

Primjena elektrokemijske tehnike diferencijalne impulsne voltametrije na karakterizaciju kafeina iz uzorka dodatka prehrani

Guberac, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:499807>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Marija Guberac

**Primjena elektrokemijske tehnike diferencijalne impulsne
voltometrije na karakterizaciju kafeina iz uzorka dodatka prehrani**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Fizikalna kemija

Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 29. svibnja 2020.

Mentor: dr. sc. *Ivana Tomac, znan. sur.*

Primjena elektrokemijske tehnike diferencijalne impulsne voltametrije na karakterizaciju kafeina iz uzorka dodatka prehrani

Marija Guberac, 0113139634

Sažetak: Kafein je alkaloid, zastupljen u kavi, energetskim napitcima, dodacima prehrani i slično. Diferencijalna pulsna voltametrija ubraja se u elektrokemijske, elektroanalitičke tehnike. Karakterizira ju visoka osjetljivost, selektivnost, točnost i niske LOD i LOQ vrijednosti te je stoga prikladna za primjenu na različite uzorke. Diferencijalna pulsna voltametrija je metoda u kojoj je osnovni signal pobude linearno rastući potencijal na koji se superponiraju mali kvadratični naponski impulsi iznosa od 10–100 mV u vrlo kratkom vremenskom periodu. Cilj ovog diplomskog rada je razviti elektrokemijsku tehniku diferencijalnu pulsnu voltametriju, ispitati elektrokemijsko ponašanje kafeina i primijeniti na analizu dodatka prehrani. Za elektrokemijsku karakterizaciju kafeina i dodatka prehrani koristila bi se standardna troelektrodna ćelija i inertni pufer. Na osnovi istraživanja može se zaključiti da primijenjeni elektrokemijski uvjeti: pH vrijednost osnovnog elektrolita, višestruka uzastopna polarizacija i koncentracija analita utječu na elektrokemijsko ponašanje kafeina.

Ključne riječi: kafein, dodatak prehrani, diferencijalna pulsna voltametrija

Rad sadrži: 33 stranice
15 slika
2 tablica
38 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|---|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Maja Molnar</i> | predsjednik |
| 2. dr. sc. <i>Ivana Tomac, znan. sur.</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | član |
| 4. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 29. rujan 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE

THESIS University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Applied Chemistry and Instrumental Methods
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Physical Chemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 7 held on May 29, 2020.

Mentor: *Ivana Tomac*, PhD

Application of Electrochemical Technique Differential Pulse Voltammetry to the Characterization of Caffeine from a Dietary Supplement Sample

Marija Guberac, 0113139634

Summary: Caffeine is an alkaloid, present in coffee, energy drinks, dietary supplements and so on. Differential pulse voltammetry is one of the electrochemical, electroanalytical techniques. It is characterized by high sensitivity, selectivity, accuracy and low LOD and LOQ values. Therefore, is suitable for application to various real samples. Differential pulse voltammetry is a method in which the basic excitation signal is a linearly increasing potential to which small square voltage pulses of 10–100 mV are superimposed in a very short period. The aim of this work is to develop the electrochemical differential pulse voltammetry, to examine the electrochemical behaviour of caffeine and to apply it to the analysis of dietary supplements. A standard three-electrode cell and inert buffer are used for electrochemical characterization of caffeine and dietary supplement. Based on the research, it can be concluded that the applied electrochemical conditions: pH value of the basic electrolyte, multiple consecutive polarization and concentration of analyte affect the electrochemical behaviour of caffeine.

Keywords: caffeine, coffee, dietary supplement, differential pulse voltammetry

Thesis contains: 33 pages
15 figures
2 table
38 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Maja Molnar</i> | chair person |
| 2. <i>Ivana Tomac</i> , PhD | supervisor |
| 3. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, prof. | member |
| 4. <i>Antun Jozinović</i> | stand-in |

Defense date: September 29th, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KAFEIN	4
2.1.1. Kemijski sastav.....	4
2.1.2. Izvor	6
2.1.3. Djelovanje.....	7
2.2. DODATAK PREHRANI	7
2.3. METODE ODREĐIVANJA	8
2.3.1. Spektroskopske metode	8
2.3.2. ELEKTROKEMIJSKE METODE.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. ZADATAK RADA.....	12
3.2. MATERIJALI I METODE.....	12
3.2.1. Priprema otopina.....	12
3.2.4. Diferencijalna pulsna voltometrija	12
4. REZULTATI.....	15
4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KAFEINA.....	16
4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE DODATKA PREHRANI	18
5. RASPRAVA.....	21
5.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE OTOPINE KAFEINA	22
5.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE DODATKA PREHRANI	24
6. ZAKLJUČAK.....	26
7. LITERATURA	28

1. UVOD

Kafein je organska molekula koja se sastoji od ugljika, vodika, dušika i kisika. Kafein ili trimetilksantin predstavlja alkaloid ksantina, prirodna je i farmakološka tvar. Prisutan u velikom broju različitih biljaka te konzumiranjem kave, čaja i bezalkoholnih napitaka ulazi u ljudski organizam. Također, kafein ima i ljekovita svojstva i koristi se kao djelatna tvar u lijekovima protiv glavobolje ili opuštanja mišića. Kafein je najvjerojatnije najstariji stimulans središnjeg živčanog sustav, srca i mozga.

Dodaci prehrani su izvor hranjivih sastojaka ili drugih sastojaka s prehrambenim ili fiziološkim funkcijama. Kafein je jedan od djelotvornijih dodataka prehrani te ukoliko se uzima u odgovarajućim količinama imat će pozitivan učinak na organizam i suzbijanje umora dok unosom velikih količina dolazi do nastanka nuspojava.

Do danas su razvijene različite instrumentalne metode za identifikaciju i kvantifikaciju kafeina u biljkama, kavi, čaju, bezalkoholnim pićima i farmaceutskim proizvodima. Najčešće korištena tehnika je HPLC metoda za određivanje kafeina u složenim realnim uzorcima gdje se vrlo niska koncentracija kafeina može odrediti s velikom točnošću i preciznošću.

Elektrokemijske metode zbog svoje brzine, selektivnosti, preciznosti i osjetljivosti se često primjenjuju za analizu realnih uzoraka. Uz cikličku i pravokutnovalnu voltametriju, diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) se sve češće primjenjuje za identifikaciju i kvantifikaciju kafeina u realnim uzorcima. Diferencijalna pulsna voltametrija je pulsna tehnika, a primjenjuje se u elektrokemijskoj analizi za karakterizaciju realnih uzoraka zbog mogućnosti određivanja malih koncentracija elektroaktivnih vrsta.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada razviti elektrokemijsku tehniku diferencijalnu pulsnu voltametriju, ispitati elektrokemijsko ponašanje kafeina i primijeniti na analizu dodatka prehrani.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KAFEIN

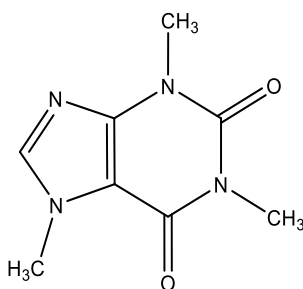
2.1.1. Kemijski sastav

Kafein je organska molekula koja se sastoji od ugljika, vodika, dušika i kisika, kemijske formule $C_8H_{10}N_4O_2$ (Preedy, 2012). Kafein ili trimetilksantin (1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion (IUPAC) je alkaloid ksantina, prirodna i farmakološka tvar (Textor, 2003), bijeli kristalni prah bez mirisa i vrlo gorkog okusa (Burge i Raches, 2003). Molekularna masa kafeina je 194,19 g, talište je 236 °C, a točka sublimacije je 178 °C. **Slika 1** prikazuje kafein u obliku bijelog kristalnog praha.

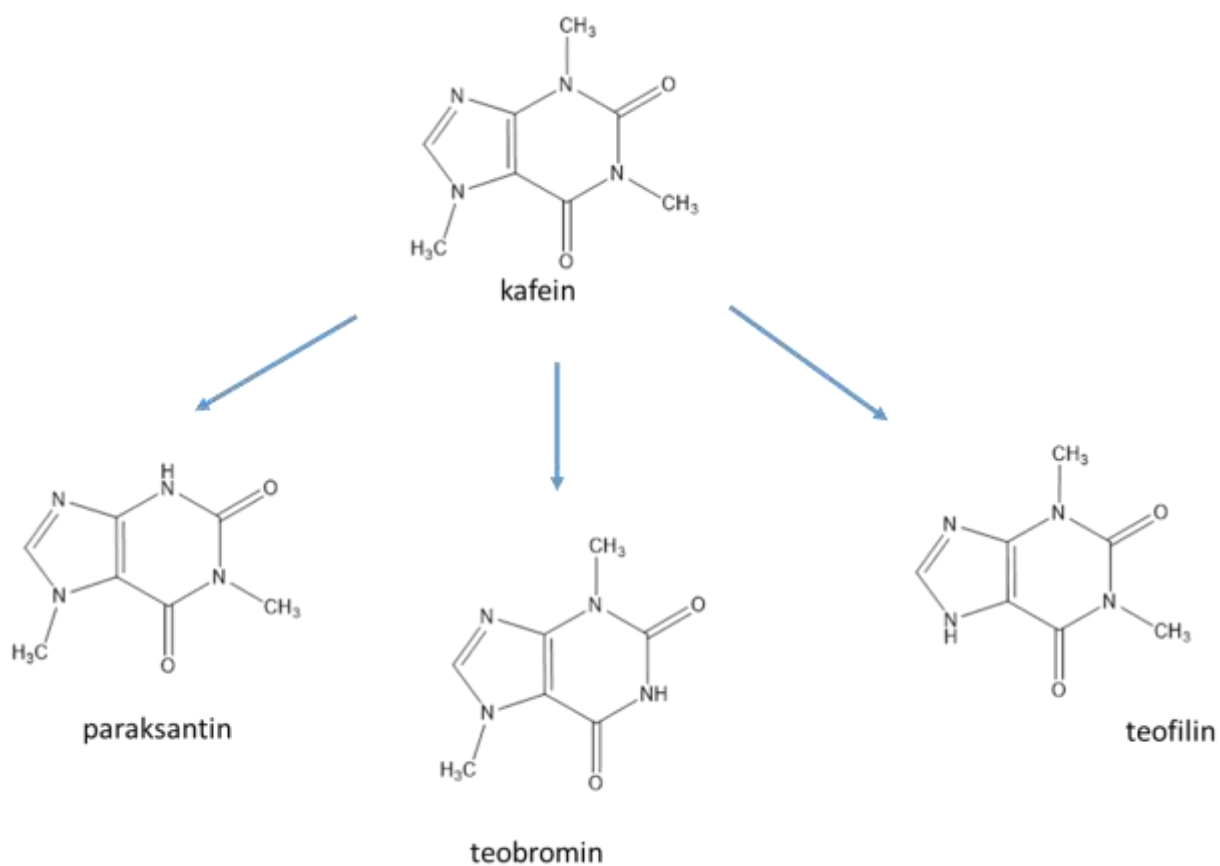


Slika 1 Kafein (WEB 1)

Kafein pripada skupini prirodnih alkaloida, a glavni je član metilksantinskih alkaloida (Preedy, 2012). Također, pripada grupi purina kao i teofilin i teobromin. Osnovna struktura kafeina predstavlja purinsku jezgru, odnosno strukturu kafeina čine dva prstena koji s vanjske strane sadrže više supstituenata. Dvostruki prsten čini jezgru osnovne strukture purina. Jedan od prstena je šesteročlani, a drugi peteročlani i svaki ima dva atoma dušika. Na vanjskim stranama prstena, na atomima ugljika C-2 i C-6 nalazi se po jedan atom kisika povezan s dvostrukim vezama. Na atomima dušika N-1, N-3 i N-7 nalaze se po jedna metil-grupa (-CH₃). Kod teofilina i teobromina nedostaju metil-grupe. Kod teofilina to je metil-grupa na atomu N-7, a kod teobromina na atomu N-1 (WEB 1). **Slika 2** prikazuje kemijsku strukturu kafeina.



Slika 2 Kemijska struktura kafeina



Slika 3 Strukturni prikaz kafeina i njemu srodnih spojeva

Otapanje kafeina ovisi o temperaturi. Topljiv je u kloroformu i metilen-kloridu, a umjereno topljiv u etanolu i vodi pri sobnoj temperaturi, ali se topljivost povećava u kipućoj vodi. **Tablica 1** prikazuje otapanje kafeina u različitim otapalima.

Tablica 1 Otapanje kafeina (WEB 1)

OTAPALO	NAJMANJA KOLIČINA KAFEINA KOJA SE MOŽE OTOPITI
voda pri normalnoj temperaturi	21,74 g/l
voda pri 80 °C	181,82 g/l
etanol pri normalnoj temperaturi	15,15 g/l
etanol pri 60 °C	45,45 g/l
Aceton	20,00 g/l
Kloroform	181,82 g/l

2.1.2. Izvor

Kafein, teobromin i teofilin su prirodni alkaloidi prisutni u listovima čaja, kavi i sjemenki kakaa te u hrani i pićima spravljenim od njih (Bispo i sur., 2002; Preedy, 2012). Najvažniji izvor kafeina su kava, čaj, guarana, kola i kakao. Količina kafeina u tim proizvodima je različita. Najveći sadržaj kafeina je u guarani koja sadrži 47%, listovi čaja sadrže 3.5%, zrna kave 1.1-2.2%, a kakao zrno 0.03% (Cabrera i sur., 2003). Razina kafeina i teobromina mnogo je veća u pupoljcima i mladim listovima *Coffea arabica* L. nego u potpuno razvijenom lišću. Kafein je glavni sastojak kave. U prosjeku 90% odraslih konzumira kafein u različitim napitcima, a najčešće su to kava, čaj, bezalkoholni napitci i slično. Smatra se jednom od najčešće konzumiranih droga s više od 80% svjetske populacije koja svakodnevno konzumira kafein (Carrillo i Benitez, 2000; Norton i sur., 2011). U malim tragovima može se naći u površinskim vodama gdje dopijeva iz mokraće ili kada se proizvodi, koji ga sadrže, ispuštaju u cjevovode ili kanalizaciju (Seiler i sur., 1999). Tada se često koristi kao izvrstan pokazatelj ljudskog otpada (Grujić Letić i sur., 2015).

2.1.3. Djelovanje

Kafein utječe na središnji živčani sustav, srce te ubrzava rad mozga. Odnosno djeluje kao stimulans na način da privremeno odgađa umor i pospanost (Svilaas, 2004). Koristi se u liječenju blage respiratorne depresije uzrokovane narkoticima i za liječenje zatajenja cirkulacije. Preporučena dnevna doza je 200 mg/dan (Paxeus i Schroder, 1996). Visoke doze dovode do nuspojava koje su povezane sa središnjim živčanim sustavom kao što su ovisnost i anksioznost (Nehlig, 1999). Kafein se upotrebljava i za liječenje glavobolje u kombinaciji s drugim lijekovima poput aspirina, paracetamola i tramadola te dodatak kafeina povećava učinkovitost tableta protiv bolova za 40% (Madhusudhan, 2013; Straube i sur., 2011). Međutim, vjerojatnije je da će osoba koja uzima kombinirane lijekove koji sadrže kafein osjetiti štetne učinke poput tahikardije, tjeskobe i slično (Sawynok, 2011). Također, može utjecati na kardiovaskularni sustav te utjecati na loš rad jetre (Bispo, 2002). Doza od 10 g je smrtonosna što je otprilike 100 šalica kave (Paxeus i Schroder, 1996). Kafein se ne nakuplja u organizmu i normalno se izlučuje iz organizma nekoliko sati od konzumacije (Nour, 2008).

2.2. DODATAK PREHRANI

Dodaci prehrani su koncentrirani izvor hranjivih sastojaka ili drugih sastojaka s prehrambenim ili fiziološkim funkcijama. Svrha dodataka prehrani je da potpomognu unos hranjivih sastojaka u uobičajenoj prehrani i da nadopune prehranu tvarima koje se putem normalnog unosa hrane u organizam ne dobivaju u dovoljnoj količini, a sve u svrhu povoljnog učinka na zdravlje potrošača. Na taj se način povećava otpornost organizma na stresne vanjske utjecaje te pomaže u održavanju pravilnih fizioloških funkcija organizma. Dodaci prehrani mogu se nalaziti na tržištu u različitim doziranim oblicima kao što su tablete, kapsule, prahovi, tekućine, bar-pločice, čajevi, sirupi, kapi i slično te na deklaraciji moraju nositi oznaku „dodatak prehrani“. Unosom dodataka prehrani potrošaču se daje mogućnost da sam ili uz pomoć stručne osobe poboljša svoje zdravlje. Hranjivi sastojci i druge tvari u dodacima prehrani su vitamini, minerali, bjelančevine, aminokiseline, masne kiseline, celuloza, pivski kvasac, inulin, lecitin, glukomanan, bilje i ljekovito bilje i njihovi ekstrakti ili koncentrat, zaštitne tvari biljnog podrijetla (bioflavonoidi, karotenoidi, izoflavoni, glukozinolati), prirodni enzimi i koenzimi, žive kulture mikroorganizama, organska tkiva, metaboliti žlijezda i druge tvari (Pollak, 2008).

Kafein je jedan od najdjelotvornijih dodataka prehrani. Djeluje kao stimulans, ali taj utjecaj opada s prevelikom konzumacijom, odnosno dolazi do tolerancije na kafein. Međutim, ukoliko se kontinuirano unosi u organizam čimbenik za suzbijanje umora će ostati isti. Preporučena dnevna doza je 1-3 mg/kg TM dnevno. Također, kafein utječe na poboljšanje sportskog performansa u svim sportskim aktivnostima kao što su sportovi izdržljivosti ili ekipni sportovi. Osjetljivost na unos kafeina je različita kod ljudi te je teško odrediti preporuke za unos. Međutim, istraživanja su pokazala da je potrebno unijeti nešto veće doze kafeina od 4 do 6 mg/kg TM, otprilike sat vremena prije početka sportske aktivnosti. Apsorpcija i distribucija kafeina u organizmu je jako brza, 99% kafeina se apsorbira već 45 min nakon unosa. Također, kafein je česti sastojak tzv. „*fat-burner*-i“ koji se koriste za gubitak masnog tkiva i djeluju na dva načina. Na način da pojačava nastanak topline u tijelu i smanjuje apetit, a zajedno dovode do smanjenog unosa energije i proizvodnje energije u tijelu (Spiller, 1998; Chambers, 2009; WEB 2).

Deklaracija za dodatke prehrani i dijetetske proizvode je specifična i mora zadovoljiti određene zahtjeve propisane posebnim propisima. Ono što dodatak prehrane čini drugačijim od uobičajene hrane su komponente čija određena količina ima značajan utjecaj na zdravlje i taj se utjecaj navodi u raznim tvrdnjama (Pollak, 2008).

2.3. METODE ODREĐIVANJA

Neke od najčešće primjenjivanih metoda za karakterizaciju kafeina u realnim uzorcima su UV/Vis spektroskopija, kolorimetrija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), spektroskopija s Furierovom transformacijom infracrvenog spektra (FTIR), elektrokemijske metode (kulometrija, voltometrija) i slično.

2.3.1. Spektroskopske metode

Spektroskopska mjerenja su jedna od najčešće primjenjivanih analitičkih tehnika. Primjenjuju se za analizu jednostavnih, ali i kompleksnih uzoraka (Bhawani i sur., 2015). Spektrofotometrijska metoda ubraja se u apsorpcijske metode koje se temelje na ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini zračenja koje prolazi kroz analit. Apsorbancija se može pratiti u ultraljubičastom, vidljivom, infracrvenom području. UV-VIS spektrofotometrija je prihvatljiva jer je jeftina, brza, jednostavna i lako dostupna. Ova vrsta spektrofotometrije prati promjenu apsorbancije u području valnih duljina od 200 do 800 nm te daje informacije o strukturi

ispitanog analita (Taletović i sur., 2015). Također, se primjenjuje i za kvantifikaciju sadržaja kafeina u farmaceutskim i prehrambenim uzorcima primjenom tehnike standardne adicije ili kalibracijske krivulje (Corciova i Ivanescu, 2014).

Kolorimetrija je još jedna jednostavna tehnika koja se primjenjuje u karakterizaciji kafeina (Venkatesh i sur., 1994). Nadalje, danas je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti tehnika od najčešćeg izbora jer je selektivna, precizna i osjetljiva. Također je HPLC metoda pogodna za kompleksne uzorke kao što su uzorci hrane, farmaceutski pripravci i slično (Abbood i Aldiab, 2017). Do danas ne postoji jedinstvena HPLC metoda koja se može primijeniti za kvantifikaciju sadržaja kafeina u svim različitim uzorcima, ali se C18 kolona najčešće upotrebljava za separaciju kafeina iz uzorka (Grujić-Letić i sur., 2016; Patil, 2012; Motora i Beyene, 2017).

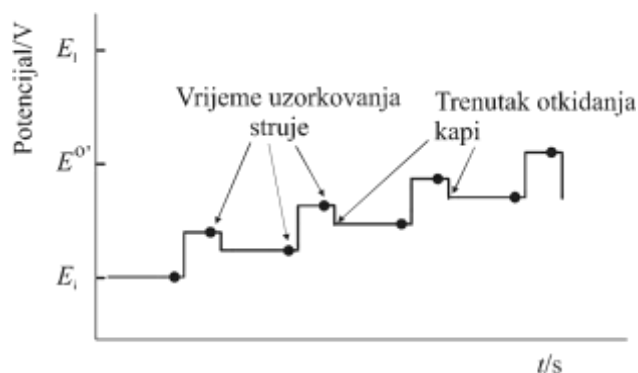
2.3.2. ELEKTROKEMIJSKE METODE

Elektrokemijske metode uz HPLC metodu, danas su sve zastupljenije jer su jeftine, ne zahtijevaju kompliciranu pripremu uzoraka, brze su, selektivne i precizne. Hansen i Dryhurst su još 1970. godine primijenili kulometriju na praćenje elektrokemijske oksidacije kafeina. Zatim, Sontag i Kral su 1979. godine objavili istraživanje elektrokemijske oksidacije kafeina primjenom diferencijalno pulsne polarografije i primijenili dobivene rezultate na realne uzorke kao što su kava i čaj. Nakon ovih istraživanja, slijedi razvoj i primjena cikličke, diferencijalne pulsne i pravokutnovalne voltometrije, primjena različitih radnih elektroda kao što su boron doped dijamantna elektroda, elektroda od staklastog ugljika i njezine modifikacije s nanočesticama te ispitivanje utjecaja različitih elektrolita kao što su $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, Britton-Robinson pufer, $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatni, fosfatni pufer (Tadesse i sur., 2013; Zen i sur., 1998; Spataru i sur., 2002; Švorc, 2013).

Diferencijalna pulsna voltometrija

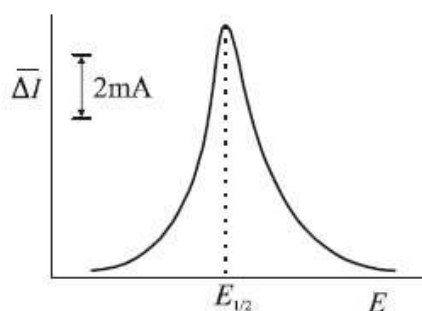
Diferencijalna pulsna voltometrija (DPV) ubraja se u pulsne tehnike za određivanje vrlo niskih koncentracija elektroaktivnih specija u različitim uzorcima. Predstavlja voltometrijsku tehniku kod koje se mali pravokutni naponski impuls (amplitude od 10 do 100 mV) pridružuje na stepeničasto rastući napon pobude (Piljac, 2010). Na **Slici 2** prikazan je signal pobude. Granica

detekcije DPV iznosi oko 10^{-8} mol dm^{-3} . Potencijal vrha vala E_p približno je jednak potencijalu polovine vala, $E_{1/2}$, na cikličkom voltamogramu.



Slika 4 Signal pobude kod diferencijalne pulsne voltometrije (Piljac, 2010).

Mjerenje se provodi na način da se potencijal radne elektrode tijekom mjerenja održava na osnovnom potencijalu (E_i). Pri osnovnom potencijalu struja ćelije (redukcije ili oksidacije) je jednaka nuli. U određenom trenutku na osnovni napon (E_i) superponira se pravokutni naponski impuls kratkog trajanja. Takvim pravokutnim impulsom izaziva se elektrodna reakcija redukcije odnosno oksidacije. Struja se uzorkuje i mjeri prije svakog naponskog impulsa i pri kraju trajanja naponskog impulsa. Tako uzorkovana i izmjerena struja registrira se kao konstantna vrijednost do sljedećeg naponskog impulsa. Oblik signala odziva je promjena razlike struje prije i nakon primjene naponskog impulsa u ovisnosti o potencijalu elektrode i ima oblik vrha (pika) (Piljac, 2010).



Slika 5 Izgled diferencijalnog pulsnog voltamograma (Piljac, 2010)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je:

- ispitati utjecaj elektrolita, utjecaj višestruke uzastopne polarizacije i utjecaj promjene koncentracije na elektrokemijska svojstva kafeina te
- primijeniti elektrokemijsku tehniku diferencijalne pulsne voltametrije na karakterizaciju kafeina u uzorku dodatka prehrani.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Priprema otopina

Otopina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnog pufera (AcB) korištena je kao osnovni elektrolit pH vrijednosti 3, 4, 5 i 6 za provođenje diferencijalne pulsne voltametrije.

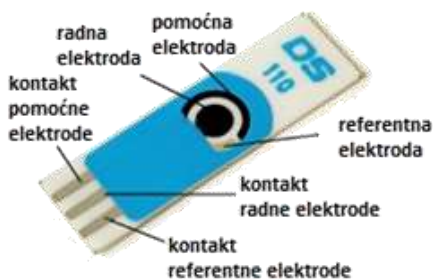
Stock otopina kafeina pripremljena je u koncentraciji $1,15 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ u ultračistoj vodi te se razrjeđivanjem u odgovarajućoj pH vrijednosti elektrolita pripremala željena koncentracija. Stock otopina kafeina čuvana je zaštićena od svjetla u hladnjaku na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Uzorak dodatka prehrane, kafein (My Protein, UK) pripremljen je otapanjem tablete kafeina, u 200 mL ultračiste vode. Neposredno prije analize, uzorak tablete kafeina je filtriran preko filter papira.

Za pripravu svih otopina u ovom diplomskom radu korištena je ultračista voda (vodljivost vode $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) dobivena vakuum filtracijom.

3.2.4. Diferencijalna pulsna voltametrija

Mjerenje je provedeno na kompjuterski kontroliranom elektrokemijskom sustavu $\mu\text{Autolab}$ (Eco-Chemie, Utrecht, Nizozemska). Mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi. Analiza je provedena u staklenoj stacionarnoj ćeliji. Za elektrokemijsko mjerenje primjenom DPV upotrijebila se komercijalna "Screen Printed" ugljikova elektroda na koju je nanesen sloj karboksiliranih jednostjenčanih ugljikovih nanočestica (engl. *Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNT elektroda*), od tvrtke DropSens, Španjolska. Ova elektroda predstavlja tro-elektrodni sustav u kojem je SWCNT-COOH/ugljik radna elektroda, sloj ugljika pomoćna i sloj srebra kao referenta elektroda i električni kontakt za sve tri elektrode.



Slika 6 Komercijalna "Screen Printed" ugljikova elektroda

Ispitan je utjecaj različitih eksperimentalnih uvjeta na elektrokemijska svojstva standarda kafeina i dodatka prehrani kafeina:

- a) utjecaj pH otopine osnovnog elektrolita, acetatni pufer (AcB), $c=0,1 \text{ mol L}^{-1}$, u rasponu od pH 3 do pH 6,
- b) utjecaj višestruke uzastopne polarizacije,
- c) utjecaj koncentracija otopine kafeina u rasponu koncentracija od $5 \cdot 10^{-6}$ do $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$,
- e) utjecaj dodatka prehrani kafeina.

Sva voltametrijska mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi $\pm 25^\circ\text{C}$ te su ponavljana tri puta. DP-voltamogrami su snimljeni prema eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 2**.

Tablica 2 Eksperimentalni uvjeti diferencijalne pulsne voltametrije

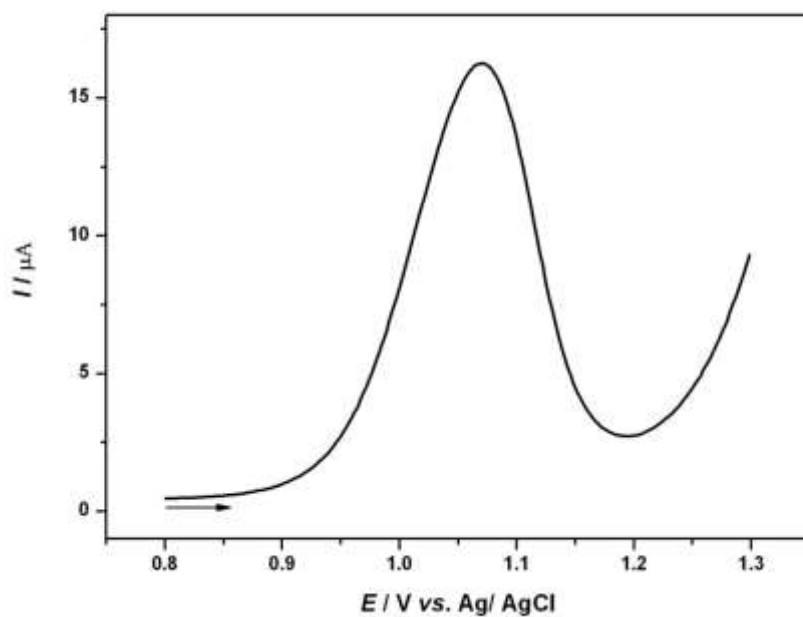
Parametar	Iznos
Početni potencijal (mV)	-0,4
Konačni potencijal (mV)	1,4
Brzina polarizacije (mV/s)	5
Korak potencijala (mV)	2
Amplituda pulsa (mV)	50

Identifikacija i kvantifikacija kafeina u uzorku dodatka prehrani provedena je na osnovi usporedbe oksidacijskog potencijala standarda kafeina i obogaćivanjem uzorka dodatka prehrani određenom koncentracijom otopine standarda.

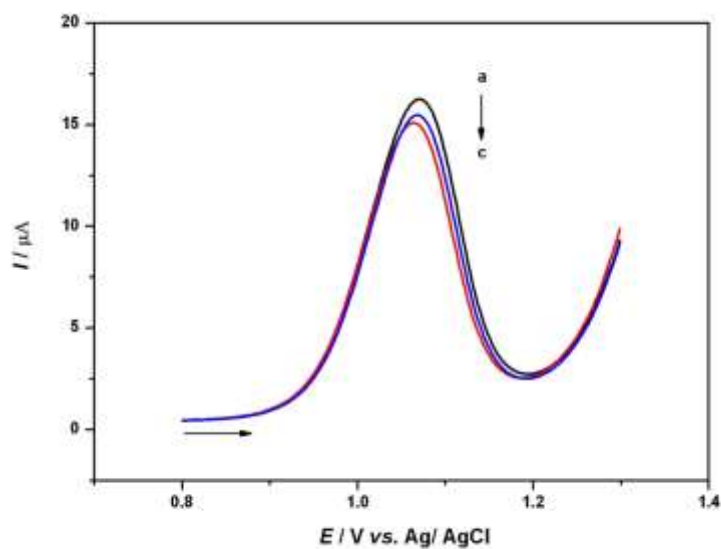
Sadržaj kafeina u uzorku dodatka prehrani izražen je u mg kafeina po litri, a izračunat je na osnovi iznosa struje anodnog pika, primjenom kalibracijske krivulje kreirane pomoću koncentracija otopine standarda kafeina.

4. REZULTATI

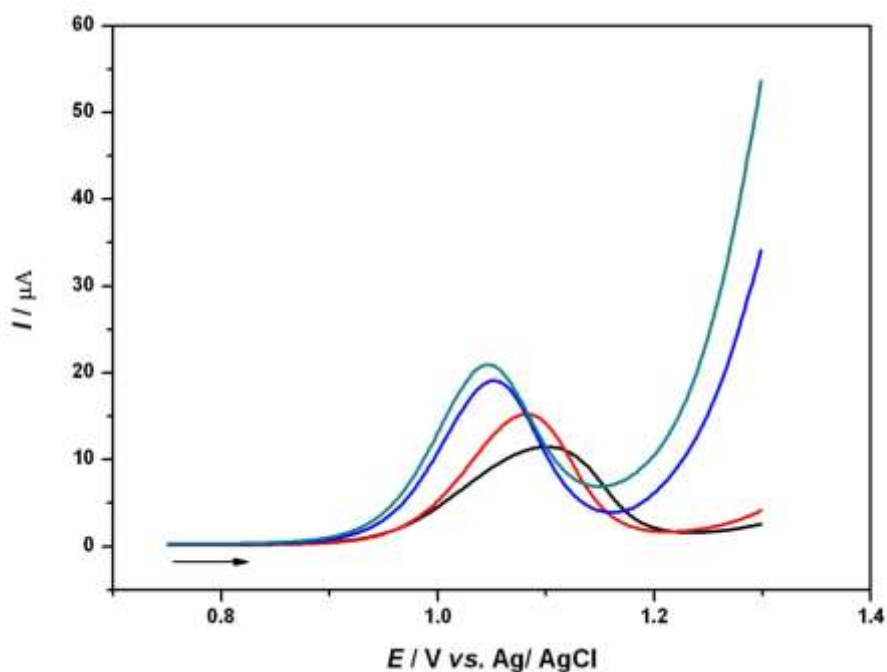
4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KAFEINA



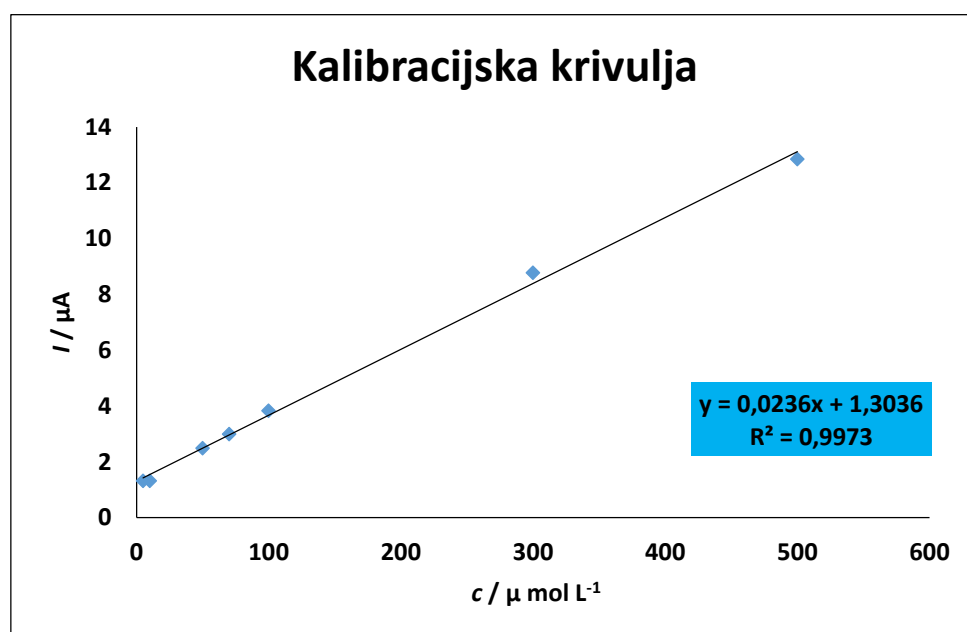
Slika 7 Diferencijalni pulsni voltamogram standarda kafeina koncentracije $7,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 2**



Slika 8 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na elektrokemijska svojstva kafeina koncentracije $7,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 2**

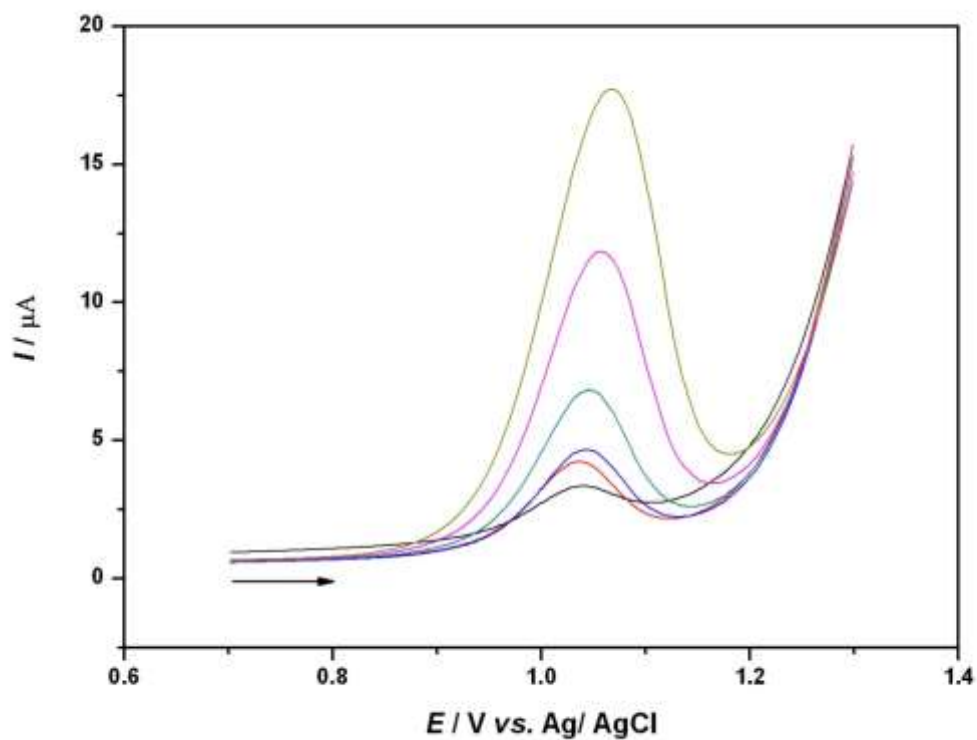


Slika 9 Diferencijalni pulsni voltamogrami utjecaja promjene pH elektrolita na elektrochemijska svojstva kafeina koncentracije $7,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 3 (crno), pH 4 (crveno), pH 5 (plavo) i pH 6 (zeleno) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 2**

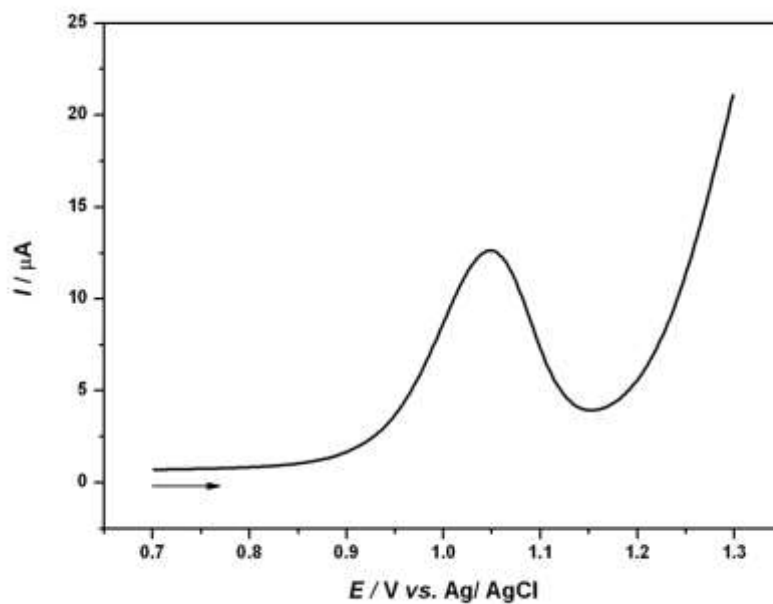


Slika 10 Kalibracijska krivulja standarda kafeina

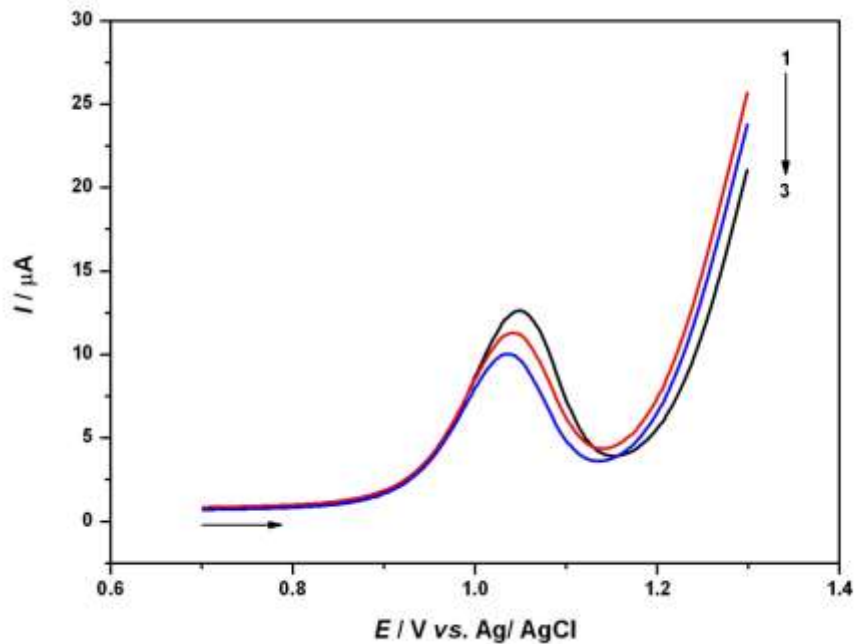
4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE DODATKA PREHRANI



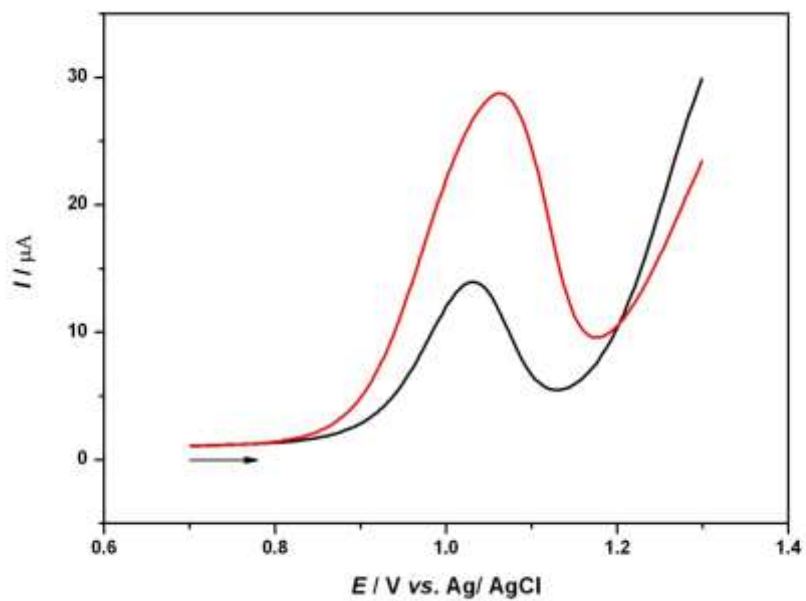
Slika 11 Diferencijalni pulsni voltamogrami uzorka dodatka prehrani (crno DF 100, crveno DF 50, plavo DF 40, zeleno DF 25, roza 10, smeđe DF 5) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 2**



Slika 12 Diferencijalni pulsni voltamogram uzorka dodatka prehrani (DF 10) u 0.1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 2**



Slika 13 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na diferencijalne pulsne voltamograme uzorka dodatka prehrani (DF 10) u 0.1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 2**



Slika 14 Diferencijalni pulsni voltamogrami obogaćivanje uzorka dodatka prehrani (DF 10) (crno bez dodatka kafeina, crveno s dodatkom kafeina) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 2**

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu ispitano je elektrokemijsko ponašanje otopine kafeina primjenom diferencijalne pulsne voltametrije. S ciljem utvrđivanja elektrokemijskog ponašanja otopine kafeina ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita i utjecaj promjene koncentracije analita. Također, razvijena metoda diferencijalne pulsne voltametrije primijenjena je na karakterizaciju (identifikaciju i kvantifikaciju) kafeina u uzorku dodatka prehrani.

5.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE OTOPINE KAFEINA

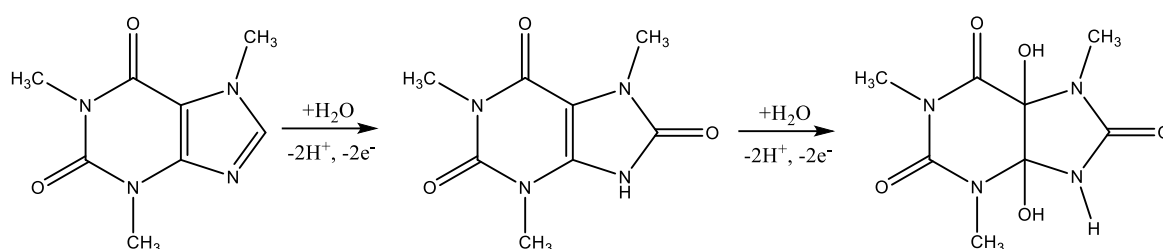
Slika 7 prikazuje diferencijalno pulsni (DP) voltamogram otopine kafeina ($7,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na komercijalnoj "screen printed" elektrodi u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu (pH 4). Diferencijalno pulsni voltamogram kafeina pokazuje jedan jasno izraženi anodni pik na potencijalu od $1,05 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na diferencijalne pulsne voltamograme otopine kafeina prikazan je na **Slici 8**. Iz prikaza diferencijalnih pulsni voltamograma otopine kafeina ($7,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na komercijalnoj "screen printed" elektrodi u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu (pH 4) uočava se pad anodnog strujnog odziva pri drugoj i trećoj polarizaciji te pomak elektrodnog potencijala prema većim vrijednostima elektrodnog potencijala. Opadanje anodnog strujnog odziva karakterizira nastanak oksidacijskih produkata na površini radne elektrode te je difuzija molekula iz otopine kafeina otežana prema površini radne elektrode (Spataru i sur., 2002.; Campean i sur., 2011.; Tadesse i sur., 2013.).

Ispitani utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita na diferencijalne pulsne voltamograme otopine kafeina ($7,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na komercijalnoj "screen printed" elektrodi u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu (pH 3, 4, 5, 6) prikazan je na **Slici 9**. Iz grafičkog prikaza na **Slici 9** uočava se jedan jasno izraženi oksidacijski strujni pik pri svim ispitanim pH vrijednostima, dok pri pH 6 osnovnog elektrolita uočava se najviši strujni odziv. Međutim, za istraživanje u ovom diplomskom radu nije odabrana pH vrijednost koja daje najviši strujni odziv već pH 4 zbog lakše usporedbe dobivenih rezultata s istraživanjima drugih autora (Hansen i Dryhurst, 1971; Sontag i Kral, 1979; Zen i sur., 1998.; Spataru i sur., 2002.; Campean i sur., 2011.; Tadesse i sur., 2013.; Švorc, 2013.; Torres i sur., 2014.; Redivo i sur., 2018.) koji su u svojim istraživanjima elektrokemijskog ponašanja otopine kafeina različitim elektrokemijskim tehnikama na modificiranim radnim elektrodama koristili niske pH vrijednosti pufera (pH 4 i pH 5).

Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine kafeina u različitim pH vrijednostima pokazuje porast strujnog odziva s povećanjem pH vrijednosti (iz kiselog u neutralni medij) te pomak elektrodnog potencijala prema pozitivnim vrijednostima (Hansen i Dryhurst, 1971; Spataru i sur., 2002.; Campean i sur., 2011.; Tadesse i sur., 2013.).

Autori Hansen i Dryhurst (1971.) u svom istraživanju elektrokemijskog ponašanja otopine kafeina zaključili su da se proces oksidacije odvija pri izmjeni četiri protona i četiri elektrona ($4 \text{H}^+ - 4 \text{e}^-$). Odnosno, grupa autora Tedessi i suradnici (2013.) predložili su mehanizam oksidacije otopine kafeina prikazane **Slikom 15**.



Slika 15 Mehanizam elektrokemijske oksidacije otopine kafeina (Tadesse i sur., 2013.)

Mehanizam elektrokemijske oksidacije otopine kafeina odvija se u dva koraka. U prvom koraku se odvija 2H^+ , 2e^- oksidacija veze s C-8 na N-9 dajući kao produkt supstituiranu mokraćnu kiselinu. Nadalje, u drugom koraku se također odvija 2H^+ , 2e^- oksidacija na 4,5-diol analogu mokraćne kiseline koja se vrlo brzo raspada.

S ciljem ispitivanja utjecaja koncentracije na diferencijalne pulsne voltamograme otopine kafeina i s ciljem ispitivanja sadržaja kafeina u realnim uzorcima, kreirana je kalibracijska krivulja (**Slika 10**). Kalibracijska krivulja otopine kafeina kreirana je na osnovi ovisnosti množinske koncentracije o anodnom strujnom odzivu u rasponu koncentracija od 5 do 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ te se uočava linearni porast anodnog strujnog odziva povećanjem koncentracije analita. Dobila se **Jednadžba linearne regresije (1)**

$$I_p (\mu\text{A}) = 0,0236 c (\mu\text{mol L}^{-1}) + 1,3036 \quad (1)$$

i koeficijent korelacije 0,9973. Osjetljivost primijenjene elektrokemijske tehnike izražena je preko granice detekcije koja iznosi 15,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i granice kvantifikacije koja iznosi 52,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

5.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE DODATKA PREHRANI

Razvijena elektrokemijska metoda, diferencijalna pulsna voltometrija primijenjena je na ispitivanje elektrokemijskog ponašanja realnog uzorka koji sadrži kafein. Uzorak dodatka prehrani koji sadrži kafein pripremljen je za analizu kako je opisano u poglavlju **3.2.1. Priprema otopina i uzorka** te su primijenjeni eksperimentalni uvjeti iz **Tablice 2**.

S ciljem ispitivanja elektrokemijskog ponašanja realnog sustava, dodatak prehrani, ispitan je utjecaj različitog razrjeđenja (DF) koji je iznosio 100, 50, 40, 25, 10 i 5 (**Slika 11**) na diferencijalnih pulsni voltamogram uzorka dodatka prehrani na komercijalnoj „*screen printed*“ elektrodi u 0.1 mol L⁻¹ acetatnom puferu pH 4. Iz prikaza DP voltamograma realnog uzorka uočava se opadanje anodnog strujnog odziva povećanjem razrjeđenja ispitane otopine odnosno najniži strujni odziv prisutan je pri DF 100, a najviši pri DF 5 te je stoga izabran za daljnju analizu DF 10 (**Slika 12**). Na **Slici 12** prikazan je DP voltamogram uzorka dodatka prehrani te se uočava jedan jasno izraženi anodni pik pri potencijalu 1,05 V kao što se uočava i na DP voltamogramu standarda kafeina (**Slika 7**).

Nadalje, ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na DP voltamogram uzorka dodatka prehrani te se uočava jednaka pojava kao i kod DP voltamograma standarda kafeina (**Slika 8**) odnosno u drugoj i trećoj polarizaciji primjećuje se opadanje strujnog odziva i pomak elektrodnog potencijala prema nižim vrijednostima što vjerojatno upućuje na nastanak oksidacijskih produkata na površini radne elektrode i otežanu difuziju molekula iz ispitivane otopine prema površini elektrode.

Zatim, da bi se provela identifikacija kafeina i potvrdila njegova prisutnost u uzorku provedeno je obogaćivanje realnog uzorka s poznatom koncentracijom standarda kafeina ($c = 1,92 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹). Na **Slici 14** prikazani su DP voltamogrami realnog uzorka prije i nakon dodatka standarda kafeina te se jasno uočava značajni porast anodnog strujnog odziva realnog uzorka nakon dodatka standarda kafeina, dok se potencijal pika (1,05 V) vrlo malo pomakao prema pozitivnim vrijednostima (oko 2-3 mV). Pomak potencijala oksidacije vjerojatno je posljedica adsorpcije oksidacijskih produkata na površini radne elektrode. Iz DP voltamograma prikazanih na **Slici 14** može se zaključiti da se anodni strujni odziv nedvojbeno odnosi na oksidaciju kafeina prisutnog u uzorku dodatka prehrani.

Kreirana kalibracijska krivulja i jednadžba pravca primijenjeni su na određivanje sadržaja kafeina u realnom uzorku. Deklarirani sadržaj kafeina u ispitanom uzorku dodatka prehrani iznosi 200 mg. Primjenom diferencijalne pulsne voltometrije dobiveni sadržaj ispitanog uzorka iznosi $188 \pm 2,2$ mg / tableti dodatka prehrani te je dobiveni sadržaj kafeina u dodatku prehrani u skladu s deklariranim sadržajem. Diferencijalna pulsna voltometrija pokazala se primjenjiva za karakterizaciju elektrokemijskog ponašanja kafeina i identifikaciju i kvantifikaciju u realnom uzorku. Također, su potrebna daljnja istraživanja i usporedba rezultata diferencijalne pulsne voltometrije primijenjene na elektrokemijsko ponašanje s drugim elektrokemijskim i instrumentalnim tehnikama.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi istraživanja provedenih u ovom diplomskom radu može se zaključiti:

- Ispitivana elektrokemijska svojstva kafeina primjenom diferencijalne pulsne voltometrije pokazala su da primijenjeni elektrokemijski uvjeti: pH vrijednost osnovnog elektrolita, višestruka uzastopna polarizacija i koncentracija analita utječu na elektrokemijsko ponašanje kafeina.
- Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na diferencijalne pulsne voltamograme kafeina se uočava u opadanju strujnog odziva i malom pomaku potencijala u drugoj i trećoj polarizaciji prema pozitivnijim vrijednostima zbog nastanka oksidacijskih produkata tijekom polarizacija na površini radne elektrode.
- Mehanizam elektrokemijske oksidacije otopine kafeina je proces oksidacije pri izmjeni četiri protona i četiri elektrona ($4 \text{ H}^+ - 4 \text{ e}^-$).
- Kalibracijska krivulja otopine kafeina kreirana je na osnovi ovisnosti množinske koncentracije o anodnom strujnom odzivu u rasponu koncentracija od 5 do 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ te se uočava linearni porast anodnog strujnog odziva povećanjem koncentracije analita ($\text{LOD} = 15,8 \mu\text{mol L}^{-1}$).
- Ispitani utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na DP voltamograme uzorka dodatka prehrani pokazuje jednaku pojavu kao i kod DP voltamograma standarda kafeina (opadanje strujnog odziva i pomak elektrodnog potencijala prema nižim vrijednostima).
- Obogaćivanjem uzorka dodatka prehrani s poznatom koncentracijom standarda kafeina provela se identifikacija kafeina te se uočava jasno izražen anodni strujni odziv nakon dodatka standarda kafeina koji se nedvojbeno odnosi na oksidaciju kafeina prisutnog u uzorku dodatka prehrani.
- Primjenom diferencijalne pulsne voltometrije dobiveni sadržaj ispitanog uzorka iznosi $188 \pm 2,2 \text{ mg / tableti}$ dodatka prehrani te je dobiveni sadržaj kafeina u dodatku prehrani u skladu s deklariranim sadržajem (200 mg / tableti).
- Diferencijalna pulsna voltometrija pokazala se primjenjiva za karakterizaciju elektrokemijskog ponašanja kafeina i identifikaciju i kvantifikaciju u realnom uzorku.

7. LITERATURA

- Abbood A, Aldiab D: HPLC determination of caffeine in some beverages and pharmaceutical dosage forms available in Syrian market. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* 10: 1174-1179, 2017.
- Bhawani Showkat A, Fong SS, Mohamad Nasir MI: Spectrophotometric Analysis of Caffeine. *International Journal of Analytical Chemistry* 2015: 1-2, 2015.
- Bispo MS, Veloso MCC, Pinheiro HLC, DE Oliveira RFS, Reis JON, De Andrade JB: Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatographic science* 40: 45–48, 2002.
- Burge LJ, Raches DW: Determination of caffeine by HPLC with UV detector, J. Liquid Chromatogr. *Related Technology* 26: 1977-1990, 2003.
- Cabrera C, Gimenez R, Lopez CM: Caffeine contents in different food products, J. Agric. *Food Chem* 51: 4427-4435, 2003.
- Campean A, Tertis M, Sandulescu R: Voltammetric determination of some alkaloids and other compounds in pharmaceuticals and urine using an electrochemically activated glassy carbon electrode. *Central European Journal of Chemistry*, 9 (4): 33-340, 2011.
- Carrillo, J, Benitez, J: Clinically Significant Pharmacokinetic Interactions between Dietary Caffeine and Medications. *Clinical Pharmacokinetics* 39: 127-153, 2000.
- Chambers Kenneth, P: *Caffeine and health research*. Nova Biomedical, New York, 2009.
- Corciova A, Ivanescu B: Determination of caffeine content from different pharmaceutical and natural products. *Section C-Research paper* 5 (4): 138-141 2014.
- Grujić Letić N, Rakić B, Šefer E, Milanović M, Nikšić M, Vujić I, Milić N: Quantitative determination of caffeine in different matrices. *Macedonian pharmaceutical bulletin* 62 (1): 77 – 84, 2016.
- Hansen BH, Dryhurst G: Electrochemical oxidation of Theobromine and Caffeine at the Pyrolytic graphite electrode. *Electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry* 30: 407-416, 1970.
- Madhusudhan, SK: Novel analgesic combination of tramadol, paracetamol, caffeine and taurine in the management of moderate to moderately severe acute low back pain. *Journal of Orthopaedics* 10: 144-148, 2013.

- Motora KG, Beyene TT: Determination of caffeine in raw and roasted coffee beans of ilu abba bora zone, south west Ethiopia. *Indo American Journal of pharmaceutical research* 7: 463-469, 2017.
- Nehlig A: Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and behavioral reviews* 23: 563–576, 1999.
- Norton, TR, Lazev, AB, Sullivan, MJ: The 'Buzz' on Caffeine: Patterns of Caffeine Use in a Convenience Sample of College Students. *Journal of Caffeine Research* 1, 35– 40, 2011.
- Nour V, Trandafir I, Ionica ME: Quantitative determination of caffeine in carbonated beverages by an HPLC method. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 14: 123-127, 2008.
- Patil NP: Caffeine in various samples and their analysis with HPLC – A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 16: 76-83, 2012.
- Paxeus N, Schroder HF: Screening for non-regulated organic compounds in municipal waste in Goteberg, Sweden. *Water Science and Technology* 33: 9-15, 1996.
- Piljac I: *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*. Media Print, Zagreb, 2010.
- Pollak L: Dodaci prehrani i hrana za posebne prehrambene potrebe. *Medicus* 17 (1): 47 – 55, 2008.
- Preedy VR: *Caffeine: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. RSC Publishing, London, 2012.
- Redivo L, Stredansky M, Angelis E, Navarini L, Resmini M, Švorc L: Bare carbon electrodes as simple and efficient sensors for the quantification of caffeine in commercial beverages. *Royal society open science* 5: 5, 2018.
- Sawynok, J: Caffeine and pain. *Pain* 152: 726-729, 2010.
- Seiler, RL, Zaugg, SD, Thomas JM, Howcrof DL: Caffeine and Pharmaceuticals as Indicators of Waste Water Contamination in Wells. *Groundwater* 37, 405-410, 1999.
- Sontag G, Kral K: Voltammetrische Bestimmung von Coffein in Kaffee, Tee und coffeinhaltigen Getränken. *Mikrochimica Acta* 1: 229-240, 1979.

- Spataru N, Sarada BV, Tryk DA, Fujishima A: Anodic Voltammetry of Xanthine, Theophylline, Theobromine and Caffeine at Conductive Diamond Electrodes and Its Analytical Application. *Electroanalysis* 14: 721-728, 2002.
- Spiller GA: *Caffeine*. CRC Press, Boca Raton, 1998.
- Svilaas A, Sakhi AK, Andersen LF, Svilaas T, Strom EC, Jacobs JDR, Ose L, Blomhoff R: Intake of antioxidants in coffee; wine and vegetables are correlated with plasma carotenoids in human. *Journal of the American College of Nutrition* 134: 562-567, 2004.
- Straube, A, Aicher, B, Fiebich, BL, Haag, G: Combined Analgesics in (headache) Pain Therapy: Shotgun Approach or Precise Multi-Target Therapeutics? *BMC Neurology* 11: 43, 2011.
- Švorc L: Determination of Caffeine: A Comprehensive Review on Electrochemical Methods. *International Journal of Electrochemical Science* 8: 5755-5773, 2013.
- Tadesse Y, Tedesse A, Saini RC, Pal R: Cyclic Voltammetric Investigation of Caffeine at Anthraquinone Modified Carbon Paste Electrode. *International Journal of Electrochemistry*, 2013. (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/849327>) (16.8.2020.)
- Taletović A, Banjanin B, Poljaković M, Srabović M, Vuković S: Optimizacija izolacije, identifikacija kofeina iz različitih supstrata. Časopis Farmaceutsko zdravstvenog fakulteta univerziteta u Travniku, 15-22. Vox Scientiae PHARM-HEALTH, FZF Travnik, 2014.
- Textor Z, Beer M, Anetseder M, KoStler H, Kagerbauer E, Kenn W, Hahn D, Roewer N: Caffeine impairs intramuscular energy balance in Patients. *Muscle & Nerve* 28: 353- 358, 2003.
- Torres AC, Barsan MM, Brett C: Simple electrochemical sensor for caffeine based on carbon and Nafion-modified carbon electrodes. *Food Chemistry* 149: 215-220, 2013.
- Venkatesh S, Swamy MM, Reddy YSR, Suresh B, Sethuraman M: A simple method for determination of caffeine content in tea samples. *Ancient Science of Life* 105: 35-38, 1994.
- Zen JM, Ting YS, Shihm Y: Voltammetric determination of caffeine in beverages using a chemically modified electrode. *Analyst* 123: 1145-7, 1998.
- WEB 1: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Kofein> (16.8.2020.)

WEB 2: <https://nutriofit.hr/kofein-kao-dodatak-prehrani/> (16.8.2020.)