

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných látek v různých fázích pražení kávy
Michaela Zimová

Diplomová práce
2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Zimová**
Osobní číslo: **C21442**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Stanovení vybraných látek v různých fázích pražení kávy**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši týkající se složení a výroby kávy. Dále se zaměřte na fyzikálně chemické vlastnosti 5-hydroxymethylfurfuralu, furfuralu, maltolu, 2-furylmethylketonu, 5-methylfurfuralu, glukózy, fruktózy a sacharózy a jejich kvantitativní analýzy s využitím moderních separačních technik.
2. Optimalizujte podmínky pro analýzu vybraných derivátů furanu pomocí separační techniky RP-HPLC s DAD.
3. Optimalizujte podmínky pro analýzu glukózy, fruktózy a sacharózy separační technikou HPLC s RI detekcí.
4. Nalezené optimální podmínky aplikujte pro stanovení obsahu výše uvedených látek ve vzorcích kávy při různém stupni pražení a při různém způsobu její přípravy.
5. Dosažené výsledky porovnejte a vyhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Soňa Řezková, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultanti diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Ing. Michal Kašpar
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení vybraných látek v různých fázích pražení kávy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2023

Michaela Zimová v.r.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Soně Řezkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu při jejím zpracování. Dále bych chtěla poděkovat konzultantům doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. a Ing. Michalovi Kašparovi za rady, pomoc a ochotu při zpracování práce. Také bych chtěla poděkovat pražárně ZRNO44 za poskytnuté vzorky a milou spolupráci. Poděkování patří také mé rodině za podporu, pomoc a umožnění mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá stanovením furanických látek a maltolu v různých fázích pražení kávy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD detektorem. Pozornost je věnována také sacharidům, které byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickým detektorem. K analýze byly použity komerčně dostupné vzorky zrnkové a instantní kávy a také vzorky kávy odebírané v určitých časových intervalech během pražení.

KLÍČOVÁ SLOVA

káva, furanické látky, sacharidy, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

TITLE

Determination of selected substances in different stages of coffee roasting

ANNOTATION

The diploma thesis is focused on the determination of furanic substances and maltol in different stages of coffee roasting using high-performance liquid chromatography with DAD detector. Attention is also paid to carbohydrates which were determined using high-performance liquid chromatography with refractometric detector. Commercially available bean and instant coffee samples as well as coffee samples taken at specific time intervals during roasting were used for the analysis.

KEYWORDS

coffee, furanic substances, carbohydrates, high-performance liquid chromatography

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
SEZNAM TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	11
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
1.1 Kávovník.....	14
1.1.1 Plody kávovníku.....	15
1.1.2 Složení kávových zrn.....	15
1.2 Technologie zpracování kávy.....	19
1.2.1 Technologie instantní kávy.....	22
1.3 5-hydroxymethylfurfural.....	23
1.4 2-furaldehyd (furfural).....	24
1.5 2-furylmethylketon (2-acetylfuran).....	25
1.6 5-methylfurfural (5-methylfuran-2-karbaldehyd).....	26
1.7 Maltol.....	26
1.8 Analýza furanických látek v potravinách.....	27
1.9 Sacharidy.....	28
1.9.1 Glukóza.....	28
1.9.2 Fruktóza.....	29
1.9.3 Sacharóza.....	30
1.9.4 Analýza sacharidů v potravinách.....	30
2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	32
2.1 Chromatografie v systémech s obrácenými (převrácenými) fázemi.....	35
2.2 Chromatografie v systémech s normálními fázemi.....	36
2.3 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC).....	36
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37

3.1	Přístroje a zařízení	37
3.2	Chemikálie	37
3.3	Analyzované vzorky	38
3.4	Pracovní postupy.....	39
3.4.1	Úprava vzorku k analýze	39
3.4.2	Stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu metodou HPLC-DAD	39
3.4.3	Stanovení vybraných sacharidů metodou HPLC-RI.....	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
4.1	Optimalizace HPLC-DAD metody	42
4.2	Optimalizace HPLC-RI metody.....	45
4.3	Volba podmínek úpravy vzorku	46
4.3.1	Typ rozpouštědla a teplota extrakce.....	46
4.3.2	Doba extrakce	47
4.3.3	Hrubost mletí	48
4.3.4	Navážka	49
4.3.5	Opakovatelnost extrakce.....	50
4.4	Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu.....	51
4.4.1	Stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu u komerčních vzorků	51
4.4.2	Stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu při procesu pražení.....	54
4.5	Výsledky stanovení sacharidů.....	58
	ZÁVĚR	60
5	POUŽITÁ LITERATURA	62
6	PŘÍLOHY	73

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Řez kávovou třešní	15
Obrázek 2 – Přeměna sacharózy během procesu pražení kávových zrn	16
Obrázek 3 – Kofein.....	18
Obrázek 4 – Porovnání tvaru zrn arabiky a robusty	22
Obrázek 5 – HMF	23
Obrázek 6 – Furfural.....	24
Obrázek 7 – 2-furylmethylketon.....	25
Obrázek 8 – 5-methylfurfural	26
Obrázek 9 – Maltol	26
Obrázek 10 – Glukóza	29
Obrázek 11 – Fruktóza.....	29
Obrázek 12 – Sacharóza	30
Obrázek 13 – Schéma kapalinového chromatografu	32
Obrázek 14 – Detektor s diodovým polem	35
Obrázek 15 – Chromatogram kalibrační směsi standardů o koncentraci 10 mg/l naměřený finální metodou (dávkový objem 3 μ l; vlnová délka 280 nm).....	42
Obrázek 16 – Chromatogram vzorku Z16 naměřený finální metodou (dávkový objem 3 μ l; vlnová délka 280 nm)	43
Obrázek 17 – Chromatogram vzorku Z16 naměřený finální metodou (dávkový objem 0,3 μ l; vlnová délka 264,8 nm)	45
Obrázek 18 – Chromatogram kalibrační směsi standardů sacharidů 9g/l.	46
Obrázek 19 – Výsledky optimalizace volby rozpouštědla a teploty extrakce vyjádřené jako průměr celkové plochy vybraných látek ze dvou měření.	47
Obrázek 20 – Výsledky optimalizace doby extrakce vyjádřené jako průměr celkové plochy vybraných látek ze dvou měření.	48
Obrázek 21 – Závislost relativní koncentrace na době pražení furanických látek a maltolu (arabika).....	57
Obrázek 22 – Závislost relativní koncentrace na době pražení furanických látek a maltolu (robusta).....	57
Obrázek 23 – Závislost relativní koncentrace na době pražení sacharidů v arabice a robustě	59

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Taxonomie kávovníku	14
Tabulka 2 – Porovnání obsahu látek v zelených a pražených kávových zrnech	16
Tabulka 3 – Obsah kofeinu v sušině v různých druzích kávy.....	18
Tabulka 4 – Vlastnosti HMF	23
Tabulka 5 – Obsah HMF v potravinách.....	24
Tabulka 6 – Vlastnosti furfuralu	25
Tabulka 7 – Vlastnosti 2-furylmethylketonu	25
Tabulka 8 – Vlastnosti 5-methylfurfuralu.....	26
Tabulka 9 – Vlastnosti maltolu	27
Tabulka 10 – Vlastnosti glukózy.....	29
Tabulka 11 – Vlastnosti fruktózy	29
Tabulka 12 – Vlastnosti sacharózy	30
Tabulka 13 – Vlastnosti kolon používaných v HPLC.....	33
Tabulka 14 – Seznam vzorků káv	38
Tabulka 15 – Podmínky měření HPLC-DAD.....	40
Tabulka 16 – Podmínky měření HPLC-RI	40
Tabulka 17 – Hodnoty retenčních časů pro ověření identifikace vybraných látek a hodnoty LOD a LOQ	44
Tabulka 18 – Limity LOD a LOQ pro jednotlivé sacharidy.....	45
Tabulka 19 – Plochy jednotlivých látek pro optimalizaci hrubosti mletí	48
Tabulka 20 – Plochy jednotlivých látek pro optimalizaci navážky vzorku	49
Tabulka 21 – Opakovatelnost extrakce vyjádřená jako RSD ploch píků pro tři různá opakování	50
Tabulka 22 – Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu ve vzorcích zrnkové a instantní kávy.....	52
Tabulka 23 – Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu ve vzorcích kávy v různých stupních pražení (arabika).....	55
Tabulka 24 – Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu ve vzorcích kávy v různých stupních pražení (robusta).....	55
Tabulka 25 – Výsledky stanovení sacharidů v různých stupních pražení (arabika).....	58
Tabulka 26 – Výsledky stanovení sacharidů v různých stupních pražení (robusta).....	58

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2-FMK – 2-furylmethylketon

5-MF – 5-methylfurfural

ACN – acetonitril

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

BSTFA – N,O-*bis*-trimethylsilyltrifluoroacetamid

CAD – detektor nabitého aerosolu

CGA – chlorogenová kyselina

DAD – detektor s diodovým polem

ELSD – aerosolový detektor rozptylu světla

F – furfural

GC – plynová chromatografie

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

HILIC – hydrofilní interakční chromatografie

HMF – 5-hydroxymethylfurfural

HMFA – kyselina 5-hydroxymethyl-2-furoová

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IARC – Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

IUPAC – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii

K – kofein

LC – kapalinová chromatografie

LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

M – maltol

NP-HPLC – chromatografie v systémech s normálními fázemi

PTFE – polytetrafluorethylen

RI – refraktometrický detektor

RP-HPLC – chromatografie v systémech s obrácenými fázemi

RSD – relativní směrodatná odchylka

SD – směrodatná odchylka

SEC – chromatografie prostorové výluky

UHPLC – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

USA – Spojené státy americké

UV – ultrafialové záření

ÚVOD

Káva je nápoj připravovaný z upražených a čerstvě namletých kávových zrn rostliny zvané kávovník (*Coffea*) a zalitý vodou o teplotě přibližně 90 °C. Vzhledem ke své výrazné chuti, vůni a povzbuzujícím účinkům na lidský organismus se řadí mezi nejoblíbenější a nejkonsumovanější nápoje po celém světě.

Pražením dochází ke vzniku kontroverzního 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF), jehož deriváty jsou předmětem výzkumů kvůli potenciálním karcinogenním a mutagenním účinkům. Množství HMF v kávě oproti například medu není dán normami. Kromě HMF během pražení vzniká také akrylamid, který se již objevuje dle IARC mezi karcinogeny pro člověka a jeho množství jsou v pražené i instantní kávě kontrolovány. Při pražení zelených kávových zrn dochází k Maillardovým reakcím, to jsou reakce mezi redukujícími sacharidy a aminokyselinami, bílkovinami a peptidy.

Cílem diplomové práce bylo najít optimální podmínky pro analýzy furanických látek, maltolu a sacharidů a následně tyto látky identifikovat a kvantifikovat v reálných vzorcích zrnkových, instantních káv a také ve vzorcích arabiky a robusty v různých fázích pražení.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kávovník

Zelená kávová zrna jsou obsažena v ovoci ze stromů a keřů zvaných kávovník. Jedná se o vytrvalou a stále zelenou rostlinu. Životní cyklus obvykle trvá 10 až 15 let, ale produkce ovoce klesá podstatně dříve, proto musí být na plantážích stromy pravidelně obnovovány. Pěstují se v tropických oblastech, jako je rovníková Afrika, Jáva, Sumatra a další ostrovy Nizozemské východní Indie, Západní Indie, Indie, Arábie, ostrovy Tichého oceánu, Mexika a Střední a Jižní Ameriky [1]. Taxonomie kávovníku je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1 – Taxonomie kávovníku [1]

Oddělení	Krytosemenné
Třída	Dvouděložné
Řád	Hořcotvaré
Čeleď	Mořenovité
Rod	Kávovník
Druhy	kávovník arabský kávovník robusta kávovník liberijský a další

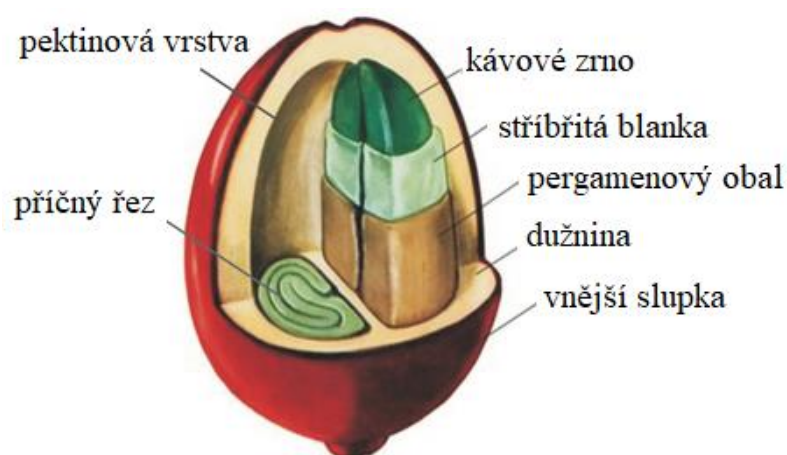
První kávovníky byly objeveny již v 16. století, větší pozornost si ovšem tyto rostliny získaly až v druhé polovině 19. století, kdy se o ně začali zajímat badatelé a botanici z celého světa [1].

V rámci rodu *Coffea* je známo přes 100 druhů, 25 druhů bylo podrobně zkoumáno a pouze dva mají výrazný obchodní význam: *Coffea arabica* a *Coffea canephora* (robusta). Káva arabika představuje přibližně 60 % světové roční produkce a má vyšší cenu než robusta, která tvoří přibližně 40 % roční produkce. Větší oblíbenost kávy arabika je zřejmě způsobena nižším obsahem kofeinu a vynikajícím aroma [1,2,3].

Vzhledem k rozdílným podmínkám pěstování a způsobu zpracování lze pozorovat určité rozdíly mezi arabikou a robustou. Arabika se pěstuje ve vyšších nadmořských výškách, mírných teplotách (cca 15 až 24 °C), má sladkou květinovou chuť a stromy dosahují výšky 6 metrů. Robusta, která je odolnější vůči chorobám a škůdcům, roste v rovinných teplejších oblastech (24 až 29 °C), má slabou chuť, někdy výraznou hořkost a stromy rostou přibližně do výšky 10 metrů [1,4,5,6].

1.1.1 Plody kávovníku

Plody kávovníku jsou 10 až 15 mm dlouhé bobule, nazývané také třešně, obsahující dvě semena (kávová zrna). U nezralých kávových plodů bývá slupka zbarvena zeleně, zralé kávové plody se zbarvují do červenofialové nebo tmavě červené barvy. Jsou tvořeny slupkou (epikarp nebo exokarp), dužinou (mezokarp), pektinovou vrstvou (bezbarvou, tenkou, viskózní a vysoce hydratovanou vrstvou slizu), nažloutlým pergamenem (endokarp), stříbřitou blankou a zrny s rozdílnou morfologií a vlastnostmi (viz. Obrázek 1). Kávové plody jsou bohaté na vlákninu, fytochemické sloučeniny a živiny, ovšem 90 % z nich se během zpracování ztrácí [1,7,8].



Obrázek 1 – Řez kávovou třešní [9]

1.1.2 Složení kávových zrn

Složení zelených kávových zrn, které následně určuje vlastnosti a kvalitu kávy, závisí na druhu kávovníku, podmínkách pěstování, stupni zralosti při sklizni, způsobu sklizně a neposlední řadě také na způsobu zpracování [8].

Během procesu pražení dochází ke změnám chemických, fyzikálních a sensorických vlastností kávových zrn. Tyto změny jsou způsobeny po sobě jdoucími reakcemi včetně Maillardovy reakce, rozkladu cukru (karamelizace) a oxidace lipidů [10].

Složení zelených i pražených kávových zrn tedy nelze přesně vyjádřit. Běžně se vyskytující látky včetně jejich přibližného obsahu v zelených a pražených kávových zrnech zobrazuje následující tabulka.

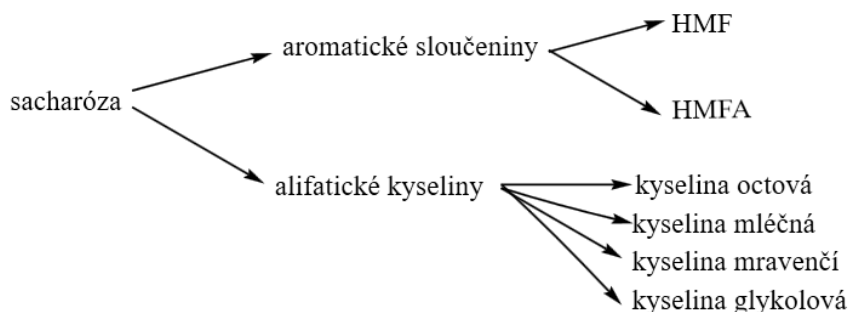
Tabulka 2 – Porovnání obsahu látek v zelených a pražených kávových zrnech [11]

Složka	Arabika		Robusta	
	zelená kávová zrna	pražená kávová zrna	zelená kávová zrna	pražená kávová zrna
Polysacharidy	50,0 – 55,0	24,0 – 39,0	37,0 – 47,0	–
Oligosacharidy	6,0 – 8,0	0 – 3,5	5,0 – 7,0	0 – 3,5
Lipidy	12,0 – 18,0	14,5 – 20,0	9,0 – 13,0	11,0 – 16,0
volné aminokyseliny	2,0	0	2,0	0
Bílkoviny	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0
CGA	5,5 – 8,0	1,2 – 2,3	7,0 – 10,0	3,9 – 4,6
Kofein	0,9 – 1,2	0 – 1,0	1,6 – 2,4	0 – 2,0
Trigonelin	1,0 – 1,2	0,5 – 1,0	0,6 – 0,8	0,3 – 0,6
mastné kyseliny	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5
minerální látky	3,0 – 4,2	3,5 – 4,5	4,0 – 4,5	4,6 – 5,6
Melanoidiny	–	16,0 – 17,0	–	16,0 – 17,0

Hodnoty jsou uvedeny v % suché hmotnosti.

Sacharidy tvoří až 60 % zelených kávových zrn. 34 % až 53 % tvoří převážně nerozpustné polysacharidy (mannan, škrob, celulóza, pektiny), 6% až 12% rozpustné sacharidy. Největší zastoupení má sacharóza, která tvoří až 9 % sušiny. Dalšími cukry jsou glukóza a fruktóza a vyskytovat se může také galaktóza, arabinóza, rafinóza a polymery galaktózy, manózy, arabinózy a glukózy [12].

Sacharóza se procesem pražení mění na alifatické kyseliny, furany a aldehydy, které ovlivňují chuť kávy (viz. Obrázek 2).



Obrázek 2 – Přeměna sacharózy během procesu pražení kávových zrn [11]

Kromě sacharózy degradují také další sacharidy, především glukóza a fruktóza a v kávových nápojích se mohou nacházet pouze ve stopových množstvích. V instantní kávě se z hlediska nízkomolekulárních sacharidů vyskytují především arabinóza, galaktóza a manóza [12].

V zelené kávě jsou obsaženy netěkavé alifatické kyseliny (kyselina citronová, jablečná) a těkavé kyseliny (kyselina octová, propanová, butanová, isovalerová, hexanová a dekanová). Z fenolických sloučenin se vyskytují především kyselina chlorogenová (CGA) a její deriváty. V nižším obsahu se v kávových zrnech z hlediska fenolických látek vyskytují třísloviny, lignany a antokyany [5,8,11,12]. Lipidy jsou zastoupeny triacylglyceroly, esterifikovanými dipeptidy, volnými mastnými kyselinami, volnými diterpeny, steroly, tokoferoly a fosfolipidy [13]. Další složkou jsou aminokyseliny, bílkoviny a minerály draslík, hořčík, vápník, železo, zinek, sodík [14,15,16].

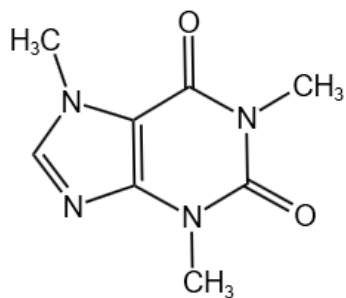
Při pražení dochází k reakcím (Maillardovy reakce, karamelizace, Streckerova degradace aj.), při kterých dochází k rozpadu sacharidů, aminokyselin, trigonellinu, části kyseliny chinové, karotenoidů a minoritních lipidů a vzniku těkavých látek aldehydů, furanů, pyrazinů, ketonů, alkoholů, esterů, sloučeniny obsahující síru (2-furfurylthiol) a guaiacol [11,17,18].

Z furanů má největší obsah 5-hydroxymethylfurfural. Jeho množství v kávě je dáno typem kávových zrn, teplotou a dobou pražení [19]. Během pražení dochází také k tvorbě akrylamidu, který se vyskytuje ve větším množství v robustě než v arabice. Během skladování ovšem jeho obsah v kávě klesá [8]. Nejvyšších koncentrací dosahuje akrylamid na začátku procesu pražení kávy, kdy v této fázi dochází ke spotřebování volného asparaginu. V případě pražené kávy nesmí množství akrylamidu překročit 400 µg/kg a u instantní kávy se hranice pohybuje kolem 800 µg/kg [20].

Hlavním alkaloidem v kávových zrnech, ať zelených či pražených je kofein.

Kofein

Kofein neboli 1,3,7-trimethylxantin, vzorec je znázorněn na obrázku 3. Jeho obsah se liší v závislosti na druhu kávy. Jedná se o psychoaktivní drogu.



Obrázek 3 – Kofein

Kofein je nositelem hořkosti, zvyšuje bdělost stimulací centrálního nervového systému a krevní tlak, zrychluje dýchání, zlepšuje náladu, zvyšuje výkonnost a zmírňuje příznaky spojené s Parkinsonovou chorobou a třesy. Nadměrná konzumace kávy resp. kofeinu má i negativní účinky na zdraví člověka, například nespavost, úzkost, neklid, napětí, nervozitu, vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění nebo případnou závislost na kofeinu. Především kvůli závislosti na kofeinu vznikla snaha připravit bezkofeinovou kávu [8,21].

Tento alkaloid se zcela vstřebává 45 minut po perorálním požití v žaludku a tenkém střevě. Poločas rozpadu kofeinu u dospělého člověka je přibližně 2,5 až 4,5 hodiny [22,23].

Obsah kofeinu v jednotlivých druzích kávy popisuje následující tabulka.

Tabulka 3 – Obsah kofeinu v sušině v různých druzích kávy [6]

Druh kávy	Obsah kofeinu v sušině
Káva pražená	nejméně 0,6 %
Instantní káva	nejméně 2,5 %
Káva pražená bez kofeinu	nejvíce 0,1 %
Káva instantní bez kofeinu	nejvíce 0,3 %

Mikrobiologie kávových třešní

Kávové třešně mohou být kontaminovány celou řadou mikroorganismů včetně toxinogenních druhů. Nejběžnějšími přirozenými kontaminanty kávy jsou *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, které se vyskytují během pěstování, zpracování, přepravy i skladování. Mají-li tyto kontaminanty vhodné podmínky jako je dostatečná teplota a vlhkost, produkují škodlivé mykotoxiny [24].

K tvorbě mykotoxinů dochází nejčastěji po sklizni a zdrojem plísní může být půda, povrchy a zařízení v sušárně. Výskyt mykotoxinů lze ovšem eliminovat dodržováním posklizňových

postupů a využitím pouze kvalitních kávových plodů. Doporučuje se, aby zelená kávová zrna arabiky obsahovala maximálně 12-14 % vlhkosti, relativní vlhkost mezi 50 a 75 % a aby teplota byla nižší než 26 °C [24].

1.2 Technologie zpracování kávy

Sklizeň

Velmi důležitým krokem pro získání kvalitních plodin kávy je sklizeň zralých kávových třešní. V případě sklizně nezralých nebo naopak přezralých třešní jsou výsledkem nekvalitní a vadná kávová zrna. Jelikož kávové třešně nedozrávají ve stejný čas, se sběrem kávových třešní je vhodné začít, jakmile je již většina zralá [1,25].

Sklizeň může být realizována dvěma způsoby, ručně nebo mechanicky. Ručně lze sbírat jednu kávovou třešeň za druhou nebo stříhat větvičky. Mechanická sklizeň spočívá v třesení stromem pomocí stroje s mechanickými vibracemi. Ruční sběr se jeví jako časově náročnější a vyžaduje více pracovních sil, ovšem přináší kvalitnější výběr kávových třešní [1,25].

Mezi nejvýznamnější vady ovlivňující kvalitu kávy patří nezralé, černé, kyselé kávové třešně nebo kávové třešně poškozené hmyzem či mechanicky. Nutností je taktéž zamezit kontaminaci a růstu mikroorganismů především plísní, a to nejen během samotné sklizně, ale také přisušení a skladování kávových zrn. Kontaminace má vliv nejen na sensorickou kvalitu kávového nápoje, ale také v případě produkce mykotoxinů může negativně ovlivnit lidské zdraví [1,25].

Zpracování kávových zrn

Po sklizni prochází plody primárním zpracováním, zrna jsou oddělena od zbytku plodu a následně se třídí dle počtu a druhu vad, velikosti atd [1]. V případě kávy lze rozlišit dva způsoby zpracování, a to suché a mokré. Způsob zpracování zelené kávy má zásadní vliv na výsledné sensorické vlastnosti. Lepším aroma, vyšším obsahem chlorogenové kyseliny, trigonelinu a nižším obsahem sacharózy se vyznačuje káva zpracovaná mokřím způsobem [8].

Suché zpracování

Suché zpracování spočívá v sušení sklizených kávových třešní na slunci, následované mechanickým loupáním a odstraněním slupky, dužiny, slizu, pergamenu a je-li to možné, tak i stříbřité blanky [8]. Suchý způsob zpracování se využívá především v Brazílii a Africe a produktem suchého zpracování je „přírodní“ zelená káva [1].

Mokrý způsob zpracování

Mokrý způsob zpracování představuje sofistikovanější postup s tendencí vytvářet kvalitnější kávový nápoj [1]. U tohoto způsobu zpracování se poškozené a nezralé plody oddělí ve vodě flotací od zralých plodů, které se potopí. Z potopených plodů se slupka a většina dužiny mechanicky odstraní ve vodě lisováním přes síto (pomocí rozvlákňovače). Následně se odstraňují zbytky dužiny a také sliz tzv. „řízenou“ fermentací, která probíhá 12 až 48 hodin mytím v betonových nádržích, nebo mechanickým drhnutím (aquapulping) [8].

Během fermentačního kroku dochází k hydrolýze slizu enzymy a mikroorganismy nacházejícími se na slupkách plodů. Tyto mikroorganismy mají vliv na konečnou kvalitu kávových zrn [8]. Zrna se suší buď na dvorcích nebo na stolech, či lze využít kombinaci se sušením horkým vzduchem. Mokrý způsob zpracování se využívá v místech, kde se kávové třešně sklízí ručně, například v Kolumbii, Asii a Střední Americe [1].

Hlavním rozdílem mezi suchým a mokrým způsobem zpracování je ten, že při mokrém zpracování je většina částí, které tvoří kávovou třešň odstraněno kromě stříbřité slupky před sušením. Stříbřitá slupka se odstraňuje až během procesu fermentace a po něm [1]. Při mokrém zpracování se využívají zralé červené kávové třešně, naopak při suchém zpracování se používají kávové třešně v různých stupních zralosti. Zároveň mokrý způsob zpracování kávových třešní vyžaduje větší pečlivost a přesnost [26].

Bez ohledu na to, jaký způsob zpracování je využíván, je nezbytné kávová zrna vysušit. Během procesu sušení se obsah vody v kávových zrnech sníží z 50 % až na 12 %. V případě suchého zpracování probíhá sušení až tři týdny, u mokrého zpracování řádově několik dní [26].

Polosuchý způsob zpracování

Alternativní metodou vyvinutou v Brazílii může být polosuchá metoda zpracování, která kombinuje suchou a mokrou metodu zpracování. Spočívá v promytí, výběru plodů ve flotačních nádržích a využití rozvlákňovače jako u mokrého způsobu s absencí fermentačního kroku. Následně jsou kávová zrna skladována, tříděna ručně či mechanicky, případně oddělena od vadných zrn a připravena na pražení. Kávová zrna také mohou být zbavena kofeinu nebo před pražením ošetřena parou [1].

Pražení

Proces pražení lze považovat za vůbec nejdůležitějšího činitele při výrobě kávy. Pražení dává výsledné kávě komplexní vůni a chuť. Stupně pražení lze hodnotit posouzením barvy zrn okem, kolorimetrem nebo dle úbytku hmotnosti vody po pražení [11].

Kávová zrna se praží v pražicích strojích rozmanité konstrukce (horizontální či vertikální rotující bubny s lopatkami, vertikální rotující mísy nebo horizontální/vertikální fluidní lože) horkým vzduchem, který je zahříván plynem. Proces pražení probíhá za atmosférického tlaku [27,28].

Pražení zelených kávových zrn je možné rozdělit do tří základních stupňů, a to na světlé (230 °C po dobu 12 minut), střední (240 °C po dobu 14 minut) a tmavé (250 °C po dobu 21 minut). Kávová zrna jsou během procesu neustále promíchávána a je stále sledována teplota, vlhkost a barva kávových zrn [27,29]. Ve skutečnosti existuje až 10 různých stupňů pražení kávových zrn a to: Světlá skořice (Light Cinnamon), Skořice (Cinnamon), Nová Anglie (New England), Amerika (American), Světlé město (Light City), Město plus (City Plus), Střední (Medium), Plné město (Full City), Světlá Francie (Light French), Vídeň (Viennese), Francie (French), Itálie (Halian) a Španělsko (Spanish) [17].

Proces pražení je ale mnohem složitější a dá se vysvětlit pomocí tzv. teplotních fází. V první se odpařuje voda, volná i vázaná a tato fáze probíhá v teplotním rozmezí 20 až 130 °C. Vzrostli teplota nad 130 až 140 °C, kávová zrna začnou měnit svůj tvar, barvu, začnou bobtnat v procesu označovaném jako neenzymatické hnědnutí. Při zvyšování teplot na 140 až 160 °C se zvýší objem kávových zrn až dochází k vzniku trhlin a k jejich rozpadu. Zároveň během této fáze vznikají aromatické látky a také se snižuje obsah chlorogenové kyseliny. Při teplotách nad 180 až 190 °C vznikají látky odpovídající za aroma, barvu a chuť kávových zrn. Při teplotách v rozmezí 190 až 220 °C vznikají další aromatické látky (např. HMF), uvolňuje se voda a oxid uhličitý [29,30].

Jakmile jsou kávová zrna upražena, během 4-10 minut jsou na sítích nebo v chladicích bubnech schlazena studeným vzduchem. Následně se odstraní vadná zrna a kávová zrna namelou a balí, nejčastěji pod inertním plynem nebo vakuově [27].



Obrázek 4 – Porovnání tvaru zrn arabiky a robusty [31]

Pražení Torrefacto

Zvláštní typ pražení využívající se především v zemích jižní Evropy a jižní Ameriky je tzv. Torrefacto. Tento způsob pražení spočívá v přidání cukru do kávy robusta na konci procesu, aby došlo ke zhnědnutí kávového výluhu a zamaskování negativní chuti. Teplota pražení je vyšší než 200 °C, sacharóza se mění na karamel a tvoří kolem pražených zrn spálený film. Cukr se zde využívá k maskování nekvalitních a vadných zrn. Tento způsob pražení byl vynalezen proto, aby se zabránilo kažení kávy zamezením kontaktu kyslíku se zrny. Pražená káva Torrefacto má charakteristickou karamelovou chuť [11].

1.2.1 Technologie instantní kávy

K výrobě instantní kávy je třeba použít pražená kávová zrna. Jedná se ovšem o technologicky a finančně velmi náročný proces. Nejčastěji se k výrobě instantní kávy využívá směs, ve které převládá robusta nebo se instantní káva vyrábí pouze ze 100% robusty, hlavní roli hraje především cena.

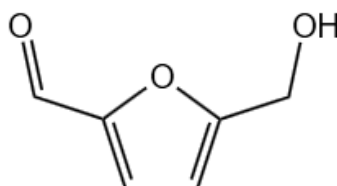
Základní surovinou pro výrobu instantní kávy je tekutý extrakt zpracovaný z pražené kávy a sušený sprejováním, aglomerováním nebo vymrazováním. Sušení kávového extraktu sprejováním spočívá ve stříkání kávového extraktu společně s horkým vzduchem do vysoké věže. Působením vysoké teploty dochází k odpaření vody a na dně věže se zachycuje usušený kávový prášek. Jedná se o poměrně snadný způsob přípravy instantní kávy, ovšem vlivem vysoké teploty může být ovlivněno výsledné aroma a chuť instantní kávy [6].

Sušení sprejováním dále následovala aglomerace neboli shlukování, kdy se k usušenému kávovému prášku přidá malé množství vody nebo kávového oleje a drobné částičky kávy se poslepují do granulí a vysuší.

Posledním způsobem výroby instantní kávy je sušení vymrazováním. Kávový extrakt je zmrazen na teplotu $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Využívá se proces lyofilizace neboli vakuové vymrazení spočívající v odstranění vlhkosti vakuem a jelikož nedochází k zahřívání směsi, výrobku zůstává jeho chuť a aroma. Výsledným produktem je mražením vysušená krystalická instantní káva [6].

1.3 5-hydroxymethylfurfural

5-hydroxymethylfurfural (HMF) s názvem dle IUPAC 5-(hydroxymethyl)furan-2-karbaldehyd je tvořen furanovým kruhem s aldehydovou a alkoholovou funkční skupinou [29]. Jedná se o krystalickou pevnou látku s charakteristickou vůní květů heřmánku [32].



Obrázek 5 – HMF

Tato látka je dobře rozpustná v běžných organických rozpouštědlech, například v methanolu, ethanolu, acetonu, ethylacetátu, dimethylformamidu, vodě. Dále je rozpustný také v etheru, benzenu, chloroformu a méně rozpustný v tetrachlormethanu a petroletheru [32].

Tabulka 4 – Vlastnosti HMF [29,32]

5-hydroxymethylfurfural	
molekulový vzorec	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$
molární hmotnost	126,11 g/mol
bod tání	$31,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
bod varu	$114 - 116\text{ }^{\circ}\text{C}$
hustota	$1,2062\text{ g/cm}^3$

Zatím není zařazen mezi karcinogeny, ovšem jeho metabolity, jmenovitě 5-sulfoxymethylfurfural a 5-chloromethylfurfural jsou intenzivně studovány pro svou potenciální karcinogenitu a genotoxicitu [33]. Také mohou způsobit rakovinu kůže a jater [34].

HMF je jedním z nejběžnějších meziproduktů Maillardovy reakce, dále vzniká jako jeden z produktů rozkladu kyseliny askorbové a využívá se k hodnocení intenzity zahřívání

při zpracování ovocných šťáv. Kromě toho je důležitým parametrem čerstvosti a kvality potravin a indikátorem nedostatečné doby nebo teploty skladování v různých potravinách [34].

Vysoký obsah 5-hydroxymethylfurfuralu obsahuje především pražená káva, brambůrky, hranolky a sušenky [33]. Tuto látku lze nalézt také v medu, balzamikovém octu, chlebu, obilovinách, ovocných šťávách, sušeném ovoci, džemu, sójové omáčce, vínu a pivu viz. tabulka 5. V čerstvých potravinách je ale jeho koncentrace nízká [35,36].

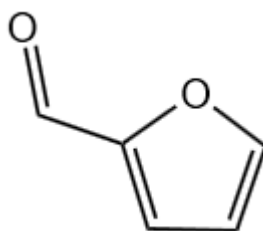
Tabulka 5 – Obsah HMF v potravinách [36]

Potravina	Koncentrace HMF (mg/kg nebo mg/l)
káva	900-1200
ocet	43-455
cereálie	15-717
chleba	14,8-17,1
pivo	4,3-7,0
sušené ovoce	4-2400
ovocná šťáva	0,1-3,0

Lze se setkat i s pozitivními efekty na lidské zdraví, a to antioxidačními, antialergenními a protizánětlivými [35]. HMF není dlouhodobě stabilní, a tudíž ho není možné delší dobu skladovat [37].

1.4 2-furaldehyd (furfural)

2-furaldehyd, též zvaný furfural je bezbarvá olejovitá kapalina se specifickým zápachem připomínajícím pach benzaldehydu. Na vzduchu a světle mění barvu – žloutne až hnědne a pryskyřičnatí (polymeraci urychlují horké alkalické roztoky). Furfural lze částečně rozpustit ve vodě, ovšem lépe je rozpustný v alkoholu či etheru [38].



Obrázek 6 – Furfural

Tabulka 6 – Vlastnosti furfuralu [38]

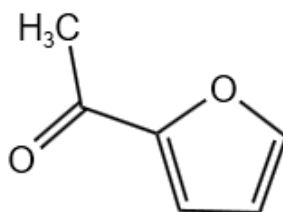
2-furaldehyd	
molekulový vzorec	C ₅ H ₄ O ₂
molární hmotnost	96,09 g/mol
bod tání	-36,5 °C
bod varu	162 °C
Hustota	1,1563 g/cm ³

Furfural je obsažen v esenciálních olejích. Průmyslově se připravuje z pentozanů, které jsou obsaženy ve stéblech a otrubách obilí. Laboratorně se připravuje z kukuřičných klasů nebo ho lze připravit z pyridinu.

Používá se při výrobě furfural-fenolových plastů jako je například Durite, dále nachází využití při rozpouštědlové rafinaci ropných olejů a jako rozpouštědlo pro nitrovanou bavlnu a acetát celulózy. Dále se používá k výrobě laků, nebo jako insekticid, fungicid, germicid či jako katalyzátor nebo činidlo v analytické chemii [38].

1.5 2-furylmethylketon (2-acetylfuran)

Jedná se o látku se sladkým balzamiko-skořicovým nádechem. Hojně se vyskytuje v esenciálních olejích, sladkých kukuřičných produktech, ovoci a také v květinách [39]. Z hlediska rozpustnosti je rozpustný v etanolu, velmi málo rozpustný ve vodě, lépe v propylenglykolu a rostlinných olejích. Nejčastěji se využívá jako potravinářská přísada, aromatizační prostředek nebo příchuť [40].



Obrázek 7 – 2-furylmethylketon

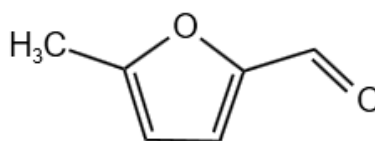
Tabulka 7 – Vlastnosti 2-furylmethylketonu [40]

2-furylmethylketon	
molekulový vzorec	C ₆ H ₆ O ₂
molární hmotnost	110,11 g/mol

2-furylmethylketon	
bod tání	33 °C
bod varu	67 °C
hustota	1,102 – 1,107 g/cm ³

1.6 5-methylfurfural (5-methylfuran-2-karbaldehyd)

5-methylfurfural je bezbarvou kapalinou s lehkou karamelovou vůní. Lze ho poměrně snadno rozpustit v olejích, méně dobře ve vodě a je také mísitelný s etanolem. Nejčastěji se využívá jako potravinářská přísada, aromatizační prostředek nebo příchut' [41].



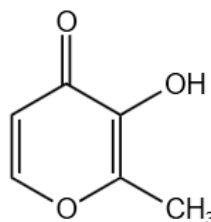
Obrázek 8 – 5-methylfurfural

Tabulka 8 – Vlastnosti 5-methylfurfuralu [41]

5-methylfurfural	
molekulový vzorec	C ₆ H ₆ O ₂
molární hmotnost	110,11 g/mol
bod varu	89 – 90 °C
hustota	1,098 – 1,108 g/cm ³

1.7 Maltol

Maltol je bílá krystalická látka s vůní po karamelu. Rozpouští se v horké vodě, chloroformu, méně pak v benzenu, etheru, petroletheru. V alkalických hydroxidech se rozpouští za vzniku žlutých roztoků. Využívá se především jako ochucovadlo, pečivu dodává „čerstvě upečenou“ vůni a chuť [42].



Obrázek 9 – Maltol

Tabulka 9 – Vlastnosti maltolu [42]

Maltol	
molekulový vzorec	C ₆ H ₆ O ₃
molární hmotnost	126,11 g/mol
bod tání	161 – 162 °C
sublimuje	při 93 °C

Maltol se nachází především v kůře mladých modřínů, borovém jehličí, čekance, dehtech izolovaných ze dřeva a také v praženém sladu. Získává se alkalickou hydrolyzou solí streptomycinu [42].

1.8 Analýza furanických látek v potravinách

Z furanických látek je nejčastěji analyzovanou látkou HMF. Pro jeho stanovení v různých potravinách jsou využívány spektrometrické, chromatografické a elektroanalytické techniky. I když převažují chromatografické techniky, pro svou jednoduchost, rychlost a v neposlední řadě i ekonomickou nenáročnost jsou využívány i spektrofotometrické techniky [36].

Velmi často je analyzován med, kde je maximální množství HMF stanoveno normou jakosti [43]. Pro jeho stanovení byla využita například technika iontově-výměnné chromatografie [44] či plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií [36,45], kde je nezbytné použít derivatizaci.

Technikou HPLC v systému obrácených fází s UV detekcí byl stanoven hydroxymethylfurfural i další furany ve vzorcích medu a medovice [46], chlebu [47], kávě [10,19,29,48,49].

Dalšími technikami jsou GC-MS nebo UHPLC s UV detekcí, kde byl stanoven obsah furanických látek v plodech dřínu lékařského [36,50,51,52,53,54]. HMF byl analyzován ve vzorcích dětské výživy technikou LC-MS s APCI zdrojem. Obsah furanických látek byl stanoven také technikou HPLC-MS v kávových zrnech při různých způsobech jejich zpracování [55].

1.9 Sacharidy

Sacharidy jsou polyhydroxyaldehydy či polyhydroxyketony nesoucí v molekule alespoň tři alifaticky vázané uhlíkové atomy a sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku acetalových vazeb [16].

Tato skupina látek představuje pro lidský organismus rychlý a důležitý zdroj energie [56]. Vznikají v buňkách fotoautotrofních organismů asimilací vzdušného oxidu uhličitého v přítomnosti vody a s využitím energie světla. V buňkách plní tyto látky řadu funkcí, například jsou zdrojem energie, jedná se o biologicky aktivní látky nebo jsou složkami mnoha biologicky aktivních látek (např. glykoproteiny), jsou základními stavebními jednotkami mnoha buněk a chrání buňky před působením vnějších vlivů [16].

Sacharidy lze dělit z několika hledisek, například podle jejich funkce ve výživě na:

- sacharidy využitelné
- sacharidy špatně využitelné
- sacharidy nevyužitelné

Mezi využitelné sacharidy patří některé polysacharidy, především škrob, glykogen a dextriny nebo oligosacharidy sacharóza, maltóza, laktóza či monosacharidy glukóza a fruktóza. Špatně využitelnými sacharidy jsou z monosacharidů například xylóza a arabinóza, z oligosacharidů rafinóza, stachyóza, galaktoinozitol a z polysacharidů především inulin, který se vyskytuje v topinamburu nebo čekance, používá se jako sladidlo pro diabetiky. Mezi sacharidy nevyužitelné se z monosacharidů řadí například mannóza, sorbóza a z polysacharidů celulóza, hemicelulózy, rezistentní škrob, pektiny nebo chitin vyskytující se v houbách [56].

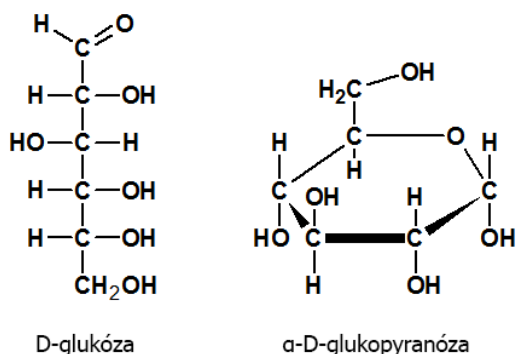
Sacharidy lze dále dělit dle počtu cukerných jednotek, které v molekule obsahují na:

- monosacharidy (1 cukerná jednotka)
- oligosacharidy (2-10 cukerných jednotek)
- polysacharidy (více než 10 cukerných jednotek) [16]

1.9.1 Glukóza

Tento sacharid bývá označován jako hroznový či škrobový cukr [16]. Glukóza patří mezi monosacharidy a jedná se o zdroj energie pro rostliny a živočichy a také sladidlo potravin, nápojů. Hodnota hladiny glukózy v krvi nad 7 mmol/l indikuje onemocnění zvané diabetes [57].

Vyskytuje se především v ovoci a medu, je to základní volný cukr cirkulující v těle vyšších živočichů [58].



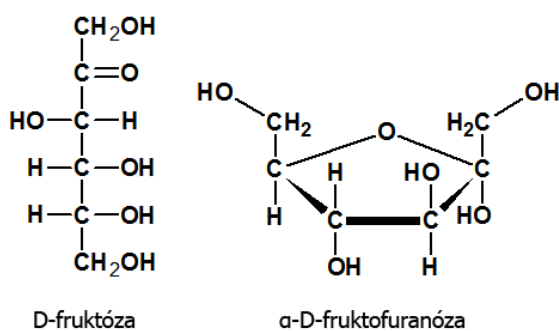
Obrázek 10 – Glukóza

Tabulka 10 – Vlastnosti glukózy [57,59]

Glukóza	
molekulový vzorec	$C_6H_{12}O_6$
molární hmotnost	180,16 g/mol
bod tání	146 °C
hustota	1,56 g/cm ³

1.9.2 Fruktóza

Fruktóza je monosacharid, tvoří bílé krystalky bez zápachu. Obdobně jako glukóza a sacharóza i fruktóza se využívá jako sladidlo. Vyskytuje se především v ovoci a medu. Tento sacharid lze rozpustit ve vodě, v methanolu, pyridinu, ethylaminu, methylaminu či horkém acetonu [60].



Obrázek 11 – Fruktóza

Tabulka 11 – Vlastnosti fruktózy [60]

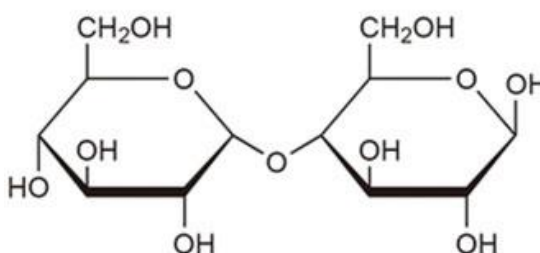
Fruktóza	
molekulový vzorec	$C_6H_{12}O_6$
molární hmotnost	180,16 g/mol

Fruktóza	
bod tání	103 °C
hustota	1,6 g/cm ³

1.9.3 Sacharóza

Sacharóza, synonymem třtinový cukr, stolní cukr nebo řepný cukr, je bílá krystalická či pevná prášková látka bez zápachu, která zahřátím karamelizuje. Tuto látku lze velmi dobře rozpustit ve vodě a methanolu, méně v ethanolu a nelze ji rozpustit v ethyletheru. Sacharóza patří mezi disacharidy. Zdrojem tohoto disacharidu je cukrová řepa, čirok nebo třtinový cukr [61,62].

Využívá se jako sladidlo do potravin a nealkoholických nápojů. Jedná se o vstupní surovinu pro výrobu etanolu, butanolu, glycerolu nebo kyseliny citronové, konzervant, antioxidant nebo jako náhrada glycerolu [61,62]. Lze ji také využít jako surovinu pro výrobu invertního cukru, fruktooligosacharidů, palatinózy a palatinitolu [16]. Sacharóza je v trávicím systému štěpena na glukózu a fruktózu a její přebytečné množství se mění v tuk [56].



Obrázek 12 – Sacharóza

Tabulka 12 – Vlastnosti sacharózy [61]

Sacharóza	
molekulový vzorec	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
molární hmotnost	342,30 g/mol
bod tání	185,5 °C
hustota	1,59 g/cm ³

1.9.4 Analýza sacharidů v potravinách

Sacharidy lze stanovit velkým množstvím metod fyzikálních, chemických a enzymových. Mezi metody fyzikální patří metody denzitometrické, refraktometrické a polarimetrické [63,64]. Chemické metody vychází z redukčních vlastností sacharidů či barevných kondenzačních reakcích jejich degradačních produktů [65].

Spektrofotometrické metody pro stanovení sacharidů jsou dnes hojně využívány především pro dobrou citlivost, snadnou manipulaci a dostupnost vybavení [66].

Moderní techniky používané ke stanovení sacharidů v potravinách jsou metody chromatografické s RI detekcí [67,68] a elektroforetické s fluorescenční detekcí [69], UV detekcí [70] a vodivostní detekcí [71].

Technika HPLC s RI detekcí byla použita pro stanovení sacharidů v medu [72], medovinách [73] s ELS detekcí v medu, melase, džemu, lískooříškové pomazánce a arašídovém másle [74].

Technikou kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí po předchozí derivatizaci byly stanoveny sacharidy v pivu a mléce [70], s fluorescenční detekcí v medu [69].

Sacharidy lze stanovit pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem. Jedná se o metodu velmi hojně používanou ke sledování kvality mléka v mlékárenském průmyslu. Jejím největším nedostatkem je nezbytnost derivatizace sacharidů s cílem zvýšit jejich těkavost. Nejčastěji se sacharidy převádí na methylestery, trifluoroacetáty či trimethylsilyl ethery [75]. Touto technikou byly sacharidy stanoveny také v datlovém sirupu [76].

V zelené kávě lze sacharidy analyzovat například pomocí aniontově-výměnné chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí. Metoda je použitelná pro zpracování velkého množství vzorků a výhodou je, že nevyžaduje derivatizaci [77,78].

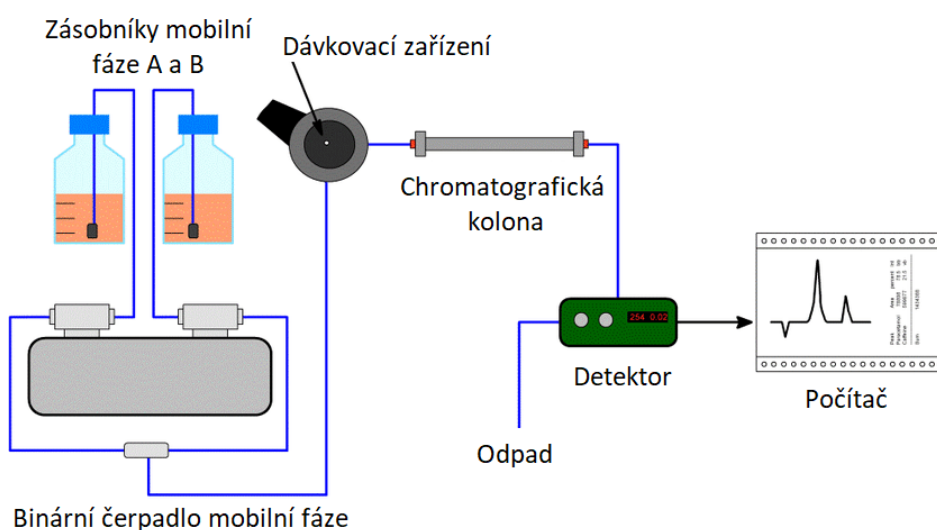
2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi separační techniky založené na rozdílném dělení analytů mezi dvě fáze – stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Stacionární fází bývá tuhá látka nebo kapalina zakotvená na nosiči, mobilní fází je kapalina [79].

Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z následujících částí:

- zásobníky mobilní fáze
- vysokotlaké čerpadlo
- dávkovací zařízení (autosampler, manuální dávkovací ventil)
- chromatografická kolona
- detektor
- vyhodnocovací zařízení (software, počítač) [79]



Obrázek 13 – Schéma kapalinového chromatografu [80]

Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze představují většinou skleněné nádoby různých objemů, nejčastěji 1 – 2,5 litru. Nezbytným krokem je odstranění plynu z mobilní fáze, k čemuž se používá helium, vakuový průtočný odplyňovač (degaser) nebo ultrazvuk. Odplynění mobilní fáze se využívá proto, aby nedocházelo k uvolnění bublinek rozpuštěných plynů při změně tlaku na výstupu z chromatografické kolony nebo v koloně. Slouží k eliminaci problémů, jako jsou například

nestálost základní linie, která vede k poklesu citlivosti detekce, nedostatečné opakovatelnosti dávkovaného objemu vzorku, nereprodukovatelným retenčním časům a dalším [79,81].

Vysokotlaké čerpadlo

Čerpadla jsou určena k čerpání mobilní fáze a jsou zhotovena z takového materiálu, který odolává korozi a zároveň agresivnímu charakteru mobilních fází. Nejčastěji se používá nerezová ocel, titan nebo keramika. Čerpadla musí poskytovat především stabilní průtok mobilní fáze, nejčastěji se jedná o průtoky 0,1 – 5 ml/min. V HPLC lze rozlišit několik typů čerpadel a to: pneumatická čerpadla, čerpadla injekčního typu, pístová čerpadla, membránová čerpadla nebo dvoupístová čerpadla zapojená do série. Nejvíce používanými čerpadly jsou pístová čerpadla [79,81].

Dávkovací zařízení

V současné době se k dávkování vzorků využívají manuální dávkovací ventily či automatické dávkovače tzv. autosamplery. Obě tyto metody jsou založeny na dávkovací smyčce, která je vyměnitelná a umožňuje volit dávkovaný objem vzorku od 1 do 100 μ l i více [79].

Chromatografické kolony

Chromatografické kolony, které se používají v HPLC musí splňovat tři podmínky:

- být chemicky odolné vůči působení mobilní fáze
- musí být odolné vůči vysokým tlakům
- vnitřní povrch kolony by měl být dokonale hladký [79]

Typy kolon včetně jejich parametrů znázorňuje následující tabulka.

Tabulka 13 – Vlastnosti kolon používaných v HPLC [81]

Typ kolony	délka [cm]	průměr [cm]	částice [μ m]	průtok [ml/min]	množství vzorku [g]
Konvenční analytické	6 – 25	0,3 – 0,46	3 – 10	1 – 3	10^{-10} – 10^{-4}
Pro rychlé analýzy	2 – 5	0,3 – 0,46	1,5 – 5	2 – 5	10^{-10} – 10^{-4}
Mikrokolony	10 – 50	0,05 – 0,21	3 – 10	0,02 – 0,2	10^{-12} – 10^{-5}
Plněné kapilární	10 – 100	0,01 – 0,05	3 – 10	0,001 – 0,02	10^{-14} – 10^{-6}
Pro SEC	15 – 100	0,6 – 1,0	5 – 20	0,5 – 2	10^{-6} – 10^{-1}
Semipreparativní	10 – 25	0,8 – 1,0	5 – 20	10 – 100	10^{-3} – 10^{-1}

Typ kolony	délka [cm]	průměr [cm]	částice [μm]	průtok [ml/min]	množství vzorku [g]
Preparativní	10 – 25	2,0 – 5,0	5 – 20	100 – 1000	10 ⁻² – 10

V porovnání s plynovou chromatografií se v HPLC uplatňují přímé kolony. Obvykle užívané kolony mají délku 10 nebo 15 cm, vnitřní průměr 4,6 mm a tyto kolony jsou naplněny částicemi o průměru 5 μm. Umožňují rozlišení 40 000 až 70 000 teoretických pater na 1 m [82].

Detektory

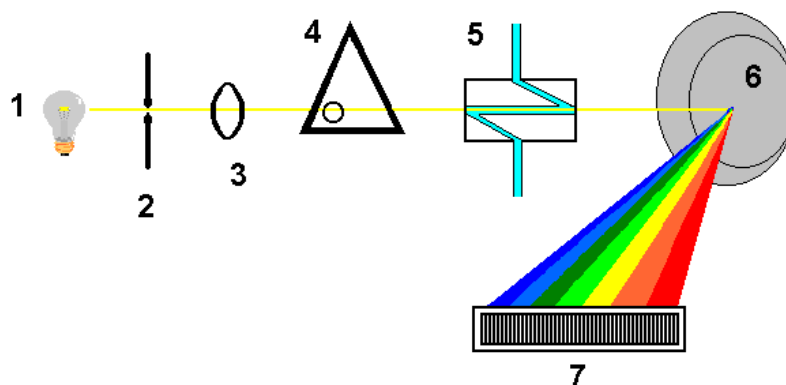
Detektory se nachází za chromatografickou kolonou, do detektoru je zaveden eluát právě z chromatografické kolony a úkolem detektorů je zaznamenat odlišnost v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, která obsahuje analyt. Detektory lze klasifikovat na detektory koncentrační a hmotnostní nebo na detektory nedestrukční a destruktivní.

Ideální detektor by měl být nedestruktivní, spolehlivý a snadno použitelný, specifický, měl by poskytovat široký lineární dynamický rozsah, být univerzální, vysoce citlivý atd. Ideální detektor ovšem neexistuje, je třeba hledat kompromisy [79,81].

V současné době se hojně využívají spektrofotometrické detektory vycházející z Lambert-Beerova zákona a založené na principu absorpce záření v ultrafialové či viditelné oblasti elektromagnetického záření.

Kromě spektrofotometrických detektorů (detektor s diodovým polem) se rozlišují také detektory fluorescenční, elektrochemické – amperometrické, coulometrické; detektory na bázi aerosolu – ELSD, CAD; refraktometrické či vodivostní detektory.

Detektor s diodovým polem (DAD detektor) představuje spektrofotometrický jednopaprskový detektor, který je tvořen plošnými fotodiodami, jejich počet se pohybuje od 512 do 1024. Detektor dává v aktuálním čase UV spektra pro každý pík na chromatogramu [79,81].



Obrázek 14 – Detektor s diodovým polem, 1 - záření ze zdroje, 2 - štěrba, 3 - čočka, 4 - clona, 5 - měrná cela detektoru, 6 - holografická mřížka, 7 - pole fotodiod [81]

Refraktometrický detektor patří mezi univerzální detektory mající ovšem některé nevýhody jako například nízká citlivost detekce, teplotní závislost odezvy nebo nemožnost použití gradientové eluce. Při průchodu látky detektor poskytuje odezvu úměrnou rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a indexu lomu mobilní fáze v referenční cele detektoru [79,81].

2.1 Chromatografie v systémech s obrácenými (převrácenými) fázemi

Využívá se k separaci nepolárních, polárních, někdy i iontových látek. Separace spočívá v nepolárních interakcích mezi analyzovanými látkami, mobilní i stacionární fází. Mobilní fáze je v tomto uspořádání polární, stacionární fáze nepolární. Stacionární fází jsou nejčastěji oktadecylové (C18), oktylové (C8) nebo jiné alkylové a alkylarylové skupiny chemicky vázané na silikagelu, případně nitrilové skupiny. Mobilní fází je voda s vhodnými polárními organickými rozpouštědly, nejčastěji se jedná o metanol či acetonitril. S klesající polaritou organického rozpouštědla roste eluční síla mobilní fáze. Podle rostoucí eluční síly mobilní fáze lze nejběžněji používaná rozpouštědla seřadit takto:

voda < metanol < acetonitril < propan-2-ol < dioxan < tetrahydrofuran

Pouze voda bez organického rozpouštědla není dostačující mobilní fází v RP-HPLC a to z důvodu, že nedostatečně smáčí povrch běžné stacionární fáze.

Velmi často se s chromatografií na obrácených fázích lze potkat jako s prvotní možností při vývoji a optimalizaci nové HPLC metody. Používá se také při studiu biologických vzorků, především metabolitů nových léčiv či rostlinných extraktů [79,81,83].

2.2 Chromatografie v systémech s normálními fázemi

Chromatografie v systémech s normálními fázemi byla převládající technikou od 70. let 20. století v oblasti tenkovrstvé chromatografie a nízkotlaké LC. Tyto systémy se vyznačují polárními stacionárními fázemi (silikagel nebo polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči) a méně polárními mobilními fázemi (propanol a n-hexan), zpravidla se jedná o směsi dvou rozpouštědel s rozdílnou polaritou. Retence látek na koloně s rostoucí polaritou roste. Dle rostoucí polarity na funkčních skupin lze organické sloučeniny s jednou funkční skupinou uspořádat v pořadí rostoucí retence na polární adsorbentu:

Alifatické uhlovodíky < aromatické uhlovodíky < halogensloučeniny < ethery < terciální aminy < nitrily < nitrosloučeniny < estery karboxylových kyselin < ketony < aldehydy < primární aminy < amidy < alkoholy < fenoly < karboxylové kyseliny < sulfokyseliny

Z hlediska využitelnosti tohoto typu separace látek již v současnosti upouští, například z důvodu použití těkavých organických rozpouštědel. Tuto chromatografii lze také využít k separaci izomerů – tokoferolů, retinolů nebo retinalů [79,81].

2.3 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Mechanismus HILIC separace není v současné době zcela vysvětlen. Jedním z možných principů je, že HILIC spočívá v rozdělování látek mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu stacionární fáze. Stacionární fáze funguje jako tzv. „přenašeč“ vody [79].

HILIC představuje alternativu HPLC pro separaci polárních látek, umožňuje také analýzu nabitých látek a poprvé se tato chromatografie objevuje v roce 1990, kdy ji jako první navrhl Alpert. HILIC používá polární stacionární fáze (silikagel) jako u NP-HPLC zatímco mobilní fáze jsou podobné s RP-HPLC (např. acetonitril, tetrahydrofuran, propanol-2-ol, ethanol nebo methanol). Tento typ chromatografie lze použít k analýze malých organických kyselin, sacharidů, léčiv, peptidů, vitaminů, fenolů, pesticidů, toxinů, estrogenů a cytostatik [79,84,85,86].

Využití HILIC poskytuje řadu výhod jako například: dobrou retenci pro polární látky, možnost využití vyšších průtoků mobilní fáze, jednoduchou náhradu NP-HPLC nebo lze tuto metodu spojit s ionizací elektrospřejem, a to díky mobilním fázím obsahujícím vysoká procenta acetonitrilu [79].

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a zařízení

Analýza furanických látek, maltolu a kofeinu byla uskutečněna za využití LC systému Agilent 1200 Series (Agilent, Palo Alto, CA, USA), jehož součástí bylo duální vysokotlaké čerpadlo mobilní fáze, odplyňovač mobilní fáze, autosampler, termostat kolony a DAD detektor. Pro separaci látek byla využita kolona Kinetex C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm) od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA).

Pro analýzu sacharidů byl rovněž využit systém Agilent 1200 Series (Agilent, Palo Alto, CA, USA), jehož součástí bylo duální vysokotlaké čerpadlo mobilní fáze, odplyňovač mobilní fáze, autosampler, termostat kolony a RI detektor RID-10a od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko). Pro separaci byla použita kolona Luna Omega SUGAR (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm) od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA).

Pro veškerá navažování byly využity analytické váhy od firmy SARTORIUS model A 200 S (Ústí nad Labem, Česká republika). Pro pipetování objemů v rádech jednotek až tisíců mikrolitrů byly použity automatické pipety of firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Mletí kávových zrn bylo provedeno pomocí elektrického kávového mlýnku ETA Magico (Praha, Česká republika). Pro úpravu vzorku a odplynění mobilní fáze byla použita ultrazvuková lázeň od firmy Bandelin Sonorex (Berlín, Německo). Pro centrifugaci vzorků byla použita centrifuga Biofil, firmy Merck (Brno, Česká republika). Vzorky byly před HPLC analýzou filtrovány přes PTFE (polytetrafluorethylen) stříkačkové filtry o velikost pórů 0,45 μm a průměru 13 mm od firmy Labicom (Olomouc, Česká republika).

3.2 Chemikálie

- 2-Furfural (analytický standard), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- 2-Furylmethylketon (99 %), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- 5-Hydroxymethylfurfural (≥ 99 %), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- 5-Methylfurfural (99 %), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- Acetonitril (vhodný pro HPLC, ≥ 99,9 %), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- Demineralizovaná voda – purifikace v systému Mili-Q® od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- D-Fruktóza (≥ 99 %), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- D-Glukóza monohydrát (pro analýzu), Penta (Praha, Česká republika)

- Kofein (ze zásob Univerzity Pardubice)
- Maltol (analytický standard), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- Metanol (vhodný pro HPLC, $\geq 99,9\%$), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- Sacharóza (pro analýzu), Penta (Praha, Česká republika)

3.3 Analyzované vzorky

Pro první část experimentální práce bylo zakoupeno celkově 22 vzorků kávy, přičemž 17 vzorků bylo kávy zrnkové a 5 vzorků kávy instantní. Vzorky se lišily značkou, zemí původu a zastoupením poměru arabika/robusta. Vzorky byly skladovány v suchu a v uzavíratelných obalech. Seznam vzorků včetně typu kávy a země původu je shrnut v tabulce 14.

Tabulka 14 – Seznam vzorků káv

Označení	Název	Druh kávy	Země původu
Z1	TCHIBO Privat Kaffee Brazil Mild	100% arabika	Brazílie
Z2	TCHIBO Privat Kaffee Brazil Decaf	100% arabika	Brazílie
Z3	TCHIBO Volcano Beans	100% arabika	Východní Afrika
Z4	TCHIBO Espresso Milano Style	100% arabika	Směs různého původu
Z5	TCHIBO Barista Espresso	100% arabika	fairtrade producenti
Z6	TCHIBO Privat Kaffee Latin Grande	100% arabika	Latinská Amerika
Z7	Marila standard	100% robusta	Afrika
Z8	Deluxe Tanzania Thamani	100% arabika	Tanzanie
Z9	Královská pražírna kávy Ethiopia Sidamo Grande 2	100% arabika	Etiopie
Z10	Královská pražírna kávy Colombia Supremo 18+	100% arabika	Kolumbie
Z11	Královská pražírna kávy Guatemala SHB Teresita	100% arabika	Guatemala
Z12	Cafedirect Machu Picchu	100% arabika	Peru
Z13	L'or	100% arabika	Brazílie
Z14	Mokasirs DECISO	20% arabika	neuveдено
Z15	Mokasirs ORO BIO	arabika	neuveдено
Z16	Lavazza Caffè espresso	100% arabika	neuveдено
Z17	Staročeská jihlavanka směs	směs robusty	Asie, Latinská Amerika
I1	L'or Classique smooth & aromatic	směs arabiky a robusty	neuveдено
I2	Tesco original instant coffee	směs arabiky a robusty	neuveдено
I3	Jihlavanka Crema	100% robusta	Asie, Latinská Amerika
I4	O Poranku	30 % inst.káva, 70 % obilí	neuveдено

Označení	Název	Druh kávy	Země původu
15	Nescafé gold rich aroma & smooth taste	arabika	neuveveno

Pro druhou část experimentální práce byly získány vzorky kávy arabika (Brazílie) a kávy robusta (Indie) a to v různých stádiích procesu pražení (od zelené kávy po konečný produkt). Káva arabika byla odebírána během pražení v následujících intervalech – zelená káva; 4; 6; 8 a 12 minut. Káva robusta byla odebírána v intervalech – zelená káva; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 a 17 minut. Dále byly obdrženy dva další vzorky kávy arabika (Peru a Etiopie), avšak u těchto vzorků byly porovnávány pouze stádia zelené kávy a konečného produktu. Všechny tyto vzorky byly získány ve spolupráci s pardubickou pražírnou ZRNO44. Obdržené vzorky byly skladovány v suchu a v papírových obalech až do doby mletí a extrakce.

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Úprava vzorku k analýze

Na základě výsledků optimalizace extrakčních podmínek byl pro úpravu vzorků zvolen následující postup: Na analytických vahách byly do Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml naváženy co nejpřesněji 2 g namletého vzorku kávy. K tomuto vzorku bylo přidáno 20 ml demineralizované vody předehřáté na teplotu 60 ± 2 °C. Erlenmeyerova baňka byla ihned vložena do ultrazvukové lázně předehřáté na teplotu 60 °C \pm 2 °C a byla provedena extrakce vzorku do rozpouštědla po dobu 10 minut. Po ukončení extrakce byly 3 ml každého extraktu převedeny do dvou mikrozkušavek Eppendorf o objemu 1,5 ml a centrifugovány po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl roztok nad sedlinou filtrován přes PTFE stříkačkový filtr a umístěn do lednice do doby analýzy.

3.4.2 Stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu metodou HPLC-DAD

Vzorky kávy pořízené z českých obchodů a vzorky kávy obdržené ve spolupráci s pardubickou pražírnou ZRNO44 byly proměřeny finální optimalizovanou HPLC-DAD metodou (viz. Kapitola 4.1 – Optimalizace HPLC-DAD metody). Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce 15. Dávkovaný objem 0,3 μ l byl použit pro analýzu kofeinu u všech vzorků a pro analýzu HMF u vzorků instantní kávy. HMF a ostatní látky ve vzorcích zrnkové kávy byly vyhodnoceny na základě výsledků získaných při dávkování vzorku 3 μ l.

Tabulka 15 – Podmínky měření HPLC-DAD

Kolona	Kinetex C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm)
Mobilní fáze A	Demineralizovaná voda + 0,1 % kyseliny octové
Mobilní fáze B	Acetonitril + 0,1 % kyseliny octové
Profil gradientu	3 % B od 0 do 5 min; 3 – 20 % B od 5 do 23 min; 20 – 100 % B od 23 do 23,1 min; 100 % B od 23,1 do 28 min
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Teplota kolony	15 °C
Dávkovaný objem	3 a 0,3 μl
Vlnové délky detekce	280 a 264,8 nm
Detektor	Detektor s diodovým polem

Příprava kalibrační řady a její proměření

Kvantifikace látek proběhla na základě metody vnější kalibrace. Pro přípravu zásobních roztoků standardů furanických látek a maltolu bylo naváženo 10 mg daného standardu a rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody. Z takto připravených roztoků byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 a 100 mg/l. Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Kalibrační přímky jsou uvedeny v přílohách 1-3.

Na přípravu zásobních roztoků HMF a kofeinu bylo naváženo 10 mg a rozpuštěno v 1 ml demineralizované vody. Z těchto roztoků byla připravena kalibrační řada o koncentracích 50; 100; 250; 500; 1000; 2000 a 3000 mg/l. Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát.

3.4.3 Stanovení vybraných sacharidů metodou HPLC-RI

Analýza glukózy, fruktózy a sacharózy byla provedena optimalizovanou HPLC-RI metodou (viz. Kapitola 4.2 – Optimalizace HPLC-RI metody). Stanovení sacharidů proběhlo pouze pro vzorky získané ve spolupráci s pardubickou pražírnu ZRNO44. Podmínky pro analýzu sacharidů jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16 – Podmínky měření HPLC-RI

Kolona	Luna Omega SUGAR (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm)
Mobilní fáze	Acetonitril/demineralizovaná voda (85:15)
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Dávkovaný objem	5 μl
Detektor	Refraktometrický detektor

Příprava kalibrační řady a její proměření

Kvantifikace sacharidů proběhla na základě metody vnější kalibrace. K přípravě zásobního roztoku glukózy, fruktózy a sacharózy byly naváženy 3 g od každého cukru, rozpuštěno

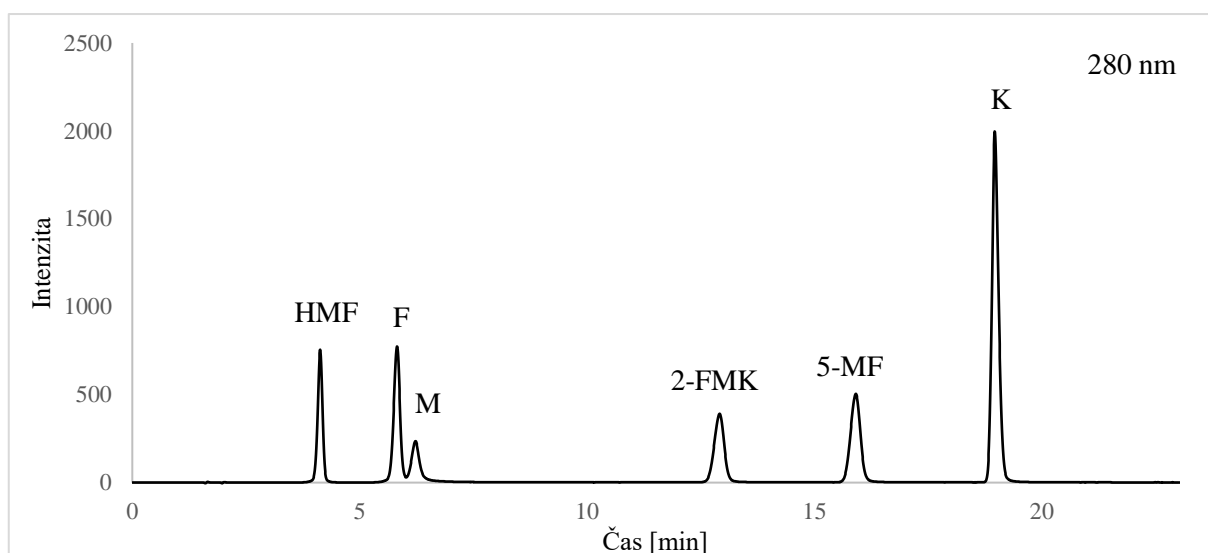
a doplněno na konečný objem 50 ml demineralizovanou vodou. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentracích 0,9; 2,1; 3; 6; 9; 15 a 21 g/l. Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace HPLC-DAD metody

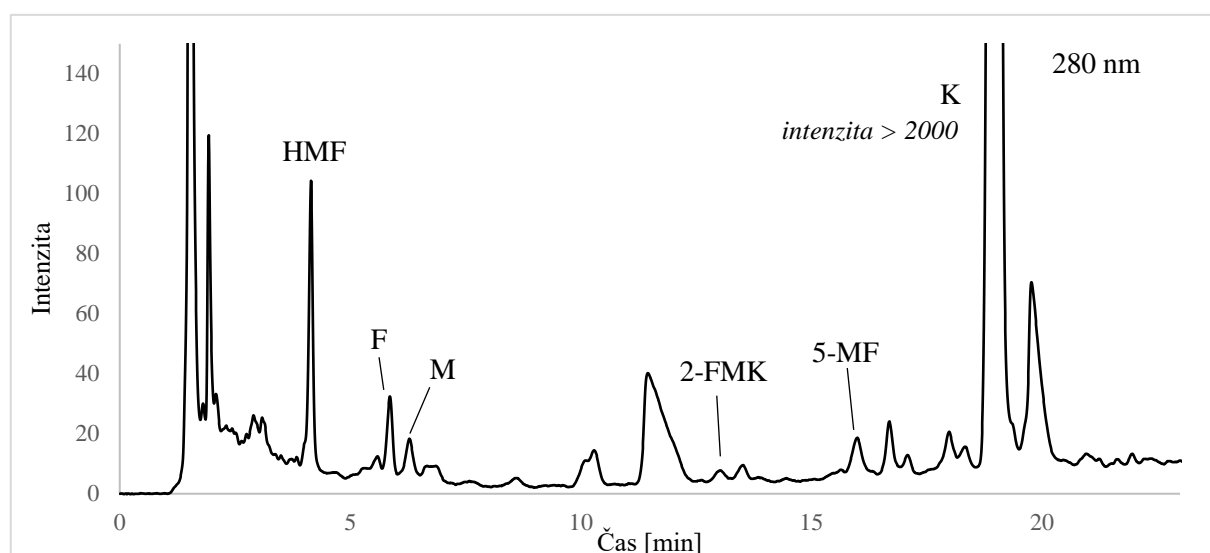
Při optimalizaci metody se vycházelo především z publikací založených na RP-HPLC-DAD analýzách [48,51,52,53] již zmíněných v kapitole 1.8. Při vývoji metody byl použit obecný gradient od 3 % B (acetonitril) do 50 % B při celkové době gradientu 30 minut a zjišťovala se retence jednotlivých látek na koloně Kinetex C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm). Následně byly zvoleny optimální vlnové délky detekce na základě absorpčních maxim jednotlivých píků. Pro furanické látky a maltol byla zvolena vlnová délka 280 nm a pro kofein 264,8 nm. Následně byla snižována strmota gradientu, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení všech látek alespoň na základní linii.

Vzhledem ke skutečnosti, že nebylo možné maltol a furfural oddělit ani při zařazení kroku izokratické eluce po dobu prvních 5-ti minut při 3 % B, bylo nezbytné vyzkoušet vliv teploty na separaci těchto dvou látek. Postupným snižováním teploty z 30 °C bylo dosaženo uspokojivého rozlišení této dvojice až při teplotě 15 °C. V praxi ovšem není běžné používat tak nízkou teplotu, nicméně při této teplotě nedocházelo výrazněji k rozšiřování píků a zároveň byla zachována dobrá opakovatelnost retenčních časů. Výsledný záznam analýzy kalibračního roztoku o koncentraci 10 mg/l je znázorněn na obrázku 15 a konečná metoda je popsána v kapitole 3.4.2.



Obrázek 15 – Chromatogram kalibrační směsi standardů o koncentraci 10 mg/l naměřený finální metodou (dávkový objem 3 μl; vlnová délka 280 nm). HMF-5-hydroxymethylfurfural, F-furfural, M-maltol, 2-FMK-2-furylmethylketon, 5-MF-5-methylfurfural, K-kofoein

Pro ověření vhodnosti metody pro analýzu vybraných látek v reálných vzorcích byla provedena analýza zkušební vzorku Z16 (obrázek 16), kdy bylo do kádinky naváženo 10 g vzorku a zalito 100 ml vroucí demineralizované vody, mícháno po dobu 10 minut a ochlazeno na laboratorní teplotu. Následně byly 3 ml vzorku odpipetovány do dvou Eppendorf zkumavek, centrifugováno a filtrováno s použitím PTFE filtrů o velikosti pórů 0,45 μm. Z tohoto vzorku byly připraveny dva roztoky pro analýzy, jeden se samotným vzorkem a druhý s přidavkem směsi standardů, tak, aby výsledná koncentrace přidavku byla 1 mg/l. Tyto dva roztoky byly měřeny optimalizovanou metodou (*Gradient 1*) a dvěma dalšími metodami (*Gradient 2 = 3 % B od 0 do 5 min; 3 – 40 % B od 5 do 30 min; teplota kolony 15 °C a Gradient 3 = 3 – 30 % od 0 do 30 min; teplota kolony 30 °C*). Optimalizovanou metodou byl rovněž změřen roztok thiomochoviny o koncentraci 10 mg/l pro zjištění mrtvého objemu kolony.



Obrázek 16 – Chromatogram vzorku Z16 naměřený finální metodou (dávkový objem 3 μl; vlnová délka 280 nm). HMF-5-hydroxymethylfurfural, F-furfural, M-maltol, 2-FMK-2-furylmethylketon, 5-MF-5-methylfurfural, K-kofein

Získané retenční časy jsou zaznamenány v tabulce 17. Porovnání retenčních časů, resp. retenčního chování jednotlivých píků s retenčními časy standardních přidavků sloužilo pro ověření identifikace jednotlivých látek. Dalším způsobem ověření identifikace látek bylo porovnání absorpčních spekter standardů s absorpčními spektry píků ve vzorku (viz. přílohy 4-15). Limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) byly získány na základě směrnice kalibračních křivek z výšek píků a velikosti šumu odezvy detektoru dle rovnic 1 a 2. Rovnice 1 – Vztah pro výpočet limitu detekce LOD

$$LOD = \frac{(3 \times h)}{m} \quad (1),$$

h – šum detektoru, m – směrnice kalibrační křivky (závislost výšky píku na koncentraci)

Rovnice 2 – Vztah pro výpočet limitu kvantifikace LOQ

$$LOQ = \frac{(10 \times h)}{m} \quad (2),$$

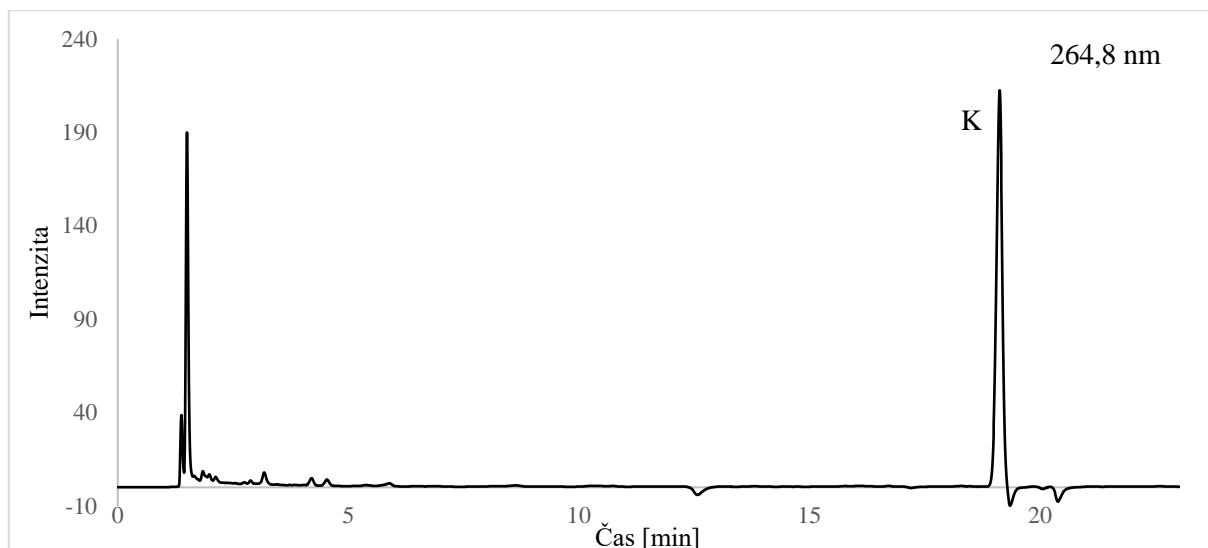
h – šum detektoru, m – směrnice kalibrační křivky (závislost výšky píku na koncentraci)

Tabulka 17 – Hodnoty retenčních časů pro ověření identifikace vybraných látek a hodnoty LOD a LOQ

	t_R (Gradient 1)	t_R (Gradient 2)	t_R (Gradient 3)	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
HMF	4,16	4,17	3,68	0,274	0,912
	<u>4,17</u>	<u>4,14</u>	<u>3,69</u>		
Furfural	5,88	5,89	5,28	0,260	0,866
	<u>5,90</u>	<u>5,85</u>	<u>5,28</u>		
Maltol	6,30	6,25	5,40	1,321	4,403
	<u>6,28</u>	<u>6,21</u>	<u>5,41</u>		
2-Furylmethylketon	13,01	12,35	9,39	0,534	1,780
	<u>13,03</u>	<u>12,31</u>	<u>9,37</u>		
5-Methylfurfural	16,03	14,53	12,06	0,515	1,718
	<u>16,02</u>	<u>14,49</u>	<u>11,94</u>		
Kofein (dávkování 0,3 μl)	18,94	15,30	11,68	14,651	48,835
	<u>18,92</u>	<u>15,29</u>	<u>11,60</u>		

Podtržené hodnoty jsou retenční časy přidavků standardních látek ke vzorku Z16.

Byla optimalizována metoda pro analýzu vybraných furanických látek, maltolu a kofeinu v kávě. Posledním krokem bylo zjištění rozsahu koncentrací kalibrační roztoků pro kvantifikaci sloučenin na základě metody vnější kalibrace. Použité rozmezí koncentrací pro tvorbu kalibračních přímek je shrnuto v kapitole 3.4.2. V případě kofeinu bylo nezbytné aplikovat dávkování vzorku 0,3 μ l (obrázek 17) a to z důvodu, že odezva při dávkování 3 μ l se nepohybovala v rámci linearit kalibrace. To samé platilo v případě HMF u analýzy vzorků instantní kávy (I1 – I5). Z tohoto důvodu byly všechny vzorky změřeny při dávkování 3 a 0,3 μ l.



Obrázek 17 – Chromatogram vzorku Z16 naměřený finální metodou (dávkový objem 0,3 μ l; vlnová délka 264,8 nm). K-kofein

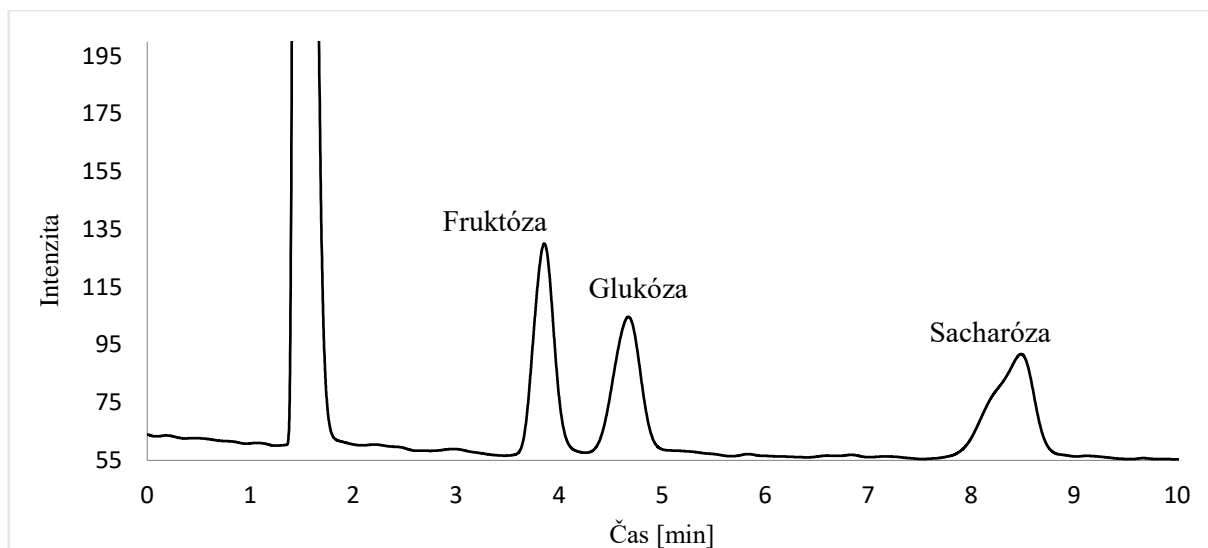
4.2 Optimalizace HPLC-RI metody

Optimalizace podmínek pro stanovení sacharidů, konkrétně glukózy, fruktózy a sacharózy vychází z přešlé diplomové práce [73]. K detekci sacharidů bylo možno využít RI detektor, který lze označit za poměrně selektivní pro sacharidy, tedy látky vyznačující se optickou otáčivostí. Pro rozdělení jednotlivých sacharidů byla využita separace v systému HILIC. Byla použita izokratická eluce ACN/H₂O na koloně Luna Omega SUGAR 100 Å (150 x 3 mm, velikost částic 3 μ m).

K vytvoření metody byla použita směs standardů sacharidů o koncentraci 9 g/l. Bylo optimalizováno množství ACN jako organického modifikátoru mobilní fáze (90%, 87%, 85% a 80% ACN), aby proběhla separace co nejrychleji a s přijatelným rozlišením jednotlivých dvojic. Optimální podmínky separace sacharidů jsou uvedeny v tabulce 16 a chromatogram kalibrační směsi standardů sacharidů je znázorněn na obrázku 18. Vzhledem k nízkému obsahu glukózy a fruktózy v kávě a k jejich detekčním limitům (Tabulka 18) bylo možné identifikovat z vybraných sacharidů, až na jednu výjimku (zelená kávová zrna Brazílie), ve všech vzorcích pouze sacharózu.

Tabulka 18 – Limity LOD a LOQ pro jednotlivé sacharidy

	LOD [g/l]	LOQ [g/l]
Fruktóza	0,222	0,740
Glukóza	0,341	1,136
Sacharóza	0,486	1,619



Obrázek 18 – Chromatogram kalibrační směsi standardů sacharidů 9g/l.

4.3 Volba podmínek úpravy vzorku

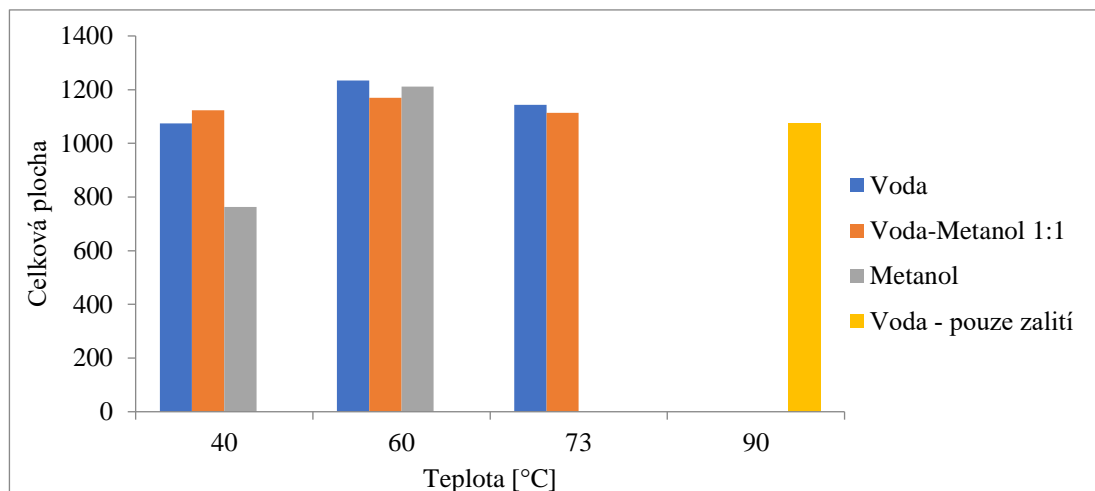
Vzorek kávy byl upraven pomocí extrakce v ultrazvukové lázni. První experimenty byly provedeny následovně: do Erlenmeyerovy baňky byly naváženy 2 g vzorku Z16, vzorek byl zalit 20 ml vroucí demineralizované vody a extrahován v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut. Při prvních experimentech nebyla kontrolována teplota ultrazvukové lázně. Vzorek kávy byl po extrakci ochlazen a napipetován do plastových Eppendorf mikrozkušavek a centrifugován po dobu 10 minut. Na závěr byl vzorek kávy zfiltrován přes PTFE filtry do skleněných vial a analyzován metodou HPLC-DAD pro stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu.

Za těchto podmínek bylo identifikováno všech 6 látek ve vzorku kávy. Následně byly voleny optimální podmínky pro další analýzy, a to teplota a doba extrakce, typ rozpouštědla, hrubost mletí a množství vzorku k analýze. Optimalizované podmínky pro extrakci byly vybrány na základě výsledků HPLC-DAD analýz.

4.3.1 Typ rozpouštědla a teplota extrakce

Prvními optimalizovanými parametry byly typ rozpouštědla a teplota extrakce. Pro volbu vhodného rozpouštědla (vybráno na základě literatury [87,88]) a extrakční teploty byla testována samotná demineralizovaná voda (40; 60; 73 °C ± 2 °C), směs demineralizované vody a metanolu 1:1 (40; 60; 73 °C ± 2 °C) a samotný metanol (40; 60 °C ± 2 °C). Rozpouštědla byla před smícháním se vzorkem přehřívána na cílovou teplotu experimentu. Dále bylo vyzkoušeno zalití vzorku kávy 20 ml demineralizované vody přehřáté na 90 °C a ponechání v ultrazvuku bez cíleného vyhřívání lázně. Navážka pro tyto experimenty byla 2 g, doba extrakce 20 min a objem rozpouštědla byl zvolen 20 ml. Výsledné extrakty byly filtrovány

přes skládaný filtr a doplněny na původní objem 20 ml. Totéž bylo provedeno u všech extraktů v průběhu celého procesu optimalizace extrakčních parametrů.

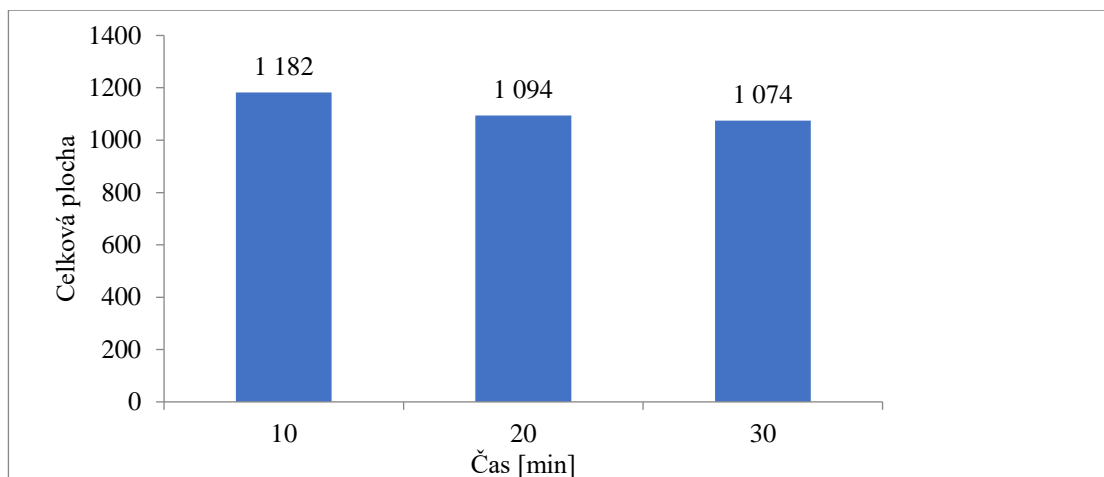


Obrázek 19 – Výsledky optimalizace volby rozpouštědla a teploty extrakce vyjádřené jako průměr celkové plochy vybraných látek ze dvou měření.

Vyhodnocení bylo provedeno na základě sumy ploch furanických látek a maltolu. Kofein do sumy ploch započítán nebyl, jelikož by výrazně ovlivnil celkový výsledek. Celková plocha pro jednotlivé experimenty je vždy průměrem ze dvou analýz. Z obrázku 19 je patrné, že za daných podmínek je nejvhodnějším extrakčním rozpouštědlem demineralizovaná voda při teplotě 60 °C. Naopak nejméně vhodným extrakčním rozpouštědlem se jeví samotný metanol při teplotě 40 °C. Pro další experimenty byla zvolena pouze demineralizovaná voda a teplota extrakce 60 °C.

4.3.2 Doba extrakce

Dalším optimalizovaným parametrem byla doba extrakce. Pro volbu vhodné doby extrakce byly testovány tři časové úrovně – 10; 20 a 30 minut. Jako extrakční rozpouštědlo byla použita demineralizovaná voda, teplota extrakce byla 60 °C, navážka byla zvolena 2 g a objem rozpouštědla byl 20 ml.



Obrázek 20 – Výsledky optimalizace doby extrakce vyjádřené jako průměr celkové plochy vybraných látek ze dvou měření.

Vyhodnocení bylo provedeno na základě sumy ploch furanických látek a maltolu. Kofein do sumy ploch započítán nebyl, výrazně by ovlivnil celkový výsledek. Celková plocha pro každou časovou úroveň extrakce je vždy průměrem ze dvou analýz. Dle obrázku 20 lze usuzovat, že nejlépe se jeví doba extrakce 10 minut, ačkoliv tento výsledek může být zatížen chybou v opakovatelnosti extrakce. Nicméně lze říci, že doba extrakce 10 minut se jeví jako dostačující.

4.3.3 Hrubost mletí

Dalším optimalizovaným parametrem byla hrubost mletí. Hrubost mletí byla vyzkoušena na vzorku Z13. Pro ověření vlivu úrovně mletí a velikosti výsledného zrna byly testovány tři úrovně mletí – jemné, střední, hrubé. Navážka kávy byla zvolena 2 g, objem demineralizované vody byl 20 ml, doba extrakce 10 minut a teplota 60 °C. Pro každou úroveň mletí byly provedeny dvě analýzy metodou HPLC-DAD.

Tabulka 19 – Plochy jednotlivých látek pro optimalizaci hrubosti mletí

Mletí	HMF	Furfural	Maltol	2-Furylmethylketon	5-Methylfurfural	Kofein
Jemné_01	787,1	320	107,2	67,4	201,3	23640,2
Jemné_02	786,2	326,4	106,1	65,2	196,2	23683,2
Střední_01	752,9	314,4	160,9	81,6	197,3	22481,3
Střední_02	751,7	316,4	164,7	76,3	198,4	22406,8
Hrubé_01	721	307,9	133,9	80,8	190,7	22525,5
Hrubé_02	721,3	305,2	134	72,4	185,7	22541,2

Pro ověření vlivu hrubosti mletí, bylo využito statistické testování ANOVA (analýza rozptylu). Toto statistické testování slouží pro ověření podobnosti souborů dat získaných při dvou a více různých podmínkách měření. V našem případě souborem dat byly plochy píků (viz. Tabulka

19) a různými podmínkami byly tři různé hrubosti mletí. Aby bylo možné porovnat data jako celek, musely být plochy jednotlivých píků vyděleny průměrem ploch pro danou látku (v takovém případě dojde k zachování hodnoty RSD). Např. pro HMF bylo získáno celkem 6 ploch (při dvou měření každé ze tří hrubostí) a z těchto šesti ploch byla získána průměrná hodnota. Tím bylo získáno 6 hodnot relativních ploch píku. Takto se postupovalo v případě každé látky, včetně kofeinu. Získaná data nyní bylo možno vložit do online statistické softwaru Statistics Kingdom (Statskingdom, Melbourne, Australia) pro výpočet ANOVA, přičemž byly využity celkem tři soubory dat, kdy každý soubor reprezentoval konkrétní hrubost mletí. Vstupní parametry pro výpočet byly následující: hypotéza H_0 – všechny průměry jsou si rovny; hypotéza H_1 – alespoň jeden průměr je odlišný od ostatních; úroveň významnosti $\alpha = 0,05$; efekt – střední; velikost efektu – 0,25; odlehlé hodnoty – zahrnutý; typ efektu – f; zaokrouhlení – 4.

Po výpočtu byly získány následující výstupní parametry: hodnota $F = 3,2845$; hodnota $p = 0,05002$. Jelikož hodnota p byla větší než hodnota α , byla přijata hypotéza H_0 – všechny průměry jsou si rovny a tím pádem hrubost mletí nemá vliv na extrakci vybraných látek za již zmíněných podmínek.

4.3.4 Navážka

Následujícím optimalizovaným parametrem byla navážka vzorku, resp. poměr navážky a objemu rozpouštědla. Optimální navážka vzorku byla testována na vzorku Z13. Pro zjištění vlivu velikosti navážky byly zvoleny tři různé úrovně – 1; 2 a 3 g kávy. Objem demineralizované vody byl 20 ml, doba extrakce byla zvolena 10 minut a extrakce probíhala při teplotě 60 °C. Pro každou navážku byly provedeny dvě HPLC-DAD analýzy.

Tabulka 20 – Plochy jednotlivých látek pro optimalizaci navážky vzorku

	HMF	Furfural	Maltol	2-Furylmethylketon	5-Methylfurfural	Kofein
Navážka 1g_01	404,1	176,6	54	46,6	105	11520,3
Navážka 1g_02	405,2	170,5	56,3	44,1	102,5	11531,8
Navážka 2g_01	743,1	323,9	104,5	88,4	187,7	22084,3
Navážka 2g_02	748,1	328,2	103,6	92,3	190	22037
Navážka 3g_01	1117,9	501,5	260,4	140,5	282,1	30480,3
Navážka 3g_02	1127,6	499,7	267,5	148,5	282,8	30533,1

Stejný způsob, jakým se postupovalo v případě ověření vlivu hrubosti mletí, byl použit i pro ověření vlivu velikosti navážky, resp. poměru navážka – objem rozpouštědla. Jediným rozdílem byla nutnost sjednocení velikosti ploch na konkrétní navážku. K tomuto účelu byly hodnoty ploch pro navážku 1 g vynásobeny dvěma a hodnoty ploch pro navážku 3 g byly vyděleny

hodnotou 1,5, čímž došlo k přepočtu všech ploch na navážku 2 g. Následně byly všechny plochy přepočítány na relativní plochy a byly vloženy do softwaru pro výpočet ANOVA (viz. Tabulka 20).

Výpočtem byly získány následující výstupní parametry: hodnota $F = 2,3533$ a hodnota $p = 0,1108$. Hodnota p byla větší než úroveň významnosti α a byla přijata hypotéza H_0 – všechny průměry jsou si rovny a vliv velikosti navážky nemá vliv na extrakci vybraných látek za již zmíněných podmínek. Nicméně, pro finální úpravu vzorku byla zvolena navážka 2 g, jelikož při této hodnotě byly získány vyšší píky, než v případě navážky 1 g a zároveň zůstal zachován relativně nízký poměr navážka – objem rozpouštědla, než v případě navážky 3 g.

Finální podmínky pro úpravu vzorku jsou tedy následující: extrakčním rozpouštědlem byla pro finální experimenty zvolena demineralizovaná voda, teplota extrakce 60 °C, doba extrakce 10 minut a navážka vzorku 2 g.

4.3.5 Opakovatelnost extrakce

Na závěr experimentu byla zjišťována opakovatelnost extrakce. Do tří Erlenmeyerových baněk byly naváženy 2 g vzorku Z13 a dále již byla provedena extrakce za již zmíněných finálních podmínek – objem demineralizované vody byl 20 ml, doba extrakce byla zvolena 10 minut a extrakce probíhala při teplotě 60 °C. Každý extrakt byl analyzován dvakrát metodou HPLC-DAD.

Tabulka 21 – Opakovatelnost extrakce vyjádřená jako RSD ploch píků pro tři různá opakování

	HMF	Furfural	Maltol	2-Furylmethylketon	5-Methylfurfural	Kofein
Extrakce 1_01	733,5	303,6	170,1	66,3	181,8	23943,4
Extrakce 1_02	733,1	298,9	171,3	66	187,2	23949,2
Extrakce 2_01	753,7	319,4	181,7	68,3	185,9	24764,4
Extrakce 2_02	745,6	320,1	186,7	65,5	188,8	24835,2
Extrakce 3_01	733,5	321,6	176,3	60,4	180,9	24966,9
Extrakce 3_02	735,2	323,7	184,4	62,2	185,3	25242,8
RSD [%]	1,16	3,34	3,88	4,50	1,66	2,21

Pro každou látku byl vypočítán průměr a hodnota směrodatné odchylky, následně byla vypočítána hodnota residuální směrodatné odchylky (RSD) v %, která je ukazatelem rozptylu dat (viz. Tabulka 21). Lze si povšimnout, že pro všechny látky je hodnota RSD menší než 5 %, což lze považovat za uspokojivý výsledek.

4.4 Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu

Veškeré analyzované vzorky kávy, tedy vzorky zrnkové, instantní kávy i vzorky kávy z pardubické pražírny ZRNO44 byly analyzovány pomocí HPLC – DAD metody.

4.4.1 Stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu u komerčních vzorků

K analýze bylo použito celkem 22 vzorků kávy, 17 zrnkových a 5 instantních. Nejvíce vzorků měla zastoupena společnost TCHIBO, dále Královská pražírna kávy a Mokasirs. Od společnosti TCHIBO byl mezi vzorky pro porovnání analyzován také jeden vzorek bezkofeinové kávy. Mezi instantními vzorky káv byl kromě typických značek, jako jsou L'or nebo Nescafé analyzován vzorek polské instantní kávy O Poranku. Tento vzorek dle etikety obsahoval pouze 30 % instantní kávy a ze 70 % byl tvořen praženými cereáliemi. Výsledky analyzovaných látek v daných vzorcích kávy jsou shrnuty v tabulce 22 ve formátu koncentrace \pm směrodatná odchylka (SD) ze tří měření.

Tabulka 22 – Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu ve vzorcích zrnkové a instantní kávy

Vzorek	HMF [mg/kg ± SD]	Furfural [mg/kg ± SD]	Maltol [mg/kg ± SD]	2-Furylmethylketon [mg/kg ± SD]	5-Methylfurfural [mg/kg ± SD]	Kofein [g/kg ± SD]
Z1 TCHIBO Privat Kaffee Brazil Mild	300,9 ± 0,31	61,1 ± 0,55	92,6 ± 6,61	22,0 ± 0,72	34,4 ± 2,87	17,3 ± 0,02
Z2 TCHIBO Privat Kaffee Brazil Decaf	276,9 ± 1,44	60,0 ± 0,79	109,9 ± 6,78	18,8 ± 1,85	35,7 ± 1,98	2,1 ± 0,04
Z3 TCHIBO Volcano Beans	459,0 ± 2,08	98,8 ± 0,60	112,9 ± 4,30	23,9 ± 0,32	49,2 ± 1,57	15,6 ± 0,01
Z4 TCHIBO Espresso Milano Style	287,0 ± 0,20	65,4 ± 0,26	139,2 ± 0,37	22,4 ± 0,44	40,5 ± 0,46	14,8 ± 0,04
Z5 TCHIBO Barista Espresso	51,5 ± 1,15	16,4 ± 0,31	202,2 ± 3,53	19,7 ± 0,39	17,5 ± 0,52	13,3 ± 0,02
Z6 TCHIBO Privat Kaffee Latin Grande	285,3 ± 0,15	65,1 ± 0,54	141,1 ± 0,41	24,0 ± 0,62	40,7 ± 0,54	15,0 ± 0,05
Z7 Marila standard	43,5 ± 0,11	13,4 ± 0,44	141,4 ± 2,37	51,2 ± 1,17	*8,0 ± 0,33	24,3 ± 0,05
Z8 Deluxe Tanzania Thamani	151,7 ± 1,32	44,6 ± 0,37	162,1 ± 0,72	22,2 ± 0,84	33,9 ± 0,85	13,1 ± 0,02
Z9 Královská pražírna kávy Ethiopia Sidamo Grande 2	312,3 ± 0,32	71,2 ± 0,14	118,9 ± 0,44	19,5 ± 1,34	38,9 ± 0,25	18,5 ± 0,06
Z10 Královská pražírna kávy Colombia Supremo 18+	126,5 ± 0,53	36,3 ± 0,60	208,2 ± 2,00	24,1 ± 0,50	30,6 ± 0,47	15,5 ± 0,01
Z11 Královská pražírna kávy Guatemala SHB Teresita	163,2 ± 0,82	39,2 ± 0,17	147,0 ± 4,86	19,0 ± 0,28	29,0 ± 0,23	15,2 ± 0,01
Z12 Cafedirect Machu Picchu	472,2 ± 1,03	103,6 ± 0,41	96,3 ± 2,04	25,3 ± 0,01	48,4 ± 0,61	15,1 ± 0,05
Z13 L'or	158,7 ± 1,44	42,4 ± 0,26	156,6 ± 3,37	*17,2 ± 0,50	27,1 ± 0,72	15,5 ± 0,05
Z14 Mokasirs DECISO	54,8 ± 0,42	33,4 ± 0,65	226,6 ± 1,29	25,8 ± 0,30	18,0 ± 0,25	21,9 ± 0,02
Z15 Mokasirs ORO BIO	155,1 ± 0,89	61,6 ± 0,47	219,2 ± 1,92	22,8 ± 0,18	43,6 ± 0,19	13,2 ± 0,04
Z16 Lavazza Caffè espresso	132,3 ± 0,62	30,4 ± 0,40	119,8 ± 1,52	19,5 ± 0,36	35,2 ± 0,80	16,7 ± 0,03
Z17 Staročeská jihlavanka směs	92,0 ± 0,23	44,1 ± 0,61	151,1 ± 0,55	41,7 ± 0,66	24,5 ± 0,46	26,3 ± 0,03
I1 L'or Classique smooth & aromatic	6212,6 ± 15,11	95,2 ± 0,46	454,1 ± 0,61	57,6 ± 0,67	68,6 ± 0,94	31,0 ± 0,09
I2 Tesco original instant coffee	3223,7 ± 7,49	47,2 ± 0,60	398,5 ± 3,28	74,4 ± 0,49	57,5 ± 0,79	49,6 ± 0,06
I3 Jihlavanka Crema	1545,3 ± 5,44	39,5 ± 0,71	412,0 ± 3,16	47,9 ± 0,26	52,1 ± 0,29	45,5 ± 0,07
I4 O Poranku	1830,2 ± 6,21	17,4 ± 0,44	573,1 ± 2,14	*15,8 ± 0,58	*15,4 ± 0,15	10,9 ± 0,02
I5 Nescafé gold rich aroma & smooth taste	1301,3 ± 2,46	15,8 ± 0,36	248,8 ± 1,33	*13,5 ± 0,68	19,0 ± 0,74	20,0 ± 0,03

* hodnoty jsou pod mezí kvantifikace

Z výsledků měření vyplývá, že vzorky zrnkové kávy obsahují méně HMF než vzorky kávy instantní v porovnání s koncentracemi ostatních furanických látek, kde již takové rozdíly mezi zrnkovými a instantními vzorky káv pozorovány nejsou. Dále lze pozorovat poměrně výrazné koncentrace kofeinu u prvních tří vzorků instantních káv (I1, I2 a I3) v porovnání s ostatními vzorky. Tyto tři zmíněné vzorky, především vzorek Jihlavanka Crema (I3) je tvořen 100% robustou a vzorky L'or (I1) a Tesco originál (I2) jsou směsí arabiky a robusty. Vykazují tak vysoké koncentrace kofeinu v porovnání s ostatními vzorky proto, že robusta obsahuje 2-3x více kofeinu než arabika (viz. Tabulka 2), toto tvrzení bylo také analýzami potvrzeno. Ze zrnkových káv dosahuje obdobně vysokých koncentrací pouze Marila standard (Z7) a Staročeská jihlavanka směs (Z17), kdy se také v prvním případě jedná o 100% robustu, ve druhém o směs robusty. Naopak nejnižší koncentrace kofeinu byla potvrzena u vzorku bezkofeinové kávy TCHIBO Privat Kaffee Brazil Decaf (Z2). Obsah kofeinu v bezkofeinové kávě by měl být nižší než 0,1 % (v 1 kg bezkofeinové kávy musí být obsah kofeinu nižší než 1000 mg), tudíž dle tohoto kritéria vzorek Z2 překračuje povolený obsah kofeinu v bezkofeinové kávě (viz. Tabulka 2).

Z pohledu HMF byla nejvyšší koncentrace této furanické látky zjištěna u kávy L'or (I1), následovala káva Tesco original (I2) a O Poranku (I3). Naopak nejméně HMF obsahovala káva Marila standard (Z7), následovala TCHIBO Barista Espresso (Z5) a Staročeská Jihlavanka směs (Z17).

Nejvyšší koncentrace maltolu byla nalezena u polské kávy O Poranku. U tohoto vzorku byla očekávána a potvrzena nejvyšší koncentrace této látky, jelikož obsahuje 70 % pražených cereálií a pouze 30 % kávy a zároveň ze vzorků instantní kávy obsahuje nejméně kofeinu. Po bezkofeinové kávě od společnosti TCHIBO (Z2) se jedná o vzorek s druhým nejnižším obsahem kofeinu mezi všemi vzorky.

Koncentrace HMF u vzorků zrnkových káv se pohybovaly v rozmezí 43,5 – 472,2 mg/kg, u furfuralu 13,4 – 103,6 mg/kg, maltolu 92,6 – 226,6 mg/kg, 2-furylmethylketonu 17,2 – 51,2 mg/kg, 5-methylfurfuralu 8,0 – 49,2 mg/kg a kofeinu 13,1 – 26,3 g/kg.

Koncentrace HMF u instantních vzorků káv se pohybovaly v rozmezí 1301,3 – 6212,6 mg/kg, u furfuralu 15,8 – 95,2 mg/kg, maltolu 248,8 – 454,1 mg/kg, 2-furylmethylketonu 13,5 – 74,4 mg/kg, 5-methylfurfuralu 19,0 – 68,6 mg/kg a kofeinu 20,0 – 49,6 g/kg. Do těchto koncentračních rozmezí pro jednotlivé látky nebyly zohledněny vzorky TCHIBO Privat Kaffee Brazil Decaf (Z2) a O Poranku (I4).

4.4.2 Stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu při procesu pražení

Dále byly analyzovány vzorky arabiky (Brazílie) a robusty (Indie) v různých stupních pražení (od zelené kávy až po finální produkt) a také vzorky arabiky (Peru a Etiopie), u kterých byla analyzována pouze zelená káva a následně finální produkt. U arabiky trval celý proces pražení 12 minut, u robusty 17 minut (robusta byla kvůli experimentu pražena do vyššího stupně). Z pražírny ZRNO44 byly získány záznamy teplotních profilů pražení arabiky a robusty, které jsou uvedeny v příloze 16-17.

Tabulka 23 – Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu ve vzorcích kávy v různých stupních pražení (arabika)

Vzorek	HMF [mg/kg ± SD]	Furfural [mg/kg ± SD]	Maltol [mg/kg ± SD]	2-Furylmethylketon [mg/kg ± SD]	5-Methylfurfural [mg/kg ± SD]	Kofein [g/kg ± SD]
Zelená Brazílie	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	13,4 ± 0,03
4 min	*0,9 ± 0,13	*5,5 ± 0,16	<LOD	<LOD	<LOD	15,3 ± 0,01
6 min	18,4 ± 0,07	*6,2 ± 0,06	<LOD	<LOD	*1,0 ± 0,14	13,7 ± 0,03
8 min	100,0 ± 0,43	*6,1 ± 0,36	82,8 ± 2,95	<LOD	*1,8 ± 0,13	12,9 ± 0,21
10 min	587,5 ± 0,34	34,4 ± 0,73	100,9 ± 1,23	<LOD	*12,4 ± 0,16	15,6 ± 0,04
12 min (Pražená Brazílie)	472,9 ± 0,53	49,4 ± 0,15	79,6 ± 0,65	<LOD	30,1 ± 0,17	15,6 ± 0,03
Zelená Etiopie	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	9,5 ± 0,03
Pražená Etiopie	456,3 ± 0,28	70,6 ± 0,14	107,0 ± 0,94	*15,8 ± 0,43	36,8 ± 0,11	14,0 ± 0,04
Zelená Peru	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8,5 ± 0,03
Pražená Peru	615,0 ± 0,48	85,4 ± 0,11	104,4 ± 0,99	19,3 ± 0,22	39,8 ± 0,69	14,6 ± 0,04

* hodnoty jsou pod mezí kvantifikace

Tabulka 24 – Výsledky stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu ve vzorcích kávy v různých stupních pražení (robusta)

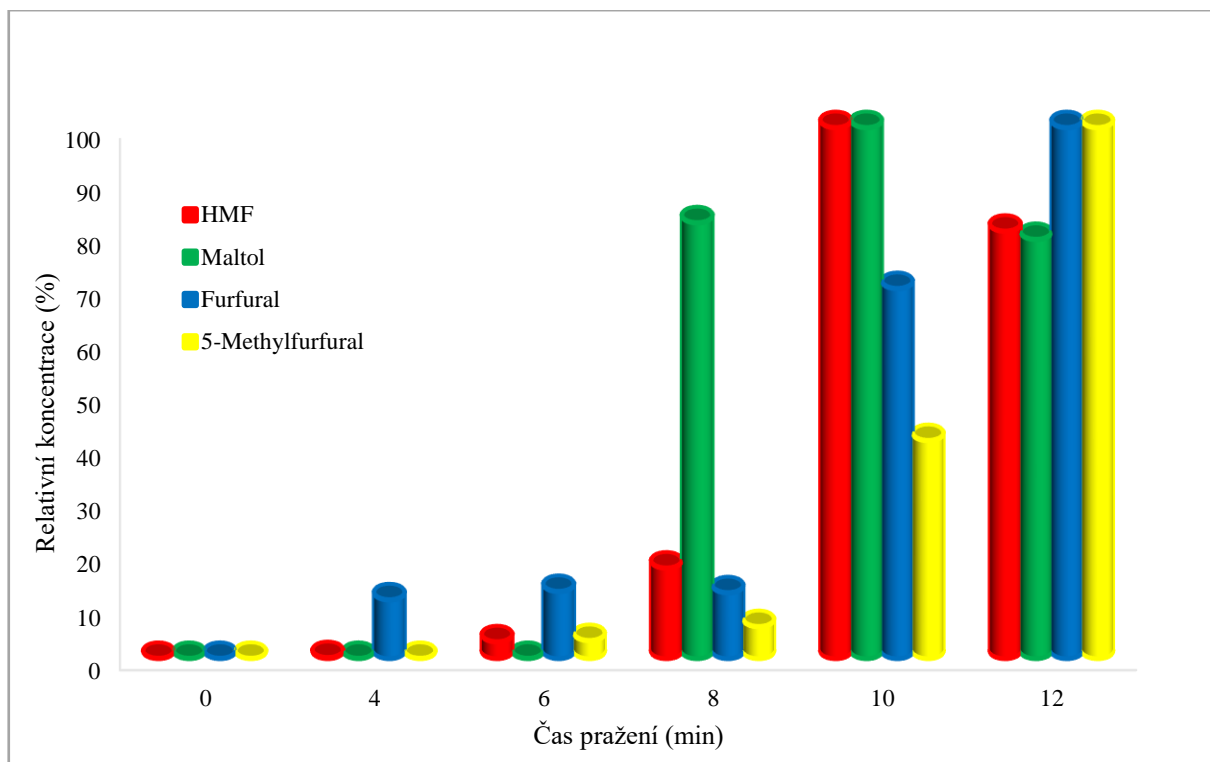
Vzorek	HMF [mg/kg ± SD]	Furfural [mg/kg ± SD]	Maltol [mg/kg ± SD]	2-Furylmethylketon [mg/kg ± SD]	5-Methylfurfural [mg/kg ± SD]	Kofein [g/kg ± SD]
Zelená robusta	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15,9 ± 0,02
2 min	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	16,0 ± 0,04
4 min	*0,6 ± 0,03	<LOD	<LOD	*7,5 ± 0,06	<LOD	24,0 ± 0,01
6 min	*1,0 ± 0,10	<LOD	<LOD	*8,4 ± 0,28	<LOD	22,8 ± 0,02
8 min	11,9 ± 0,01	*2,8 ± 0,16	47,8 ± 0,18	*7,6 ± 0,43	*0,3 ± 0,11	25,8 ± 0,03
10 min	110,8 ± 0,68	14,5 ± 0,26	86,9 ± 0,72	*14,3 ± 0,16	*2,7 ± 0,11	24,5 ± 0,02
12 min	290,3 ± 0,79	37,5 ± 0,22	118,4 ± 0,63	*17,1 ± 0,13	*14,1 ± 0,04	25,9 ± 0,03
14 min	144,2 ± 0,30	37,2 ± 0,07	172,6 ± 0,53	21,8 ± 0,17	26,3 ± 0,32	27,6 ± 0,02
16 min	41,5 ± 0,69	19,4 ± 0,09	211,5 ± 0,76	22,9 ± 0,08	19,1 ± 0,19	25,7 ± 0,04
17 min (Pražená robusta)	31,1 ± 0,69	15,3 ± 0,28	259,8 ± 0,90	27,7 ± 0,27	*15,1 ± 0,20	30,8 ± 0,05

* hodnoty jsou pod mezí kvantifikace

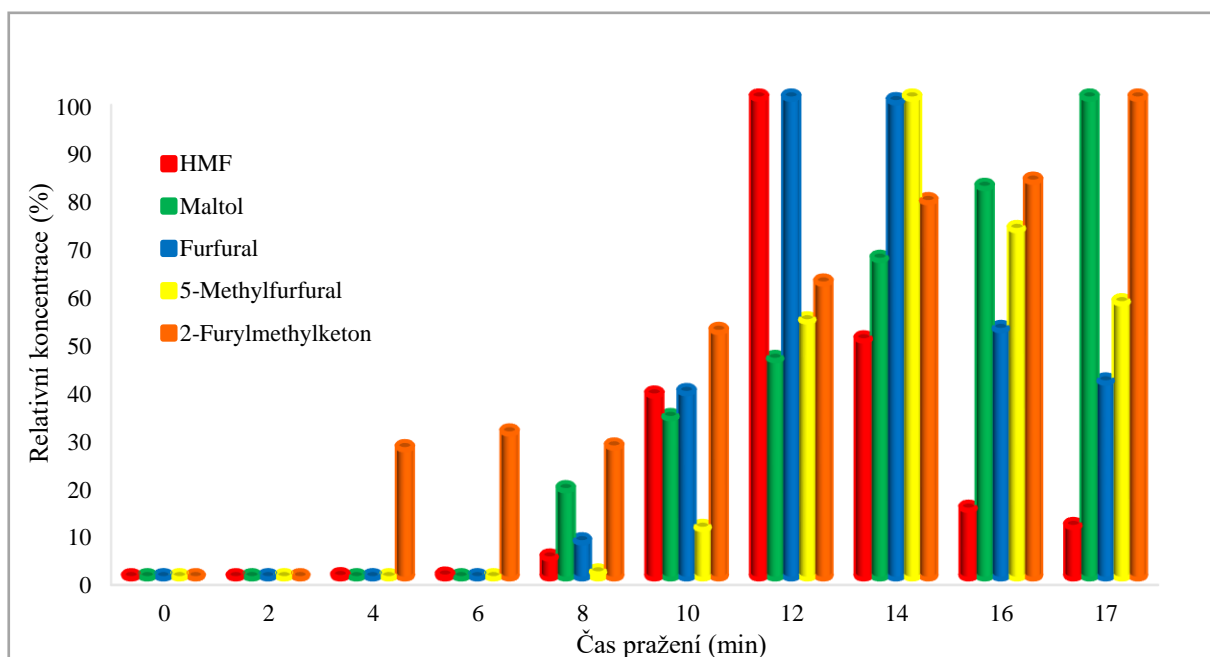
Z tabulky 23 a je patrné, že v zelené kávě arabika (Brazílie, Etiopie, Peru) se nenacházely furanické látky ani maltol, ale pouze kofein. Pražená káva (Brazílie, Etiopie, Peru) již obsahovala furanické látky, maltol i kofein ovšem s výjimkou pražené Brazílie, ve které nebyl detekován 2-furylmethylketon. Koncentrace kofeinu se u kávy arabika (Brazílie) během pražení příliš výrazně neměnila v porovnání se zelenou a praženou Etiopií nebo zelenou a praženou Peru, kde je zřetelný významnější rozdíl (zelená káva – pražená káva). Koncentrace HMF, stejně tak maltolu dosahuje svého maxima v 10. minutě, s rostoucí dobou pražení pak jejich koncentrace klesá. Koncentrace furfuralu, stejně jako 5-methylfurfuralu s dobou pražení roste a maxima tyto látky dosahují v 12. minutě, tedy na konci pražení (viz. Obrázek 21).

Obdobně jako u arabiky, také u robusty nebyly kromě kofeinu detekovány žádné furanické látky ani maltol v zelené kávě (viz. Tabulka 24). S rostoucí dobou pražení byly postupně identifikovány jednotlivé furanické látky, maltol i kofein. Koncentrace HMF a furfuralu do 12. minuty pražení rostla, kde dosáhla svého maxima, následně prudce klesala. Maltol začal vznikat až od 8. minuty pražení a zaznamenal plynulý nárůst koncentrace až do konce pražení. Koncentrace 2-furylmethylketonu zaregistrovala od 4. minuty pražení nárůst, v 8. minutě mírný pokles a pak následoval již nárůst koncentrace až do 17. minuty pražení. Koncentrace 5-methylfurfuralu zaznamenala své maximum v 14. minutě, poté již s dobou pražení jeho koncentrace plynule klesala (viz. Obrázek 22). Koncentrace kofeinu se během pražení poměrně výrazně mění. Na tuto skutečnost odkazuje i studie [89], která prokázala odlišnost kofeinu v jednotlivých kávových zrnech ze stejného sběru.

L. Macheiner a kol. [51] ve své práci analyzovali furany v různých stupních pražení a došli ke stejnému závěru, že ze sledovaných furanických látek vzniká během pražení nejvíce HMF v porovnání s ostatními furanickými látkami, HMF dosáhlo během pražení svého maxima v odlišném čase. To může být dáno druhem kávy a teplotním profilem pražení. Zároveň se autoři nezaměřili na analýzu maltolu, který nemůže být s touto studií porovnán.



Obrázek 21 – Závislost relativní koncentrace na době pražení furanických látek a maltolu (arabika).



Obrázek 22 – Závislost relativní koncentrace na době pražení furanických látek a maltolu (robusta).

4.5 Výsledky stanovení sacharidů

Glukóza, fruktóza a sacharóza byly analyzovány pomocí HPLC metody s RI detekcí. K analýze byly použity pouze vzorky arabiky a robusty v různých stupních pražení z pražírny ZRNO44, kde byl očekáván vysoký obsah těchto sacharidů. U komerčně dostupných vzorků nebyl předpokládán tak vysoký obsah sacharidů, proto tyto vzorky nebyly podrobeny analýzám.

Tabulka 25 – Výsledky stanovení sacharidů v různých stupních pražení (arabika)

Vzorek	Sacharóza [g/kg ± SD]
Zelená Brazílie	92,1 ± 5,36
4 min	93,6 ± 9,16
6 min	75,7 ± 8,56
8 min	48,3 ± 2,24
10 min	22,0 ± 5,03
12 min (Pražená Brazílie)	*7,7 ± 1,00
Zelená Etiopie	107,8 ± 12,05
Pražená Etiopie	<LOD
Zelená Peru	61,8 ± 13,53
Pražená Peru	*1,5 ± 0,29

* hodnoty jsou pod mezí kvantifikace

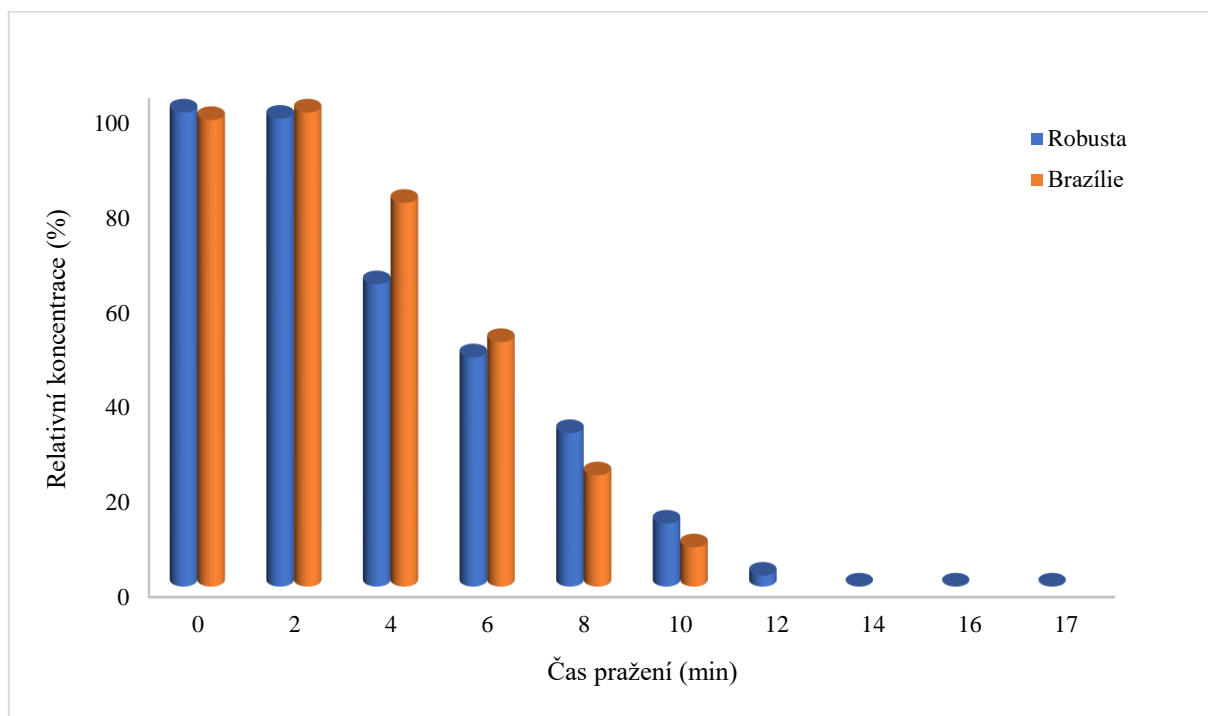
Pouze v zelené kávě (Brazílie) byla detekována glukóza a fruktóza, ovšem jejich koncentrace se nachází pod hodnotou LOQ. V dalších stupních pražení a vzorcích zelené a pražené kávy byly hodnoty glukózy a fruktózy pod LOD. Koncentrace sacharózy se vzrůstající dobou pražení klesá. Během prvních 4 minut pražení se její koncentrace ještě neměnila, probíhala fáze sušení (viz. Tabulka 25). Pokles koncentrace sacharózy si lze vysvětlit tak, že během pražení dochází k reakcím sacharidů s aminokyselinami, peptidy a bílkovinami a k úbytku sacharidů za vzniku např. furanických látek a také dochází ke karamelizaci.

Tabulka 26 – Výsledky stanovení sacharidů v různých stupních pražení (robusta)

Vzorek	Sacharóza [g/kg ± SD]
Zelená robusta	35,2 ± 0,44
2 min	34,7 ± 1,12
4 min	22,4 ± 3,08
6 min	17,0 ± 1,84
8 min	*11,4 ± 1,24
10 min	*4,7 ± 1,83
12 min	*0,8 ± 0,71
14 min	<LOD
16 min	<LOD
17 min (Pražená robusta)	<LOD

* hodnoty jsou pod mezí kvantifikace

V robustě již nebyla detekována glukóza a fruktóza ani v zelené kávě. Koncentrace sacharózy opět procesem pražení klesala v důsledku reakcí sacharidů s aminokyselinami, bílkovinami a peptidy. Koncentrace sacharózy se na začátku pražení neměnila, první 2 minuty probíhalo sušení kávových zrn. V 8. – 12. minutě se hodnoty nacházely pod LOQ a od 14. minuty již nebyla detekována ve vzorku kávy ani sacharóza (viz. Tabulka 26).



Obrázek 23 – Závislost relativní koncentrace na době pražení sacharidů v arabice a robustě.

Pokles sacharózy je ve vzorcích arabiky a robusty víceméně lineární v čase až do 12. minuty, kdy se její koncentrace blíží nule (obrázek 23). Z tabulky 26 je patrné, že zelená arabika obsahuje téměř trojnásobné množství sacharózy.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá stanovením furanických látek, maltolu a sacharidů ve vzorcích kávy. K analýze byly použity komerčně dostupné vzorky zrnkové a instantní kávy a také vzorky kávy v různých fázích pražení, které byly získány ve spolupráci s pardubickou pražírnou ZRNO44.

V experimentální části práce byly nejprve optimalizovány podmínky pro stanovení furanických látek, maltolu a kofeinu technikou HPLC s DAD a pro stanovení sacharidů technikou HPLC s RI detekcí. Dále byla optimalizována úprava vzorků před analýzou. Vhodným extrakčním rozpouštědlem pro jednotlivé analýzy byla zvolena demineralizovaná voda, teplota extrakce 60 °C, navážka vzorku 2 g, objem rozpouštědla 20 ml a doba extrakce 10 minut. Dle statistického testování pomocí analýzy rozptylu ANOVA bylo zjištěno, že hrubost mletí kávových zrn ani velikost navážky nemá vliv na extrakci analyzovaných látek.

Optimalizované podmínky byly použity pro stanovení furanických látek, maltolu, kofeinu a sacharidů ve 22 komerčně dostupných vzorcích káv a dále také ve vzorcích arabiky a robusty v různých fázích pražení (od zelené kávy až po konečný produkt). Byly porovnávány obsahy jednotlivých furanických látek a maltolu ve vzorcích zrnkových a instantních káv. Z výsledků měření vyplývá, že vzorky zrnkové kávy obsahovaly nižší obsah HMF než vzorky instantní kávy. U ostatních furanických látek již takové rozdíly pozorovány nebyly. Nejvyšší koncentraci HMF vykazovala instantní káva L'or, naopak nejnižší mletá káva Marila standard. Mezi vzorky byla analyzována také bezkofeinová káva značky TCHIBO, která překročila povolené množství kofeinu, které by mělo být nižší než 0,1 %. Nejvyšší koncentrace maltolu byla potvrzena u vzorku polské instantní kávy O Poranku, jelikož tato káva byla pouze ze 30 % kávou a zbylých 70 % tvořily pražené cereálie.

Obsah furanických látek, maltolu a sacharózy byly vyhodnoceny a porovnány také ve vzorcích arabiky a robusty v různých fázích pražení. Bylo potvrzeno, že zelená kávová zrna neobsahovala furanické látky ani maltol a tyto látky začaly vznikat až procesem pražení. Naopak sacharóza dosahovala nejvyšších koncentrací v zelených kávových zrnech a během pražení postupně klesala. Procesem pražení totiž dochází k reakci sacharidů s aminokyselinami, bílkovinami, peptidy a vzniku furanických látek.

Vzhledem k nízkým koncentracím glukózy a fruktózy nebylo možné tyto sacharidy ve vzorcích káv identifikovat. Výjimkou byla sacharóza, která se v kávě vyskytovala řádově v desítkách

g/kg, a proto ji bylo možné ve vzorcích jako jedinou ze sacharidů stanovit. V porovnání arabika/robusta obsahovala zelená kávová zrna arabiky až trojnásobně vyšší koncentrace sacharózy než robusta.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] FARAH, Adriana a Thiago FERREIRA DOS SANTOS. The Coffee Plant and Beans. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 5-10. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2
- [2] RUIZ-DIAZ, Claudia Patricia, José C. VERLE RODRIGUES, Erick MIRO-RIVERA a Liz M. DIAZ-VAZQUEZ. Impact of the coffee berry borer on the volatile and semi-volatile compounds; qualitative profile of *Coffea arabica* berries. *Food Chemistry Advances* [online]. 2023, **2**. ISSN 2772753X. Dostupné z: doi:10.1016/j.focha.2022.100154
- [3] ZRNO 44 | ZRNO 44 | [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.zrno44.cz/>
- [4] CAGLIANI, Laura Ruth, Gloria PELLEGRINO, Graziella GIUGNO a Roberto CONSONNI. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* in roasted and ground coffee blends. *Talanta* [online]. 2013, **106**, 169-173. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.12.003
- [5] ASHIHARA, Hiroshi. Plant Biochemistry. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 19-28. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00003-6
- [6] BRZOŇOVÁ, L., *Svět kávy*. 2. přepracované vydání. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú., [2017]. Jak poznáme kvalitu?. ISBN 978-80-87719-53-4.
- [7] LITTARDI, Paola, Massimiliano RINALDI, Maria GRIMALDI, Antonella CAVAZZA a Emma CHIAVARO. Effect of Addition of Green Coffee Parchment on Structural, Qualitative and Chemical Properties of Gluten-Free Bread. *Foods* [online]. 2021, **10**(1). ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10010005
- [8] ESQUIVEL, Patricia a Víctor M. JIMÉNEZ. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* [online]. 2012, **46**(2), 488-495. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2011.05.028
- [9] COFFEE: THE JOURNEY FROM THE SEED TO YOUR CUP | Essense Coffee. [online]. [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://essense.coffee/en/coffee-the-journey-from-the-seed-to-your-cup/>

- [10] HAMZALIOĞLU, Aytül a Vural GÖKMEN. 5-Hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling. *Food Chemistry* [online]. 2020, **318**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126467
- [11] WEI, Feifei a Masaru TANOKURA. Chemical Changes in the Components of Coffee Beans during Roasting. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 83-91. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00010-3
- [12] OLIVEIRA PETKOWICZ, Carmen L. de. Polysaccharides in Coffee and Their Relationship to Health. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 163-172. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00018-8
- [13] SILVA, Ana Carolina R., Rafael GARRETT, Claudia M. REZENDE a Sven W. MECKELMANN. Lipid characterization of arabica and robusta coffee beans by liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2022, **111**. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2022.104587
- [14] CANO-MARQUINA, A., J.J. TARÍN a A. CANO. The impact of coffee on health. *Maturitas* [online]. 2013, **75**(1), 7-21. ISSN 03785122. Dostupné z: doi:10.1016/j.maturitas.2013.02.002
- [15] ÖZDESTAN, Özgül. Evaluation of bioactive amine and mineral levels in Turkish coffee. *Food Research International* [online]. 2014, **61**, 167-175. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2013.12.027
- [16] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [17] Pražení kávy: Proč a jak se praží káva | Lázeňská káva. *301 Moved Permanently* [online]. © Lázeňská káva s.r.o. 2016 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: <https://www.lazenskakava.cz/co-se-deje-se-zrnem-v-prubehu-prazeni/>

- [18] PROCIDA, Giuseppe, Corrado LAGAZIO, Francesca CATENI, Marina ZACCHIGNA a Angelo CICHELLI. Characterization of Arabica and Robusta volatile coffees composition by reverse carrier gas headspace gas chromatography–mass spectrometry based on a statistical approach. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2020, **29**(10), 1319-1330. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-020-00779-7
- [19] PARK, Sung-hyun, Ara JO a Kwang-Geun LEE. Effect of various roasting, extraction and drinking conditions on furan and 5-hydroxymethylfurfural levels in coffee. *Food Chemistry* [online]. 2021, **358**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.129806
- [20] KOCADAĞLI, Tolgahan a Vural GÖKMEN. Formation of acrylamide in coffee. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2022, **45**. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2022.100842
- [21] G, Messina, Zannella C a Monda V. The Beneficial Effects of Coffee in Human Nutrition. *Biology and Medicine* [online]. 2015, **07**(04). ISSN 09748369. Dostupné z: doi:10.4172/0974-8369.1000240
- [22] NIEBER, Karen. The Impact of Coffee on Health. *Planta Medica* [online]. 2017, **83**(16), 1256-1263. ISSN 0032-0943. Dostupné z: doi:10.1055/s-0043-115007
- [23] CAMPION, Edward W., Rob M. VAN DAM, Frank B. HU a Walter C. WILLETT. Coffee, Caffeine, and Health. *New England Journal of Medicine* [online]. 2020, **383**(4), 369-378. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1816604
- [24] VIEIRA, Tiago, Sara CUNHA a Susana CASAL. Mycotoxins in Coffee. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 225-233. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00025-5
- [25] DE MELO, Wellington Washington Andrade, Fábio Lúcio SANTOS a Francisco SCINOCCA. Modal analysis of the coffee fruit-peduncle-branch system coffee fruit-peduncle-branch system. *Smart Agricultural Technology* [online]. 2023, **4**. ISSN 27723755. Dostupné z: doi:10.1016/j.atech.2023.100217
- [26] KLEINWÄCHTER, Maik, Gerhard BYTOF a Dirk SELMAR. Coffee Beans and Processing. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 73-81. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00009-7

- [27] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [28] CATÃO, Alexandre A., Nathan de S. MATEUS, Cinthia da C. GARCIA, Michelle C. DA SILVA, Fabio J.M. NOVAES, Simone ALVES, Philip J. MARRIOTT a Ademário I. DA SILVA. Coffee-roasting variables associated with volatile organic profiles and sensory evaluation using multivariate analysis. *Applied Food Research* [online]. 2022, **2**(2). ISSN 27725022. Dostupné z: doi:10.1016/j.afres.2022.100223
- [29] ASGHARI, Zeinab, Hassan SERESHTI, Sara SOLTANI, Hamid RASHIDI NODEH a Mohammad HOSSEIN SHOJAEI ALIABADI. Alginate aerogel beads doped with a polymeric deep eutectic solvent for green solid-phase microextraction of 5-hydroxymethylfurfural in coffee samples. *Microchemical Journal* [online]. 2022, **181**. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2022.107729
- [30] GRZELCZYK, Joanna, Petr FIURASEK, Ashok KAKKAR a Grażyna BUDRYN. Evaluation of the thermal stability of bioactive compounds in coffee beans and their fractions modified in the roasting process. *Food Chemistry* [online]. 2022, **387**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.132888
- [31] Srovnání zrnkové kávy Arabiky a Robusty. COFFEESPOT, Pražírna [online]. [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.coffeespot.cz/blog/rozdily-kava-arabica-robusta/>
- [32] PubChem Compound Summary for CID 237332, 5-Hydroxymethylfurfural, 2023. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/237332>
- [33] ZHU, Mengting, You LONG, Yingjie MA, Yousheng HUANG, Yin WAN, Qiang YU, Jianhua XIE a Yi CHEN. Investigation of thermal contaminants in coffee beans induced by roasting: A kinetic modeling approach. *Food Chemistry* [online]. 2022, **378**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.132063
- [34] TEIXIDÓ, Erika, Encarnación MOYANO, F. Javier SANTOS a M. Teresa GALCERAN. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1185**(1), 102-108. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.01.057

- [35] FRANCISCO, Karen C.A., Alnilan LOBATO, Nikola TASIĆ, Arnaldo A. CARDOSO a Luís M. GONÇALVES. Determination of 5-hydroxymethylfurfural using an electropolymerized molecularly imprinted polymer in combination with Salle. *Talanta* [online]. 2022, **250**. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2022.123723
- [36] MARTINS, Fernanda C.O.L., Gabriela M.R.N. ALCANTARA, Anna Flavia S. SILVA, Wanessa R. MELCHERT a Fábio R.P. ROCHA. The role of 5-hydroxymethylfurfural in food and recent advances in analytical methods. *Food Chemistry* [online]. 2022, **395**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.133539
- [37] MENEGAZZO, Federica, Elena GHEDINI a Michela SIGNORETTO. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) Production from Real Biomasses. *Molecules* [online]. 2018, **23**(9). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092201
- [38] The Merck Index Online, Royal Society of Chemistry 2013, záznam M5603. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m5603/furfural?q=authorize>
- [39] WANG, Yu, H. RODOLFO JULIANI, James E. SIMON a Chi-Tang HO. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction. *Food Chemistry* [online]. 2009, **115**(1), 233-237. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.014
- [40] PubChem Compound Summary for CID 14505, 2-acetylfuran, 2023. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14505>
- [41] PubChem Compound Summary for CID 12097, 5-methylfurfural, 2023. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12097>
- [42] The Merck Index Online, Royal Society of Chemistry 2013, záznam M7047. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7047/maltol?q=authorize>
- [43] Norma jakosti č. ČSV 1/1999 *Český med.*

- [44] RISNER, Charles H., Melissa J. KISER a Michael F. DUBE. An Aqueous High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey and Other Sugar-containing Materials. *Journal of Food Science* [online]. 2006, **71**(3), C179-C184. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2006.tb15614.x
- [45] TEIXIDÓ, E., F.J. SANTOS, L. PUIGNOU a M.T. GALCERAN. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1135**(1), 85-90. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.09.023
- [46] NOZAL, María J, José L BERNAL, Laura TORIBIO, Juan J JIMÉNEZ a María T MARTÍN. High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, **917**(1-2), 95-103. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)00702-6
- [47] BASARAN, Burhan, Pınar ANLAR, Zeynep Feyza YILMAZ ORAL, Zerrin POLAT a Güzin KABAN. Risk assessment of acrylamide and 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) exposure from bread consumption: Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2022, **107**. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2022.104409
- [48] ALBOUCHI, Abdullatif a Michael MURKOVIC. LC method for the direct and simultaneous determination of four major furan derivatives in coffee grounds and brews. *Journal of Separation Science* [online]. 2019, **42**(9), 1695-1701. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201900061
- [49] ALBOUCHI, Abdullatif a Michael MURKOVIC. Investigation on the mitigation effects of furfuryl alcohol and 5-hydroxymethylfurfural and their carboxylic acid derivatives in coffee and coffee-related model systems. *Food Research International* [online]. 2020, **137**. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2020.109444
- [50] LIU, Qing, Pingping ZHOU, Pengjie LUO a Pinggu WU. Occurrence of Furfural and Its Derivatives in Coffee Products in China and Estimation of Dietary Intake. *Foods* [online]. 2023, **12**(1). ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods12010200

- [51] MACHEINER, Lukas, Anatol SCHMIDT, Franz KARPFF a Helmut K. MAYER. A novel UHPLC method for determining the degree of coffee roasting by analysis of furans. *Food Chemistry* [online]. 2021, **341**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128165
- [52] DE ANDRADE, Jucimara Kulek, Camila Kulek DE ANDRADE, Emy KOMATSU, Hélène PERREAULT, Yohandra Reyes TORRES, Marcos Roberto DA ROSA a Maria Lurdes FELSNER. A validated fast difference spectrophotometric method for 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) determination in corn syrups. *Food Chemistry* [online]. 2017, **228**, 197-203. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.158
- [53] DURMAZ, Gökhan a Vural GÖKMEN. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural and 2-furfural in oils as indicators of heat pre-treatment. *Food Chemistry* [online]. 2010, **123**(3), 912-916. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.001
- [54] DU, Kunze, Jin LI, Yun BAI, Mingrui AN, Xiu-mei GAO a Yan-xu CHANG. A green ionic liquid-based vortex-forced MSPD method for the simultaneous determination of 5-HMF and iridoid glycosides from Fructus Corni by ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2018, **244**, 190-196. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.057
- [55] CQUATICCI, Laura, Simone ANGELONI, Nazarena CELA, Fernanda GALGANO, Sauro VITTORI, Giovanni CAPRIOLI a Nicola CONDELLI. Impact of coffee species, post-harvesting treatments and roasting conditions on coffee quality and safety related compounds. *Food Control* [online]. 2023, **149**. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2023.109714
- [56] PÁNEK, J., *Základy výživy*. Praha: Svoboda Servis, 2002. ISBN 80-86320-23-5.
- [57] PubChem Compound Summary for CID 5793, Glukóza, 2023. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5793>
- [58] SHENDURSE, A.M. a C.D. KHEDKAR. Glucose: Properties and Analysis. In: *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 239-247. ISBN 9780123849533. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00353-6

- [59] Glukóza – Multimediaexpo.cz. *Multimediální česká otevřená encyklopedie Multimediaexpo.cz* [online].
Dostupné z: <http://www.multimediaexpo.cz/mmecz/index.php/Gluk%C3%B3za>
- [60] PubChem Compound Summary for CID 2723872, Fruktóza, 2023. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fructose>
- [61] PubChem Compound Summary for CID 5988, Sacharóza, 2023. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5988>
- [62] HOZA, Ignác. *Potravinářská biochemie I*. Vyd. 2. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011. ISBN 978-80-7318-936-5.
- [63] HÁLKOVÁ, Jana, Jana RIEGLOVÁ a Marie RUMÍŠKOVÁ. *Analýza potravin*. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2000. ISBN 80-902775-3-5.
- [64] GALANT, A.L., R.C. KAUFMAN a J.D. WILSON. Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry* [online]. 2015, **188**, 149-160. ISSN 03088146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.071](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.071)
- [65] Davídek Jiří, Velíšek Jan. *Analýza potravin*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha (1988).
- [66] BAŞKAN, Kevser Sözgen, Esmâ TÜTEM, Esin AKYÜZ, Seda ÖZEN a Reşat APAK. Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. *Talanta* [online]. 2016, **147**, 162-168. ISSN 00399140. Dostupné z: [doi:10.1016/j.talanta.2015.09.049](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.049)
- [67] JURKOVÁ, Marie, Jana OLŠOVSKÁ a Pavel ČEJKA. Determination of Sugars and Saccharides in Beer. *Kvasny Prumysl* [online]. 2018, **64**(2), 58-64. ISSN 00235830. Dostupné z: [doi:10.18832/kp201812](https://doi.org/10.18832/kp201812)
- [68] ZAKHAROVA, A. M., I. L. GRINSHTEIN a L. A. KARTSOVA. Determination of carbohydrates and sweeteners in foods and biologically active additives by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2013, **68**(12), 1081-1084. ISSN 1061-9348. Dostupné z: [doi:10.1134/S1061934813100122](https://doi.org/10.1134/S1061934813100122)

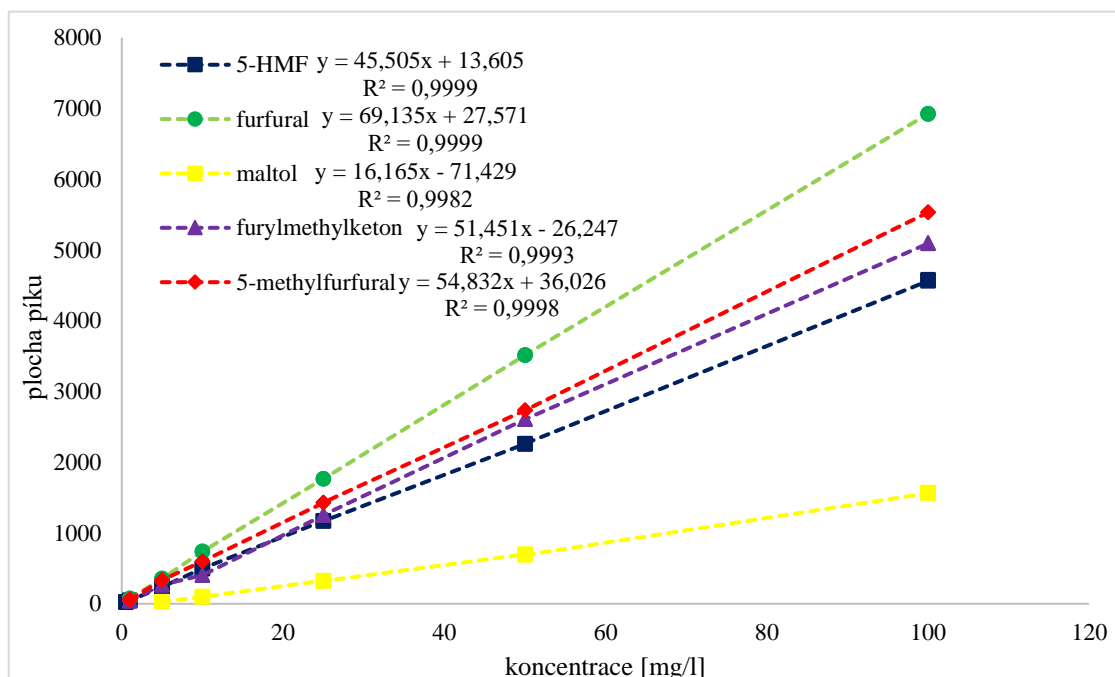
- [69] ANDRASI, M.; GYEMANT, G.; SAJTOS, Z.; NAGY, C. Analysis of Sugars in Honey Samples by Capillary Zone Electrophoresis Using Fluorescence Detection. *Separations* 2023, 10, 150. Dostupné z: doi.org/10.3390/separations10030150
- [70] WANG, Tong, Xingbin YANG, Dongying WANG, Yadong JIAO, Yu WANG a Yan ZHAO. Analysis of compositional carbohydrates in polysaccharides and foods by capillary zone electrophoresis. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **88**(2), 754-762. ISSN 01448617. Dostupné z: [doi:10.1016/j.carbpol.2012.01.039](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.039)
- [71] TŮMA, Petr, Blanka SOMMEROVÁ a Václav DANĚČEK. On-line coupling of capillary electrophoresis with microdialysis for determining saccharides in dairy products and honey. *Food Chemistry* [online]. 2020, **316**. ISSN 03088146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2020.126362](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126362)
- [72] JALALUDIN, Iqbal a Jeongkwon KIM. Comparison of ultraviolet and refractive index detections in the HPLC analysis of sugars. *Food Chemistry* [online]. 2021, **365**. ISSN 03088146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2021.130514](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130514)
- [73] MELICHAROVÁ, Šárka. *Stanovení vybraných látek v různých stádiích kvasného procesu medoviny*. Pardubice, 2016. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Soňa Řezková, Ph.D.
- [74] SOYSEVEN, M., B. SEZGIN a G. ARLI. A novel, rapid and robust HPLC-ELSD method for simultaneous determination of fructose, glucose and sucrose in various food samples: Method development and validation. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2022, **107**. ISSN 08891575. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jfca.2022.104400](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104400)
- [75] IDDA, Ilenia, Nadia SPANO, Marco CIULU, Valeria M. NURCHI, Angelo PANZANELLI, Maria IVAN. PILO a Gavino SANNA. Gas chromatography analysis of major free mono- and disaccharides in milk: Method assessment, validation, and application to real samples. *Journal of Separation Science* [online]. 2016, **39**(23), 4577-4584. ISSN 16159306. Dostupné z: [doi:10.1002/jssc.201600583](https://doi.org/10.1002/jssc.201600583)
- [76] AL-MHANNA, Najah, Holger HUEBNER a Rainer BUCHHOLZ. Analysis of the Sugar Content in Food Products by Using Gas Chromatography Mass Spectrometry and Enzymatic Methods. *Foods* [online]. 2018, **7**(11). ISSN 2304-8158. Dostupné z: [doi:10.3390/foods7110185](https://doi.org/10.3390/foods7110185)

- [77] MURKOVIC, Michael a Karin DERLER. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2006, **69**(1-2), 25-32. ISSN 0165022X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbbm.2006.02.001
- [78] CASEIRO, Alexandre, Iain L. MARR, Magda CLAEYS, Anne KASPER-GIEBL, Hans PUXBAUM a Casimiro A. PIO. Determination of saccharides in atmospheric aerosol using anion-exchange high-performance liquid chromatography and pulsed-amperometric detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1171**(1-2), 37-45. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.09.038
- [79] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [80] SCHERF-CLAVEL, Oliver. Impurity Profiling of Challenging Active Pharmaceutical Ingredients without Chromophore. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2016, 194. Disertační práce.
- [81] Čáslavský, Josef a Ševčík G. K. Jiří. *Organická analýza*. Český Těšín: 2 THETA, 2022, 119-186, ISBN 978-80-88279-17-4.
- [82] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Přeložili Karel NESMĚRÁK, Václav ČERVENÝ, Tomáš KRÍŽEK, Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [83] JARDIM, Isabel C. S. F., Liane MALDANER, Josimara LOURENÇO, Livia M. A. FIORAVANTI a Carol H. COLLINS. Some new selective stationary phases for RP-HPLC. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(19), 2917-2929. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201000313
- [84] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231-247. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5308-5
- [85] GRECO, G. a T. LETZEL. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2013, **51**(7), 684-693. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmt015

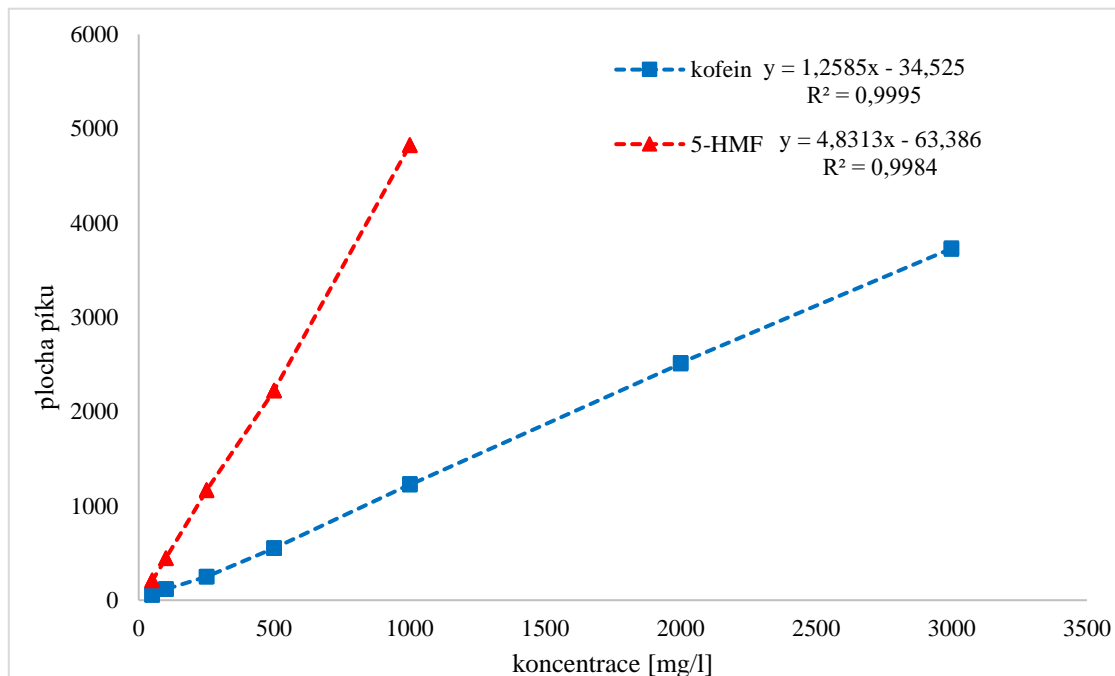
- [86] VAN NUIJS, Alexander L.N., Isabela TARCOMNICU a Adrian COVACI. Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, **1218**(35), 5964-5974. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.01.075
- [87] KLIKAROVÁ, Jitka, Barbora ŘEHÁKOVÁ a Lenka ČESLOVÁ. Evaluation of regular and decaffeinated (un)roasted coffee beans using HPLC and multivariate statistical methods. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2022, **114**. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2022.104841
- [88] BONDAM, Aline Felten, Daiele DIOLINDA DA SILVEIRA, Jaqueline POZZADA DOS SANTOS a Jessica Fernanda HOFFMANN. Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2022, **123**, 172-186. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.03.013
- [89] FOX, Glen P., Alex WU, Liang YIRAN a Lesleigh FORCE. Variation in Caffeine Concentration in Single Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(45), 10772-10778. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf4011388

6 PŘÍLOHY

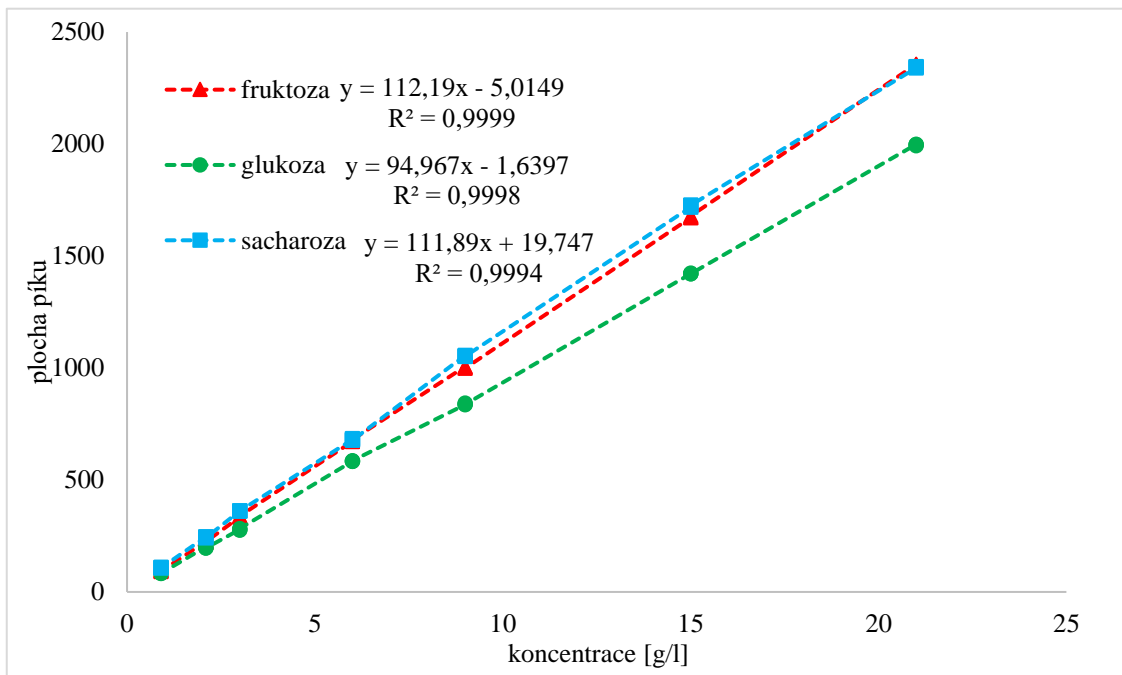
Příloha 1: Kalibrační závislost plochy píků furanických látek a maltolu na jejich koncentraci



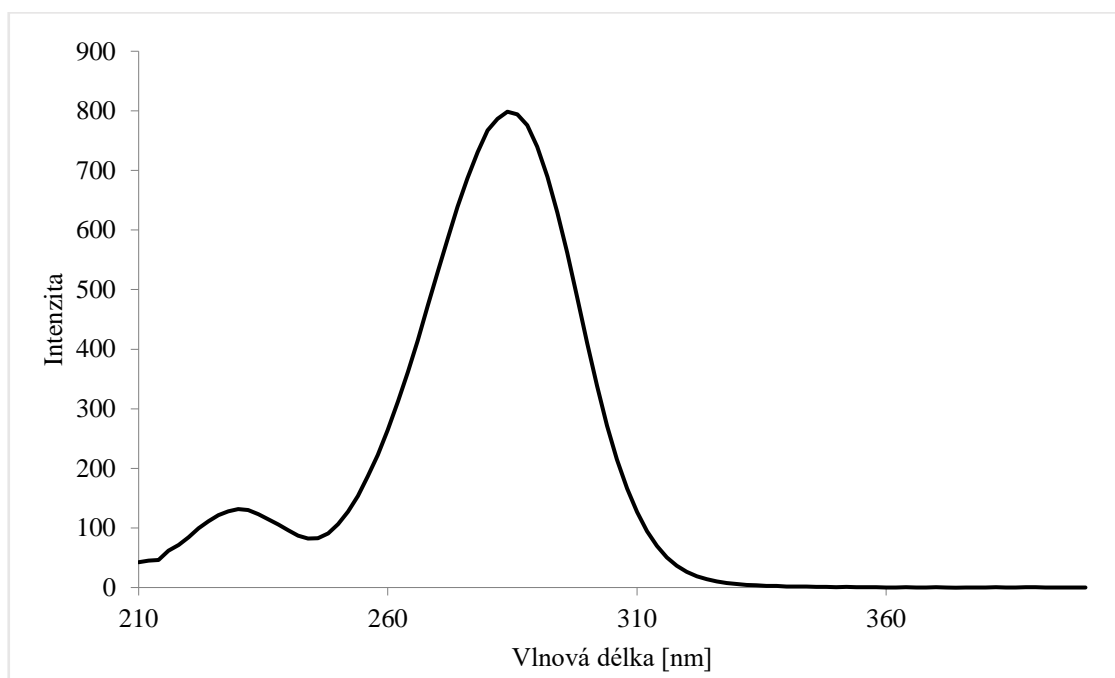
Příloha 2: Kalibrační závislost plochy píků HMF a kofeinu na jejich koncentraci



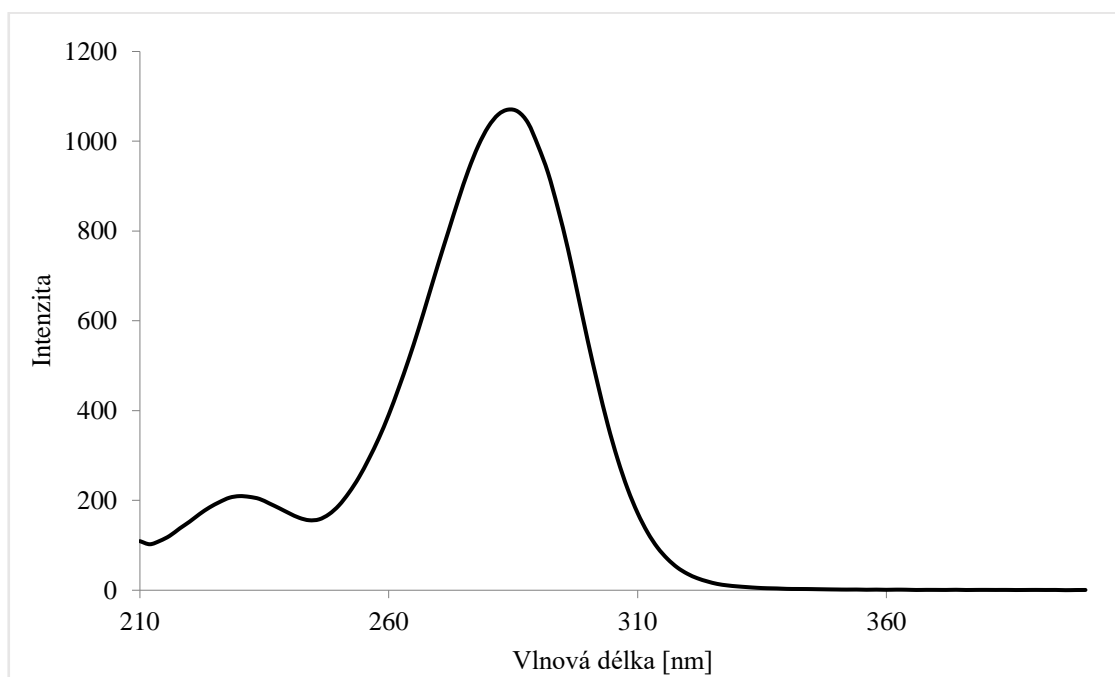
Příloha 3: Kalibrační závislost plochy píků jednotlivých sacharidů na jejich koncentraci



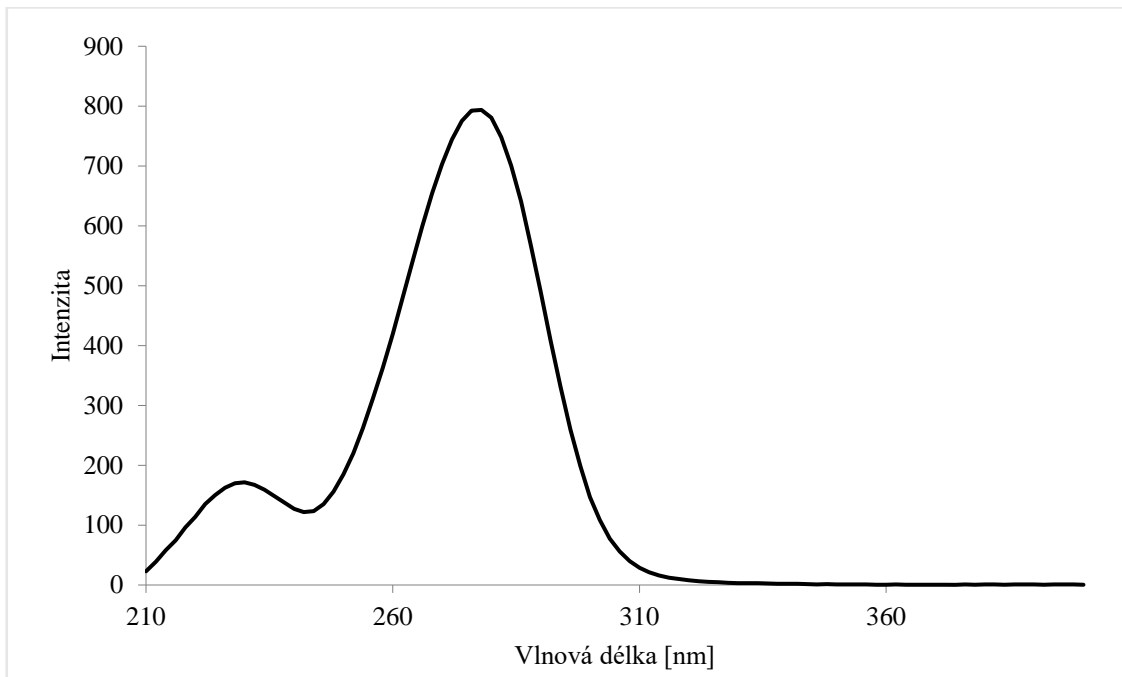
Příloha 4: UV spektrum standardu HMF o koncentraci 10 mg/l z HPLC-DAD analýzy



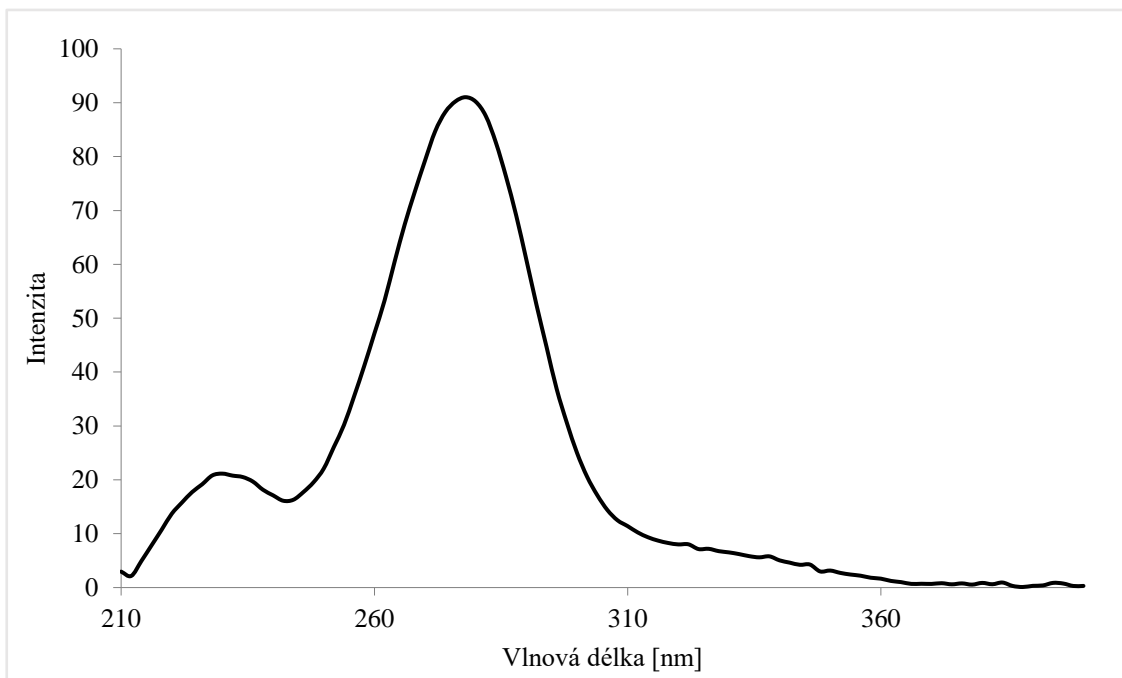
Příloha 5: UV spektrum HMF z HPLC-DAD analýzy vzorku Z16



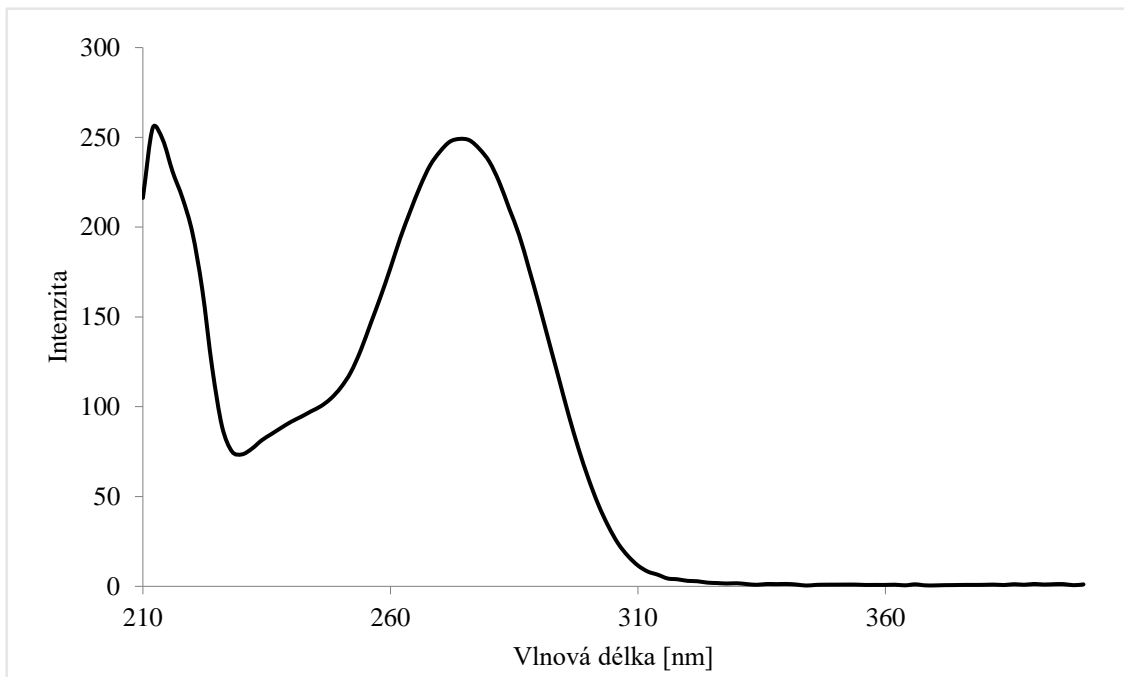
Příloha 6: UV spektrum standardu furfuralu o koncentraci 10 mg/l z HPLC-DAD analýzy



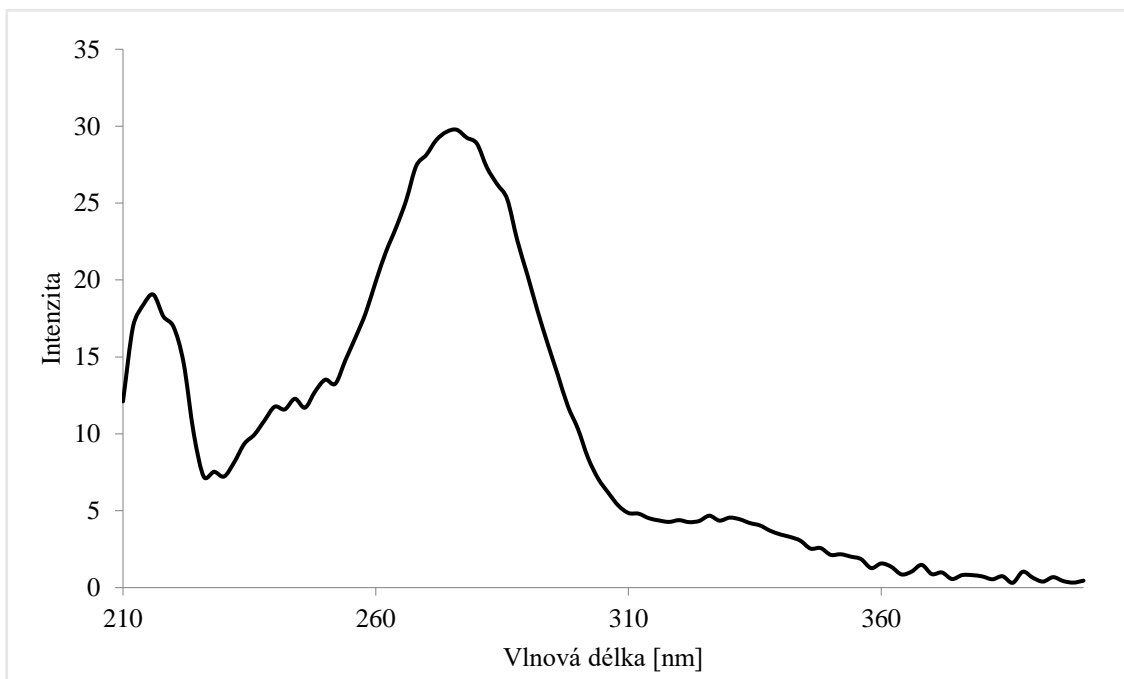
Příloha 7: UV spektrum furfuralu z HPLC-DAD analýzy vzorku Z16



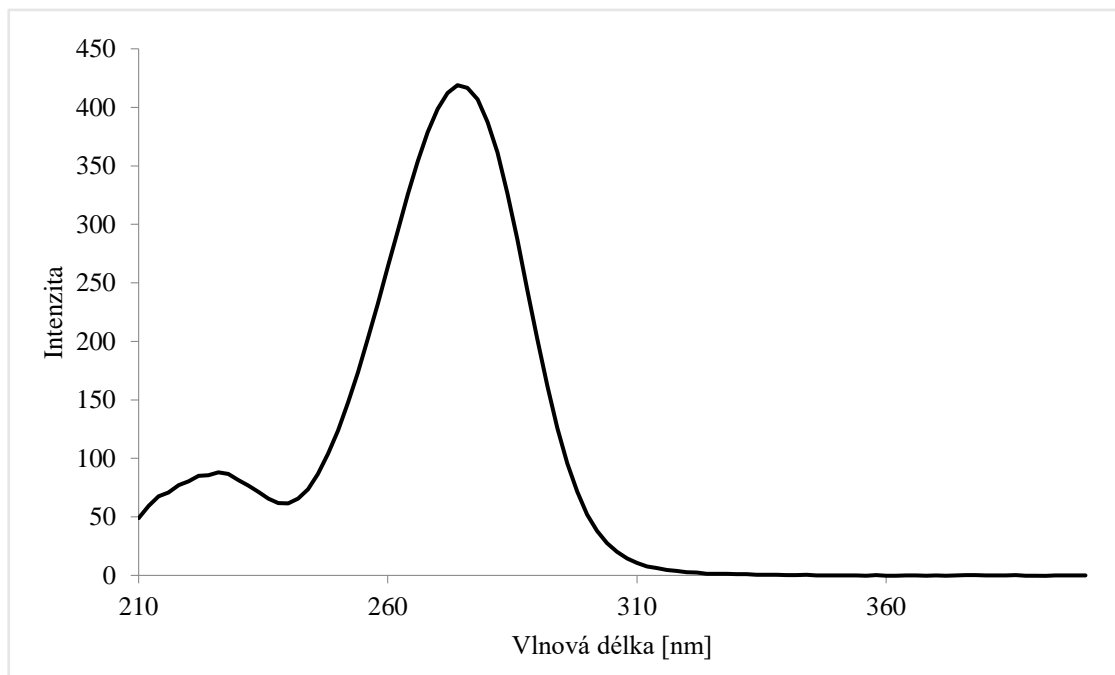
Příloha 8: UV spektrum standardu maltolu o koncentraci 10 mg/l z HPLC-DAD analýzy



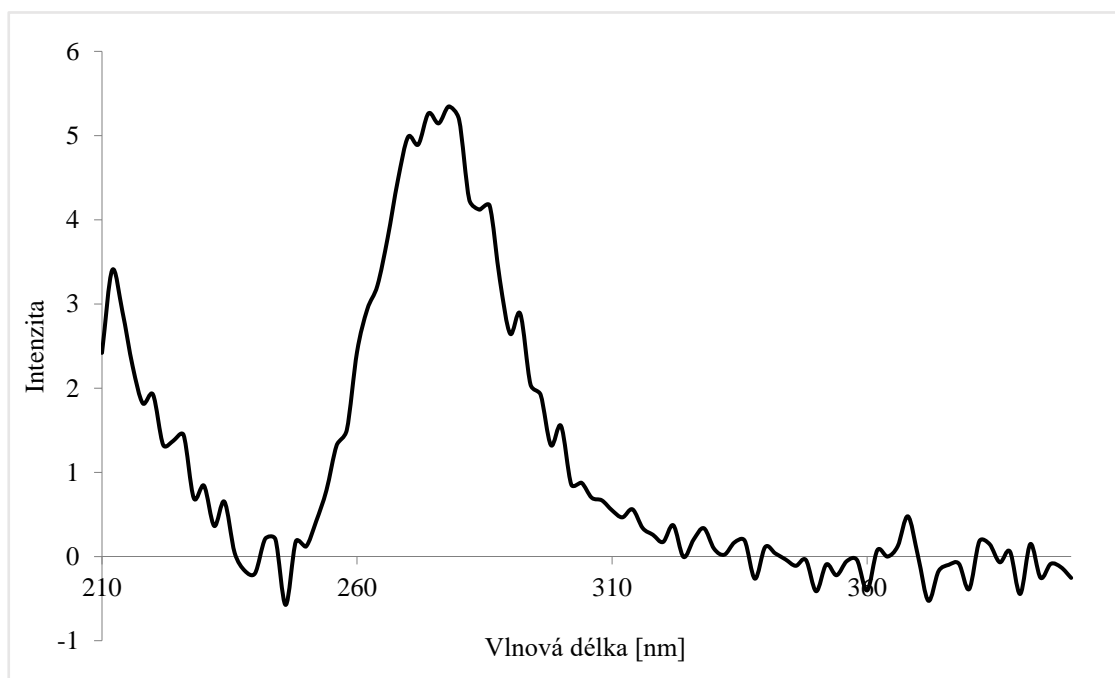
Příloha 9: UV spektrum maltolu z HPLC-DAD analýzy vzorku Z16



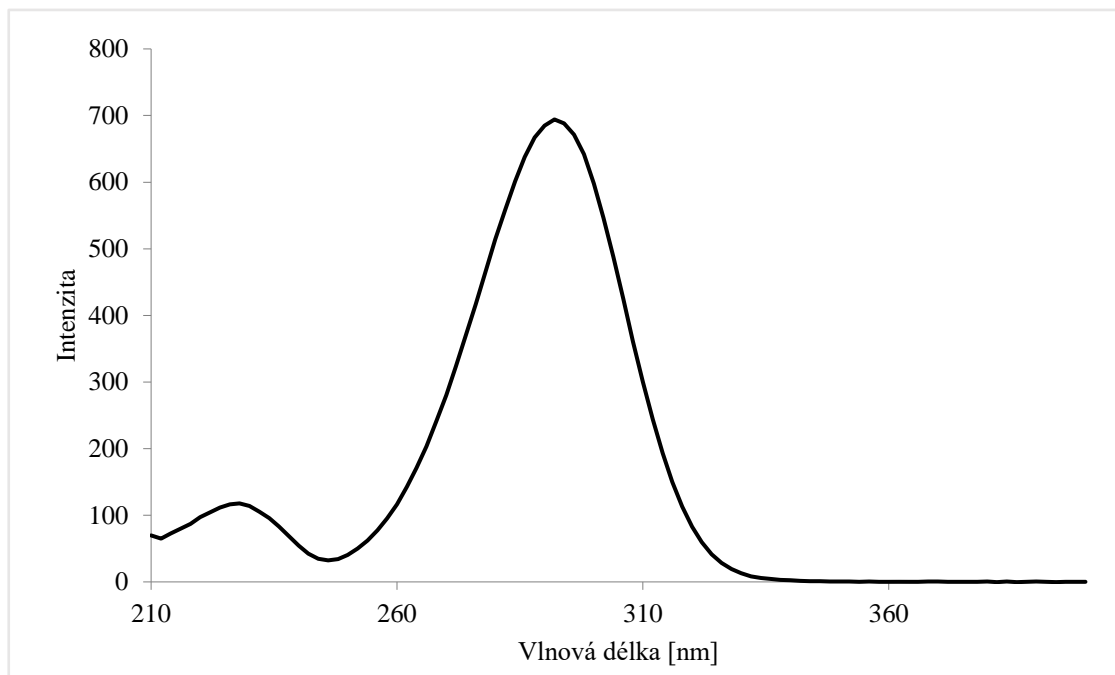
Příloha 10: UV spektrum standardu 2-furylmethylketonu o koncentraci 10 mg/l z HPLC-DAD analýzy



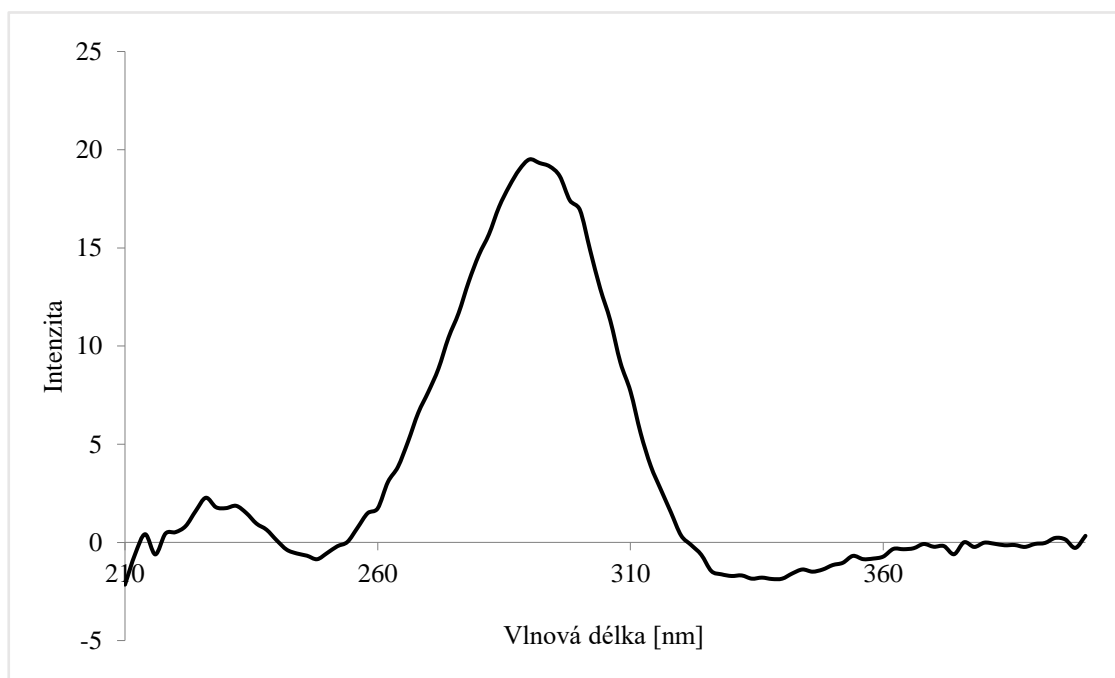
Příloha 11: UV spektrum 2-furylmethylketonu z HPLC-DAD analýzy vzorku Z16



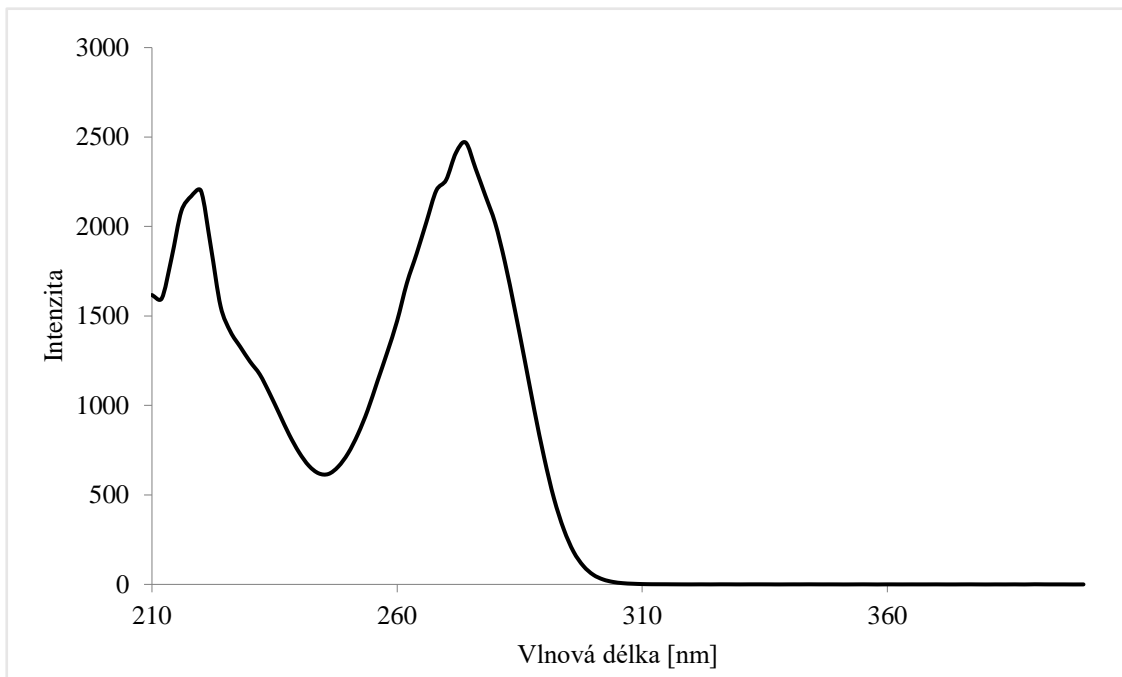
Příloha 12: UV spektrum standardu 5-methylfurfuralu o koncentraci 10 mg/l z HPLC-DAD analýzy



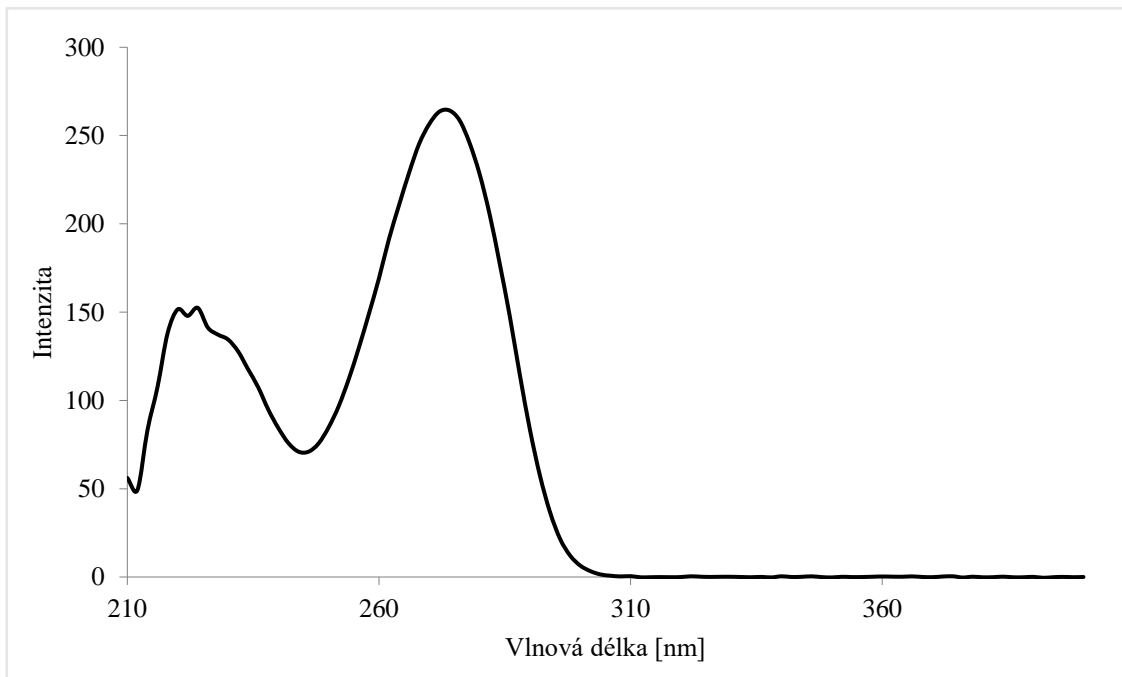
Příloha 13: UV spektrum 5-methylfurfuralu z HPLC-DAD analýzy vzorku Z16



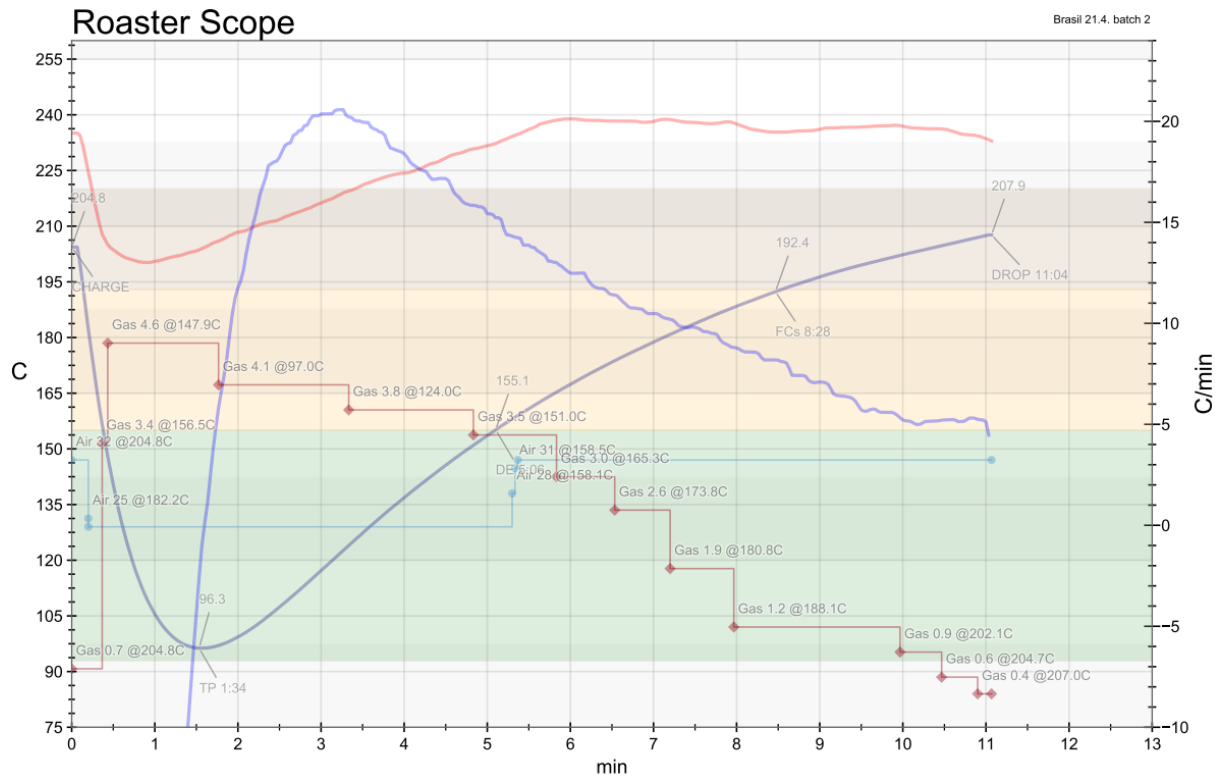
Příloha 14: UV spektrum standardu kofeinu o koncentraci 10 mg/l z HPLC-DAD analýzy



Příloha 15: UV spektrum kofeinu z HPLC-DAD analýzy vzorku Z16



Příloha 16: Záznam teplotního profilu pražení Brazílie (arabika)



Příloha 17: Záznam teplotního profilu pražení Indie (robusta)

