće	BURN	0,032% / 32 mg/100 mL	320 mg/L [2]
	CC EN	0,03% / 32 mg/100 mL	
	HELL	32 mg/100 mL	
	MON	0,032% / 32 mg/100 mL	
	RB	0,03% / 32 mg/100 mL	

[1] Nije navedeno
[2] Preporuka HZJZ, nije definirano zakonom
[3] Podaci preuzeti s deklaracija na analiziranim proizvodima

U uvodu ovoga rada spomenute su dozvoljene, odnosno preporučene koncentracije kofeina u osvježavajućim bezalkoholnim pićima od biljnih ekstrakata i energetskim pićima. Pravilnikom o općem deklariranju ili označavanju hrane (31) određeno je kako prehrambeni proizvodi kojima je dodan kofein iz bilo kojeg izvora, moraju imati to istaknuto na deklaraciji. Također, ako proizvod sadrži više od 150 mg/L kofeina, na uočljivom mjestu mora biti istaknuto „visoki sadržaj kofeina“, te deklarirati koliki je taj sadržaj izraženo u mg/100 mL. Uz to, na deklaraciji se mora „navesti i upozorenje »ne miješati s alkoholom, ne preporučuje se trudnicama, djeci, starijim i bolesnim osobama«“ (31).

Kao što je vidljivo u Tablici 3, sva analizirana pića tipa „kola“ na deklaraciji navode kako sadrže kofein, a za uzorak Fresh Cola Light se čak navodi i koliki je sadržaj kofeina. Izuzetak je uzorak Cockta koji na deklaraciji ne navodi da sadrži kofein, a to je potvrđeno i ovim istraživanjem. Na deklaraciji uzorka Fresh Cola Light stoji kako sadrži 0,01%, odnosno 100 ppm kofeina, dok je istraživanjem utvrđena upola manja koncentracija u ovom uzorku.

Koncentracija kofeina utvrđena u ovom radu za sve uzorke ovog tipa je ispod zakonski dopuštene granice.

Što se tiče uzoraka energetskih pića, utvrđeno je da dva analizirana uzorka prelaze preporuku o koncentraciji kofeina u energetskim pićima (Red Bull, Hell). Ujedno, u navedenim proizvodima je utvrđena koncentracije kofeina viša nego što je istaknuto na deklaraciji. Svi proizvodi uključeni u ovo istraživanje na deklaracijama jasno ističu sve zakonom propisane elemente.

6. Zaključci

1. Toksikološki značaj kofeina koji se nalazi u prehrambenim proizvodima dobro je istražen, ali je potrebno obratiti dodatnu pozornost na ugrožene skupine ljudi - osobe u razvoju, adolescente, kronične bolesnike, trudnice i dojilje.
2. Forenzični značaj kofeina vezan je za konzumaciju čistog kofeina intravenozno, u obliku tableta ili pak praha, a tržište ovakvih pripravaka s visokim udjelima kofeina zahtjeva dodatnu regulaciju.
3. Metoda određivanja koncentracije kofeina UV-VIS spektrometrijom u uzorcima različitih napitaka pokazala se jednostavnom, brzom, jeftinom i pouzdanom.
4. Postupak ekstrakcije kofeina iz uzoraka napitaka treba dodatno unaprijediti kako bi rezultati bili točni i ponovljivi.
5. Od odabranih analiziranih skupina napitaka, najveću koncentraciju kofeina sadrže crni i zeleni čajevi, zatim slijede energetska pića pa osvježavajuća bezalkoholna pića od biljnih ekstrakata.

7. Literatura

1. Rehman R, Ashraf S. Analysis of caffeine contents in commercial beverages and tea samples of Pakistan using UV/Visible spectrometry. BCC. 2017; 49 (4): 823-8.
2. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine. Dostupno na: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
3. Gerald I, Ebuka Arthur D, Adedayo A. Determination of CaffeineIn Beverages: A Review. AJER. 2014; 3 (8): 124-137.
4. Wienberg BA, Bealer BK. The World of Caffeine – The Science and Culture of the World's Most Popular Drug. 1st ed. New York: Routledge; 2002.
5. Bellussi G, Bohnet M, Bus J, Drauz K, Greim H, Jackel KP et al. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 7th ed. Wienheim: Wiley-VCH; 2000.
6. González-Calderón D, González-Romero C, González-González CA, Fuentes-Benítes A. Synthesis of caffeine from theobromine: Bringing back an old experiment in a new setting. Educación Química. 2015; 26 (1): 9-12
7. Zajac MA, Zakrzewski AG, Kowal MG, Narayan S. A Novel Method of Caffeine Synthesis from Uracil. Synth. Commun. 2003; 33 (19): 3291-7.
8. Planning Committee for a Workshop on Potential Health Hazards Associated with Consumption of Caffeine in Food and Dietary Supplements; Food and Nutrition Board; Board on Health Sciences Policy; Institute of Medicine. Caffeine in Food and Dietary Supplements: Examining Safety: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2014. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK202233/. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
9. Reyes CM, Cornelis MC. Caffeine in the Diet: Country-Level Consumption and Guidelines. Nutrients. 2018; 10 (11): 1772.
10. Association of Official Analytical Collaboration International. Official Methods of Analysis. Dostupno na: http://www.eoma.aoac.org/. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
11. Borker E, Yeransian JA. Report on Caffeine in Coffee. Journal of Association of Official Agricultural Chemists. 1957; 40 (2): 346-350.
12. De Maria CAB, Moreira RFA. Analytical methods for caffeine. Quim. Nova. 2007; 30 (1): 99-105.

13. National Center for Biotechnology Information. PubChem Annotation Record for CAFFEINE, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Dostupno na: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/36. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
14. Babu VR, Patra S, Karanth NG, Kumar MA, Thakur MS. Development of a biosensor for caffeine. Anal Chim Acta. 2007; 582 (2): 329-334.
15. Narodne novine. Pravilnik o temeljnim zahtjevima za osvježavajuća bezalkoholna pića i soda-vodu. NN 23/1997. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1997_02_23_314.html. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
16. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Energetska pića s kofeinom i miješanje s alkoholom. 2013. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/sluzba-zdravstvena-ekologija/energetska-pica-s-kofeinom-i-mijesanje-s-alkoholom/. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
17. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety of caffeine. EFSA Journal. 2015; 13 (5): 4102.
18. Ferré S. Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. Psychopharmacology (Berl). 2016; 233 (10): 1963-1979.
19. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. ATC/DDD Index 2020. 2020. Dostupno na: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
20. Temple JL, Bernard C, Lipshultz SE, Czachor JD, Westphal JA, Mestre MA. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. Front Psychiatry. 2017; 8: 80.
21. Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001. 2, Pharmacology of Caffeine. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK223808/. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
22. Murray A, Traylor J. Caffeine Toxicity. [Updated 2020 Jun 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532910/. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.
23. Cappelletti S, Piacentino D, Fineschi V, Frati P, Cipolloni L, Aromatario M. Caffeine-Related Deaths: Manner of Deaths and Categories at Risk. Nutrients. 2018; 10 (5): 611.
24. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. Food Additives and Contaminants. 2003; 20 (1): 1-30.
25. World Anti-Doping Agency. The 2020 Monitoring Program. 2020. Dostupno na: https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/monitoring-program. Pristupljeno: 18. kolovoza 2020.

26. Shar Z, Shoaib H, Anwar H, Zubair M, Hussain A, Khan K. Spectrophotometric Determination of Caffeine in Selected Pakistani Beverages. J Food Processing & Beverages. 2017; 5 (1): 4.
27. Khalid A, Ahmad S, Raza H, Batool M, Khan Lodhi R, Tul Ain Q, Naseer F. Determination of Caffeine in Soft and Energy Drinks Available in Market by using UV/Visible Spectrophotometer. Fam Med Med Sci Res. 2016; 5 (4): 206.
28. Tautua A, Bamidele Martin W, Diepreye ERE. Ultra-violet Spectrophotometric Determination of Caffeine in Soft and Energy Drinks Available in Yenagoa, Nigeria. Adv. J. Food Sci. Technol. 2014; 6 (2): 155-158.
29. Chemistry World. Megget K. The Chemistry In Your Cuppa. 2016. Dostupno na: https://www.chemistryworld.com/features/the-chemistry-in-your-cuppa/2500010.article. Pristupljeno: 28. kolovoza 2020.
30. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2153, Theophylline. Dostupno na: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theophylline. Pristupljeno: 28. kolovoza 2020.
31. Narodne novine. Pravilnik o općem deklariranju ili označavanju hrane. NN 114/2004. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2004_08_114_2188.html. Pristupljeno: 28. kolovoza 2020.

8. Sažetak

Toksikološki i forenzični značaj kofeina – određivanje koncentracije kofeina u raznim napitcima

Cilj: Cilj ovog rada je kroz pregled literature opisati kemijska svojstva i toksikološki učinak kofeina uz osvrt na njegov forenzični značaj. Eksperimentalnom dijelu rada cilj je UV-VIS spektrometrijom odrediti koncentraciju kofeina u 19 odabranih uzoraka čajeva, osvježavajućih bezalkoholnih i energetskih pića dostupnih na hrvatskom tržištu. Također, potrebno je ispitati slažu li se dobivene koncentracije kofeina sa zakonski propisanim maksimalnim sadržajem kofeina u određenom tipu napitka.

Metode: Pomoću standardnih otopina kofeina poznatih koncentracija i njihovih apsorbancija izmjerenih UV-VIS spektrometrom pri valnoj duljini 274 nm, konstruiran je baždarni dijagram i određena njegova jednadžba pravca. Infuzija uzoraka čaja izvršena je u destiliranoj vodi, nakon čega je smjesa filtrirana, a filtrat miješan s kloroformom u lijevku za odjeljivanje. Uzorci osvježavajućih bezalkoholnim i energetskih pića degazirani su zagrijavanjem do ključanja i nakon toga ekstrahirani kloroformom u lijevku za odjeljivanje. Tako dobiven ekstrakt je razrijeđen, te mu je UV-VIS spektrometrom mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 274 nm. Koncentracije kofeina u uzorcima izračunate su s pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama i faktora razrijeđenja ekstrakata.

Rezultati: Rezultati ovog istraživanja su sukladni do sada provedenim sličnim istraživanjima. Uzorci crnih čajeva sadrže veće koncentracije kofeina u odnosu na zelene, dok čajevi skupno imaju više određene koncentracije od ostalih analiziranih napitaka. Energetska pića sadrže veću koncentraciju kofeina u odnosu na osvježavajuće bezalkoholne napitke kod kojih dijetalne inačice određenih napitaka imaju manju koncentraciju kofeina od svojih originalnih varijanti. Dva uzorka energetskih pića pokazala su veću koncentraciju kofeina od one preporučene. Ostali uzorci sadrže koncentracije kofeina u granicama zakonski dozvoljenog, a na deklaracijama proizvoda navode se sve propisane informacije.

Zaključak: Budući da je kofein najčešće konzumirana psihoaktivna tvar, njegov toksikološki utjecaj na ljudski organizam dobro je istražen. Forenzični značaj kofeina je malen, ali je potrebno povećati svijest o negativnom utjecaju i mogućoj zlouporabi, na tržištu lako dostupnog, čistog kofeina. Metoda određivanja koncentracije UV-VIS spektometrijom izuzetno je jednostavna, brza, jeftina i pouzdana. Ipak, postupak ekstrakcije nije pokazao dobru ponovljivost zbog čega ga kroz buduća istraživanjima treba dodatno prilagoditi smanjenjem broja koraka u protokolu i mogućeg utjecaja ljudskog faktora na rezultate.

Ključne riječi: forenzična toksikologija, kofein, UV-VIS spektometrija

9. Summary

Toxicological and forensic significance of caffeine - determination of caffeine concentration in various beverages

Objective: The aim of this paper is to describe the chemical properties and toxicological effect of caffeine through a review of the literature with reference to its forensic significance. The aim of the experimental part of the paper is to determine the concentration of caffeine in 19 selected samples of teas, refreshing soft and energy drinks available on the Croatian market by UV-VIS spectrometry. Also, it is necessary to examine whether the obtained concentrations of caffeine comply with the legally prescribed maximum caffeine content in a particular type of beverage.

Methods: Using standard solutions of caffeine of known concentrations and their absorbances measured by UV-VIS spectrometer at a wavelength of 274 nm, a calibration diagram was constructed and its equation was determined. The tea samples were infused in distilled water, after which the mixture was filtered and the filtrate mixed with chloroform in a separatory funnel. Samples of refreshing soft and energy drinks were degassed by heating to boiling and then extracted with chloroform in a separatory funnel. The extract thus obtained was diluted and its absorbance was measured by UV-VIS spectrometer at a wavelength of 274 nm. Caffeine concentrations in the samples were calculated using the calibration equation and the extract dilution factor.

Results: The results of this research are consistent with similar research conducted so far. Samples of black teas contain higher concentrations of caffeine compared to green ones, while teas collectively have higher specific concentrations than other beverages analyzed. Energy drinks contain a higher concentration of caffeine compared to refreshing soft drinks in which the dietary versions of certain beverages have a lower concentration of caffeine than their original variants. Two samples of energy drinks showed a higher concentration of caffeine than the recommended one. Other samples contain concentrations of caffeine within the limits allowed by law, and all prescribed informations are stated on product declarations.

Conclusion: Since caffeine is the most commonly consumed psychoactive substance, its toxicological impact on the human body has been well investigated. The forensic significance of caffeine is small, but there is a need to increase awareness of the negative impact and possible misuse of pure caffeine which is easily available on the market. The method of determining the concentration by UV-VIS spectrometry is extremely simple, fast, cheap and reliable. However, the extraction process did not show good repeatability, which is why it should be further adjusted through future research by reducing the number of steps in the protocol and the possible influence of the human factor on the results.

Key words: forensic toxicology, caffeine, UV-VIS spectrometry

10. Životopis

Lucija Bardić

Datum i mjesto rođenja: 11/10/1995, Zagreb

E-adresa: lucija.bardic@gmail.com

Adresa : Sajmišna 1, 10370 Dugo Selo (Hrvatska)

Obrazovanje

- *Sveučilišna prvostupnica struke znanosti o okolišu*

  Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb [listopad 2014. – srpanj 2017.]

- *Ekološka tehničarka*

  Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb [rujan 2010. – lipanj 2014.]

- OŠ Rugvica [rujan 2002. – lipanj 2010.]

Publikacije

Bardić L., Kolić A., Sabljak K., „Teroristički napadi na trajekte i njihov utjecaj na turizam“ [2019] - Zbornik radova III. međunarodna konferencija Sigurnost povijesnih gradova 2019.

Konferencije i seminari

- Sigurnost povijesnih gradova [Split, studeni 2019.]
- 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures [Split, lipanj 2019.]
- Festival znanosti [Split, travanj 2019.]
- Noć istraživača [Split, rujan 2018.]
- Dani otvorenih vrata Forenzike [Split, svibanj 2018.]
  - Izlaganje na temu "Analiza i usporedba spornog i nespornog uzorka DNA"
- Festival znanosti [Split, travanj 2018.]
- Sigurnost povijesnih gradova [Split, ožujak 2018.]

11. Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Lucija Bardić, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom Toksikološki i forenzični značaj kofeina – određivanje koncentracije kofeina u raznim napitcima rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava. Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi. Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, 28. rujna 2020.

Potpis studenta/studentice: _____