

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Martina Lamichová

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Vliv pražení kávy na obsah antioxidantů a alkaloidů

Bc. Martina Lamichová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Lamichová**
Osobní číslo: **C15558**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Vliv pražení kávy na obsah antioxidantů a alkaloidů**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V teoretické části popište technologický proces pražení kávy a složení kávy. Zaměřte se na fenolické kyseliny obsažené v kávě a na kávové alkaloidy. Dále napište rešerši na téma stanovení antioxidantů a alkaloidů v kávě separačními technikami.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek separace vybraných fenolických kyselin a alkaloidů kapalinovou chromatografií. Dále optimalizujte metodu přípravy vzorků k analýze. Nejvhodnější podmínky použijte na analýzu vzorků zrnků kávy získané během procesu pražení a na analýzu kávy získanou různým typem přípravy. Diskutujte případný vliv pražení kávy na obsah sledovaných látek.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem poznání.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci 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., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 23. 8. 2017

Bc. Martina Lamichová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Dále děkuji Patriku Lamkovi, který poskytnul veškeré vzorky káv z jeho kavárny LamCafé a také Ing. Štěpánu Hainišovi a Ing. Simoně Zapletalové, kteří mě podporovali při celém průběhu studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá stanovením antioxidantů a alkaloidů v kávě. V teoretické části je popsáno složení kávy, technologický proces pražení kávy a možné způsoby stanovení antioxidantů a alkaloidů separačními technikami. Experimentální část je zaměřena na optimalizaci separace antioxidantů a alkaloidů v kávě pomocí kapalinové chromatografie s UV a hmotnostní detekcí a na optimalizaci přípravy vzorku k analýze. Vybrané podmínky byly použity pro stanovení antioxidantů a alkaloidů v zalévané kávě a kávě připravené v kávovaru. Dále byl zkoumán vliv pražení na obsah těchto látek v kávě.

KLÍČOVÁ SLOVA

Káva, antioxidanty, alkaloidy, HPLC-UV, pražení kávy

TITLE

The effect of roasting coffee on the content of antioxidants and alkaloids

ANNOTATION

The aim of this diploma thesis is the determination of antioxidants and alkaloids in coffee. In theoretical part, the coffee composition and the technological process of coffee roasting as well as the possibility of determination of antioxidants and alkaloids by separation methods are described. The experimental part is focused on optimization of the separation of antioxidants and alkaloids in coffee by liquid chromatography with UV and mass spectrometry detection and optimization of the sample preparation for the analysis. The selected conditions were used for the determination of antioxidants and alkaloids content in brewed coffee and in coffee prepared in coffeemaker. Furthermore, the influence of coffee roasting on alkaloids and antioxidants content in coffee was studied.

KEYWORDS

Coffee, antioxidants, alkaloids, HPLC-UV, coffee roasting

OBSAH

1	ÚVOD.....	14
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1	Historie kávy.....	15
2.2	Kávovník.....	15
2.2.1	Druhy kávovníků.....	17
2.2.2	Kávovník arabský.....	17
2.2.3	Kávovník statný.....	18
2.2.4	Kávovník liberijský.....	18
2.2.5	Kávovník úzkolistý.....	19
2.2.6	Kávovník šari.....	19
2.3	Sklizeň kávy.....	19
2.4	Zpracování kávových zrn.....	20
2.4.1	Suché zpracování.....	20
2.4.2	Mokrě zpracování.....	21
2.4.3	Polopromyté zpracování.....	22
2.5	Pražení.....	22
2.5.1	Pražičky.....	23
2.5.2	Chemické a fyzikální změny během pražení.....	24
2.5.3	Stupně pražení.....	25
2.5.4	Chlazení.....	26
2.5.5	Mletí kávy.....	27
2.6	Složení látek v kávě.....	27
2.6.1	Sacharidy.....	28
2.6.2	Kyseliny.....	28

2.6.3	Alkaloidy	32
2.6.4	Minerální látky.....	35
2.6.5	Lipidy.....	35
2.6.6	Bílkoviny	35
2.7	Chromatografie	36
2.7.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	37
2.7.2	Chromatografické kolony pro HPLC.....	38
2.7.3	Detektory v kapalinové chromatografii	39
2.7.4	Hmotnostní spektrometrie.....	41
2.8	Stanovení antioxidantů a alkaloidů separačními technikami	42
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
3.1	Přístroje a zařízení.....	45
3.2	Standardní látky a chemikálie	46
3.3	Vzorky.....	47
3.4	Pracovní postupy.....	47
3.4.1	Příprava mobilní fáze.....	47
3.4.2	Příprava standardů	48
3.4.3	Podmínky HPLC analýzy	48
3.4.4	Příprava vzorku.....	49
3.4.5	Experimentální zpracování dat	50
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
4.1	Optimalizace podmínek separace HPLC	51
4.2	Optimalizace podmínek pro přípravu vzorků	55
4.3	Stanovení alkaloidů a fenolických kyselin pomocí HPLC	58
4.3.1	Trigonelin.....	59
4.3.2	Theobromin.....	61

4.3.3	Theofylin.....	63
4.3.4	Kofein	65
4.3.5	Kyselina chlorogenová	67
4.3.6	Kyselina neochlorogenová.....	69
4.3.7	Vliv pražení na obsah látek v kávě Brazílie	71
5	ZÁVĚR.....	73
6	LITERATURA	75
7	SEZNAM PŘÍLOH	82

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Plody kávovníku.....	16
Obrázek 2: Složení kávové třešně.....	16
Obrázek 3: Kávovník arabský.....	17
Obrázek 4: Séma zpracování kávy.....	20
Obrázek 5: Pražička kávy	24
Obrázek 6: Káva v různých stupních pražení	25
Obrázek 7: Strukturální vzorce kyseliny chinové (a) a tři nejčastější trans-skořicové kyseliny skupiny CGA: kyselina kávová (b), kyselina ferulová (c) a kyselina p-kumarová (d).....	29
Obrázek 8: Chemická struktura kyseliny chinové s možnými substituenty R3, R4, R5	30
Obrázek 9: Chemická struktura kyseliny chlorogenové (a) a neochlorogenové (b).....	31
Obrázek 10: Chemická struktura kofeinu	32
Obrázek 11: Chemická struktura theobrominu	33
Obrázek 12: Chemická struktura theofylinu	34
Obrázek 13: Chemická struktura trigonelinu.....	34
Obrázek 14: Schéma HPLC.....	38
Obrázek 15: Chromatografická kolona C18	39
Obrázek 16: 2D mapa rozlišení čas gradientu vs. pH MF-A.....	52
Obrázek 17: Separace směsi standardů s použitím optimalizované metody, Gradient: 0 min -5 % MeOH; 2 min - 5 % MeOH; 7 min - 30 % MeOH; 21 min - 32,5 % MeOH	52
Obrázek 18: Schéma zpracování vzorků pro zkoušku hrubosti mletí	55
Obrázek 19: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kofeinu u vybraných příprav kávy ve vzorku Brazílie.....	56
Obrázek 20: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kyseliny chlorogenové u vybraných příprav kávy ve vzorku Brazílie	57

Obrázek 21: Porovnání koncentrace kofeinu ve vzorku Brazílie na mlýnku Mahlkönig a De Longhi v přípravě espressa.....	58
Obrázek 22: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích zalévané kávy, n=3	59
Obrázek 23: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3 ...	60
Obrázek 24: Koncentrace theobrominu ve vzorcích zalévané kávy, n=3.....	61
Obrázek 25: Koncentrace theobrominu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3.	62
Obrázek 26: Koncentrace theofylinu ve vzorcích zalévané kávy, n=3.....	63
Obrázek 27: Koncentrace theofylinu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3.....	64
Obrázek 28: Koncentrace kofeinu ve vzorcích kávy připravené kávou zalévanou, n=3.....	65
Obrázek 29: Koncentrace kofeinu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3	66
Obrázek 30: Koncentrace kyseliny chlorogenové ve vzorcích kávy připravené kávou zalévanou, n=3	67
Obrázek 31: Koncentrace kys. chlorogenové ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3	68
Obrázek 32: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích kávy připravené kávou zalévanou, n=3.....	69
Obrázek 33: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3	70
Obrázek 34: Vzorek Brazílie připravený pomocí kávovaru ve všech stupních pražení a zelené kávě.....	71
Obrázek 35: Vzorek Brazílie připravený pomocí kávovaru ve všech stupních pražení a zelené kávě.....	72

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Porovnání vlastností arabiky a robusty	18
Tabulka 2: Obsah látek přítomných v kávě v hmotnostních %	27
Tabulka 3: Různé typy substituentů pro R3, R4, R5	30
Tabulka 4: Obsah hlavních chlorogenových kyselin v pražené kávě	31
Tabulka 5: Kolony, které byly použity k separaci alkaloidů a antioxidantů	43
Tabulka 6: Seznam použitých standardních látek.....	46
Tabulka 7: Seznam použitých vzorků káv	47
Tabulka 8: Podmínky separace pro antioxidanty a alkaloidy HPLC	48
Tabulka 9: Seznam a stupně pražení vzorků	49
Tabulka 10: Retenční časy separovaných látek	53
Tabulka 11: Rovnice regrese jednotlivých standardů.....	54
Tabulka 12: Meze detekce a stanovitelnosti standardů	54

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

3-CQA	Kyselina neochlorogenová (3-O-Caffeoylquinic acid)
5-CQA	Kyselina chlorogenová (5-O-Caffeoylquinic acid)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
CE	Kapilární elektroforéza
CFQA	Kaffeoylferuloylchinové kyseliny
CGA	Chlorogenové kyseliny
CoQA	p-kumaroylchinové kyseliny
CQA	Kaffeoylchinové kyseliny
diCQA	Dikaffeoylchinové kyseliny
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization)
FQA	Feruloylchinové kyseliny
GC/NPD	Plynová chromatografie s dusíko-fosforovým detektorem.
HPGF	Gelová filtrační chromatografie
HPLC/DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
HPLC/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
HPLC/UV	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem ultrafialového záření
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MS	Hmotnostní spektrometrie
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
SPE	Extrakce na tuhou fázi

1 ÚVOD

Káva patří k jednomu z nejoblíbenějších nápojů na světě. Příprava kávy a kávová kultura je v posledních letech velice diskutované téma jak mezi laickou veřejností, tak mezi odborníky. Tato tematika zažívá určitý progres v české společnosti. Lidé rádi navštěvují kavárny ať už kvůli relaxaci či setkání s přáteli. Každý z nás se rád pozastaví pár minut nad hrnkem dobře připravené kávy a variant, jak oblíbený nápoj správně připravit, aby chuťový profil odpovídal nárokům spotřebitele je mnoho a do jisté míry také určitá forma alchymie.

Mezi nejvýznamnější alkaloid obsažený v kávě patří kofein. Tento purinový alkaloid má příznivé účinky na centrální nervovou soustavu a dočasně potlačuje únavu. Kofein se dále vyskytuje v čajových lístcích nebo kakaových bobech. Další velice významnou biologicky aktivní látkou obsaženou v kávě je kyselina chlorogenová. Tento antioxidant se nachází hlavně v kávě zelené a podílí se na neutralizaci volných radikálů v lidském těle.

Pro stanovení alkaloidů a antioxidantů se nejběžněji používají chromatografické separační metody. V této práci byla ke stanovení významných alkaloidů a antioxidantů použita kapalinová chromatografie. K experimentu bylo vybráno 9 druhů káv z celého světa, u kterých bylo zjišťováno, jak pražení ovlivňuje obsah těchto látek a také, jaký vliv má hrubost mletí na přípravu espressa a zalévané kávy, která stále zůstává v oblibě české společnosti.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie kávy

První zmínky o kávovníku sahají do dob před naším letopočtem. Je známá řada historek a legend z Afriky a Arabského poloostrova o povzbudivých účincích zvláštních červených plodů, dnes známých jako kávové třešně.

Původním domovem kávovníku je Etiopie ve východní Africe. Do Evropy se káva dostala až před koncem 16. století, kde velice rychle nabrala na popularitě a začátkem 17. století se začaly otevírat první evropské kavárny zejména v Itálii. V průběhu 17. století byla káva přenesena holandskými pěstiteli na Srí Lanku, Jávu a Sumatru, proto se hlavním dovozcem kávy stala Indonésie, která si dodnes drží přední příčky ve vývozu kávy do celého světa. Během 18. století byla káva rozšířena také do francouzských kolonií v Jižní a Střední Americe. Odkud je dodnes světově známá odrůda *Blue Mountain*^{1,2}.

Příprava kávy spočívala v louhování pomletých zrněk kávy v horké vodě. Velký průlom v přípravě přinesl v roce 1901 Luigi Bezzera, který vynalezl espresso. Vymyslel stroj, kterým jde díky vysokému tlaku a určité teplotě snadno a rychle připravit silnou čerstvou kávu³.

První kavárna v Čechách byla otevřena v Brně začátkem 17. století Turkem Ahmedem. O něco později byla otevřená i první kavárna v Praze. Arabský prodejce Gorgos Hatalah il Damaski, který byl nejdříve pouličním prodejcem tohoto lahodného nápoje, později v roce 1714 získal povolení na otevření své vlastní kamenné kavárny pod malostranskou Mosteckou věží^{4,5}.

2.2 Kávovník

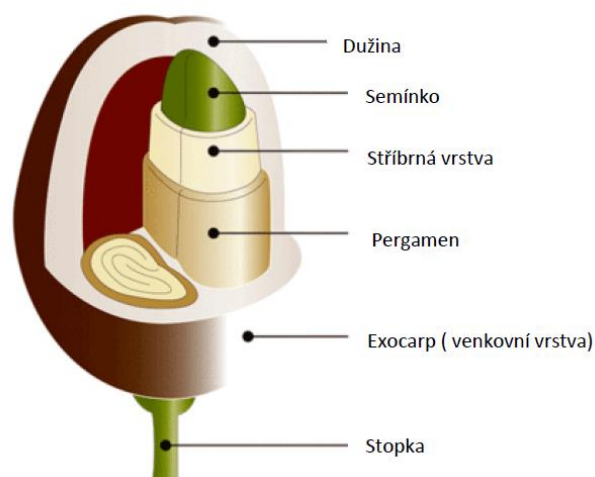
Kávovník (Obrázek 1) radíme mezi ovocné dřeviny do rodu *Coffea* do čeledi mořenovitých, která zahrnuje kolem 500 rodů a více jak 6000 druhů. Tato rostlina roste v celém tropickém a subtropickém pásmu. Může dosahovat výšky až 15 metrů, avšak některé druhy kávovníku radíme mezi keře, jiné mezi stromy. Délka života je kolem 50 let. První plody mívá

mezi 2 až 6 rokem po zasazení, dle konkrétního druhu. Kávovník kvete několikrát do roka a jeho drobné bílé květy často připomínají květy jasmínu⁶.



Obrázek 1: Plody kávovníku⁷

Plody kávovníku, ze kterých vzniká káva, se nazývají kávové třešně. Průřez kávovou třešní je zobrazen na Obrázku 2. První vrstvu tvoří zevní slupka (exokarp), pod ní je sladká lepkavá dužina (mezokarp) a pergamenová slupka obsahující jednotlivá semena, která jsou pokryta stříbrnou blankou^{3,8}.



Obrázek 2: Složení kávové třešně⁹

2.2.1 Druhy kávovníků

Mezi kávovníky rodu *Coffea* můžeme zařadit více jak 70 zástupců, ale pouze dva z nich mají ekonomický význam. Komerčně pěstovaný kávovník arabský, který tvoří zhruba 65 % celkové produkce a kávovník robusta přibližně s 30 % světové produkce. Mezi další, ale méně významné druhy patří kávovník liberijský, úzkolistý, šari, affinis a congensis.

2.2.2 Kávovník arabský

Kávu Arabika řadíme mezi kvalitnější druhy káv. Kávovník arabský (Obrázek 3) roste ve vyšších nadmořských výškách okolo 600 až 2000 metrů nad mořem, dosahuje výšky až 5 metrů a není příliš náročný na pěstování, nevadí mu ani proměnlivé počasí. Pěstuje se při teplotách mezi 15 až 24 °C. Kávovník arabský obsahuje méně kofeinu než kávovník robusta a je často napadán listovou rzí, plody a semena kávovým broukem^{3,10}.

Mezi nejvýznamnější odrůdy patří Arabika Typica, původem z Etiopie, která je ceněná pro svoji kvalitu, ale má nízkou produktivitu kávy. Arabica Bourbon roste v Brazílii a Latinské Americe, vyznačuje se relativně rychle zrajícími drobnými plody žluté i červené barvy. Tato káva má excelentní kvalitu, a o 30 % vyšší produktivitu kávy než odrůda Arabika Typica. Mezi další významné odrůdy patří Arabica Caturra, Pacamara, Geisha, Mundo Nuovo a také světově známá Blue Mountain¹¹.



Obrázek 3: Kávovník arabský¹²

2.2.3 Kávovník statný

Kávovník statný též nazývaný kávovník robusta patří mezi levnější a méně kvalitní kávy. Roste v nižších nadmořských výškách okolo 200 až 600 metrů nad mořem a je daleko méně náročný na pěstování než kávovník arabský. Kávovník dorůstá výšky až 13 metrů a vyžaduje stabilní klimatické podmínky. Zrání je mnohem rychlejší a své první plody mívá již po 2 až 3 letech od zasazení. S robustou se tedy setkáváme mnohem častěji, jelikož je pro svou nižší kvalitu cenově dostupnější.

Oba kávovníky arabika i robusta jsou pěstovány v tropech, ale přesto vyžadují odlišné klimatické a teplotní podmínky. Arabika má hlubší kořenový systém, proto ji lze pěstovat ve vyšších horských oblastech, kde se teploty pohybují do 25 °C. Naopak robusta vyžaduje teplejší a stabilnější klima. Porovnání vlastností je uvedené v Tabulce 1¹¹.

Tabulka 1: Porovnání vlastností kávovníku arabika a robusta¹³

VLASTNOSTI	ARABIKA	ROBUSTA
Kořenový systém	Hluboký	Mělký
Ideální teplota	15-25 °C	20-30 °C
Nadmořská výška	900-2000 m.n.m.	0-900 m.n.m.
Množství srážek	1500-2000 mm	2000-3000 mm
Doba kvetení	Po dešti	Nepřavidelná
Doba od odkvětu k plodu	9 měsíců	10-11 měsíců
Obsah oleje v zrnech	15-17 %	10-12 %
Obsah cukru v zrnech	6-9 %	3-7 %
Obsah kofeinu v zrnech	0,8-1,4 %	1,7-4 %

2.2.4 Kávovník liberijský

Kávovník liberijský tzv. liberika tvoří zhruba 1 % světové produkce. Tato káva se používá především do směsí. Kávovník liberijský dorůstá až do výšky 18 metrů a vyznačuje se velkými květy, kožovitými listy a bohatou úrodou. Patří mezi podřadnější kávy z důvodu slabší

kvality obsahových látek. Poptávka na trhu je velice nízká a pěstuje se pouze okrajově v oblastech Libérie, Konga a Pobřeží slonoviny.

2.2.5 Kávovník úzkolistý

Kávovník úzkolistý roste na kopcích deštných pralesů v oblasti Guinei, Sierra Leone a Konga v nadmořských výškách okolo 200-700 metrů. Kávovník dorůstá do výšky 7 m a má drobné tmavozelené listy a kávové třešně mají v době zralosti tmavě fialovou až černou barvu.

2.2.6 Kávovník šari

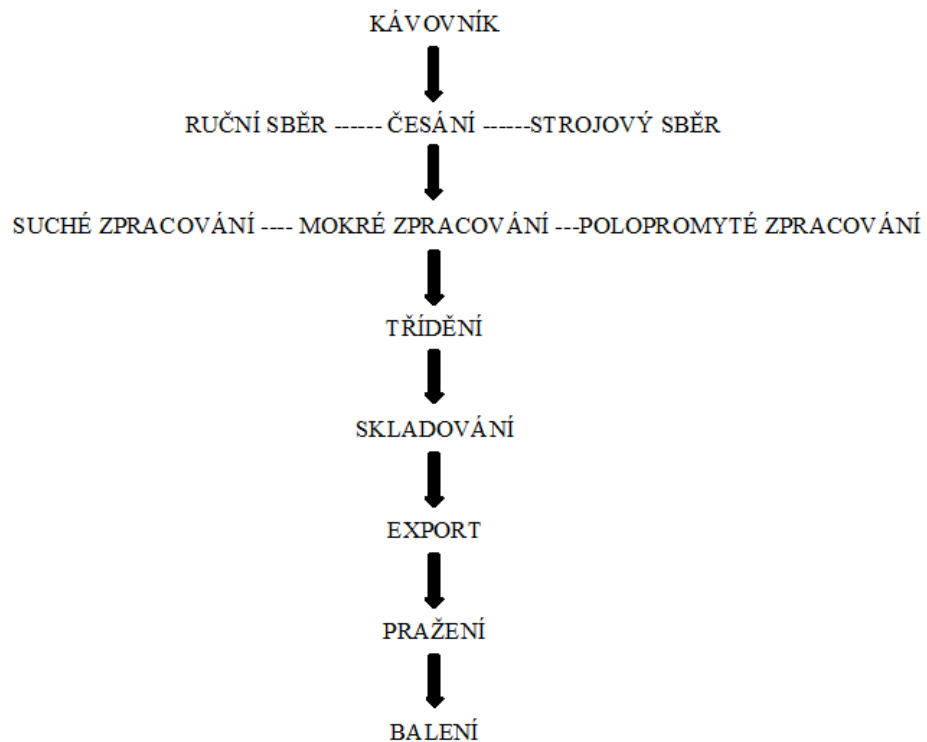
Rostlina kávovníku šari tzv. excelsa dorůstá do výšky 20 m, nevdí jí sucho a je odolná vůči nemocem. Pěstuje se převážně v oblastech Konga a Vietnamu^{1,3,11}.

2.3 Sklizeň kávy

Po 3 až 4 letech od zasazení dává kávovník své první plody. V průběhu zrání se mění jejich barva ze zelené na žlutou a postupem času na červenou. Doba sklizně se mění dle zeměpisné polohy. Severně od rovníku se kávové třešně sklízí od září do prosince, na jihu od rovníku, tj. například v Brazílii, probíhá hlavní sklizeň od dubna do začátku srpna. V zemích ležících na rovníku, v Ugandě či Kolumbii sklizeň probíhá celý rok díky stálým klimatickým podmínkám. Sklizeň se provádí dvojím způsobem. Výběrové kvalitnější kávy se vždy sbírají ručně. Sběrání probíhá v odstupech 8 až 10 dní. Sbírají se vždy pouze uzralé červené plody. Zbytek nezralých plodů se nechává na stromech dozrát. Způsob této metody je velice šetrný a navíc se zamezí sběru špatných nezralých či nahnilých plodů. Další možnost ručního sběru je tzv. stripping neboli česání, kdy se ze stromů kávovníků sbírají veškeré plody, což je časově méně náročné, nicméně veškeré sebrané plody se musí třídít. Druhý způsob česání je strojový. Používá se v nižších nadmořských výškách, je časově nenáročný, ale velice nešetrný, dochází k odtržení listů i celých větví kávovníku³.

2.4 Zpracování kávových zrn

Bezprostředně po sklizni se nasbírané kávové třešně musí zpracovat. Na Obrázku 4 je zobrazeno celkové schéma zpracování kávy. Ke zpracování kávy lze využít některý ze tří způsobů, z nichž každý má svůj význam a promítne se v celkové ceně a chuti kávy⁶.



Obrázek 4: Schéma zpracování kávy

2.4.1 Suché zpracování

Při suchém zpracování kávy se kávové třešně volně rozloží na betonových či kamenných podlahách a v pravidelných intervalech jsou prohrabávány a obráceny, aby docházelo k rovnoměrnému schnutí. Na noc se plody zakrývají kvůli vlhkosti a zabránění fermentačních pochodů. Sušení trvá tak dlouho, než vlhkost peckovic klesne na 12 %, což jsou zhruba 4 týdny. Vnější slupka zhnědne a následně v loupacích strojích dojde k mechanickému oddělení semene od uschlé dužiny^{3,11}.

Tato metoda patří mezi nejstarší, nejjednodušší a finančně nenáročná, avšak je velice časově náročná. Používá se zejména pro méně kvalitní kávy v oblastech Afriky a Arábie^{6,10}.

2.4.2 Mokrý zpracování

Metoda mokrého zpracování vyžaduje vyšší náklady, ale lépe zachová kvalitu a aromaticnost. Používá se zejména na zpracování Arabiky.

Kávové třešně jsou shromážděny ve vodních nádržích, kde dochází k jejich selekci. Nedo zralé, seschlé či poškozené plody plavou na hladině a jsou unášeny proudem z vodní nádrže. Zralé plody naopak klesají ke dnu. Vadné plody (černé nebo hnědé, nezralé či poškozené hmyzem), které představují přibližně 11-20 % produkce kávy, mohou mít vliv na chuť pražených produktů. Nepoškozené plody jsou těžší, mají vyšší aktivitu vody a nižší kyselost než plody poškozené. Obsah sacharózy, bílkovin, rozpustných fenolů je u nepoškozených kávových zrn také vyšší¹⁴.

Zralé plody jsou proudem unášeny do vylupovacích zařízení (tzv. pulpovník), kde se pomocí nastavitelných čepelí umístěných v rotujících válcích odstraní vrchní slupka a část dužniny. Z důvodu uchování kvality zrn je důležité, aby k oloupaní došlo do 24 hodin po sklizni. Delší časová prodleva mezi sběrem a loupáním může zapříčinit přischnutí dužniny k zrnkům a poškození kávového semena při vyloupávání.

Oloupaná zrna jsou proudem unášena do kvasných kádí, kde probíhá fermentace. Celý proces, kdy enzymy uvolňují zbývající lepkavou vrstvu oplodí, která pokrývá pergamenovou slupku semen, trvá kolem 12-36 hodin. Doba uložení oloupaných zrn v kvasných nádržích se řídí teplotou okolí, množstvím enzymů a síle zbytků obalové vrstvy. Následuje poslední promývání semen vodou. Poté se kávová semena v pergamenové slupce zhruba s 50% vlhkostí nechají sušit. Z důvodu udržení jejich stability by měla vysušená semena obsahovat pouze 10 % vlhkosti. Při celém postupu zpracování kávových zrn je důležitá kontrola kvality a čistoty, aby se zabránilo nesprávnému fermentačnímu procesu, kdy zrnka začnou zapáchat a hnit^{6,11}.

Sušení probíhá na slunci na betonových terasách, sušících stolech nebo v sušících strojích přibližně 14 dní. Semena jsou pravidelně obracena, aby došlo k jejich rovnoměrnému vysušení. Po vysušení se kávová zrna v pergamenové slupce (tzv. pergamenová káva) loupou. Tento krok zpracování nastává až před samotným exportem. Káva se zbavuje své pergamenové

slupky pomocí speciálních loupacích strojů. Poté se leští, kdy dochází k úplnému odstranění pergamenové vrstvy a uhlazení povrchu. Zrnka se dále třídí dle velikosti a kvality³.

2.4.3 Polopromyté zpracování

Při polopromytém zpracování kávy stejně jako u mokrého zpracování putují kávové třešně do vodních kádí, kde se oddělují zralé od nezralých plodů. Zralé plody jsou v loupacích strojích zbaveny vrchní slupky a části dužniny. Zrnka v pergamenové slupce se zbytkem dužniny se nechávají schnout na slunci stejně jako u suchého způsobu zpracování. Svrchní vrstva zrnka obsahuje velké množství cukrů, a proto se tato káva vyznačuje výraznou sladkostí a plností. Velkou výhodou této metody zpracování je nízká spotřeba vody a menší časová náročnost, jelikož se zrnka nechávají schnout přímo na plantážích^{3,13}.

2.5 Pražení

Pražení zelené kávy je jeden z nejdůležitějších kroků při její úpravě. Obecně je pražení definováno jako suché tepelné zpracování potravin za účelem tvorby aromatických látek, rozvoje barvy a změny textury finálního produktu. Jedná se o časově teplotní řízený proces spojený s řadou chemických reakcí¹⁵.

Proces pražení kávy probíhá při teplotách mezi 160-220 °C po dobu 5-30 minut a lze jej rozdělit do dvou fází. První fází je sušení, kdy teplota zrna nepřesáhne 160 °C. Druhou fází nazýváme pražení, kde se teplota zrna pohybuje mezi 160-220 °C. Při dosažení teploty 190 °C se spouští pyrolytické reakce^{16,17}.

Počáteční změny nastávají už při 50 °C, kdy zrno ztrácí vlhkost. Okolo 100 °C zaznamenáváme první změny barvy ze zelené na žlutou až světle hnědou. Při 150 °C dochází k uvolňování těkavých látek (CO₂), což vede ke zvýšení objemu zrna. Fáze pražení, která začíná při 180-200 °C je rozpoznatelná prasknutím, tzv. *first crack*. Díky tlaku CO₂ dojde uvnitř zrna k porušení buněčného skeletu. Většinou se kávy praží do prvního *cracku*, ale některé se praží i do druhého *cracku*. Záleží ovšem na druhu kávy a požadovaném stupni pražení. Při prvním *cracku* nastávají důležité chemické procesy^{16,18}. Dochází k rozkladu proteinů na jednoduché peptidy a vzniku různých fenolových látek. Škroby se při různých teplotách mění na jednoduché

cukry, které částečně karamelizují. Probíhají reakce neenzymatického hnědnutí známé také jako Maillardovy reakce. Jedná se o komplexní sérii reakcí mezi aminokyselinami a redukujícími cukry, respektive produkty jejich degradace. Při reakci vznikají hnědé pigmentové látky, tzv. melanoidy. Další reakcí aminokyselin je Streckerovo odbourávání, kdy dochází k dekarboxylaci a deaminaci α -aminokyselin¹⁹. Těmito chemickými procesy, dochází za vysokých teplot ke vzniku delikátních aromatických či kávových olejů, které se při prasknutí tzv. *cracku*, kdy je buněčná struktura zrn narušená, dostávají na povrch. V pražené kávě vzniká více než 600 těkavých aromatických látek. Především se jedná o furany, pyraziny, alifatické a aromatické uhlovodíky, pyroly, ketony a fenoly. Sirné látky jsou v pražené kávě zastoupeny v menším množství, ale mají významný vliv na aroma kávy^{6,20}.

2.5.1 Pražičky

Z počátku byla kávová zrna pražena jednoduchým způsobem, a to pálením bobulí na přímém ohni, později na kovových pánvích. Na přelomu 18. století se začaly objevovat první pražičky podobné těm, které se používají v dnešní době. Proces pražení byl zdoluhavý a jednalo se spíše o pálení kávy než pražení¹¹. V současné době je pražení kávových zrn vědou a zároveň uměním. Neodborným pražením je možné znehodnotit i nejkvalitnější kávu. Toto pravidlo platí i opačně, kdy mnoho zkušených pražičů dovede i z méně kvalitních zrn upražit kávu dobré chuti³.

Přístroje na pražení kávy tzv. pražičky (Obrázek 5) pracují na různých principech přenosu tepelné energie na kávové zrnko. Nejstarší používaný způsob přenosu tepelné energie je kondukce, při níž teplo přechází na kávová zrnka fyzickým kontaktem z povrchu pražícího stroje. V kávách pražených tímto způsobem můžeme cítit spálenou chuť a dochází zde k větší degradaci chlorogenových kyselin a k velkým ztrátám těkavých látek²¹. Další způsob pražení může být konvekce. Pražení horkým vzduchem se provádí ve speciálních horkovzdušných pražičkách, kdy jsou všechna zrna pražena rovnoměrně a nedochází ke vzniku zplodin, které ovlivňují finální chuť nápoje^{22,23}. Poslední a nejnovější technologií pražení je radiace¹⁶.



Obrázek 5: Pražička kávy

V Evropských pražírňách se využívají pražičky se speciálním vyhřívaným rotujícím bubnem, který se při celém procesu otáčí, a všechna zrnka jsou dokonale promíchávána. Lze říci, že v současnosti se zrnka praží nezávisle na lidském faktoru. Celý proces pražení je plně automatizován a nastavení pražicího profilu je řízeno výpočetní technikou. Každý druh kávy potřebuje jinou dobu a teplotu pražení. Zkušený pražič nejdříve připraví z každé šarže zkušební vzorky. Optimální podmínky se sledují ve třech vzorcích podle stupnice: jemně pražený (light city roast), středně pražený (city plus roast), více pražený (full city roast). V malých pražičkách tento proces trvá 8-12 minut. Tyto kávy jsou degustovány a po přidání i dalších specifikací je vybrán ten nejlepší profil (křivka) pražení³.

2.5.2 Chemické a fyzikální změny během pražení

Složení kávových zrn se dramaticky mění během pražení v důsledku pyrolýzy, karamelizace a Maillardových reakcí. Některé chemické sloučeniny jsou degradovány a jiné jsou vytvořeny, včetně bioaktivních sloučenin a látek s vysokou a střední těkavostí, které jsou důležité pro vůni a chuť. Konečné složení pražené kávy se liší podle suroviny, stupně pražení a dalších faktorů, jako je typ pražičky, čas a teplota.

Pražení způsobuje ztrátu CO₂, vodních par a těkavých sloučenin. Kromě toho dochází k degradaci polysacharidů, cukrů, aminokyselin a chlorogenových kyselin, což vede k tvorbě karamelizačních a kondenzačních produktů. Celkově dochází k nárůstu koncentrace organických kyselin a lipidů, zatímco koncentrace kofeinu a trigonelinu (N-methylnikotinové kyseliny) zůstává nezměněna²⁴. Hlavní kyseliny přítomné v zelených zrnech jsou kyselina citrónová, jablečná, chlorogenové kyseliny a kyselina chinová. Při pražení se koncentrace prvních třech kyselin snižuje, zatímco obsah kyseliny chinové se zvyšuje v důsledku degradace chlorogenových kyselin²⁵.

Chlorogenové kyseliny při pražení degradují^{26,27}. Odborná literatura uvádí, že stupeň degradace chlorogenových kyselin je v přímé závislosti na teplotě a času pražení²⁷. Perrone a kolektiv uvádějí, že káva pražená pouhých šest minut si zachovává v průměru 47 % svých chlorogenových kyselin a celých 44 % je možno nalézt v zalévané kávě²⁸. Další studie uvádí, že zhruba 10 % chlorogenových kyselin se ztrácí jako těkavé sloučeniny²⁹. Chlorogenové kyseliny pravděpodobně reagují s produkty Maillardových reakcí²⁸.

2.5.3 Stupně pražení

Při pražení rozlišujeme různé stupně a hloubky pražení (Obrázek 6). Čím delší čas pražení, tím je káva tmavší a má hořčí chuť. Naopak čím kratší čas pražení, tím je káva světlejší a kyselejší.



Obrázek 6: Káva v různých stupních pražení

Ve světě je mnoho označení a termínů pro různé stupně pražení, avšak univerzální terminologií mezi pražiči jsou výrazy: nízké, střední, vysoké nebo také světlé, střední a tmavé.

Lze konstatovat, že i tato univerzální terminologie stupňů pražení je každým pražičem chápána jinak v ohledu na oblast odkud káva pochází či dle zažitých zvyklostí a oblíbenosti pro danou oblast. Například v Brazílii, Francii, Vietnamu či Itálii se zrna praží na velice tmavou, naopak severské státy preferují kávy světlého skořicového odstínu a střední Evropa upřednostňuje pražení střední. Další běžně používané označení stupňů pražení jsou následující^{3,30}:

- a) Light Cinnamon – Zrna mají světle hnědou barvu, výraznou kyselost a chuťově připomínají toustový chléb.
- b) Cinnamon – Světle hnědá zrna se stále výraznou kyselostí.
- c) New England – Světle hnědá zrna se stále kyselou chutí. Při tomto stupni pražení dochází k prvnímu *cracku*.
- d) American, Light City – Tmavší světle hnědá barva, sladší chuť. V tuto chvíli končí první *crack*.
- e) City Plus, Medium – Zrna jsou středně hnědá, je cítit několik chutí najednou.
- f) Full City – Středně tmavá hnědá barva. Na povrchu zrn se začínají objevovat oleje, sladké a hořké tóny v chuti
- g) Light French, Viennese – Tmavě hnědá barva s více olejovými skvrnami na povrchu, výrazně hořko-sladká chuť, zrna ztrácejí kyselost.
- h) French – Tmavě hnědá barva, výrazné oleje na povrchu, lehce spálené tóny, absence kyselosti.
- i) Italian – Velmi tmavá barva, silnější spálené tóny, žádná kyselost.
- j) Spanish – Zrnka téměř černá, pokrytá olejovitou vrstvou, chuť hořká až spálená.

2.5.4 Chlazení

Po upražení zrn nastává proces chlazení. Zrnka upražené kávy musí být ochlazená co nejrychleji po upražení, aby dále neprobíhaly žádné chemické procesy. Zrnka jsou vysypána do speciálních otevřených kruhových tanků se sítím a míchadlem, přes které proudí studený vzduch. Pomocí míchadla je káva rovnoměrně promíchávána s proudícím vzduchem a dochází tak k rychlému ochlazení. Někdy lze zrna ochladit i vodou. Chlazení vodou je mnohem rychlejší, ale méně používané z důvodů absorpce a vlhnutí zrn^{16,31}.

2.5.5 Mletí kávy

Posledním důležitým krokem před samotnou extrakcí kávy je mletí pražených zrn. Jeden z nejstarších způsobů mletí kávy je hmoždíř. Zrnka byla rozdracena a tato poměrně hrubá káva byla louhována. Později se k mletí kávy používala metoda mlýnského kamene, který sloužil též k mletí obilí. Dalším jednoduchým mechanismem na mletí zrn je dřevěný skříňový mlýnek s kónickými kameny. V současné době se k mletí používají mlýnky elektrické, ty pracují buď na principu dvou zdrsňených kotoučů, nebo mají rotující čepele a lamely. Mají ovšem také své nevýhody. Při dlouhém mletí vzniká velké množství tepla, a to může znehodnotit kvalitu zrna a tím i celého nápoje. Většina dnešních mlýnků má nastavitelnou hrubost mletí. Stupně mletí rozlišujeme na hrubé, střední a jemné^{3,4}.

2.6 Složení látek v kávě

Zpracování a pražení kávových zrn hraje významnou roli v jeho chemickém složení. Látkové složení závisí na oblasti odkud kávovník pochází, a na druhu kávovníku, dále na podmínkách pěstování a jeho technologickém zpracování. Níže v Tabulce 2 jsou uvedeny průměrné koncentrace jednotlivých složek zelené kávy v hmotnostních procentech.

Tabulka 2: Obsah látek přítomných v kávě v hmotnostních %^{4,6}

SLOŽKA	ARABIKA	ROBUSTA
Rozpustné sacharidy	9-12,5	6-11,5
Ner rozpustné sacharidy	34-35	34-35
Kyseliny a fenoly	8-11	9-17
<i>těkavé kyseliny</i>	0,1	0,1
<i>netěkavé kyseliny</i>	2-2,9	1,3-2,2
<i>chlorogenové kyseliny</i>	6,7-9,3	7,1-12,1
Lipidické sloučeniny	15-18	8-12
<i>vosky</i>	0,2-0,3	0,2-0,3
<i>oleje</i>	7,7-17,8	7,7-17,8
Dusíkaté sloučeniny	11-15	11-15
Volné aminokyseliny	0,2-0,8	0,2-0,8
Bílkoviny	8,5-12	8,5-12
Kofein	0,8-1,4	1,7-4,0
Trigonelin	0,6-1,2	0,3-0,9
Minerální látky	3,0-5,4	3,0-5,4

2.6.1 Sacharidy

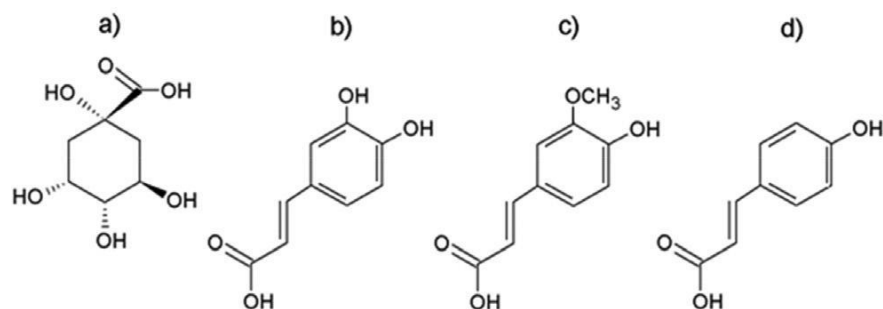
Sacharidy jsou hlavními složkami kávy, představují více než 50 % sušiny. Jedná se o ve vodě rozpustné a nerozpustné sacharidy. Při pražení tvoří barevné a aromatické produkty díky karamelizaci a Maillardovým reakcím. Polysacharidy, oligosacharidy, disacharidy a monosacharidy lze rozdělit na redukující a neredukující cukry. Polysacharidy mají majoritní podíl v zastoupení cukerných složek a představují přibližně 44 % sušiny u *C. arabica* a 47 % u *C. canephora*^{16,32,33}. Polysacharidy rozpustné ve vodě lze rozdělit na dvě frakce, vysokomolekulární a nízkomolekulární³⁴. Vysokomolekulární polysacharidy rozpustné ve vodě jsou primárně reprezentovány galaktomanany a arabinogalaktany. Nerozpustná část vysokomolekulárních polysacharidů tvořící buněčné stěny semen se skládá z mannanu, hemicelulózy a celulózy. Jejich obsah je vyšší v Arabice než v Robustě.

Monosacharidy a disacharidy jsou v kávě zastoupeny méně, avšak jsou nezbytné pro tvorbu aroma, karamelizaci a Maillardovy reakce. Sacharóza je zdaleka nejhojnější a nejdůležitější cukr v zelené kávě (8 % v Arabice a 3-6 % v Robustě)³⁵. Oligosacharidy a monosacharidy se nacházejí v zelené kávě ve stopových množstvích. Koncentrace glukózy a fruktózy stoupá v počáteční fázi pražení kvůli rozkladu sacharózy, téměř všechny volné cukry se při pražení ztrácí. Stručně řečeno, monosacharidy a disacharidy jsou pro tepelné ošetření velmi křehké, při pražení jsou kvantitativně degradovány za několika minut^{36,37}.

2.6.2 Kyseliny

Kyselost kávy je jedna ze základních vlastností kávy. Intenzita kyselosti má velmi významný vliv při senzoričném hodnocení kávy. Zelená káva obsahuje těkavé alifatické kyseliny, netěkavé alifatické kyseliny a fenolové kyseliny. Hlavní netěkavé kyseliny jsou chlorogenové kyseliny, kyselina citrónová, kyselina jablečná a kyselina chinová. Těkavé kyseliny představuje hlavně kyselina mravenčí a octová³⁸.

Chlorogenové kyseliny (CGA) jsou fenolické látky přírodního původu, které se tvoří v rostlině kávovníku esterifikací trans-skořicových kyselin (hlavně kávové, ferulové a *p*-kumarové kyseliny) s hydroxylovými zbytky kyseliny chinové (Obrázek 7). V zelené i pražené kávě se vyskytuje více jak 30 esterů skořicových kyselin.



Obrázek 7: Strukturální vzorce kyseliny chinové (a) a tři nejčastější trans-skořicové kyseliny skupiny CGA: kyselina kávová (b), kyselina ferulová (c) a kyselina p-kumarová (d)

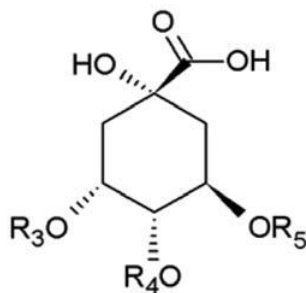
Chlorogenové kyseliny lze rozdělit podle povahy a počtu skořicových substituentů a esterifikační polohy v cyklohexanovém kruhu kyseliny chinové. Mezi hlavní chlorogenové kyseliny patří kafeoylchinové kyseliny (CQA), dikafeoylchinové kyseliny (diCQA), feruloylchinové kyseliny (FQA) a p-kumaroylchinové kyseliny (CoQA) a kafeoylferuloylchinové kyseliny (CFQA).

Chlorogenové kyseliny mají mnoho užitečných vlastností, jako je antioxidační aktivita, antikarcinogenní potenciál, zpomalují uvolňování glukózy do krve po jídle a mají silné protizánětlivé, antibakteriální vlastnosti. Velký problém je ovšem v názvosloví CGA. Během posledních desetiletí byly vydány odborné studie a články, které se zabývají tímto tématem. Bohužel při nastudování tohoto tématu můžeme být silně zmateni. Kvůli postupným objevům a izolacím jednotlivých izomerů z mnoha matric a kvůli měnícímu se systému nomenklatury jsou nesrovnalosti v odborné literatuře běžné. Největší nesrovnalosti jsou s označením dvou sloučenin patřící mezi kafeoylchinové kyseliny. Těmito sloučeninami jsou kyselina 5-kafoylchinová (také známá jako chlorogenová) a 3-kafoylchinová kyselina (známá pod názvem kyselina neochlorogenová).

Hlavní příčinou je špatné označení kyseliny chlorogenové (5-CQA), která byla nazývána jako kyselina 3-kafoylchinová (3-CQA) před rokem 1976, kdy byla zveřejněna nová pravidla pro nomenklaturu. Bohužel v odborné literatuře se stále objevují články, kde je používána nomenklatura před IUPAC a tím dochází stále k chybám, kdy je kyselina 3-kafoylchinová nazývána jako chlorogenová. V současné době jsou obě tyto sloučeniny k dispozici v čisté krystalické formě koupitelné od komerčních dodavatelů. Bohužel většina dodavatelů používá starou nomenklaturu a prodává kyselinu chlorogenovou jako kyselinu 3-kafoylchinovou. To je pravděpodobně způsobeno tím, když v roce 1976 IUPAC publikoval

číslovací systém pro cyklitolý, kyselina chlorogenová byla opravdu kyselina 3-kafoylchinová a čistá forma kyseliny neochlorogenové nebyla dosud komerčně dostupná³⁹.

Pro přesnější orientaci v chlorogenových kyselinách je na Obrázku 8, zobrazena chemická struktura kyseliny chinové s možnými substituenty R3, R4 a R5 a v Tabulce 3 jsou uvedeny různé typy substituce kyseliny chinové s kyselinou kávovou, ferulovou a p-kumarovou.



Obrázek 8: Chemická struktura kyseliny chinové s možnými substituenty R3, R4, R5

Tabulka 3: Různé typy substituentů pro R3, R4, R5³⁹

Zkratka kyseliny	R3	R4	R5
3-CQA	kyselina kávová	H	H
4-CQA	H	kyselina kávová	H
5-CQA	H	H	kyselina kávová
3-FQA	kyselina ferulová	H	H
4-FQA	H	kyselina ferulová	H
5-FQA	H	H	kyselina ferulová
3-p-CoCQA	kyselina p-kumarová	H	H
4-p-CoCQA	H	kyselina p-kumarová	H
5-p-CoCQA	H	H	kyselina p-kumarová
3,4-diCQA	kyselina kávová	kyselina kávová	H
3,5-diCQA	kyselina kávová	H	kyselina kávová
4,5-diCQA	H	kyselina kávová	kyselina kávová
3,4-CFQA	kyselina ferulová	kyselina ferulová	H
3,4-CFQA	kyselina ferulová	kyselina kávová	H
3,5-CFQA	kyselina ferulová	H	kyselina ferulová
3,5-CFQA	kyselina ferulová	H	kyselina kávová
4,5-CFQA	H	kyselina kávová	kyselina ferulová
4,5-CFQA	H	kyselina ferulová	kyselina kávová

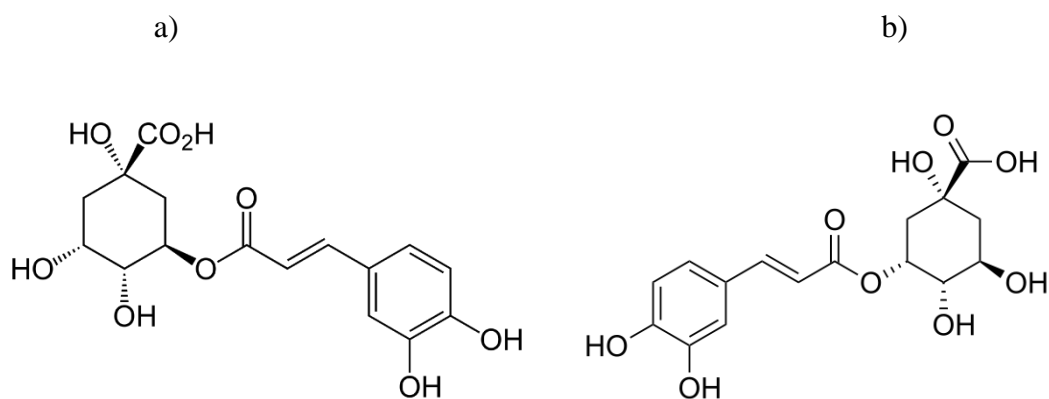
CQA = kaffeoylchinové kyseliny, diCQA = dikaffeoylchinové kyseliny
 FQA = feruloylchinové kyseliny, CoQA = p-kumaroylchinové kyseliny
 CFQA = kaffeoylferuloylchinové kyseliny

Obsah hlavních chlorogenových kyselin v pražené kávě je uvedený v Tabulce 4. V zelené kávě jsou v menší části také zastoupeny izomery kyseliny ferulové (FQA) a kyseliny p-kumarové (CoQA)⁴⁰⁻⁴³.

Tabulka 4: Obsah hlavních chlorogenových kyselin v pražené kávě²⁰

Kyselina	Obsah v g.kg ⁻¹
5-kaffeoylchinová (chlorogenová)	20
4-kaffeoylchinová (kryptochlorogenová)	2
3-kaffeoylchinová (neochlorogenová)	1

V zelené kávě se množství CGA pohybuje od 8 do 14,4 % sušiny pro Robustu a od 3,4 do 4,8 % pro Arabiku⁴⁴. Bylo zjištěno, že chlorogenová kyselina (Obrázek 9) je během pražení kontinuálně degradována a následně dochází k degradaci kyseliny kryptochlorogenové a neochlorogenové^{26,45}.



Obrázek 9: Chemická struktura kyseliny chlorogenové (a) a neochlorogenové (b)

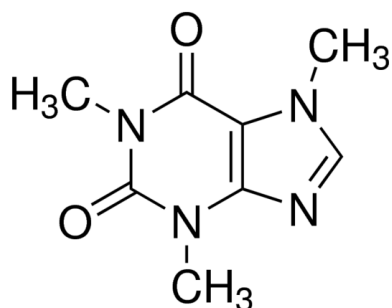
Další hojně zastoupenou kyselinou je kyselina citronová. Na rozdíl od mnoha dalších kyselin se kyselina citronová během procesu pražení nevzniká, ale pomalu se rozkládá. Ztráta obsahu kyseliny citronové závisí na řadě faktorů, ale obecně bude středně pražená káva obsahovat asi poloviční koncentraci než zelená káva⁴⁶.

2.6.3 Alkaloidy

Kávové rostliny obsahují dva různé druhy alkaloidů. Jedním typem jsou purinové alkaloidy jako je kofein (1,3,7-N-trimethylxanthin), theobromin (3,7-N-dimethylxanthin) nebo theofylin (1,3-dimethylxanthin). Druhým typem je pyridinový alkaloid trigonelin (N-methylnikotinová kyselina). Distribuce kofeinu a trigonelinu je v rostlinné říši odlišná, kofein je přítomen jak v kávě, tak v čaji, ale trigonelin se nachází pouze v kávě. Velké množství trigonelinu je také v mnoha luštěninách⁴⁷.

Kofein

Kofein (Obrázek 10) řadíme mezi nejvýznamnější purinový alkaloid obsažený v kávě. Obsah kofeinu v zelených zrnech arabiky je 0,9-1,4 % zatímco v zrnech robusty je 1,4-4,0 %. Jedná se o bílou krystalickou látku patřící do skupiny methylovaných derivátů xantinu. Nachází se ve více než 60 rostlinách včetně kávových zrn, čajových lístků a kakau^{20,47}. Stimuluje centrální nervovou soustavu a zařazujeme jej do tzv. tolerantních návykových látek, mezi které patří nikotin a ethanol⁶. Synteticky vyráběný kofein se využívá k obohacování kolových a energetických nápojů a také ve farmacii.



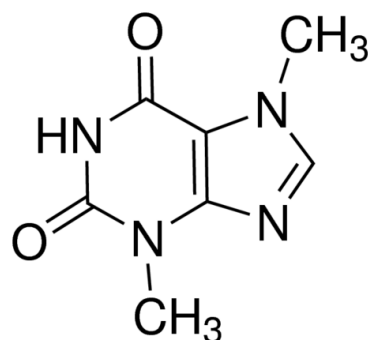
Obrázek 10: Chemická struktura kofeinu

Současné studie naznačují, že mírný příjem kofeinu není spojen se zvýšeným rizikem celkového kardiovaskulárního onemocnění, jako je arytmie, srdeční selhání nebo změny krevního tlaku. Naopak, konzumace malého množství kofeinu je spojena se sníženým rizikem kardiovaskulárních poruch⁴⁸.

Theobromin

Theobromin je dimethylxanthin přítomný ve velkých množstvích v kakaovém prášku, a také v produktech jako je čokoláda, v menší míře ho pak můžeme nalézt v kávových zrnech. I když je chemicky velmi podobný ostatním methylxantinům, jako je kofein, teofylin a trigonelin stimuluje centrální nervový systém v menším rozsahu než tyto methylxanthiny^{49,50}.

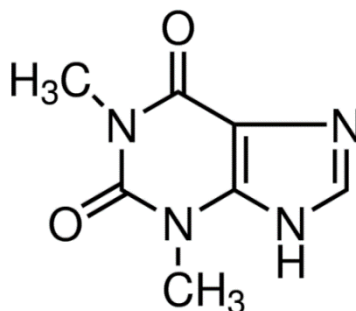
Theobromin (Obrázek 11) je bezbarvý, bez zápachu s mírně hořkou chutí. Obsah v zelených zrnech arabiky je 36-40 mg/kg a v robustě 26-82 mg/kg. Studie prokázaly pozitivní přínosy theobrominu na zdraví, včetně ochrany povrchu skloviny zubů⁵¹, potlačování kašle⁵², ochranu kardiovaskulárního systému, zvýšení HDL cholesterolu a snížení LDL cholesterolu⁵³.



Obrázek 11: Chemická struktura theobrominu

Theofylin

Theofylin (Obrázek 12) je stejně jako kofein a theobromin přírodní alkaloid, derivát xanthinu izolovaný z rostlin *Camellia sinensis* a *Coffea arabica*. Obsah v zelených zrnech arabiky je 7-23 µg/kg, v robustě 86–344 µg/kg. V čisté podobě je to bílý krystalický prášek bez zápachu s hořkou chutí. Používá se k léčbě respiračních onemocnění, jako je chronická obstrukční plicní nemoc nebo astma. Původně byl použit jako bronchodilátor, ale poměrně vysoké dávky měly časté nežádoucí účinky. V nových studiích, bylo zjištěno, že při nižších koncentracích má protizánětlivé účinky při astmatu a chronických obstrukčních plicních nemocech^{54–56}.

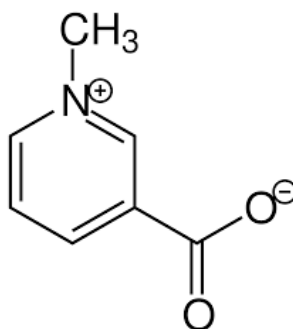


Obrázek 12: Chemická struktura theofylinu

Trigonelin

Trigonelin (Obrázek 13) je silně polární hydrofilní sloučenina, která je po kofeinu druhým nejdůležitějším alkaloidem v kávě s obsahem asi 1 %. Trigonelin se během pražení rychle degraduje, jeho koncentrace silně závisí na teplotě a době pražení⁵⁷. Během pražení se rozkládá dvěma způsoby. Prvním způsobem je migrace N-methylové skupiny, kdy vznikne methyl-nikotinát, jehož koncentrace se v pražené kávě pohybuje okolo 0,6 % a v přítomnosti vody dochází k hydrolýze na kyselinu nikotinovou. Druhým způsobem je dekarboxylace, kdy dochází k rozkladu přibližně 88 % trigonelinu a vzniká těkavý pyridin a 3-methylpyridin. Důležitý meziprodukt 1-methylpyridiniumhydroxid je dále rozkládán na metylamin, acetaldehyd a malon dialdehyd. Dalšími reakcemi vzniká velké množství produktů, především alkylpyridiny a arylpyridiny²⁰.

Bylo prokázáno, že účinky kyseliny nikotinové, nikotinamidu a trigonelinu inhibují invazivitu rakovinných buněk⁵⁸.



Obrázek 13: Chemická struktura trigonelinu

2.6.4 Minerální látky

Káva obsahuje přibližně 4 % minerálních látek, v arabice je to 3,6-4,5 %, v robustě 3,6-4,8 %¹⁶. Stejně jako u všech rostlinných materiálů převládá draslík (1,1 %), poté následuje vápník (0,2 %) a hořčík (0,2 %). Převažujícími anionty jsou fosfáty (0,2 %) a sulfáty (0,1 %)¹⁸. Stopovými prvky v kávě jsou zinek, stroncium, křemík, mangan, železo, měď, baryum, bór a hliník. Množství stopových prvků v kávě se liší podle složení půdy⁵⁹.

2.6.5 Lipidy

Lipidy jsou další hojně zastoupenou složkou v kávě, jejich celkový obsah v arabice je 8-15 % a v robustě 8-12 %. Lipidová frakce kávy je složena převážně z kávových olejů. Kávové oleje jsou tvořeny ze 75 % triacylglyceroly a mezi nejvýznamnější nenasycené mastné kyseliny zastoupené v tryacylglycerolech patří kyselina linolová, olejová a linoleová⁶⁰. Další významnou složkou lipidů jsou steroly, tokoferoly a v malém množství diterpenové alkoholy (kafestol a kahweol), fosfatidy a deriváty triptaminu.

Diterpenové alkoholy se vyskytují jako volné nebo vázané v esterech s mastnými kyselinami a v glykosidech. Pražením kávy dochází k dehydrataci a oxidaci těchto diterpenů až na aldehydy kefastrol a kahweol. Bylo prokázáno, že kafestrol a kahweol zvyšují hladinu cholesterolu v krevním séru v důsledku interakce palminátu s biologickými membránami^{20,61}. V nefiltrovaných nálevech kávy byl zjištěn nárůst diterpenových alkoholů, který má vliv na nárůst hladiny sérového cholesterolu oproti kávám filtrovaným.

Ačkoli je většina lipidů umístěna v endospermu zelené kávy, tak i malé množství kávového vosku nalezneme ve vnější vrstvě kávového zrna. Tato frakce představuje 0,2 % až 0,3 % hmotnosti semen kávy⁶²⁻⁶⁴.

2.6.6 Bílkoviny

Proteiny, peptidy a volné aminokyseliny jsou nezbytné pro aroma kávy. Při pražení jsou proteiny vystaveny rozsáhlým změnám v přítomnosti sacharidů. Celkový obsah aminokyselin klesá asi o 30 %. Mezi reaktivní aminokyseliny můžeme zařadit arginin, kyselinu

asparagovou, cystein, histidin, lysin, serin, threonin a methionin. Jejich obsah se v průběhu pražení snižuje. Zatímco stabilní aminokyseliny, zejména alanin, kyselina glutamová a leucin, po pražení své množství relativně zvýší. Síranové aminokyseliny, cystin, cystein a methionin jsou v zelené kávě většinou vázané v bílkovinách a při pražení interagují s redukcujícími cukry za vzniku intenzivně aromatických těkavých látek thiofenu a thiazolu. Hydroxylové aminokyseliny serin a threonin reagují se sacharózou za vzniku těkavých heterocyklických sloučenin – alkylpyrazinů, které významně přispívají k chuti a vůni pražené kávy⁶⁵⁻⁶⁷.

2.7 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, jež spočívá v dělení směsi látek mezi dvě fáze. Jedna fáze je vždy nepohyblivá a je nazývána jako fáze stacionární, na níž dochází k zadržování dělených látek. Druhá fáze je fáze pohyblivá nazývána jako mobilní. Touto fází jsou dělené látky unášeny. Mechanismus chromatografie tedy využívá zadržování směsi látek na stacionární fázi a opakované vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografické metody můžeme rozdělit z několika hledisek. Podle převažujícího mechanismu interakcí na:

- Adsorpční chromatografie: jedná se o separaci, při níž rozhoduje různá schopnost složek různá adsorpce na povrch stacionární fáze.
- rozdělovací chromatografie: při separaci hraje roli rozdílná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi a mobilní fázi.
- Gelová chromatografie: k dělení složek ve vzorku dochází na základě rozdílné velikosti a tvaru molekul na pórovité stacionární fázi.
- Afinitní chromatografie: separaci složek ve vzorku ovlivňuje afinita ke stacionární fázi.
- Iontově výměnná chromatografie: o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty vzorku a stacionární fází.

Podle uspořádání stacionární fáze:

- Kolonová chromatografie: stacionární fáze je umístěna v koloně
- Plošné techniky: stacionární fáze je umístěna na ploše

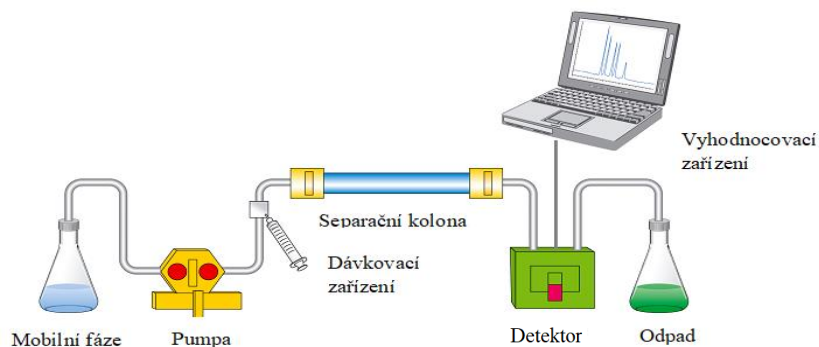
Podle skupenství mobilní fáze:

- Kapalinová chromatografie: mobilní fáze je kapalina
- Plynová chromatografie: mobilní fáze je plyn^{68,69}

2.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina, jak již vyplývá z názvu metody. Tato metoda byla vyvinuta na počátku 70. let z plynové chromatografie. Vysokých účinností bylo dosaženo použitím stacionárních fází, které obsahují malé pravidelné částice, které homogenně vyplňují kolonu. Kapalinová chromatografie umožňuje dělení většiny organických a anorganických látek. Složitější směsi lze separovat pomocí metody zvané vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC = high-performance liquid chromatography). HPLC je na rozdíl od běžné kapalinové chromatografie výkonnější, účinnější a také zkracuje dobu analýzy. U kapalinové chromatografie také hraje důležitou roli mobilní fáze, která může ovlivnit retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení. Separace analytu závisí na jeho rozdělení v mobilní a stacionární fázi. Jeho čas strávený v mobilní nebo stacionární fázi závisí na afinitě ke každé z nich. Podle mechanismu separace můžeme kapalinovou chromatografii rozdělit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnou nebo gelovou permeační chromatografii^{68,70}.

Chromatografický systém pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii je složen z několika částí. Základní schéma je znázorněno na Obrázku 14. Mobilní fáze protéká přes dávkovací zařízení, a před vstupem do kolony dochází k aplikaci vzorku. Využívá se dávkovací ventil, který zajišťuje přesné nadávkování vzorku. V koloně dochází k separaci složek vzorku podle polarit separovaných látek a polarit mobilní a stacionární fáze.

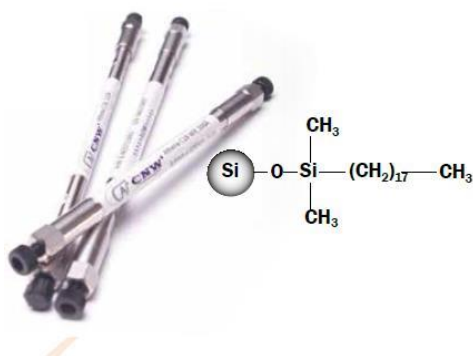


Obrázek 14: Schéma HPLC⁷¹

Pro separaci HPLC je kladen vysoký důraz na čistotu rozpouštědel mobilní fáze a také na kontinuální průtok eluentu, který zajišťuje vysokotlaké čerpadlo vyvíjející tlak až 120 MPa. Podle polaritý fází používaných v kapalinové chromatografii rozlišujeme dva základní typy. Systém s polární stacionární fází a méně polární fází mobilní je znám jako chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC). Jde o historicky nejstarší metodu kapalinové chromatografie, kde analyt soutěží s mobilní fází o aktivní místa na povrchu sorbentu a retence látek je výsledkem jejich rozdílné polaritý. V případě, že jsou polaritý obou fází opačné, stacionární fáze má nepolární charakter a mobilní fáze je polární, je to chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC), která je v dnešní době využívána přibližně v 80 % aplikací. Nejčastěji je používána chemicky vázaná nepolární fáze (C8, C18) na silikagelu jako nosiči^{70,72}.

2.7.2 Chromatografické kolony pro HPLC

Chromatografické kolony (Obrázek 15) hrají důležitou roli v separaci látek a výsledná analýza vzorku je závislá na kvalitě kolony a její náplni. Pro HPLC se používají náplňové kolony, což jsou rovné krátké trubice s hladkým vnitřním povrchem zhotovené většinou z nerezové oceli, aby odolávaly relativně vysokým pracovním tlakům i chemickému působení mobilní fáze a separovaných látek. Na účinnosti kolony závisí také její délka, tvar a materiál, kterým je naplněna. Pro HPLC se nejčastěji používají kolony o délkách 50-250 mm s vnitřním průměrem 2,1- 4,6 mm a velikostí částic 1,2-5 μm .



Obrázek 15: Chromatografická kolona C18

Nejčastější používanou stacionární fází je oxid křemičitý, který je chemicky modifikovaný vhodnou funkční skupinou, podle které rozlišujeme polaritu stacionární fáze. Nejčastěji používaná stacionární fáze je s navázaným uhlíkovým řetězcem C18, který umožňuje práci i při velmi vysokém pH (až pH 12), protože bazické sloučeniny nemohou interagovat se silikagelem. Aktivita silanolové skupiny se snižuje s včleněním polární skupiny mezi silikagel a oktadecylovou skupinu. Účinnost separace roste s klesající velikostí částic sorbentu^{70,72}.

2.7.3 Detektory v kapalinové chromatografii

K indikaci látek, které vycházejí z chromatografické kolony, je používána celá řada detektorů. V HPLC se používají detektory, které poskytují signál úměrný koncentraci látky ve vzorku. Dělí se do dvou skupin na detektory univerzální a selektivní. Detektor by za ideálních podmínek měl být schopen detekovat všechny typy látek a měl by poskytovat lineární koncentrační odezvu v širokém rozmezí koncentrací. Důležitá je také vysoká citlivost a nízká úroveň šumu. Ideální detektor tyto podmínky splňuje, ale reálný detektor se těmto podmínkám pouze přibližuje.

Druhy detektorů:

Spektrofotometrické detektory

Tyto detektory patří mezi nejrozšířenější a nejvíce používané k detekci v HPLC. Detekované látky musí absorbovat záření o dané vlnové délce, které je použito k detekci. Podle použitých vlnových délek, které se používají při měření, můžeme detektory rozdělit na detektory s fixní vlnovou délkou, s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektory diodového pole (DAD), které zaznamenávají celé UV/VIS spektrum během chromatografické separace. Získaná UV/VIS spektra píků lze následně porovnávat s knihovny spekter.

Fluorimetrický detektor

Tento detektor je velice citlivý a selektivní. Je schopný detekovat pouze látky vykazující fluorescenci. Detekovaná látka absorbuje ultrafialové budící záření a tím její molekuly přecházejí ze základního stavu do vyšších vibračních hladin. Absorbovanou energii analyt vyzáří v podobě sekundárního emisního záření. Nejjednodušší detektory jsou vybaveny rtuťovou výbojkou a filtrem jako zdrojem monochromatického záření a detekují současně i fluorescenční záření při všech vlnových délkách. Modernější a dražší detektory jsou vybaveny monochromátory, které umožňují volit si jakoukoliv libovolnou vlnovou délku jak budícího, tak emitovaného záření.

Refraktometrický detektor

Tento detektor je univerzální, nespecifický, s nižší citlivostí a lze s ním měřit v podstatě všechny látky. Je založen na měření rozdílů indexu lomu eluátu a mobilní fáze. Odezva detektoru závisí na teplotě a je úměrná rozdílů indexu lomu ve srovnávací a měrné cele.

Elektrochemický detektor

Elektrochemické detektory jsou založené na měření proudu vyvolaným při průchodu redukovatelné nebo oxidovatelné látky měrnou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým napětím. Elektrochemický detektory může být amperometrický, kde je měřen proud při konstantním elektrodovém potenciálu nebo coulometrický, kde dochází k úplné elektrolýze analytu. K nevýhodám elektrochemických detektorů patří vysoké nároky na čistotu mobilních fází z důvodů stability základní linie a reprodukovatelnosti výsledků⁶⁸.

2.7.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometry (MS) mohou být použity jako detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii a řadíme je tak do skupiny spojených technik (HPLC/MS). Hmotnostní spektrometrie umožňuje rychlou kvantifikaci a identifikaci látek s vysokou citlivostí a minimálním množstvím spotřeby vzorku, avšak mezi nevýhody patří vysoká pořizovací cena a destrukce vzorku. Mají velký význam v bioanalytických, environmentálních aplikacích, dále také v potravinové analýze, proteomice a při výzkumu nových lékařských struktur.

Identifikace či kvantifikace látek v hmotnostním spektrometru probíhá ve třech krocích. Nejdříve musí dojít k ionizaci vzorku kde jsou neutrální molekuly analytu převedeny na nabitě částice. Poté následuje rozdělení v hmotnostním analyzátoru dle poměru m/z (hmotnost /náboj) a nakonec detekce iontů v detektoru. Další nezbytnou součástí je vakuový systém, iontová optika pro urychlení a fokusaci iontů a počítač k ovládní, sběru a ukládání dat.

Důležitým krokem před samotnou analýzou je zvolení správné ionizace vzorku. Pro ionizaci analytů můžeme využít široké spektrum technik, avšak neexistuje univerzální pro všechny látky. Zvolení správné ionizační techniky je ovlivněno polaritou, těkavostí, tepelnou stabilitou a molekulovou hmotností analytu. Pro spojení HPLC/MS je nejpoužívanější technikou ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI).

Ionizace elektrosprejem je měkká, velmi šetrná technika určená pro středně polární až iontové látky. Kdy v prvním kroku dochází ke zmlžení roztoku vzorku na elektricky nabitě kapičky, poté při vypařování rozpouštědla dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje a při překročení kritické hodnoty povrchového náboje dochází k rozpadu na menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Vzniklé ionty z kapiček jsou systémem fokusačních a urychlujících elektrod transportovány do hmotnostního analyzátoru. Chemická ionizace za atmosférického tlaku je určena pro méně polární až středně polární látky a je druhou nejpoužívanější technikou ve spojení HPLC/MS. Má obdobné uspořádání jako ionizace ESI. Systém je vybaven jehlovou elektrodou s vloženým vysokým napětím 3-4 kV, čímž vzniká koronový výboj, který ionizuje molekuly mobilní fáze. Tyto ionizované molekuly mobilní fáze slouží, jako reakční plyn pro ionizaci analytu.

Mezi iontovým zdrojem a detektorem je umístěn hmotnostní analyzátor, který rozděluje ionty v poměru m/z . Nejvíce používanými analyzátorů ve spojení HPLC/MS jsou kvadrupólový analyzátor, iontová past a analyzátor doby letu^{68,73}.

Iontová past se skládá ze tří elektrod. Jedné kruhové a dvou koncových, které jsou vyklenuty do prostoru kruhu. Na elektrody je vloženo napětí a ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pasti. Tam jsou zadržovány milisekundy i déle. Postupnou změnou napětí mezi elektrodami jsou ionty podle jejich m/z vypuzeny z prostoru pasti k detektoru. Výhodou tohoto analyzátoru je vysoká citlivost a lepší rozlišovací schopnost oproti kvadrupólu⁶⁸.

2.8 Stanovení antioxidantů a alkaloidů separačními technikami.

Ke sledování obsahu antioxidantů a alkaloidů je nejvíce využívána technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Na detekci separovaných látek vycházejících z kolony lze použít UV-VIS⁷⁴, MS⁷⁵, amperometrickou⁷⁶ nebo fluorescenční detekci⁷⁷. HPLC není jediná metoda, která může sloužit k separaci látek ve vzorcích kávy. Lze využít i kapilární elektroforézu^{78,79}, tenkovrstvou chromatografii⁸⁰, plynovou chromatografii⁸¹ nebo gelovou filtrační chromatografii⁸², která představuje zajímavou alternativu k RP chromatografii. Největšími výhodami metody je současné stanovení chlorogenových kyselin, trigonelinu a kofeinu při použití čisté vody jako mobilní fáze, což je z hlediska nákladů a ekologie velice atraktivní.

Příprava a úprava vzorku

Pražená zrnka kávy nelze analyzovat přímo. Je potřeba vzorek před analýzou upravit, tak aby bylo možné použít některou ze separačních metod. Pro HPLC jsou vzorky většinou připravovány zalitím horkou vodou nebo pomocí pákových či automatických kávovarů s následnou filtrací přes filtr s velikostí pórů 0,2 nebo 0,45 μ m. Dále může být pražená káva extrahována methanolem či acetonitrem^{77,83}. Další možností úpravy vzorku je extrakce pevnou fází (SPE), kdy je vzorek naředěn horkou vodou a následně extrahován pomocí SPE kolonek⁷⁴. Tento postup se používá pro stanovení látek, které jsou přítomné ve stopovém množství. Pro plynovou chromatografii je nutné vzorky derivatizovat pomocí mepivacainu a 10M NaOH⁸¹.

Chromatografické kolony

K separaci alkaloidů a antioxidantů v kávách se používají převážně kolony s nepolární stacionární fází. Stacionární fáze je tvořena chemicky vázanými nepolárními skupinami na silikagelu jako nosiči. Nejpoužívanější stacionární fází je oktadecylový zbytek (C18) a částečně

i oktylový zbytek (C8). Pro separaci alkaloidů a antioxidantů byly nejčastěji používány kolony s rozměry 100-250 mm s vnitřním průměrem 2-4,6mm a velikostí částic 5 μm. Použité kolony jsou uvedeny v Tabulce 5. Pro filtrační gelovou chromatografií lze použít kolonu TSK G-3000 SW HPGF⁸².

Tabulka 5: Kolony, které byly použity k separaci alkaloidů a antioxidantů

Kolona	Rozměry	Velikost částic	Separované látky	Citace
ODC-C18	250 x 4,6 mm	5 μm	Chlorogenové kyseliny	[75]
Aquasil C18	200 x 4,2 mm	5 μm	Kofein	[74]
Bondesil C18	150 x 4,0 mm	5 μm	Kofein, Theobromin, Theofylin	[83]
LinChroCART RP C18	250 x 4 mm	5 μm	Chlorogenové kyseliny	[84]
Merck Supersherp	250 x 4 mm	5 μm	Kofein, Trigonelin, Chlorogenové kyseliny	[44]
Kinetex C18	100 x 4,6 mm	2,6 μm	Kofein, chlorogenové kyseliny	[77]
S5 ODS2	150 x 2 mm	5 μm	Kofein, Trigonelin	[85]

Podmínky separace:

Pro analýzu kávy v systému s obrácenými fázemi jsou používány mobilní fáze složené ze směsi polárních látek. K eluci látek je nejčastěji využívána gradientová eluce, kdy v průběhu separace dochází ke změně poměru složek mobilní fáze. Tím dochází ke zvyšování eluční síly a zrychlení celé analýzy. Jako mobilní fáze byly použity: vodný roztok kyseliny citronové pH 2,4 + acetonitril⁸⁵, fosfátový pufr o pH 2,4 + methanol⁷⁴, 0,3% vodný roztok kyseliny mravenčí + methanol⁸⁶ a také vodný roztok kyseliny octové o pH 3 + methanol⁷⁵. Bylo prokázáno, že alkaloidy lze úspěšně analyzovat na kolonách s nepolární stacionární fází v jednoduchých systémech obsahující pouze vodu a organické rozpouštědlo bez přidaných pufrů a modifikátorů. Kofein, theofylin a teobromin byl stanoven v elučním systému obsahující pouze vodu s ACN nebo vodu s methanolem⁸⁰. Pro kapilární elektroforézu lze využít jako nosný pufr tetraboritan sodný⁷⁸.

Detektory

K detekci významných alkaloidů a antioxidantů lze využít různé detektory. Nejčastěji používaný detektor je UV/VIS^{26,83} s pevně nastavenou vlnovou délkou. Pro chlorogenové kyseliny byla nejčastěji použita vlnová délka 325 nm a 273 nm. Pro kofein, trigonelin a theobromin 275 nm a 272 nm. Dále je možné použít detektor UV/VIS s diodovým polem (DAD), který umožňuje sledovat celé UV/VIS spektrum při analýze. Lze také využít fluorescenční detektor s excitační vlnovou délkou např. pro chlorogenové kyseliny a kofein 280 nm a emisní vlnovou délkou 310 nm⁷⁷. Další možností je dusíko-fosforový detektor u plynové chromatografie⁸¹. Rovněž lze k detekci využít HPLC/MS s elektrosprejem⁸⁶ nebo TLC/MS⁸⁰. Další možností stanovení alkaloidů je amperometrická detekce, kde byla použita měrná skleněná uhlíková elektroda a elektroda argenticchloridová jako srovnávací⁷⁶.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

Kapalinový chromatograf se spektrofotometrickým a hmotnostním detektorem

Chromatografické analýzy kávy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Kapalinový chromatograf byl složen ze zásobníku na mobilní fázi, odplyňovače mobilní fáze, kvarterní gradientové pumpy, dávkovacího zařízení, termostatu kolon, UV detektoru a hmotnostního detektoru Agilent 1100 Series LC/MSD trap SL. Separace látek byla provedena na koloně Gemini 5u C18/ 110A (150 x 3 mm, Phenomenex).

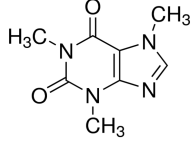
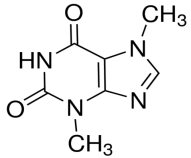
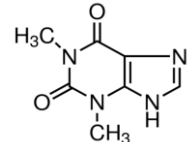
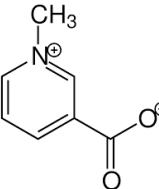
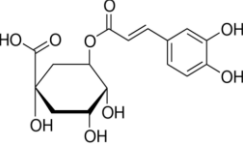
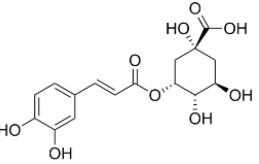
Další zařízení:

- analytické váhy KERN ABT 220 - 4M (Kern & Son, Balingen, Německo)
- pH metr CG 842 (SCHOTT GLAS, Mainz, Německo)
- Membránové filtry Nylon (PA) 0,45 μm , 25 mm (Merck, Německo)
- sada automatických pipet (Biohit, Helsinky, Finsko)
- ultrazvuk Tk 52 (Bandelin electronic, Německo)
- mlýnek - Retsch GM 200 (Fisher Scientific, Pardubice)
- kávovar - De Longhi ESAM 5500 M, (De Longhi, Itálie)
- kávovar - De Longhi EC 680, (De Longhi, Itálie)
- mlýnek na kávu - De Longhi KG 89, (De Longhi, Itálie)
- mlýnek na kávu - Mahlkönig VTA 6S3 (Stawert Mühlenbau, Německo)
- pražička - 1kg Elektrik coffee roaster TJ- 067 (North coffee, Čína)
- úprava vody - MILI-Q, (Merck Milipore, Německo)
- běžné laboratorní sklo

3.2 Standardní látky a chemikálie

Standardní látky:

Tabulka 6: Seznam použitých standardních látek

Standardy	Struktura	Mr [g.mol ⁻¹]	[M+H] ⁺	Výrobce
Kofein		194,2	195,2	Sigma Aldrich Německo
Theobromin		180,2	181,2	Sigma Aldrich Itálie
Theofylin		180,2	181,2	Sigma Aldrich Čína
Trigonelin		137,2	138,2	Sigma Aldrich Švýcarsko
Kyselina chlorogenová		354,31	355,31	Sigma Aldrich Indie
Kyselina neochlorogenová		354,31	355,31	Sigma Aldrich Německo

Chemikálie

- Acetonitril pro HPLC ≥ 99,9 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Methanol pro HPLC ≥ 99,9 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Ethanol 96 % (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina mravenčí konc. ≥ 99,9 % (Sigma Aldrich, USA)

3.3 Vzorky

Všechny vzorky byly získány ve spolupráci s kavárnou LamCafé v Hradci Králové. Seznam použitých vzorků k analýze je uveden v Tabulce 7.

Tabulka 7: Seznam použitých vzorků káv

Název kávy	Země původu [Označení]	Popis
India Cherry AAA	Indie	Kořeněná chuť s tóny muškátového oříšku, kardamomu a pepře
Chanchamayo	Peru	Vyvážená chuť s příjemnou vanilkovou sladkostí a čokoládovou dochutí
SHG Ocotopeque Las Mataras	Honduras	Chuť tropického ovoce přecházející do kokosu a mandlí.
Cerrado Dulce	Brazílie	Oříšková tóny s čokoládovou vůní
Colombia Supremo 18+	Kolumbie	Ovocná chuť s nádechem citrusových plodů
Altura Superior	Mexiko	Chuť se stopami mléčné čokolády a mandlí
Bali Kintamani	Bali	Sladká chuť s náznakem tmavé čokolády a tabáku
Flores Bajawa	Indonésie -Flores	Zemité chuť s tóny tmavého kakaa
Mandheling Lake Toba	Indie	Chuť s tóny muškátového oříšku, kardamomu a pepře

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A (MF-A) byla připravená z vody upravené přístrojem na úpravu vody a její pH bylo upraveno kyselinou mravenčí na 3,2. Mobilní fázi B (MF-B) tvořil čistý methanol.

3.4.2 Příprava standardů

Zásobní roztoky standardů alkaloidů a antioxidantů o koncentraci 10 mg/ml byly připraveny navážením 0,5 g do 50 ml odměrných baněk a rozpuštěny v methanolu pomocí ultrazvuku po dobu 5 minut. Ze zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky o následujících koncentracích: kofein (5-3000 ug/ml), trigonelin (5-1000 ug/ml), theobromin (1-250 ug/ml), theofilin (1-250 ug/ml), kyselina chlorogenová (10-6000 ug/ml), kyselina neochlorogenová (5-1800 ug/ml). Všechny tyto roztoky byly postupně analyzovány pro všechny kalibrační řady.

3.4.3 Podmínky HPLC analýzy

Pro separaci antioxidantů a alkaloidů byly po optimalizaci použity následující podmínky uvedené v Tabulce 8.

Tabulka 8: Podmínky separace pro antioxidanty a alkaloidy HPLC

Kolona	Gemini 5u C18 (150 x 3,0 mm; 5 µm)
Mobilní fáze A (MF-A)	redestilovaná voda okyselená kys. mravenčí na pH 3,2
Mobilní fáze B (MF-B)	Methanol
Gradientová eluce	0 min - 5 % MF-B 2 min - 5 % MF-B 7 min - 30 % MF-B 21 min - 32,5 % MF-B
Průtok	0,5 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Dávkovaný objem	2 µl
Vlnová délka detektce	280 nm
Podmínky MS pro ESI ionizaci	Nebulizer: 40 PSI Dry gas: 9,0 l/min Dry temp: 350 °C Scan m/z: 100-800 Target Mass m/z: 250 Averages: 10 Compound Stability: 100 % Trap Drive Level: 100 % Polarity: Pozitive

3.4.4 Příprava vzorku

Veškeré vzorky použité k analýze byly připraveny ve spolupráci s kavárnou LamCafé. Celkem bylo praženo 9 druhů zelené kávy. Z každého druhu byly během pražení odebrány dva meziproducty označené jako stupeň pražení 1 a 2 (SP1 a SP2) a hotová upražená káva (SP3). Od každého druhu kávy byly tedy analyzovány celkem 4 vzorky: káva zelená (nepražená), káva ve dvou mezistupních pražení (SP1 a SP2) a káva pražená (SP3). Seznam druhů káv a z nich připravených vzorků pro analýzu je uveden v Tabulce 9. V tabulce je zároveň uvedeno, ve kterých časech a při jakých teplotách byly jednotlivé vzorky odebírány. Všechny připravené vzorky byly uchovány ve speciálních sáčcích na kávu.

Tabulka 9: Seznam a stupně pražení vzorků

DRUH KÁVY	STUPEŇ PRAŽENÍ					
	SP1		SP2		SP3	
	teplota	čas	teplota	čas	teplota	čas
Indie	180 °C	7,5 min	200 °C	10,5 min	215 °C	12,5 min
Peru	180 °C	9,5 min	200 °C	11,0 min	215 °C	13,5 min
Honduras	180 °C	7,5 min	200 °C	10,5 min	215 °C	12,0 min
Brazílie	180 °C	7,5 min	200 °C	10,5 min	215 °C	12,5 min
Kolumbie	180 °C	7,5 min	200 °C	10,5 min	214 °C	12,5 min
Mexiko	180 °C	8,0 min	200 °C	10,0 min	215 °C	12,5 min
Bali	180 °C	8,0 min	200 °C	10,5 min	220 °C	11,5 min
Flores	180 °C	7,5 min	200 °C	10,0 min	220 °C	12,5 min
Toba	180 °C	8,0 min	200 °C	10,5 min	220 °C	12,0 min

Příprava - espresso

Stupně pražení SP1-3 byly namlety na mlýnku De Longhi KG 89 dle doporučeného návodu na přípravu espressa. Z důvodu velké tvrdosti, byla zelená zrna kávy namleta na nožovém mlýnu Grindomix GM 200 po dobu 3 minut tak, aby jemnost odpovídala přípravě kávy espresso. Z každého stupně pražení bylo pomocí kávovaru De Longhi EC 680 připraveno espresso (7 g kávy/40 ml). Takto připravený vzorek byl přefiltrován přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

Příprava – zalévané kávy

Stupně pražení SP1-3 byly namlety na mlýnku De Longhi KG 89 dle doporučeného návodu na přípravu zalévané kávy. Z důvodu velké tvrdosti byla zelená zrna kávy namleta na nožovém mlýnu Grindomix GM 200 po dobu cca 2 minut tak, aby jemnost odpovídala přípravě zalévané kávy. Z každého stupně pražení bylo naváženo 7 g kávy a zalito 50 ml vody o teplotě 98°C. Takto připravený vzorek byl louhován po dobu 10 minut a poté byl přefiltrován přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

3.4.5 Experimentální zpracování dat

Naměřené hodnoty všech analýz byly vyhodnoceny v programu OpenLab ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a dále graficky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2016. Optimalizace podmínek pro HPLC analýzu byla provedena pomocí DryLAB 4 (Molnár-Institute, Berlín, Německo) a statistická analýza naměřených dat v programu QC Expert 2.5 (TriloByte Statistical Software, Pardubice). Textová část diplomové práce byla zpracována v textovém editoru Microsoft Word 2016.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pražení kávových zrn je jedním z klíčových procesů ovlivňující kvalitu kávy. Během pražení dochází ke vzniku i zániku mnoha látek, které ovlivňují organoleptické vlastnosti kávy. V této práci bylo sledováno, jaký vliv mají stupně pražení na obsah významných alkaloidů a antioxidantů v nálevech kávy. Účelem bylo přiblížit běžným konzumentům kávy, co a v jakém množství obsahuje jejich hrneček kávy. Proto byly veškeré výsledky vztaženy na jeden šálek (40 ml), tedy jedno espresso. V první části experimentu bylo zjišťováno, jaký vliv má hrubost mletí na kávu připravenou pomocí kávovaru, moka konvice a kávu zalévanou. V druhé části byl zjišťován obsah alkaloidů a antioxidantů v zelené kávě a různých stupních pražení u devíti druhů káv pocházející z celého světa. K analýze byly vybrány nejvíce diskutované látky, které byly v kávě prokázány. Jednalo se o alkaloidy: kofein, theobromin, trigonelin, theofylin a dvě fenolické kyseliny: kyselinu chlorogenovou a neochlorogenovou.

4.1 Optimalizace podmínek separace HPLC

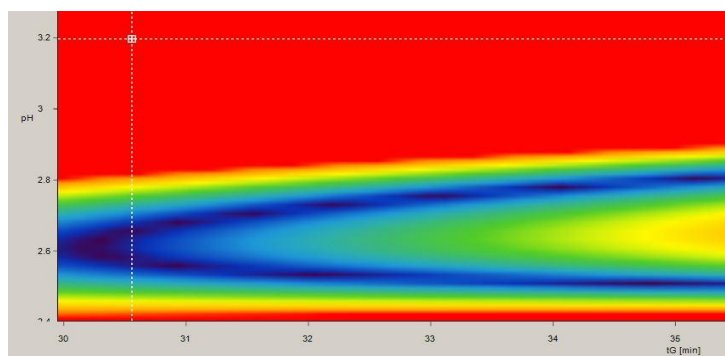
Na základě prostudovaných odborných publikací byla pro separaci alkaloidů a fenolických kyselin v kávě zvolena technika RP-HPLC s gradientovou elucí a s UV/VIS detekcí. Pro určení vhodné vlnové délky, byly nejdříve zjištěny absorpční maxima sledovaných látek alkaloidů (272-274 nm) a fenolických kyselin (331 nm). Aby bylo možné sledované látky stanovit společně byla vybrána jako nejvhodnější vlnová délka 280 nm.

Ke zjištění ideálních podmínek separace alkaloidů a fenolických kyselin byl použit program DryLab. Optimalizační a vývojový software DryLab používá reálná data k přesné simulaci tisíce experimentů, a tím z efektivní celý proces optimalizace až o 50 % času oproti samotným experimentům v laboratoři. Tento software je schopen snadno a rychle určit přesně to, jak se separace chová a bude chovat, když současně budeme měnit více parametrů, jako jsou např. pH, teplota nebo průběh gradientu.

K experimentu bylo provedeno 6 analýz. Směs standardů byla proměřena při různých kombinacích pH mobilní fáze A (2,5; 3,0; 3,5) a časech gradientu (30 a 40 minut). Pro analýzu byl nastaven lineární gradient s počáteční koncentrací 1 % methanolu a s konečnou koncentrací 60 % methanolu. Z výsledných hodnot byla vytvořena 2D mapa (Obrázek 16). Na této 2D mapě

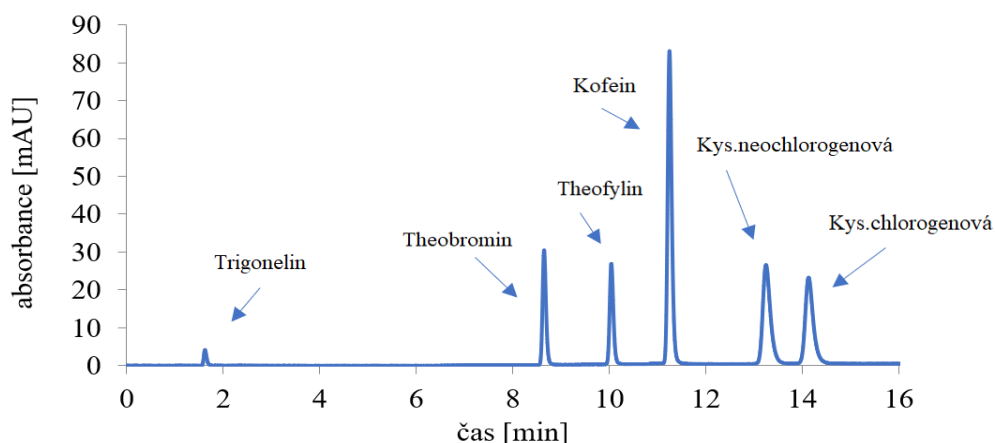
bylo možné měnit parametry (pH, čas) a tím simulovat, při jaké kombinaci parametrů budou látky nejlépe separovány.

Červená barva na této mapě znamená, že všechny látky standardní směsi mají rozlišení kritických párů látek, $R_{1,2}$, nad 1,5. Všechny látky jsou tedy dobře oddělené a podmínky separace jsou brány jako ideální pro analýzu. Jako nejvhodnější pH bylo zvoleno 3,2. Na 2D mapě můžeme vidět, že červené pole začíná u hodnoty pH 2,9. Nicméně při pH 3,2 bylo zaručeno větší rozlišení látek a tudíž i při menší změně podmínek separace zůstane rozlišení kritických párů nad 1,5 zachováno.



Obrázek 16: 2D mapa rozlišení čas gradientu vs. pH MF-A

Dále bylo vyzkoušeno několik gradientů s rozdílným obsahem methanolu, z nichž byl vybrán jako ideální gradient: 0 min - 5 % MeOH; 2 min - 5 % MeOH; 7 min - 30 % MeOH; 21 min - 32,5 % MeOH. V tomto gradientu byly všechny látky dobře separovány během 15 minut. Chromatogram standardů s vybraným gradientem je znázorněn na Obrázku 17 a retenční časy jsou uvedeny v Tabulce 10.



Obrázek 17: Separace směsi standardů s použitím optimalizované metody, Gradient: 0 min - 5 % MeOH; 2 min - 5 % MeOH; 7 min - 30 % MeOH; 21 min - 32,5 % MeOH

Tabulka 10: Retenční časy separovaných látek

Látka	Retenční čas [min]
Trigonelin	1,6
Theobromin	8,6
Theofylin	10,0
Kofein	11,2
Kys.neochlorogenová	13,2
Kys.chlorogenová	14,1

Pro stanovení alkaloidů a antioxidantů ve vzorcích kávy byla použita technika HPLC-UV/VIS. Přítomnost látek byla ověřena porovnáním retenčních časů látek ve vzorku s retenčními časy standardů. Přítomnost látek byla ověřena pomocí techniky HPLC-MS s ionizací elektrosprejem. Měření probíhalo v módu pozitiv, tudíž byla hledaná hmota m/z vždy o jednotku vyšší oproti molekulové hmotnosti. Molekulové hmotnosti standardů a sledované molekulové ionty $[M+H]^+$ jsou uvedeny v Tabulce 6. Na Obrázku P1 v příloze je uveden chromatogram standardů a na Obrázku P2 v příloze je uveden chromatogram pro vzorek Kolumbie ve 2. stupni pražení připravený v kávovaru.

Kalibrační závislost standardů

Kvantifikace látek ve vzorcích káv byla provedena metodou kalibrační křivky. Grafy kalibračních závislostí byly sestrojeny vynesáním závislosti ploch píků na koncentraci. Každý bod byl třikrát proměřen. Grafy kalibračních závislostí standardů jsou uvedeny v příloze na Obrázcích P3-8. Diagnostika regrese a významnost regresních parametrů byla ověřena Studentovým t-testem v programu QC expert 2.5. Dále byla testována významnost absolutního členu na hranici pravděpodobnosti $p = 0,05$. U všech standardů tento úsek vyšel jako nevýznamný ($p > 0,05$), proto nebyl při výpočtech brán v úvahu. Ve všech případech bylo dosaženo odpovídající linearitě, což dokazují i korelační faktory, pohybující se v rozmezí od 0,9979 do 0,9997. Rovnice regrese, významnost úseku ($P_{\text{úseku}}$) a korelační faktory jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 11: Rovnice regrese jednotlivých standardů

Látka	Rovnice regrese	P _{úseku}	R ²
Trigonelin	$y = 0,65 \pm 0,040x$	0,151	0,9995
Theobromin	$y = 5,71 \pm 0,051x$	0,830	0,9982
Theofylin	$y = 5,19 \pm 0,064x$	0,390	0,9979
Kofein	$y = 4,83 \pm 0,020x$	0,830	0,9997
Kys. Chlorogenová	$y = 2,67 \pm 0,017x$	0,054	0,9989
Kys. neochlorogenová	$y = 2,67 \pm 0,011x$	0,470	0,9997

Mez detekce a stanovitelnosti

Experimentálně byly stanoveny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Z chromatogramů byla odečtena výška šumu základní linie. Dále byly provedeny analýzy postupným ředěním standardních látek až po nejnižší detekovatelné odezvy. Z chromatogramů byly sestrojeny kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci, do kterých byly dosazeny výšky šumu základní linie, tedy její trojnásobek pro mez detekce a desetinásobek pro mez stanovitelnosti. Hodnoty meze detekce a stanovitelnosti jsou uvedeny v Tabulce 12. Hodnoty meze detekce se pro všechny standardy pohybovaly v rozmezí 0,033 – 0,302 ug/ml. Nejnižší mez detekce a stanovitelnosti měl theobromin, zatímco nejvyšší mez detekce a stanovitelnosti měla kyselina chlorogenová.

Tabulka 12: Mez detekce a mez stanovitelnosti sledovaných látek

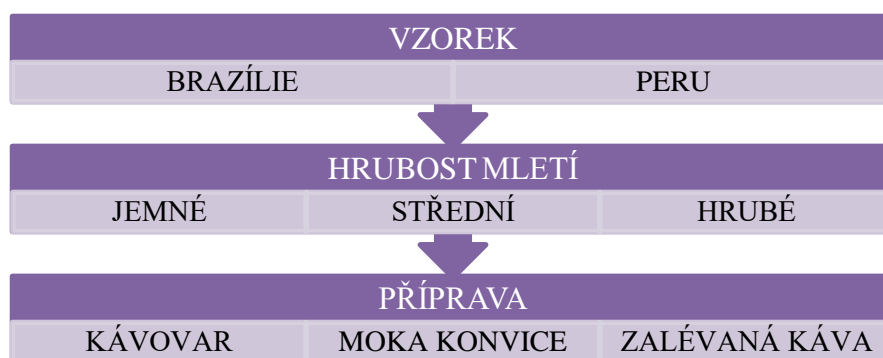
Látka	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
Trigonelin	0,193	0,646
Theobromin	0,033	0,109
Theofylin	0,067	0,225
Kofein	0,051	0,170
Kys. chlorogenová	0,302	1,005
Kys. neochlorogenová	0,244	0,813

4.2 Optimalizace podmínek pro přípravu vzorků

Hrubost mletí a následná extrakce namletých kávových zrn má přímý vliv na chuťový profil kávy. Při přípravě vzorku bylo nejdříve testováno, jak hrubost mletí ovlivňuje koncentraci látek při různých přípravách kávy. Pro přípravu kávy byl zvolen kávovar (espresso), moka konvice a káva zalévána. K mletí byl použit profesionální mlýnek na mletí kávy Mahlkönig VTA 6S3, a také komerčně dostupný mlýnek De Longhi KG 89. Vliv hrubosti mletí byl sledován na základních látkách vyskytujících se v kávě, a to na kofeinu, jako představiteli alkaloidů, a kyselině chlorogenové, jako představiteli fenolických kyselin. Výsledky jsou vztaženy na objem jednoho šálku (40 ml), tedy na velikost jednoho espressa.

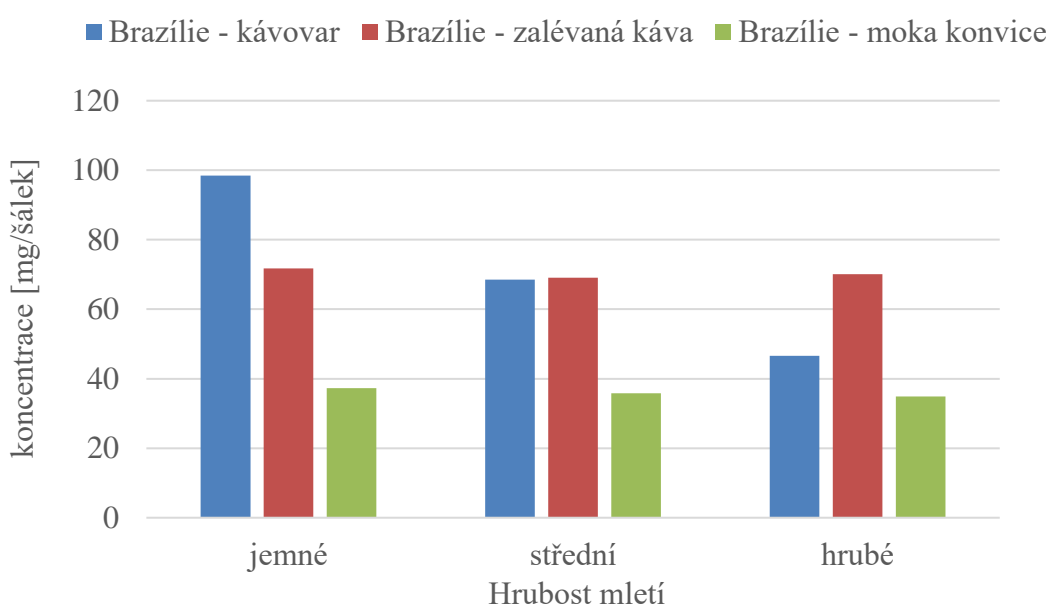
Hrubost mletí

Pro mletí byly vybrány dva druhy kávy, a to káva z Brazílie a Peru. Oba vzorky byly praženy na pražičce Elektríc coffee roaster TJ-067. Vzorek Brazílie byl pražen 13,5 min až na 215 °C a vzorek Peru byl pražen 12,5 min také na 215 °C. Poté byly oba vzorky namlety pomocí profesionálního mlýnku Mahlkönig VTA 6S3 na 3 stupně mletí: jemné, střední a hrubé. Z těchto 3 stupňů mletí bylo připraveno espresso za pomoci kávovaru od firmy De Longhi (7 g kávy/40 ml vody), káva zalévána (7 g/50 ml vody) a káva v moka konvici (7 g/100 ml vody). Po vychladnutí (cca 10 minut) byly vzorky přefiltrovány a nadávkovány do HPLC a analyzovány. Pro lepší orientaci ve zpracování vzorků je uvedeno schéma na Obrázku 18.



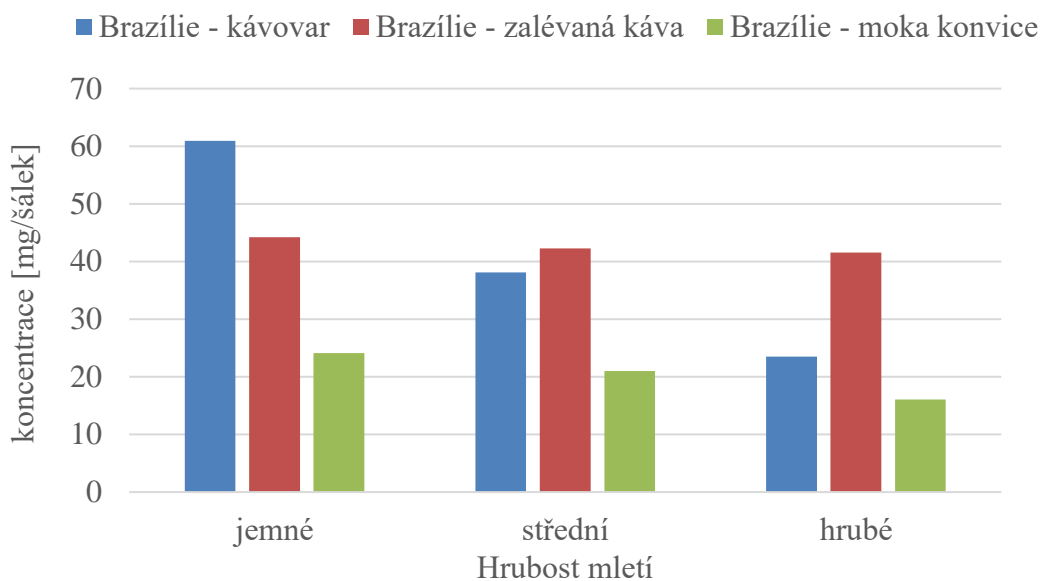
Obrázek 18: Schéma zpracování vzorků pro zkoušku hrubosti mletí

Na Obrázku 19 je graficky znázorněno, jak se koncentrace kofeinu měnila s různou hrubostí mletí kávy ve zvolené přípravě. V přípravě kávy pomocí kávovaru bylo zjištěno, že hrubost mletí má významný vliv na koncentraci kofeinu. Jemně namletá káva obsahovala dvojnásobné koncentrace kofeinu oproti hrubému mletí. V přípravě kávy v moka konvici a kávy zalévané bylo zjištěno, že tyto způsoby přípravy neměly na hrubost mletí významný vliv. Koncentrace kofeinu ve všech stupních mletí vykazovaly skoro stejné hodnoty. U vzorku Peru (Obrázek P9 v příloze) je vidět, že v přípravě pomocí kávovaru byly koncentrace kofeinu trojnásobně vyšší než u kávy hrubě namleté. Hrubost mletí neměla vliv na přípravu kávy v moka konvici a kávy zalévané.



Obrázek 19: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kofeinu u vybraných příprav kávy ve vzorku Brazílie

Porovnání koncentrace kyseliny chlorogenové u vybraných příprav kávy s různou hrubostí mletí je zobrazeno na Obrázku 20. U přípravy pomocí kávovaru bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny chlorogenové u jemného mletí byla cca 2,5x vyšší než u kávy hrubě namleté. Příprava kávy zalévané a v moka konvici neměla žádný vliv na hrubost mletí. U vzorku kávy Peru (Obrázek P10 v příloze) byla koncentrace kyseliny chlorogenové u jemně mleté kávy dvojnásobně vyšší než u kávy hrubě namleté. Příprava v moka konvici a kávy zalévané také neměla významný vliv na hrubost mletí.



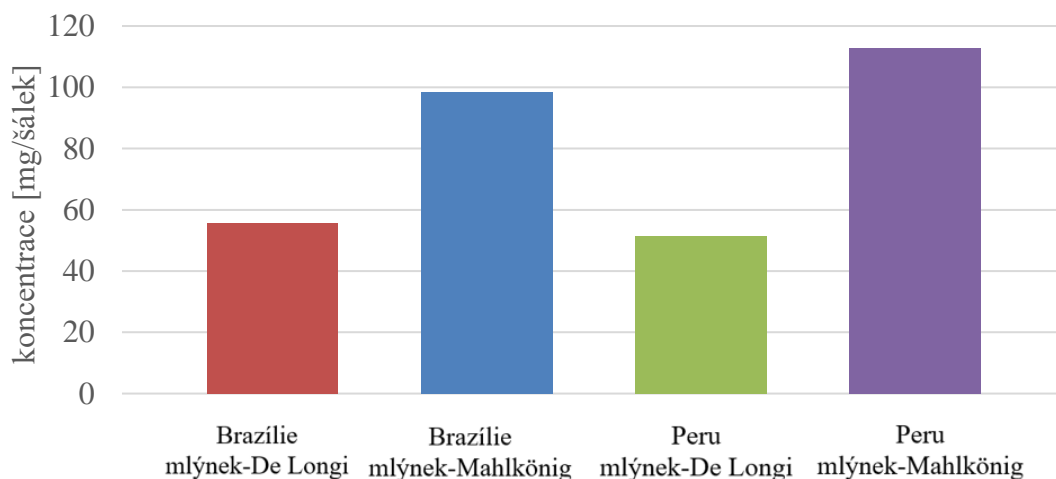
Obrázek 20: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kyseliny chlorogenové u vybraných příprav kávy ve vzorku Brazílie

Po porovnání, jak ovlivňuje hrubost mletí přípravu kávy, bylo zjištěno, že největší rozdíly byly u kávy připravené pomocí kávovaru (espresso). Pro následně zkoumaných 9 druhů kávy byla tedy vybrána příprava pomocí kávovaru s jemným mletím (doporučení od výrobce mlýnku použít na espresso jemné mletí), kde koncentrace kofeinu a kyseliny chlorogenové byly nejvyšší. Pro kávu zalévanou byla zvolena střední hrubost mletí, jelikož hrubost mletí neovlivňovala obsah sledovaných látek.

Při následném studiu průběhu pražení nebyl profesionální mlýnek bohužel k dispozici a musel být použit běžně komerčně dostupný automatický mlýnek od firmy De Longhi (De Longhi KG 89) na domácí použití. Proto byla následně provedena zkouška, zdali se liší jemné mletí na přípravu espressa mezi profesionálním a běžně dostupným mlýnkem.

Na zkoušku rozdílu mezi mlýnky byly použity dva druhy kávy, káva z Brazílie a Peru (použitý stejný stupeň pražení jako v předchozí zkoušce). Oba vzorky byly namlety na jemné mletí a připraveny pomocí kávovaru (7 g/ 40 ml vody). Již z mleté kávy bylo patrné, že na domácím mlýnku nelze dosáhnout tak jemně umleté kávy jako na mlýnku profesionálním. Na Obrázku 21 je patrné, že pomocí profesionálního mlýnku Mahlkönig byly koncentrace kofeinu dvojnásobně vyšší než u mletí na běžně dostupném mlýnku od firmy De Longhi a to u obou vzorků. Koncentrace kofeinu u kávy připravené na profesionálním mlýnku byla cca 2x větší

než při použití domácího mlýnku. Můžeme tedy konstatovat, že použití profesionálních či běžných mlýnků a jejich nastavení hrubosti mletí na přípravu espressa má značný vliv na obsah látek v kávě.



Obrázek 21: Porovnání koncentrace kofeinu ve vzorku Brazílie na mlýnku Mahlkonig a De Longhi v přípravě espressa

4.3 Stanovení alkaloidů a fenolických kyselin pomocí HPLC

Pro stanovení alkaloidů a fenolických kyselin v kávách byla použita metoda HPLC – UV/VIS. K analýze bylo použito celkem 9 druhů káv z celého světa. Z každého druhu kávy byly připraveny 4 vzorky: káva zelená (nepražená), káva ve dvou mezistupních pražení (SP1 a SP2) a káva pražená (SP3). Veškeré vzorky byly namlety podle zvolené přípravy kávy. Jemné mletí bylo zvoleno pro přípravu v kávovaru a střední mletí pro přípravu kávy zalévané.

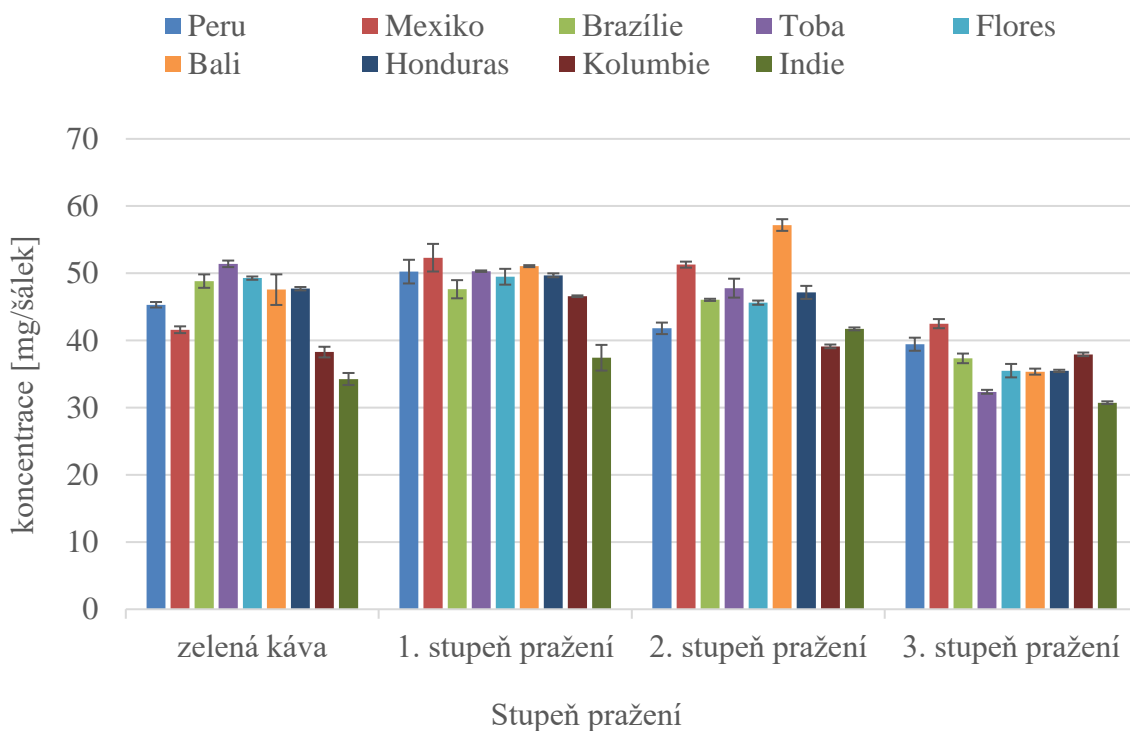
Přítomnost alkaloidů a fenolických kyselin ve vzorcích kávy byla ověřena pomocí retenčních časů standardů, také byla použita metoda HPLC-UV-MS pro ověření nalezených hmotnostních spekter vzorků a standardů. Ukázkové chromatogramy vzorku Brazílie ve všech stupních pražení a zelené kávy připravené pomocí kávovaru jsou uvedeny na Obrázcích P11-14 v příloze. Veškeré výsledky jsou přepočítány na hodnoty v mg na jeden šálek kávy (40 ml) tedy na velikost jednoho espressa. Z důvodů přiblížení běžným konzumentům, co obsahuje jeden šálek kávy.

Všechny vzorky byly třikrát změřeny, zpracovány do grafů se směrodatnými odchylkami a seřazeny podle jednotlivých látek stanovovaných ve vzorcích káv. Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách P1-12 v příloze.

4.3.1 Trigonelin

Obsah trigonelinu ve všech stupních pražení a zelené kávy připravené zálivem je graficky zpracován na Obrázku 22. V kávě připravené tímto způsobem se obsah trigonelinu pohyboval v rozmezí 34,26-51,40 mg/40 ml v zelené kávě a v rozmezí 30,74-42,50 mg/40 ml v pražené kávě (SP3).

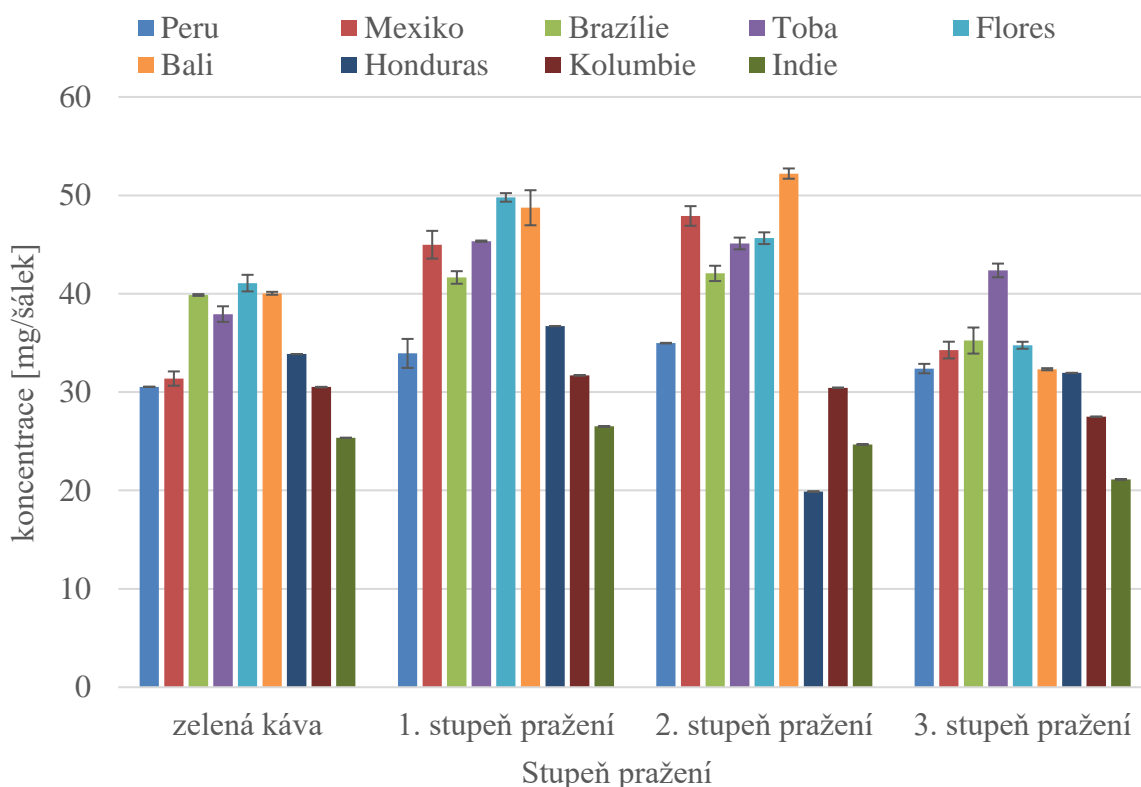
Nejnižší koncentrace v zelené kávě a v 1. stupni pražení byly nalezeny u vzorku Indie. Nevyšší u vzorku Toba pro zelenou kávu a ve vzorku Mexiko pro 1. stupeň pražení. Ve 2. a 3. stupni pražení byly nejnižší koncentrace trigonelinu ve vzorku Kolumbie a Indie a nejvyšší u vzorku Bali a Mexiko. Z Obrázku 22 je patrné, že při pražení dochází k mírnému nárůstu koncentrace trigonelinu v 1. stupni pražení. Ve 2. a 3. stupni dochází k jeho přeměně na kyselinu nikotinovou, methylpyridiny, pyrroly a další produkty³⁵. Výjimkou jsou vzorky Bali a Indie, u kterých ještě ve 2. stupni dochází k nárůstu koncentrace trigonelinu.



Obrázek 22: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích zalévané kávy, n=3

Na Obrázku 23 jsou zobrazeny koncentrace trigonelinu ve všech stupních pražení a zelené kávy připravené pomocí kávovaru. Nejnižší koncentrace v zelené kávě a 1. stupni pražení byly zaznamenány u vzorku Indie a nejvyšší u vzorku Flores. Ve 2. a 3. stupni byly nejnižší koncentrace nalezeny ve vzorku Honduras a Indie a nejvyšší u vzorku Bali a Toba. Stejně jako u kávy připravené zálivem zde můžeme pozorovat nárůst trigonelinu u 1. stupně pražení. Ve 2. a 3. stupni dochází k jeho degradaci. Ve vzorku Bali a Mexiko je vidět mírný nárůst obsahu ještě u 2. stupně pražení.

Při porovnání příprav kávy bylo zjištěno, že ve vzorcích připravených pomocí zálivu bylo přibližně o 10-15 mg/40 ml více trigonelinu než u kávy připravené pomocí kávovaru. Literatura udává, že v zelené kávě se koncentrace trigonelinu pohybuje v rozmezí 63,04-72,09 mg/40 ml a v pražené kávě v rozmezí 19,58-66,89 mg/40 ml kávy připravené zálivem⁸⁶. V další studované literatuře bylo uvedeno, že průměrný obsah trigonelinu v pražené kávě byl 143,06 mg /40 ml kávy připravené zálivem⁷⁵. Získané výsledky analyzovaných vzorků zelené a pražené kávy byly porovnány s odbornou literaturou a ve větší míře vykazují shodu.

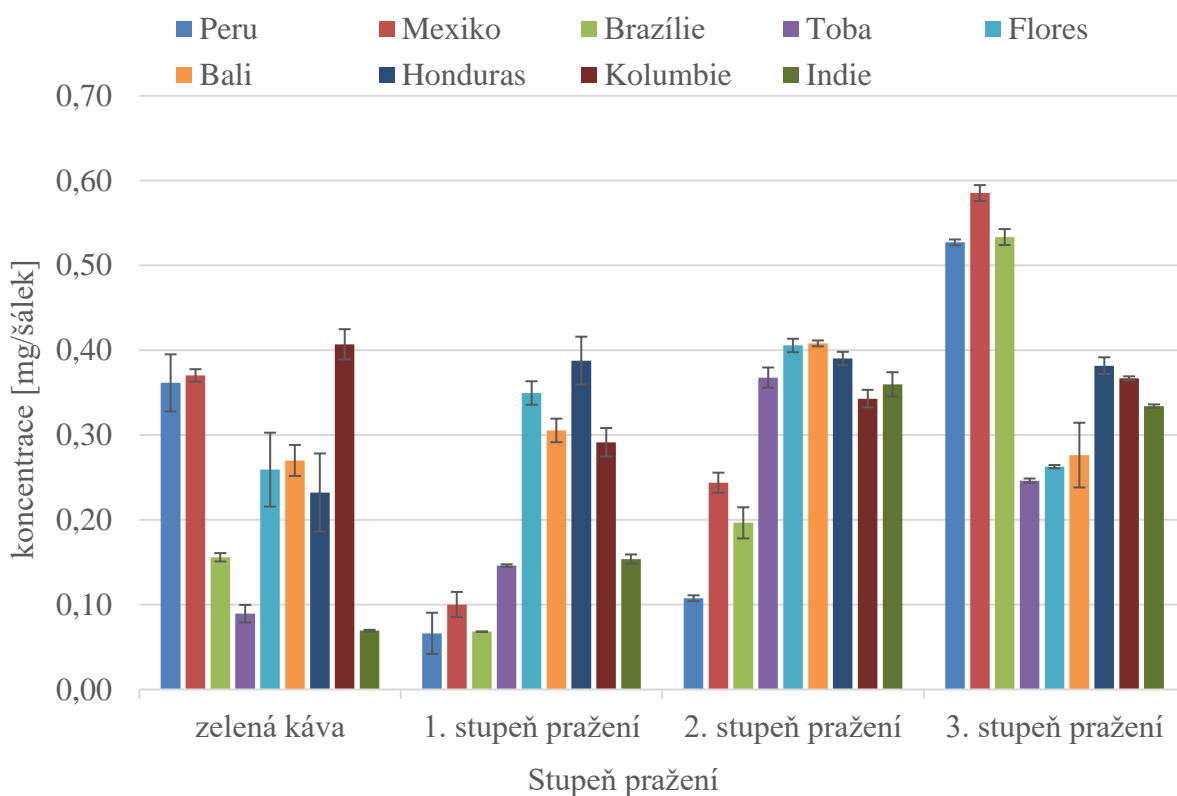


Obrázek 23: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3

4.3.2 Theobromin

Theobromin se v kávě nachází v nízkých koncentracích. V kávě připravené zálivem se koncentrace theobrominu pohybovaly v rozmezí 0,07-0,41 mg/40 ml pro zelenou kávu a pro praženou kávu (SP3) od 0,25 do 0,59 mg/ 40 ml. Hodnoty obsahu theobrominu v kávě zalévané jsou graficky zpracovány na Obrázku 24. Z obrázku je patrné, že obsah theobrominu je nestálý u všech stupňů pražení. U vzorků káv Peru, Mexiko, Kolumbie a Brazílie v 1. stupni pražení, koncentrace klesala. U vzorku Peru a Mexiko to byly 4x nižší koncentrace než v zelené kávě. Následně ve 2. a 3. stupni pražení koncentrace stoupala, u vzorku Brazílie byla koncentrace 3x vyšší než v zelené kávě.

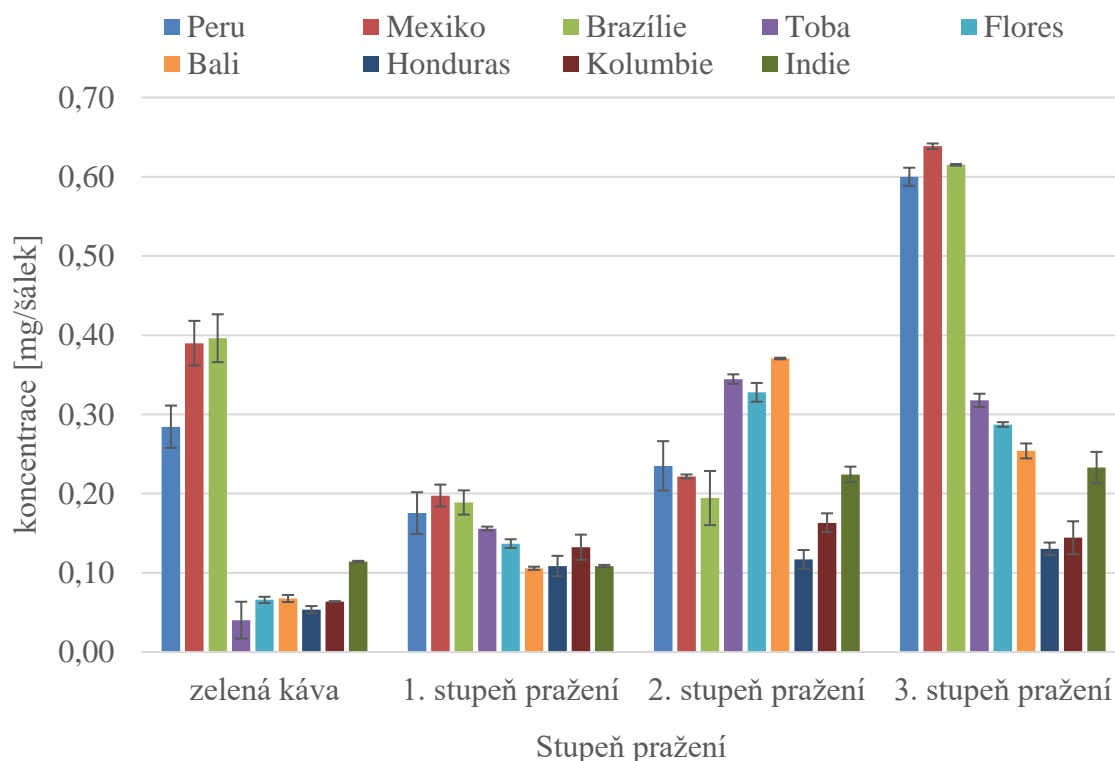
Vzorky Flores, Bali, Indie, Toba a Honduras vykazovaly v 1. a 2. stupni pražení vyšší koncentrace než v zelené kávě a ve 3. stupni docházelo k poklesu koncentrace theobrominu.



Obrázek 24: Koncentrace theobrominu ve vzorcích zalévané kávy, n=3

Obrázek 25 znázorňuje změnu koncentrace theobrominu v kávě připravené pomocí kávovaru. U některých vzorků se koncentrace v 1. stupni pražení snižovala (Peru, Mexiko, Brazílie, Indie). Nejvýznamnější pokles byl zaznamenán u vzorku Brazílie, kde koncentrace klesla o polovinu oproti zelené kávě. Ve 2. a 3. stupni koncentrace stoupla, a to nejvíce u vzorku Peru a Indie, kde byly dvojnásobné koncentrace oproti zelené kávě. Ve vzorcích Toba, Bali, Flores a Kolumbie v 1. stupni pražení koncentrace theobrominu stoupla. U vzorku Flores a Kolumbie byly zjištěny dvojnásobné koncentrace než v zelené kávě. Vzorek Toba měl po upražení 4x vyšší koncentraci theobrominu než zelená káva. Ve 2. stupni pražení opět koncentrace stoupla, a to nejvýznamněji u vzorku Flores a Toba, který vykazoval 2x vyšší koncentrace oproti 1. stupni pražení. Ve 3. stupni pražení došlo u těchto vzorků k poklesu koncentrace.

Obsah theobrominu byl v analyzovaných vzorcích kávy nestálý a v každém stupni pražení vykazoval proměnlivé koncentrace, nicméně lze říci, že koncentrace byla vyšší po skončení pražení než u zelené kávy. Literatura udává průměrný obsah theobrominu v množství 0,87 mg/ 40 ml⁷⁵ nebo 0,68 mg/40 ml⁸³. Při porovnání výsledků bylo zjištěno, že analyzované vzorky vykazují nižší koncentrace theobrominu, než uvádí odborná literatura.

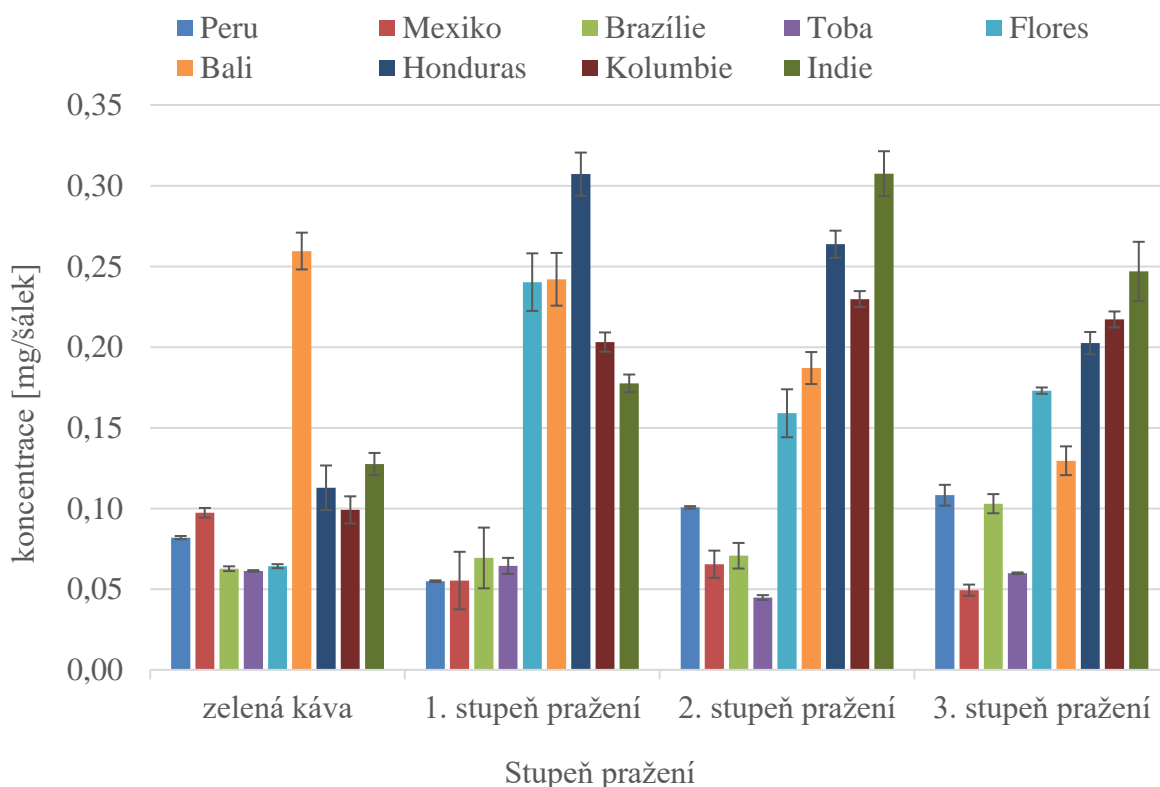


Obrázek 25: Koncentrace theobrominu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3

4.3.3 Theofylin

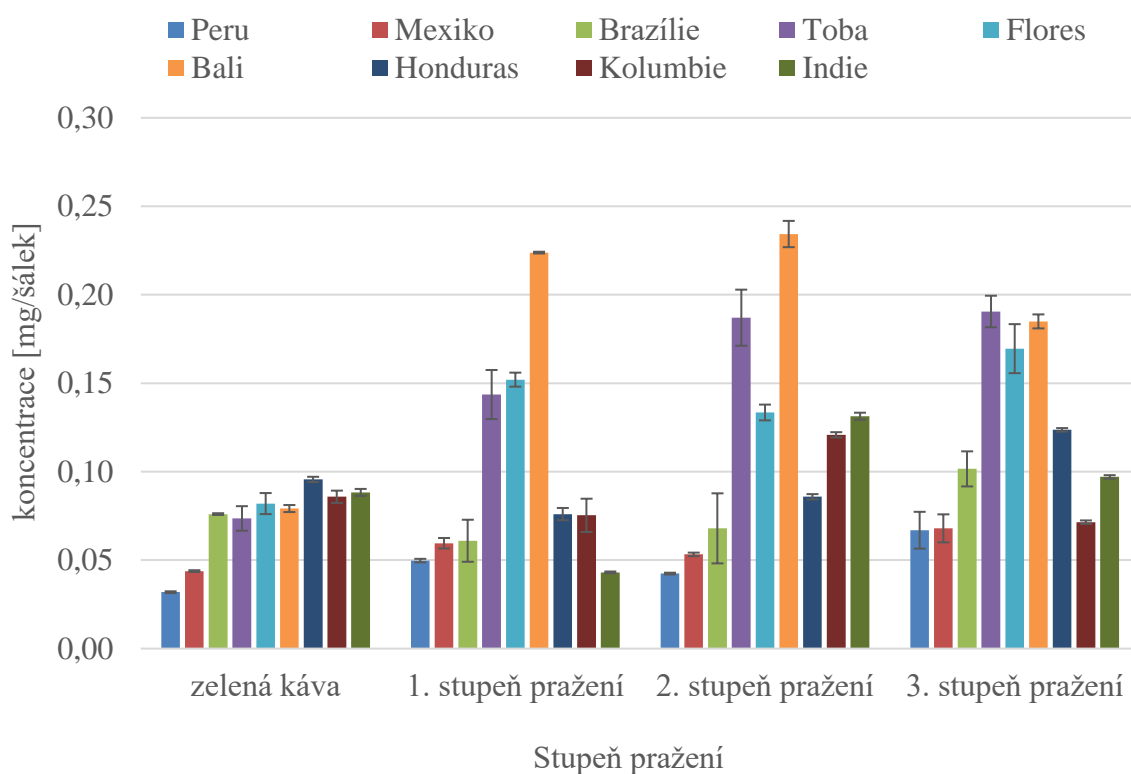
Ve vzorcích kávy připravené pomocí zálivu se koncentrace theofylinu pohybovaly v rozmezí 0,06-0,26 mg/40 ml v zelené kávě a 0,05-0,25 mg/40 ml v pražené kávě (SP3). Na Obrázku 26 je graficky znázorněn, vývoj koncentrace theofylinu v zelené kávě a ve všech stupních pražení.

Podobně jako u theobrominu se koncentrace theofylinu v různých stupních pražení pohybovala v různých koncentracích. Nejvýznamnější rozdíly v koncentracích zelené kávy a pražené kávy byly zjištěny u vzorků Flores, Kolumbie a Indie, kde koncentrace theofylinu byla více jak dvojnásobně vyšší v pražené kávě (SP3) oproti zelené kávě. Naopak vzorek Bali a Mexiko měl ve 3. stupni pražení poloviční koncentraci theofylinu než zelená káva. Ve vzorku Honduras bylo zjištěno, že při pražení na 1. stupeň byla koncentrace 2,5x vyšší než u zelené kávy. U vzorků Peru, Brazílie a Toba bylo pozorováno, že různé stupně pražení neměly velký vliv na koncentrace theofylinu.



Obrázek 26: Koncentrace theofylinu ve vzorcích zalévané kávy, n=3

Na Obrázku 27 jsou znázorněny koncentrace theofylinu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru. Největší rozdíl můžeme vidět u vzorků Toba, Flores a Bali. Vzorek Bali měl v 1. a 2. stupni pražení skoro 3x vyšší koncentraci než zelená káva. Také u vzorků Toba a Flores byly zaznamenány vyšší koncentrace než v zelené kávě. Literatura udává obsah theofylinu v rozmezí 0,259-0,714 mg/40 ml⁷⁵. V analyzovaných vzorcích se koncentrace theofylinu pohybovala na spodní hranici množství udávané v odborné literatuře.

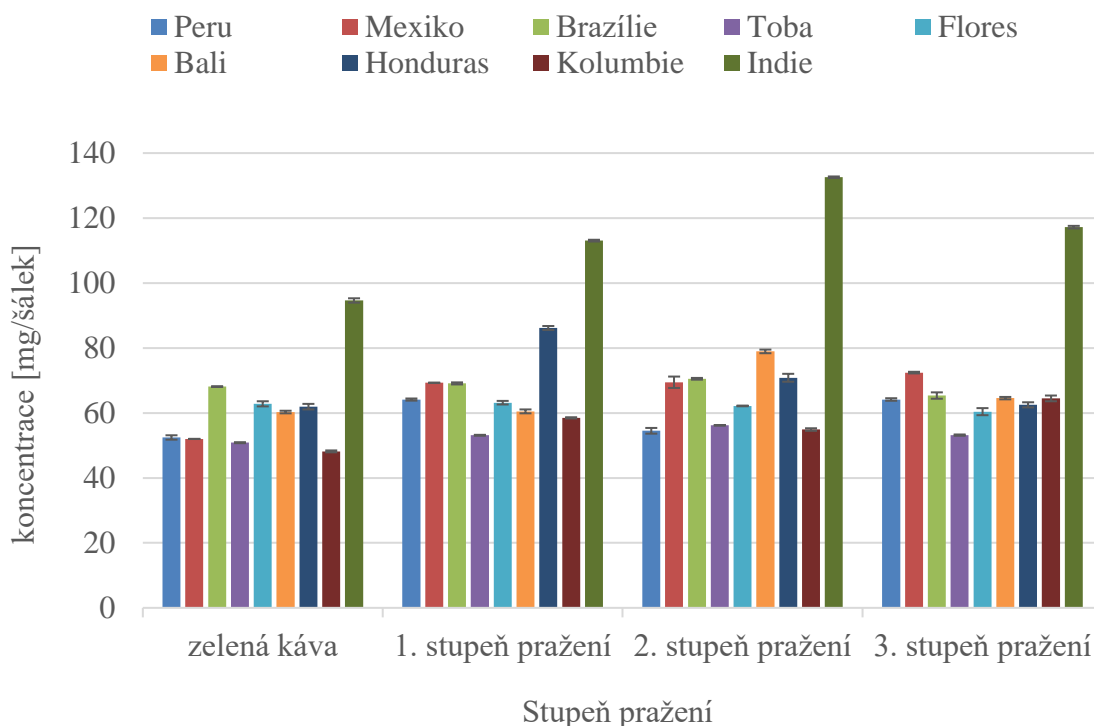


Obrázek 27: Koncentrace theofylinu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3

4.3.4 Kofein

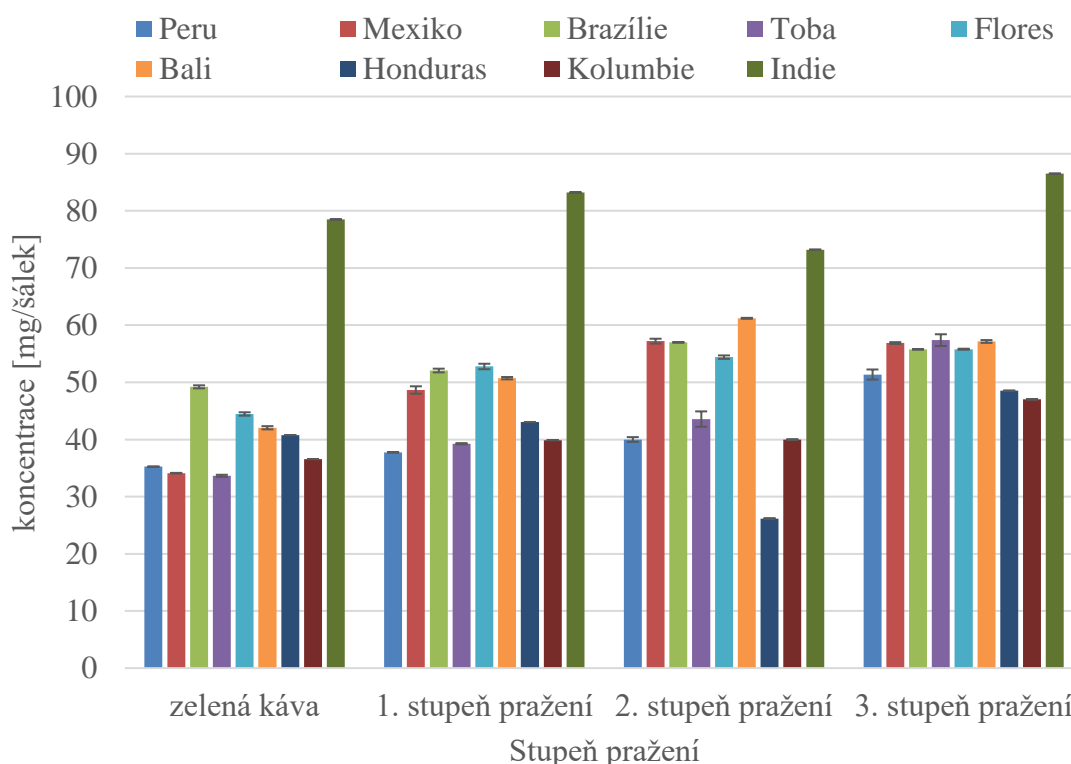
Kofein řadíme mezi nejvýznamnější purinový alkaloid obsažený v kávě. Obsah kofeinu ve vzorcích kávy připravené zálivem je graficky zpracován na Obrázku 28 a ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru na Obrázku 29. U kávy připravené zálivem se koncentrace kofeinu pohybovala v zelené kávě v rozmezí 48,17-94,64 mg/40 ml a v pražené kávě 53,18-117,21 mg/40 ml. Nejvíce kofeinu obsahoval vzorek Indie, který měl přibližně o 40 % více kofeinu než zbytek analyzovaných vzorků.

U všech vzorků byl zjištěn mírný nárůst koncentrace kofeinu v 1. stupni pražení. Nejvyšší nárůst byl pozorován u vzorků Honduras a Indie. V dalším stupni pražení byl u vzorku Peru, Honduras a Kolumbie mírný pokles obsahu kofeinu, naopak u vzorku Brazílie, Toba, Bali a Indie se koncentrace kofeinu ještě zvýšila. V posledním stupni pražení byl pozorován nárůst obsahu kofeinu ve třech vzorcích (Peru, Mexiko a Kolumbie) oproti předchozímu stupni. U ostatních vzorků naopak koncentrace poklesla. Bylo tedy prokázáno, že během pražení dochází pouze k mírným změnám obsahu kofeinu.



Obrázek 28: Koncentrace kofeinu ve vzorcích kávy připravené kávou zalévanou, n=3

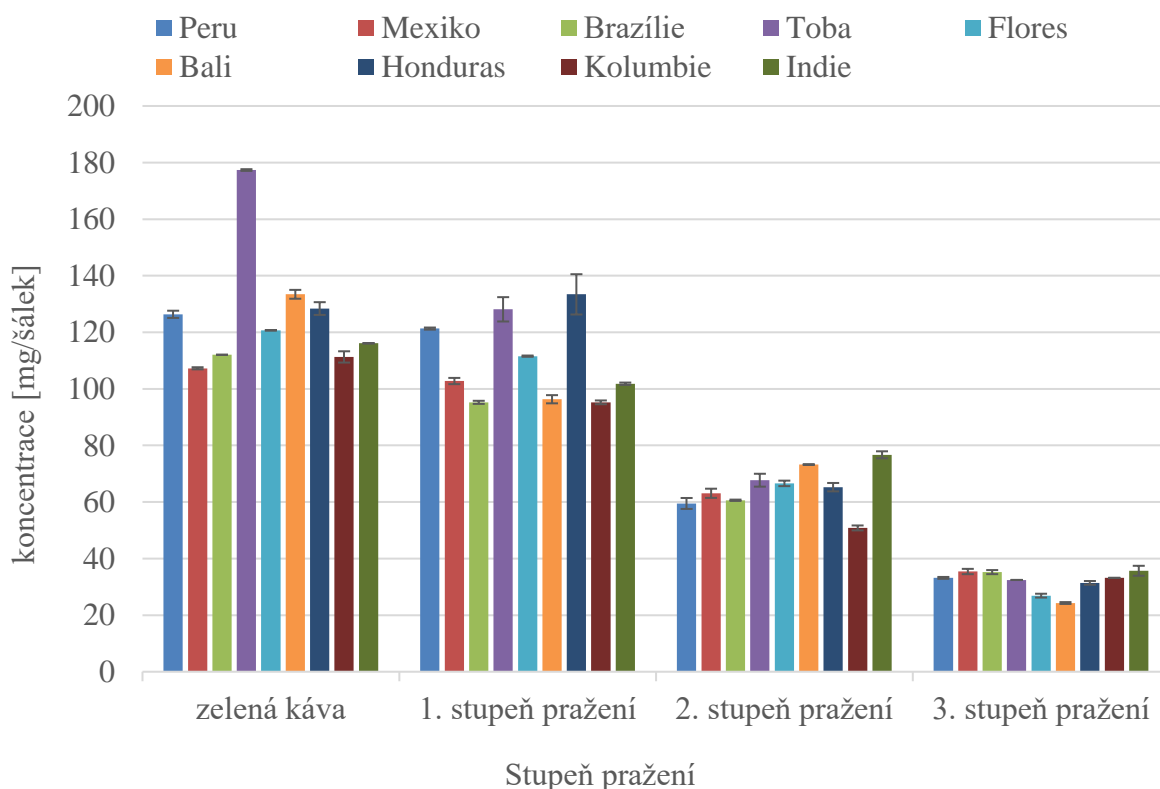
Při porovnání přípravy pomocí kávovaru na Obrázku 29 můžeme vidět, že obsah kofeinu byl u většiny káv skoro o 1/3 nižší než u zalévané kávy (Obrázek 28). Obsah kofeinu v upražené kávě (SP3) byl vyšší než v zelené kávě u všech vzorků. Z odborné literatury bylo zjištěno, že obsah kofeinu se pohybuje v rozmezí 64,33-119,091mg/40 ml zelené kávy a pražené kávy 59,031-101,92 mg /40 ml⁸⁶. V další studii bylo prokázáno, že obsah v pražených kávách je v průměru 319,56 mg/40 ml⁷⁵ nebo také v množství 93,0-163,3 mg/40 ml⁵⁰. Naše výsledky odpovídají těmto studiím.



Obrázek 29: Koncentrace kofeinu ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3

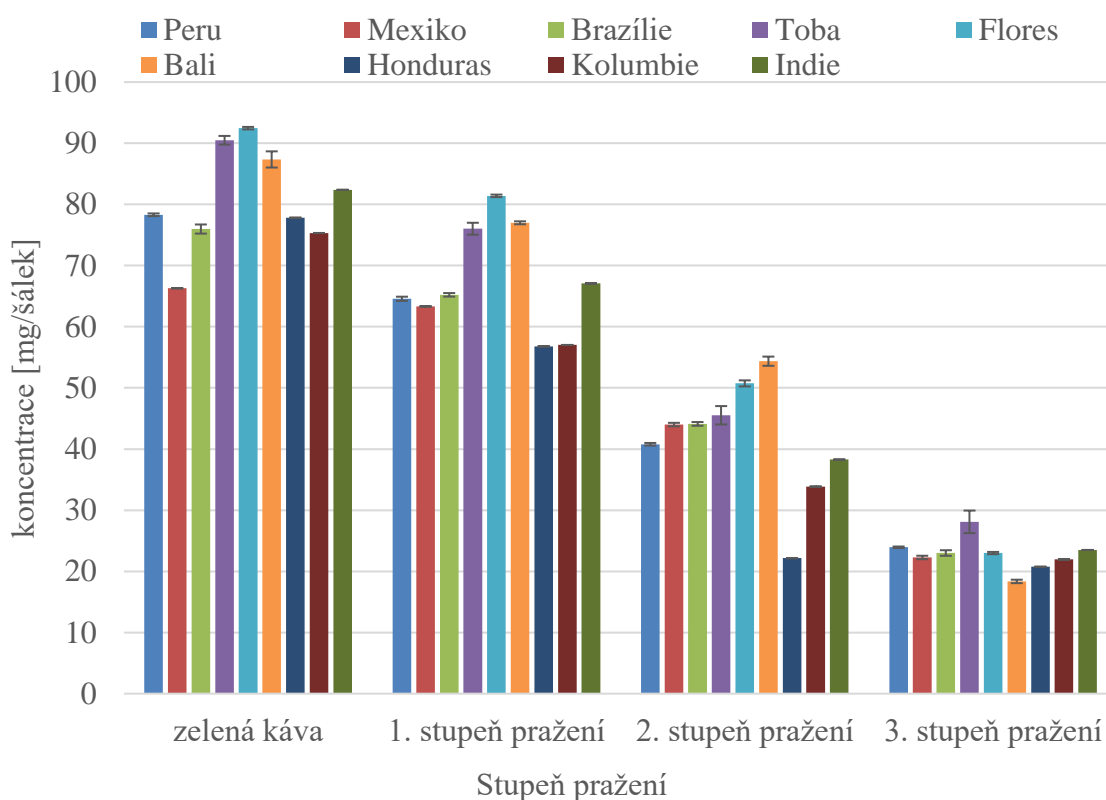
4.3.5 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová patří mezi nejvýznamnější chlorogenové kyseliny obsažené v kávě. Na Obrázku 30 je graficky zpracováno, jaký vliv měly stupně pražení na obsah této kyseliny ve vzorcích připravené zalévanou kávou. Nejvíce kyseliny chlorogenové obsahoval vzorek Toba v kávě zelené. Tento vzorek obsahoval o cca 1/3 více kyseliny chlorogenové než ostatní vzorky. Z Obrázku 30 je patrné, že během pražení dochází k postupné degradaci přibližně 2/3 kyseliny chlorogenové, což bylo pozorované u všech analyzovaných vzorků. Tuto skutečnost potvrzují i odborné studie. Při pražení dochází k degradaci této kyseliny na příslušné laktony²⁶. Z odborné literatury bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace kyseliny chlorogenové byly nalezeny vždy u zelené kávy, a to v rozmezí 218,83-297,03mg/40 ml²⁶ dále také 169,89-210,14 mg/40 ml²⁷. U kávy pražené byl zjištěn obsah 7,33-11,17 mg/40 ml²⁶ a 14,11 mg/40 ml⁸⁵ dále také 6,02-21,56 mg/40 ml. V analyzovaných vzorcích byl rovněž nalezen, nejvyšší obsah kyseliny chlorogenové v zelené kávě, a to v rozmezí 107,26-177,35 mg/40 ml. V pražené kávě byl zjištěn obsah 24,29-35,69 ml/40 ml.



Obrázek 30: Koncentrace kyseliny chlorogenové ve vzorcích kávy připravené kávou zalévanou, n=3

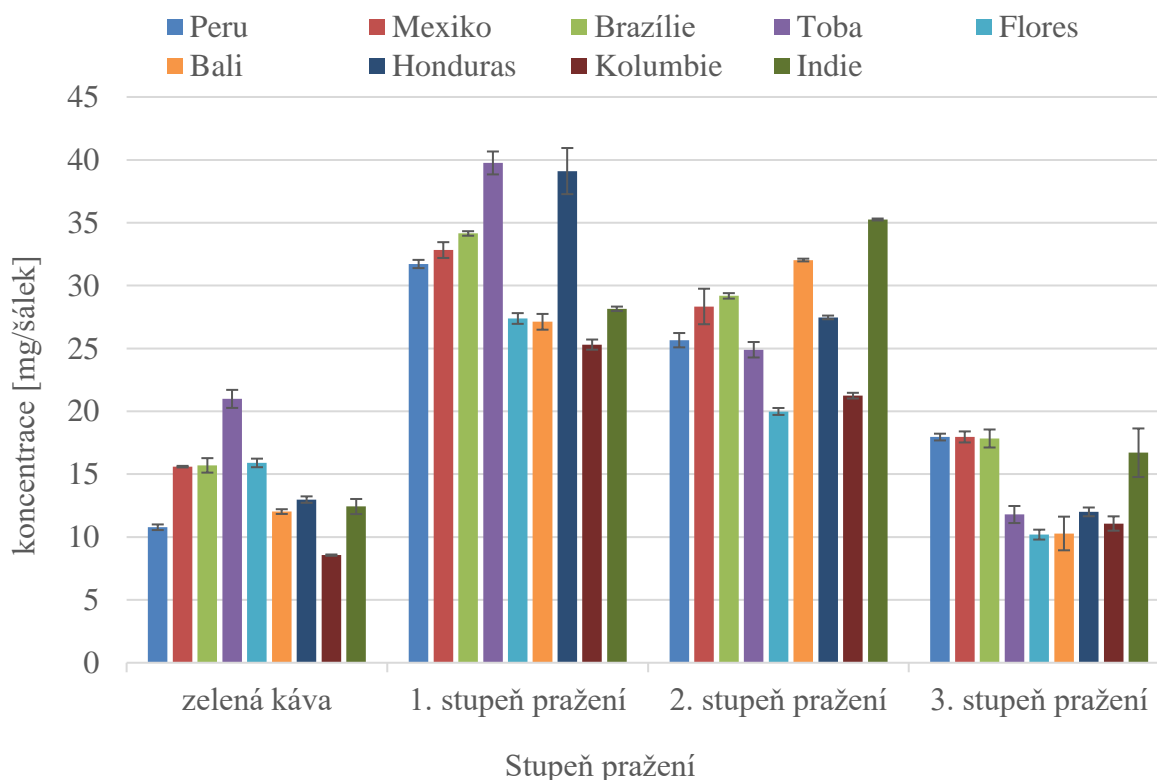
Obrázek 31 zobrazuje vliv stupně pražení na koncentraci kyseliny chlorogenové ve vzorcích připravené pomocí kávovaru. Zde byly zjištěny nejvyšší hodnoty koncentrace v kávě zelené u vzorku Flores. Stejně jako u vzorků káv připravené zálivem je zde vidět postupná degradace kyseliny chlorogenové a to u všech analyzovaných vzorků. Z porovnání obou způsobů příprav kávy (Obrázek 31 a 30) je zřejmé, že u vzorků připravených pomocí kávovaru byly zjištěny mnohem nižší koncentrace kyseliny chlorogenové než u vzorků připravených zálivem kávy.



Obrázek 31: Koncentrace kys. chlorogenové ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3

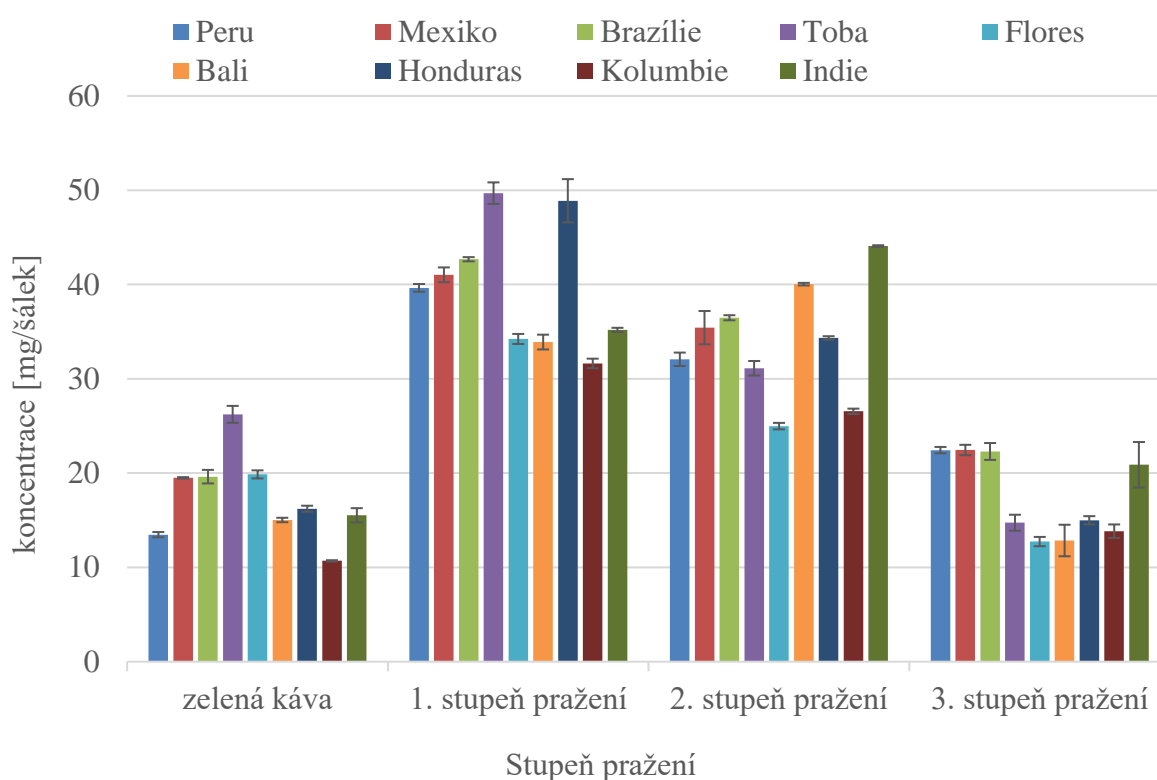
4.3.6 Kyselina neochlorogenová

Další méně zastoupená kyselina v kávě je kyselina neochlorogenová. Na Obrázku 32 je zobrazena, změna koncentrace této kyseliny v různých stupních pražení ve vzorcích připravených zálivem. Z Obrázku 32 je patrné, že při 1. stupni pražení došlo ke zvýšení obsahu kyseliny neochlorogenové ve všech analyzovaných vzorcích. Ve 2. a 3. stupni pražení docházelo k její postupné degradaci. Výjimkou byl vzorek Bali a Indie, kde i ve 2. stupni pražení byly nalezeny vyšší koncentrace kyseliny neochlorogenové oproti 1. stupni pražení. To je důkaz, že izomerizace chlorogenových kyselin se odehrává na začátku pražení. Odborná literatura potvrzuje, že při pražení kávy byl nalezen vyšší obsah kyseliny neochlorogenové ve vyšších stupních pražení oproti zelené kávě a poté docházelo k její postupné degradaci. Ve studii o chování chlorogenových kyselin během pražení bylo zjištěno, že káva pražená při 230 °C po dobu 5 min obsahovala přibližně o 35 mg/40 ml více kyseliny neochlorogenové než zelená káva²⁶. V další studii byla káva pražena 12 min na teplotu 230 °C a obsah kyseliny neochlorogenové byl vyšší o 21 mg/40 ml než obsah v zelené kávě²⁷.



Obrázek 32: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích kávy připravené kávou zalévanou, n=3

Příprava vzorků pomocí kávovaru a jejich vliv pražení na obsah kyseliny neochlorogenové je graficky zpracován na Obrázku 33. Rovněž lze pozorovat nárůst obsahu kyseliny neochlorogenové v 1. stupni, u vzorku Bali a Indie i ve 2. stupni pražení a následnou degradaci ve 3. stupni pražení. Při porovnání obou způsobů příprav kávy, bylo zjištěno, že výrazně nižší koncentrace kyseliny neochlorogenové jsou ve vzorcích připravených pomocí kávovaru. V kávě zalévané byl zjištěn obsah kyseliny neochlorogenové v rozmezí 10,70-26,23 mg/40 ml v zelené kávě a 12,74-22,45 mg/40 ml v pražené kávě. Literatura udává obsah kyseliny neochlorogenové v rozmezí 14,56-71,26 mg/40 ml u zelené kávy a 23,59 mg/40 ml u pražené kávy²⁷.

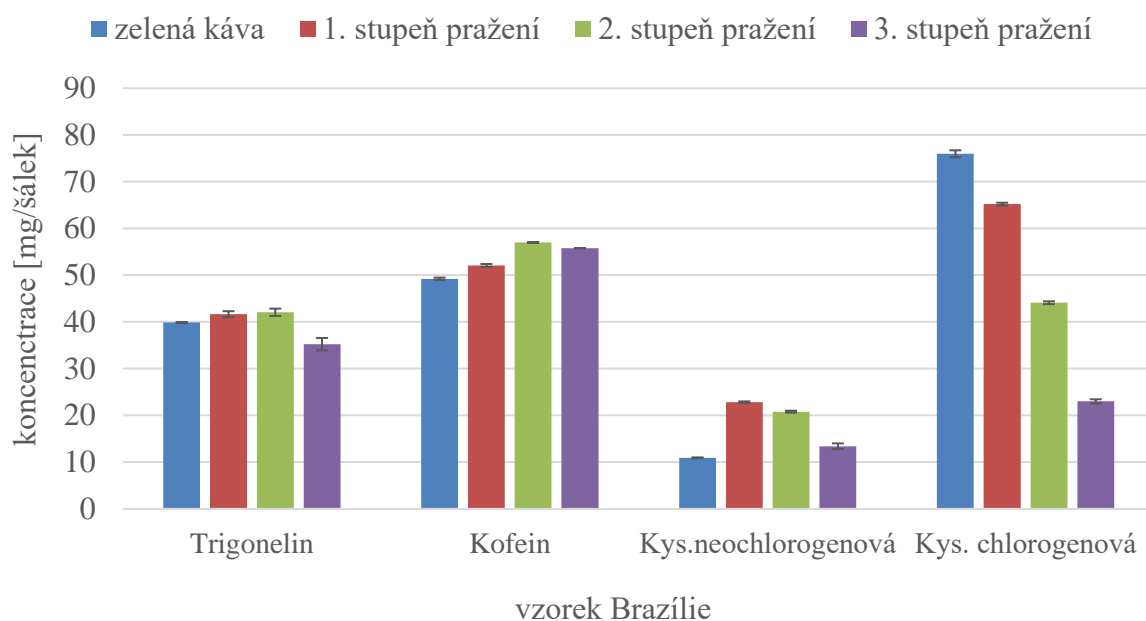


Obrázek 33: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích kávy připravené pomocí kávovaru, n=3

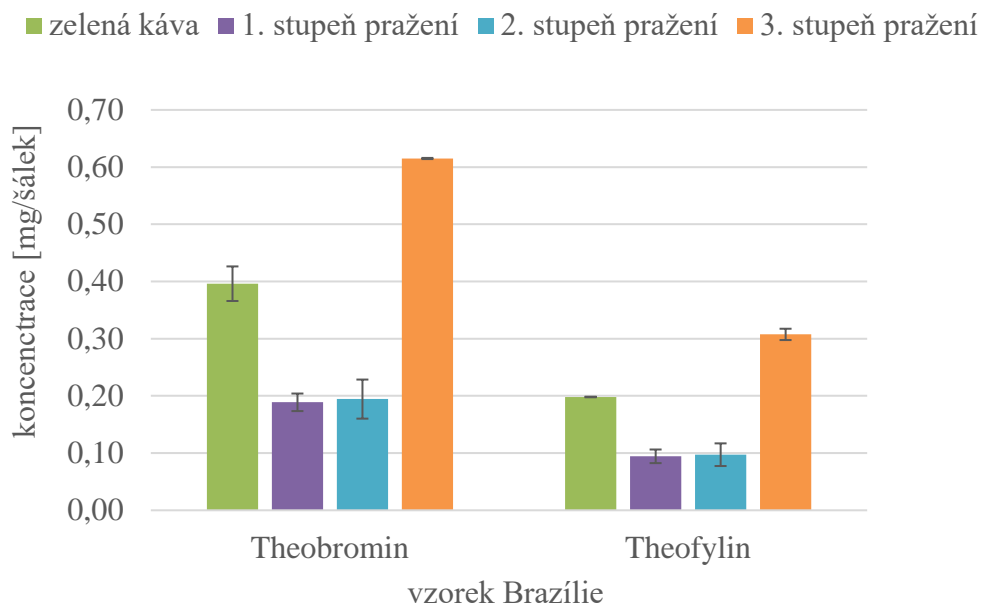
4.3.7 Vliv pražení na obsah látek v kávě Brazílie

Pro celkové shrnutí vlivu pražení kávy byl vybrán vzorek Brazílie, který byl připraven pomocí kávovaru, což je nejběžnější způsob přípravy kávy v kavárnách. Majoritními složkami byly: trigonelin, kofein, kyselina chlorogenová, kyselina neochlorogenová (Obrázek 34) a minoritními složkami: theobromin a theofylin (Obrázek 35). Z Obrázku 34 je patrné, že koncentrace trigonelinu se během pražení prakticky neměnila. Obsah kofeinu a kyseliny neochlorogenové při pražení mírně rostl a obsah kyseliny chlorogenové během pražení klesal. Na Obrázku 35 lze pozorovat, že obsah theobrominu a theofylinu byl vyšší u pražené kávy oproti zelené kávě.

V pražené kávě byl zjištěn nejvyšší obsah kofeinu a v zelené kávě vykazovala nejvyšší koncentrace kyselina chlorogenová. Naopak nejnižší koncentrace v zelené i pražené kávě vykazoval theofylin.



Obrázek 34: Vzorek Brazílie připravený pomocí kávovaru ve všech stupních pražení a zelené kávě



Obrázek 35: Vzorek Brazílie připravený pomocí kávovaru ve všech stupních pražení a zelené kávě

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení významných alkaloidů a antioxidantů v kávách včetně úpravy vzorků. Následně bylo úkolem tyto optimalizované podmínky aplikovat na vybrané druhy káv. Pro přiblížení obsahu a množství látek v kávě běžným konzumentům byly všechny uvedené výsledky vztaženy na jeden šálek (40ml), tedy na jedno espresso.

K analýze bylo použito devět druhů káv z různých zeměpisných oblastí celého světa. Během pražení všech druhů zelených káv byly odebrány vzorky pražení SP1 a SP2 v různých časových a teplotních intervalech. Při optimalizaci úpravy vzorku byl testován vliv hrubosti mletí vzorku na danou přípravu kávy. Dále byl studován vliv stupně pražení na obsah antioxidantů a alkaloidů v kávách.

Z výsledků vyplývá, že hrubost mletí a způsob přípravy vzorku kávy má významný vliv na obsah látek v kávě připravované pomocí kávovaru (espresso), zatímco v případě zalévané kávy není hrubost mletí významným faktorem ovlivňující obsah extrahovaných látek. Při porovnání zvolených způsobů příprav kávy a hrubostí mletí bylo prokázáno, že mletí kávy na profesionálních mlýncích v kavárnách nebo na komerčně dostupných mlýncích pro veřejnost značně ovlivňuje koncentraci látek v nápoji. Pro analýzu obsahu antioxidantů a alkaloidů v různých stupních pražení byla zvolena příprava pomocí kávovaru a káva zalévaná.

Z porovnání obsahu alkaloidů a antioxidantů v zelené a pražené kávě je patrné, že nejvíce zastoupenou látkou v zelené kávě je kyselina chlorogenová a v kávě pražené kofein. Naopak nejnižší koncentraci v zelené i pražené kávě má theofylin.

Ze zjištěných výsledků je zřejmé, že při pražení zelené kávy, dochází k postupné degradaci kyseliny chlorogenové. V pražené kávě byly zjištěny až o 2/3 nižší koncentrace této kyseliny oproti zelené kávě. Obsah kofeinu se během pražení mírně zvyšoval, a to u všech analyzovaných vzorků.

Dále bylo pozorováno, že během pražení koncentrace trigonelinu mírně narůstá, nicméně později klesá. Výjimkou byly vzorky Bali, Indie a Mexiko, kde byl zjištěn mírný nárůst obsahu trigonelinu i v dalších stupních pražení. U obsahu theobrominu a theofylinu ve vzorcích pražených káv není patrný žádný trend. Vzorky analyzovaných káv ve všech stupních

pražení vykazovaly proměnlivé výsledky, avšak lze konstatovat, že vyšší koncentrace měly vzorky pražené kávy než káva zelená.

Obsah kyseliny neochlorogenové v 1. stupni, v některých případech i v 2. stupni pražení narůstal, nicméně v poslední fázi pražení docházelo pravděpodobně k degradaci této kyseliny na laktony.

Při srovnání obou způsobů příprav kávy bylo prokázáno, že ve vzorku kávy připravované pomocí kávovaru byly nalezeny vždy nižší koncentrace sledovaných látek než v kávě zalévané.

6 LITERATURA

1. NORMANOVÁ J., *Káva*. Slovart, Praha, 2004, ISBN 80-7209-514-5.
2. Smékalová B., *Káva*, Ottovo nakladatelství, Praha, 2005, ISBN 80-7360-395-0.
3. Veselá P., *Knih o Kávě*, Smart Press, Praha, 2010, ISBN 978-80-87049-34-1.
4. Augustín J., *U Kávy o Kávě a Kávovinách*. Jota, Brno, 2016, ISBN 978-80-7462-850-4.
5. Kávovník [online]. 2017, [2017-10-05] Dostupné z www.kavovnik.cz.
6. Augustín J., *Povídání o Kávě*, FONTÁNA, Olomouc, 2003, ISBN 80-7336-040-3.
7. Káva pražená [online]. 2017 [2017-10-05] Dostupné z www.cerstve-prazena-kava.cz/clanky/kavovnik.
8. Vliv zpracování na chuť kávy [online]. 2017, [2017-10-05] Dostupné z www.doubleshot.cz.
9. Kávová třešen [online]. 2018 [2018-04-04] Dostupné z <https://802coffee.com>.
10. Kadlec P, Mezloch K, Voldřich M, a kol., *Technologie Potravin: Co Byste Měli Vědět o Výrobě Potravin?* Key Publishing, Ostrava, 2009, ISBN 978-80-7418-051-4
11. Thorn J., *Káva: Příručka pro Labužníky*, Fortuna Print, Praha, 2000, ISBN 80-86144-64-X
12. COFFEE ARABIKA [online]. 2017 [2017-09-05] Dostupné z <http://www.herbmuseum.ca/content/coffee-arabica>.
13. Moldvaerová A., *Kávové Opojení*, Euromedia Group, Praha, 2016, ISBN 978-80-7549-111-4.
14. Mazzafera P., Chemical composition of defective coffee beans, *Food Chem.* 1999; 64(4), 547-554. doi:10.1016/S0308-8146(98)00167-8.
15. Baggenstoss J, Poisson L, Luethi R, Perren R, Escher F., Influence of water quench cooling on degassing and aroma stability of roasted coffee. *J Agric Food Chem.* 2007, 55(16), 6685-6691. doi:10.1021/jf070338d.
16. Illy A, Viany R. *Espresso Coffee- the Science of Quality*, Elsevier Academic Press, California, 2005, ISBN 0-120370371-9.
17. Clarke RJ., Roast and Ground, *Encycl Food Sci Nutr.* 2003, 1487-1493. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00269-8.
18. Belitz H-D., Grosch W., Schieberle P., *Food Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, doi:10.1007/978-3-540-69934-7.

19. Flament I., *Coffee Flavor Chemistry*, John Wiley & Sons, England, 2002, ISBN 0-471-72038-0.
20. Velíšek J., Hajšlová J., *Chemie Potravin II.*, Osis, Tábor, 2009. ISBN 80-902391-2-9.
21. Nagaraju VD., Murthy CT., Ramalakshmi K., Srinivasa Rao PN., Studies on roasting of coffee beans in a spouted bed, *J Food Eng.* 1997, 31(2), 263-270. doi:10.1016/S0260-8774(96)00026-X.
22. Cristo HP., Martins MA., Oliveira LS., Franca AS., Transverse flow of coffee beans in rotating roasters, *J Food Eng.* 2006, 75(1), 142-148. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.04.010.
23. De Monte M., Padoano E., Pozzetto D., Waste heat recovery in a coffee roasting plant, *Appl Therm Eng.* 2003, 23(8), 1033-1044. doi:10.1016/S1359-4311(03)00033-4.
24. Buffo RA., Cardelli-Freire C., Coffee flavour: An overview, *Flavour Fragr J.* 2004, 19(2), 99-104. doi:10.1002/ffj.1325.
25. Ginz M., Balzer HH., Bradbury AGW., et al., Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee, *Eur Food Res Technol.* 2000, 211, 404-410. doi:10.1007/s002170000215.
26. Farah A., De Paulis T., Trugo LC., Martin PR., Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee, *J Agric Food Chem.* 2005, 53(5), 1505-1513. doi:10.1021/jf048701t.
27. Moon JK., Shibamoto T., Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans, *J Agric Food Chem.* 2009, 57(13), 5823-5831. doi:10.1021/jf901136e.
28. Perrone D., Farah A., Donangelo CM., Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew, *J Agric Food Chem.* 2012, 60(17), 4265-4275. doi:10.1021/jf205388x.
29. Moon JK., Shibamoto T., Formation of volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components: Quinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid, *J Agric Food Chem.* 2010, 58(9), 5465-5470. doi:10.1021/jf1005148.
30. Kávové zrno [online] 2017 [2017-010-05] Dostupné z www.kavovezrno.cz.
31. Yeretjian C., Jordan A., Badoud R., Lindinger W., From the green bean to the cup of coffee: Investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles, *Eur Food Res Technol.* 2002, 214(2), 92-104. doi:10.1007/s00217-001-0424-7.
32. Clarke R.J., Macrae R., *Coffee chemistry*, Elsevier Science Publishers, 1985, ISBN 978-94-010-8693-6.

33. Bradbury AGW., Halliday DJ., Chemical Structures of Green Coffee Bean Polysaccharides, *J Agric Food Chem.* 1990, 38(2), 389-392. doi:10.1021/jf00092a010.
34. De Maria CAB., Trugo LC., Moreira RFA., Werneck CC., Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting, *Food Chem.* 1994, 50(2), 141-145. doi:10.1016/0308-8146(94)90111-2.
35. Farah A., 2 Coffee Constituents, 2012, 21-58. doi.org/10.1002/9781119949893.ch2.
36. Liepman AH., Nairn CJ., Willats WGT., Sorensen I., Roberts AW., Keegstra K., Functional Genomic Analysis Supports Conservation of Function Among Cellulose Synthase-Like A Gene Family Members and Suggests Diverse Roles of Mannans in Plants, *Plant Physiol.* 2007, 143(4), 1881-1893. doi:10.1104/pp.106.093989.
37. Fischer M., Reimann S., Trovato V., Redgwell RJ., Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans, *Carbohydr Res.* 2001, 330(1), 93-101. doi:10.1016/S0008-6215(00)00272-X.
38. Viani R., Illy A., *Espresso Coffee*, Elsevier Academic Press, California, 2005, ISBN 0-12-370371-9.
39. Kremr D., Bajer T., Bajerová P., Surmová S., Ventura K., Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: A review, *Quim Nova.* 2016, 39(4), 530-533. doi:10.5935/0100-4042.20160063.
40. Coffee chemistry Chemistry in every cup [online]. 2017[2017-10-05] Dostupné z <https://www.chemistryworld.com/feature/chemistry-in-every-cup/3004537.article>.
41. Fujioka K., Shibamoto T., Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees, *Food Chem.* 2008, 106(1), 217-221. doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.091.
42. Farah A., Monteiro M., Donangelo CM., Lafay S., Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans, *J Nutr.* 2008, 138(12), 2309-2315. doi:10.3945/jn.108.095554.
43. Jeszka-Skowron M., Sentkowska A., Pyrzyńska K., De Peña MP., Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation, *Eur Food Res Technol.* 2016, 242(8), 1403-1409. doi:10.1007/s00217-016-2643-y.
44. Ky CL., Louarn J., Dussert S., Guyot B., Hamon S., Noirot M., Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions, *Food Chem.* 2001, 75(2), 223-230. doi:10.1016/S0308-8146(01)00204-7.
45. Clifford MN., Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, *J Sci Food Agric.* 2000, 80(7), 1033-1043.

doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T.

46. The chemistry of Organic Acids: Part 2 [online]. 2017 [2017-08-05] Dostupné z <https://www.coffeechemistry.com/library/coffee-science-publications/the-chemistry-of-organic-acids-part-2>.
47. Ashihara H., Metabolism of alkaloids in coffee plants, *Brazilian J Plant Physiol.* 2006, 18(1), 1-8. doi:10.1590/S1677-04202006000100001.
48. Turnbull D., Rodricks JV., Mariano GF., Chowdhury F., Caffeine and cardiovascular health, *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017, 89, 165-185. doi:10.1016/j.yrtph.2017.07.025.
49. Alexander J., Benford D., Cockburn A., et al., Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on theobromine as undesirable substances in animal feed, *EFSA J.* 2008, 725(5), 1-66. doi:doi:10.2903/j.efsa.2009.980.
50. BLAUCH JL., TARKA SM., HPLC Determination of Caffeine and Theobromine in Coffee, Tea, and Instant Hot Cocoa Mixes, *J Food Sci.* 1983, 48(3), 745-747. doi:10.1111/j.1365-2621.1983.tb14888.x.
51. Kargul B., Özcan M., Peker S., Nakamoto T., Simmons WB., Falster AU., Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: a pilot study, *Oral Health Prev Dent.* 2012, 10(3), 275-282. doi:10.3290/j.ohpd.a28524.
52. Halfdanarson TR., Jatoi A., Chocolate as a cough suppressant: rationale and justification for an upcoming clinical trial, *Support Cancer Ther.* 2007, 4(2), 119-122. doi:10.3816/SCT.2007.n.006.
53. Neufingerl N., Zebregs YEMP., Schuring EAH., Trautwein EA., Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: A randomized controlled trial, *Am J Clin Nutr.* 2013, 97(6), 1201-1209. doi:10.3945/ajcn.112.047373.
54. Barnes PJ., Theophylline. *Pharmaceuticals*, 2010, 3(3), 725-747. doi:10.3390/ph3030725.
55. Barnes PJ., Theophylline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013, 188(8), 901-906. doi:10.1164/rccm.201302-0388PP.
56. Barnes PJ.. Theophylline: New perspectives for an old drug, *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, 167(6), 813-818. doi:10.1164/rccm.200210-1142PP.
57. No CC a S. Review of Toxicological Literature Review of Toxicological Literature. *Search.* 1999, (79917).
58. HIRAKAWA N., OKAUCHI R., MIURA Y., YAGASAKI K., Anti-Invasive Activity of Niacin and Trigonelline against Cancer Cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(3), 653-658. doi:10.1271/bbb.69.653.

59. Chu Y-F., ed., *Coffee*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012, doi:10.1002/9781119949893.
60. Toci AT., Neto VJMF., Torres AG., Farah A., Changes in triacylglycerols and free fatty acids composition during storage of roasted coffee. *LWT - Food Sci Technol.* 2013, 50(2), 581-590. doi:10.1016/j.lwt.2012.08.007.
61. Rustan AC., Halvorsen B., Huggett AC., Ranheim T., Drevon CA., Effect of coffee lipids (cafestol and kahweol) on regulation of cholesterol metabolism in HepG2 cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997, 17(10), 2140-2149. doi:10.1161/01.ATV.17.10.2140.
62. Speer K., Kölling-Speer I., The lipid fraction of the coffee bean, *Brazilian J Plant Physiol.* 2006, 18(1), 201-216. doi:10.1590/S1677-04202006000100014.
63. Nikolova-Damyanova B., Velikova R., Jham GN., Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil, *Food Res Int.* 1998, 31(6-7), 479-486. doi:10.1016/S0963-9969(99)00016-2.
64. Araújo JMA, Sandi D., Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide, *Food Chem.* 2006, 101(3), 1087-1094. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.008.
65. Underwood GE., Deatherage FE., A study of the amino acids of green and roasted, 1952, doi.org/10.1111/j.1365-2621.1952.tb16783.x.
66. Shimizu M., Mazzafera P., Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds, *Brazilian Arch Biol,* 2000, doi:10.1590/S1516-89132000000300003.
67. Oestreich-Janzen S., *Chemistry of Coffee*, Elsevier Inc, 2013, doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.02786-4.
68. Klouda P., *Moderní Analytické Metody.*, Ostrava 2003, ISBN 80-86369-07-2.
69. Motyka K, Hlaváč J., *Stručný Přehled Separačních Metod*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2009, ISBN 978-80-244-2304-3.
70. Churáček J., *Analytická Separace Látek*. Nakladatelství technické literatury, Praha, 1990, ISBN 80-03-00569-8.
71. HPLC schéma [online]. 2018 [2018-04-04] Dostupné z <https://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>.
72. Pacáková V, Štulík K., *High Performance Liquid Chromatography*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1990, ISBN 80-7066-203-4.
73. NOVÁKOVÁ L, DOUŠA M., *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi I*, Europrint,

Praha, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3.

74. Rodrigues CI., Marta L., Maia R., Miranda M., Ribeirinho M., Máguas C., Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC, *J Food Compos Anal.* 2007, 20(5), 440-448. doi:10.1016/j.jfca.2006.08.005.
75. Rodrigues NP., Bragagnolo N., Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MSn. *J Food Compos Anal.* 2013, 32(2), 105-115. doi:10.1016/j.jfca.2013.09.002.
76. Meyer A., Ngiruwonsanga T., Henze G., Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection, *Anal Bioanal Chem.* 1996, 356(3-4), 284-287. doi:10.1007/s0021663560284.
77. Rostagno MA., Manchón N, D'Arrigo M., et al., Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column, *Anal Chim Acta.* 2011, 685(2), 204-211. doi:10.1016/J.ACA.2010.11.031.
78. Li M., Zhou J., Gu X., Wang Y., Huang XJ., Yan C., Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets, *J Sep Sci.* 2009, 32(2), 267-274. doi:10.1002/jssc.200800529.
79. Jimidar M., Hamoir TP., Foriers A., Massart DL., Comparison of capillary zone electrophoresis with high-performance liquid chromatography for the determination of additives in foodstuffs, *J Chromatogr A.* 1993, 636(1), 179-186. doi:10.1016/0021-9673(93)80070-O.
80. Petruczynik A., Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods, *Cent Eur J Chem.* 2012, 10(3), 802-835. doi:10.2478/s11532-012-0037-y.
81. McCusker RR., Goldberger BA., Cone EJ., Caffeine content of specialty coffees, *J Anal Toxicol.* 2003, 27(7), 520-522. doi:10.1093/jat/27.7.520.
82. De Maria CAB., Trugo LC., Moreira RFA., Petracco M., Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography, *Food Chem.* 1995, 52(4), 447-449. doi:10.1016/0308-8146(95)93298-6.
83. Bispo MS., Veloso MCC., Pinheiro HLC., De Oliveira RFS., Reis JON., De Andrade JB., Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr Sci.* 2002, 40(1), 45-48. doi:10.1093/chromsci/40.1.45.
84. Moeenfarid M., Rocha L., Alves A., Quantification of caffeoylquinic acids in coffee

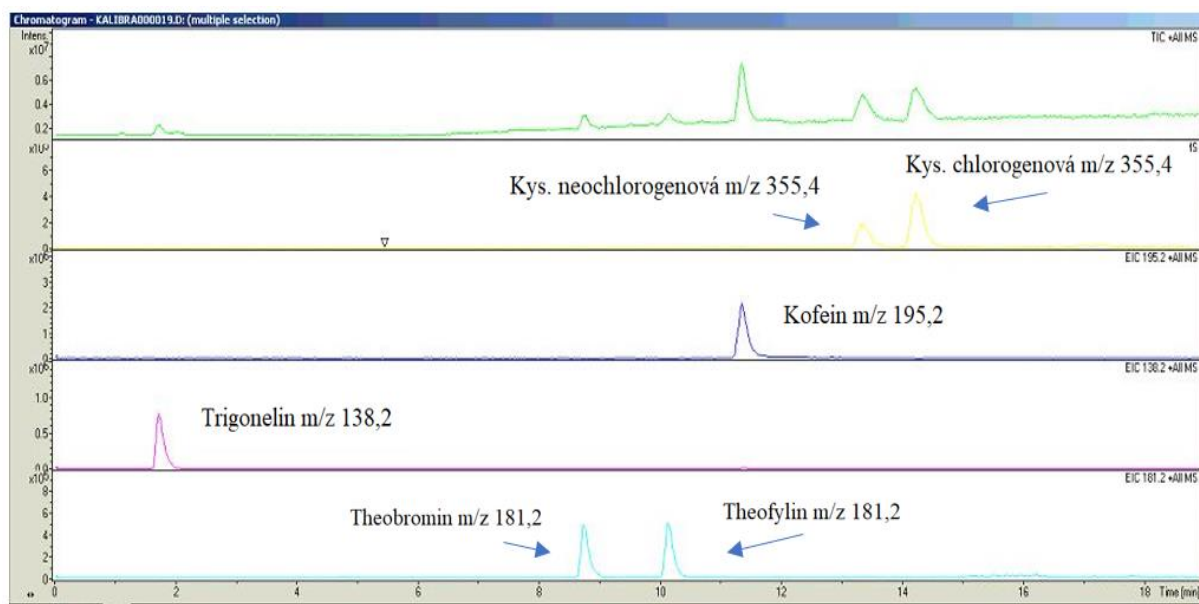
brews by HPLC-DAD, *J Anal Methods Chem.* 2014, doi:10.1155/2014/965353.

85. Perrone D., Donangelo CM., Farah A., Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry, *Food Chem.* 2008, 110(4), 1030-1035. doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.012.

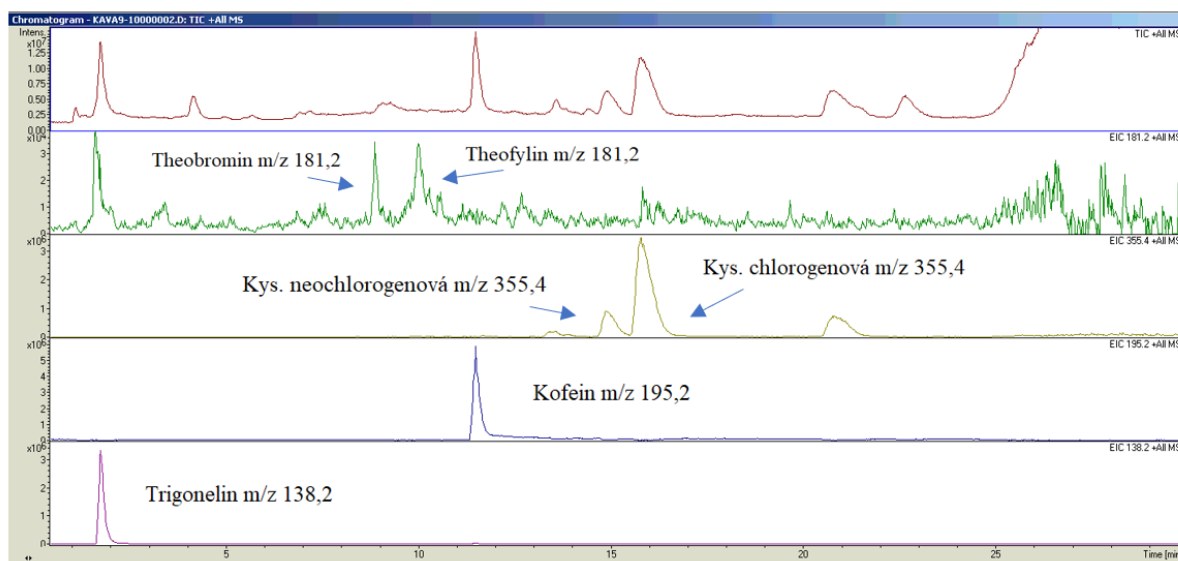
7 SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek P1: Extrahované chromatogramy pro jednotlivé m/z sledovaných látek s ESI ionizací standardů	84
Obrázek P2: Extrahované chromatogramy pro jednotlivé m/z sledovaných látek s ESI ionizací pro vzorek Kolumbie v 2. stupni pražení připravené v kávovaru.....	84
Obrázek P3: Závislost plochy píku na koncentraci kofeinu	85
Obrázek P4: Závislost plochy píku na koncentraci trigonelinu	85
Obrázek P5: Závislost plochy píku na koncentraci theobrominu	85
Obrázek P6: Závislost plochy píku na koncentraci theofylinu	86
Obrázek P7: Závislost plochy píku na koncentraci kys. chlorogenové	86
Obrázek P8: Závislost plochy píku na koncentraci kys. neochlorogenové	86
Obrázek P9: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kofeinu u vybraných příprav kávy ve vzorku Peru	87
Obrázek P10: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kys. chlorogenové u vybraných příprav kávy ve vzorku Peru	87
Obrázek P11: Chromatogram vzorku Brazílie zelené kávy připravené v kávovaru.....	88
Obrázek P12: Chromatogram vzorku Brazílie v 1. stupni pražení připravený v kávovaru.....	88
Obrázek P13: Chromatogram vzorku Brazílie v 2. stupni pražení připravený v kávovaru.....	89
Obrázek P14: Chromatogram vzorku Brazílie v 3. stupni pražení připravený v kávovaru.....	89
Tabulka P1: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3.....	90
Tabulka P2: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3.....	90
Tabulka P3: Koncentrace theobrominu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3....	91
Tabulka P4: Koncentrace theobrominu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3	91
Tabulka P5: Koncentrace theofylinu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3.....	92
Tabulka P6: Koncentrace theofylinu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3.....	92
Tabulka P7: Koncentrace kofeinu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3	93

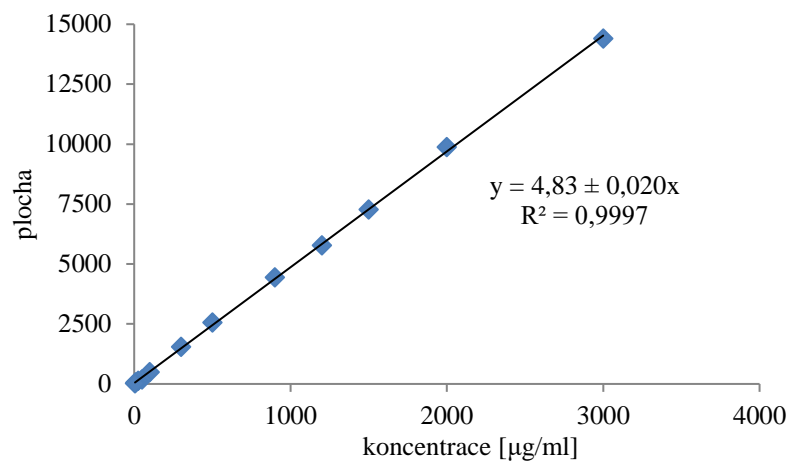
Tabulka P8: Koncentrace kofeinu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3	93
Tabulka P9: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3	94
Tabulka P10: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3	94
Tabulka P11: Koncentrace kys. chlorogenové ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3	95
Tabulka P12: Koncentrace kys. chlorogenové ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3 ..	95



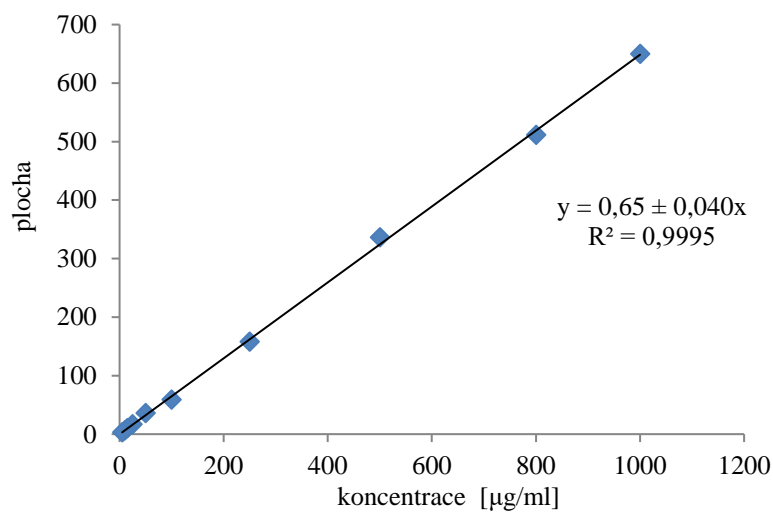
Obrázek P1: Extrahované chromatogramy pro jednotlivé m/z sledovaných látek s ESI ionizací standardů



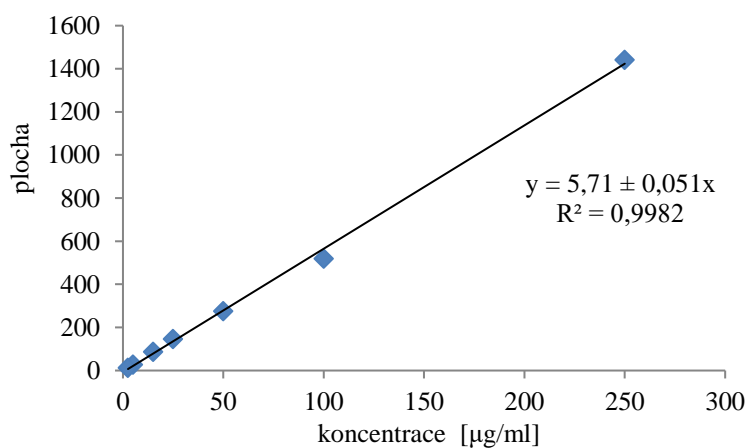
Obrázek P2: Extrahované chromatogramy pro jednotlivé m/z sledovaných látek s ESI ionizací pro vzorek Kolumbie v 2. stupni pražení připravené v kávovaru



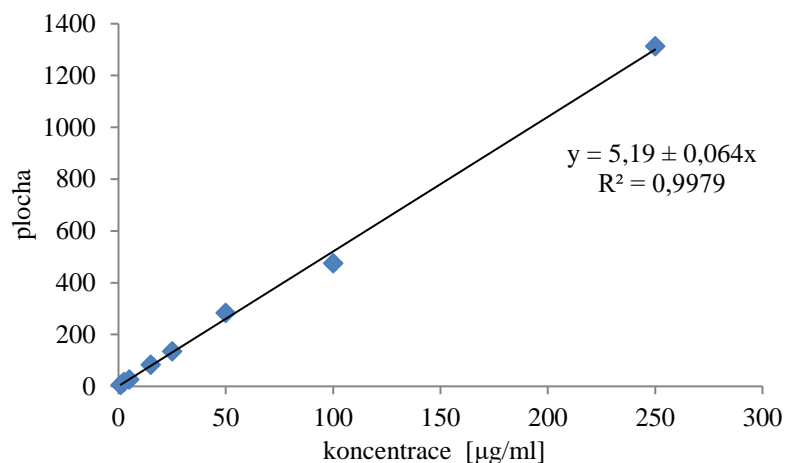
Obrázek P3: Závislost plochy píku na koncentraci kofeinu



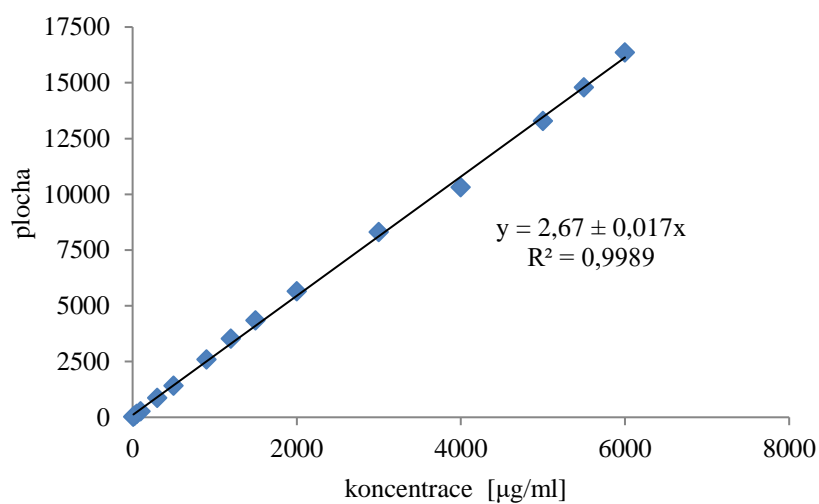
Obrázek P4: Závislost plochy píku na koncentraci trigonelinu



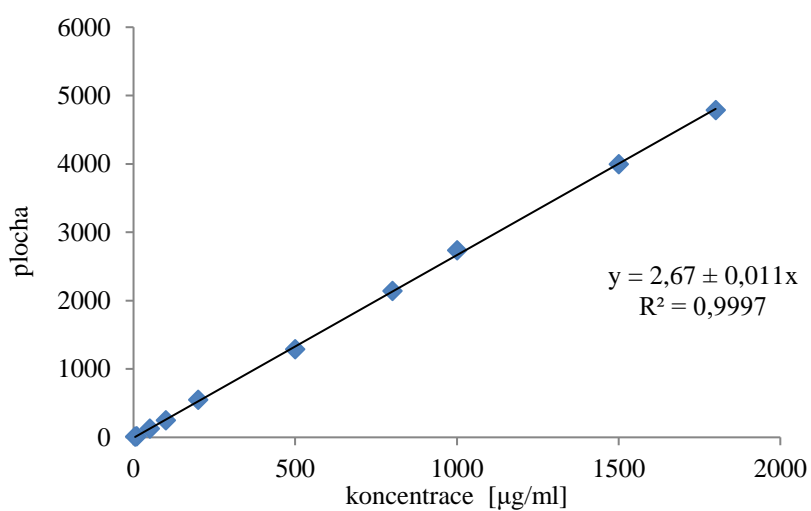
Obrázek P5: Závislost plochy píku na koncentraci theobrominu



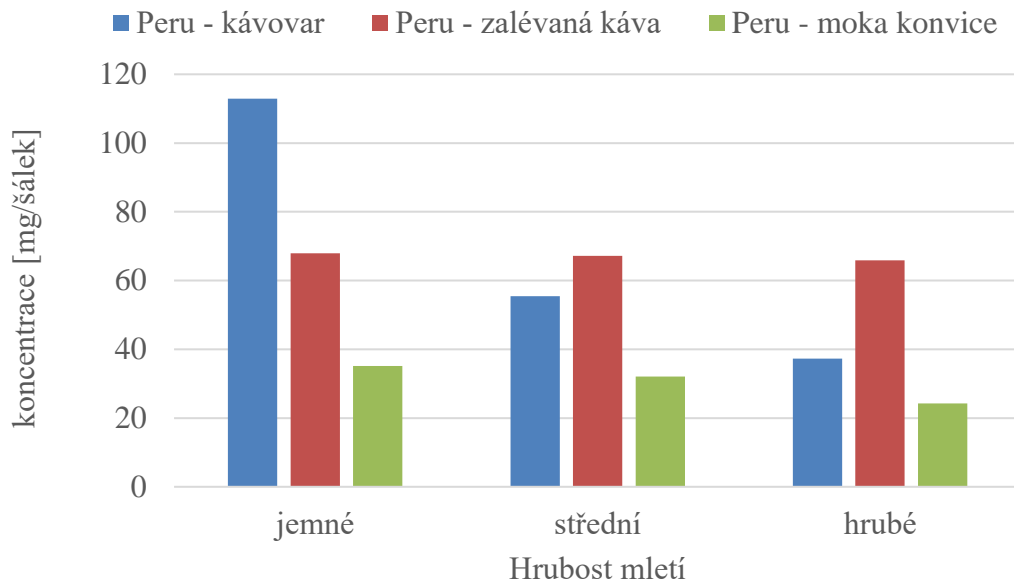
Obrázek P6: Závislost plochy píku na koncentraci theofylinu



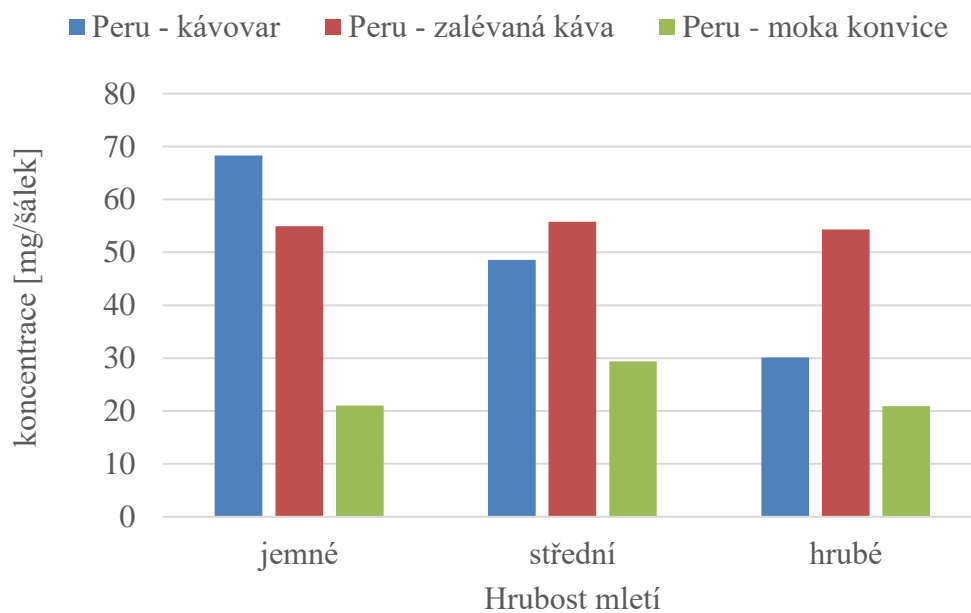
Obrázek P7: Závislost plochy píku na koncentraci kys. chlorogenové



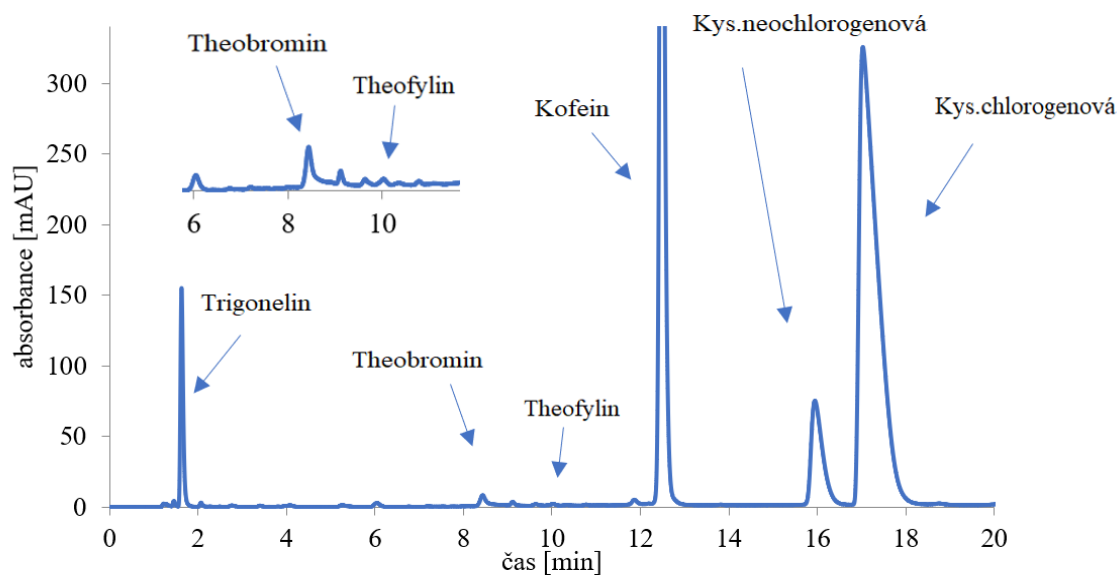
Obrázek P8: Závislost plochy píku na koncentraci kys. neochlorogenové



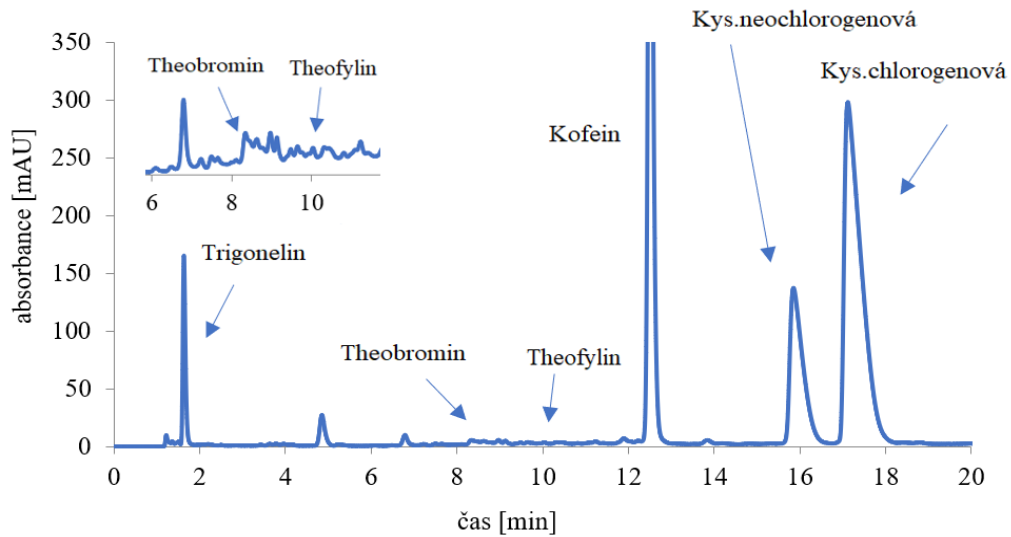
Obrázek P9: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kofeinu u vybraných příprav kávy ve vzorku Peru



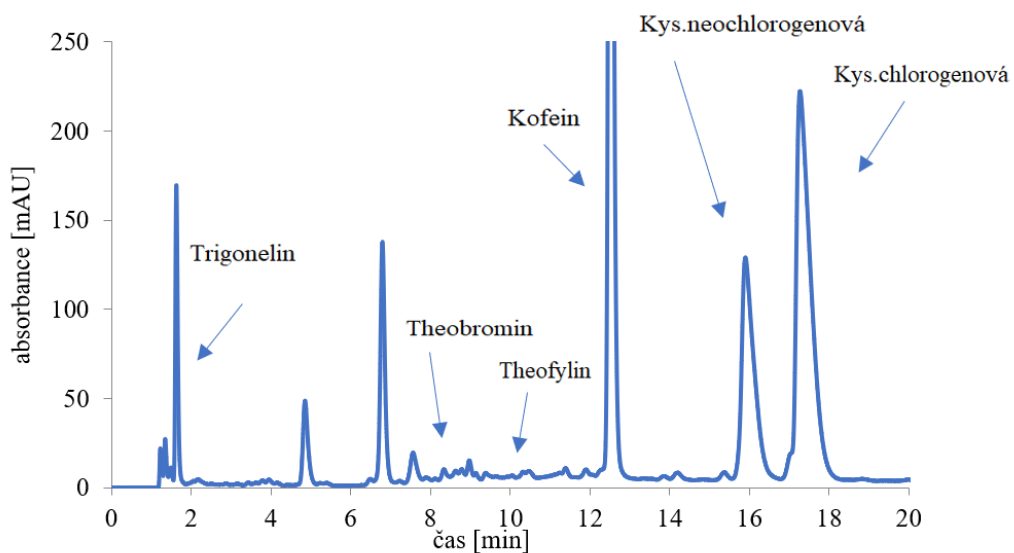
Obrázek P10: Porovnání hrubosti mletí na koncentraci kys. chlorogenové u vybraných příprav kávy ve vzorku Peru



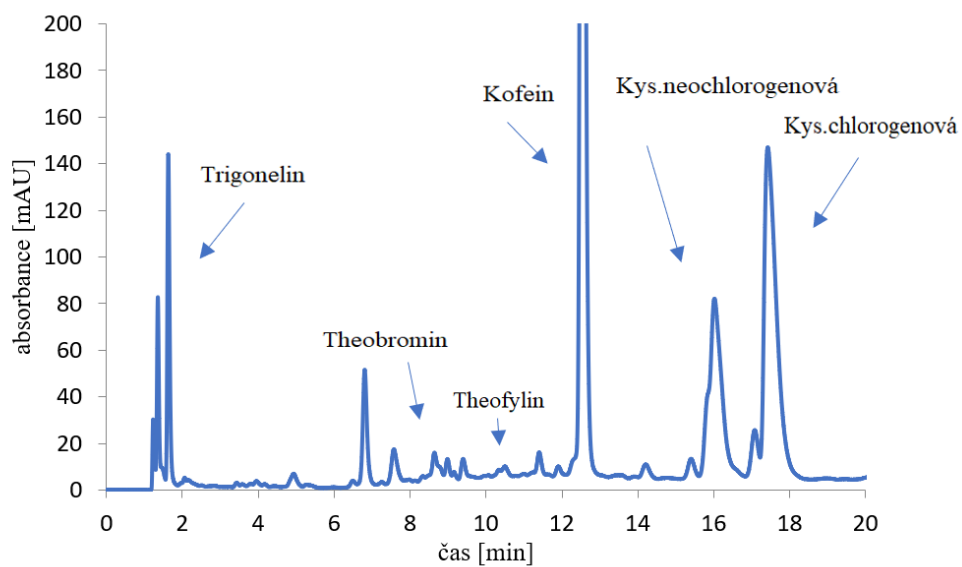
Obrázek P11: Chromatogram vzorku Brazílie zelené kávy připravené v kávovalu



Obrázek P12: Chromatogram vzorku Brazílie v 1. stupni pražení připravený v kávovalu



Obrázek P13: Chromatogram vzorku Brazílie v 2. stupni pražení připravený v kávovaru



Obrázek P14: Chromatogram vzorku Brazílie v 3. stupni pražení připravený v kávovaru

Tabulka P1: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3

Trigonelin - káva zalévaná				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	45,31±0,409	50,25±1,761	41,80±0,856	39,44±0,974
Mexiko	41,60±0,504	52,32±2,056	51,28±0,448	42,50±0,678
Brazílie	48,83±1,000	47,63±1,352	46,05±0,161	37,33±0,717
Toba	51,40±0,487	50,31±0,109	47,78±1,409	32,36±0,291
Flores	49,28±0,243	49,48±1,178	45,63±0,313	35,51±1,000
Bali	47,56±2,278	51,06±0,148	57,18±0,869	35,36±0,448
Honduras	47,70±0,252	49,70±0,291	47,15±0,974	35,47±0,170
Kolumbie	38,27±0,791	46,58±0,126	39,12±0,278	37,93±0,270
Indie	34,26±0,896	37,43±1,913	41,72±0,217	30,74±0,200

Tabulka P2: Koncentrace trigonelinu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3

Trigonelin - kávovar				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	30,53±0,022	33,93±1,474	34,97±0,030	32,39±0,478
Mexiko	30,86±0,726	43,98±1,409	47,19±1,000	34,87±0,852
Brazílie	39,87±0,091	41,65±0,639	42,06±0,778	35,24±1,326
Toba	37,93±0,791	45,34±0,065	45,11±0,596	42,37±0,696
Flores	41,08±0,843	49,79±0,435	45,64±0,596	34,76±0,356
Bali	40,04±0,148	48,74±1,782	52,21±0,522	32,32±0,109
Honduras	33,86±0,009	36,71±0,009	19,89±0,035	31,95±0,009
Kolumbie	30,51±0,022	31,70±0,009	30,44±0,009	27,49±0,009
Indie	25,35±0,009	26,51±0,009	24,68±0,017	21,12±0,017

Tabulka P3: Koncentrace theobrominu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3

Theobromin - káva zalévaná				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1. stupeň pražení [mg/40 ml]	2. stupeň pražení [mg/40 ml]	3. stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	0,36±0,034	0,07±0,024	0,11±0,003	0,53±0,003
Mexiko	0,37±0,007	0,10±0,015	0,24±0,012	0,59±0,009
Brazílie	0,16±0,005	0,07±0,000	0,20±0,018	0,53±0,009
Toba	0,09±0,010	0,15±0,001	0,37±0,012	0,25±0,002
Flores	0,26±0,044	0,35±0,014	0,41±0,008	0,26±0,002
Bali	0,27±0,018	0,31±0,014	0,41±0,003	0,28±0,038
Honduras	0,23±0,046	0,39±0,028	0,39±0,008	0,38±0,010
Kolumbie	0,41±0,018	0,29±0,017	0,34±0,010	0,37±0,002
Indie	0,007±0,001	0,15±0,005	0,36±0,014	0,33±0,002

Tabulka P4: Koncentrace theobrominu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3

Theobromin - kávovar				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1. stupeň pražení [mg/40 ml]	2. stupeň pražení [mg/40 ml]	3. stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	0,28±0,027	0,18±0,026	0,24±0,031	0,60±0,011
Mexiko	0,39±0,028	0,20±0,014	0,22±0,002	0,64±0,003
Brazílie	0,40±0,030	0,19±0,015	0,19±0,034	0,62±0,001
Toba	0,04±0,023	0,16±0,002	0,34±0,006	0,32±0,008
Flores	0,07±0,004	0,14±0,005	0,33±0,012	0,29±0,003
Bali	0,07±0,007	0,11±0,002	0,37±0,001	0,25±0,009
Honduras	0,05±0,004	0,11±0,013	0,12±0,012	0,13±0,008
Kolumbie	0,06±0,000	0,13±0,016	0,16±0,012	0,14±0,021
Indie	0,11±0,001	0,11±0,001	0,22±0,010	0,23±0,020

Tabulka P5: Koncentrace theofylinu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3

Theofylin - káva zalévaná				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	0,08±0,001	0,05±0,000	0,10±0,001	0,11±0,006
Mexiko	0,10±0,003	0,06±0,018	0,07±0,008	0,05±0,003
Brazílie	0,06±0,001	0,07±0,019	0,07±0,008	0,10±0,006
Toba	0,06±0,000	0,006±0,005	0,04±0,001	0,06±0,000
Flores	0,06±0,001	0,24±0,018	0,16±0,015	0,17±0,002
Bali	0,26±0,011	0,24±0,016	0,19±0,010	0,13±0,009
Honduras	0,11±0,014	0,31±0,013	0,26±0,008	0,20±0,007
Kolumbie	0,10±0,008	0,20±0,006	0,23±0,005	0,22±0,005
Indie	0,13±0,007	0,18±0,005	0,31±0,014	0,25±0,018

Tabulka P6: Koncentrace theofylinu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3

Theofylin - kávovar				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	0,03±0,000	0,05±0,001	0,04±0,000	0,07±0,010
Mexiko	0,04±0,000	0,06±0,003	0,05±0,001	0,07±0,008
Brazílie	0,08±0,000	0,06±0,012	0,07±0,020	0,10±0,010
Toba	0,07±0,007	0,14±0,014	0,19±0,016	0,19±0,009
Flores	0,08±0,006	0,15±0,004	0,13±0,004	0,17±0,014
Bali	0,08±0,002	0,22±0,000	0,23±0,007	0,18±0,004
Honduras	0,10±0,001	0,08±0,003	0,09±0,001	0,12±0,001
Kolumbie	0,09±0,003	0,08±0,009	0,12±0,001	0,07±0,001
Indie	0,09±0,002	0,04±0,000	0,13±0,002	0,10±0,001

Tabulka P7: Koncentrace kofeinu ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3

Kofein - káva zalévaná				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	52,45±0,674	64,13±0,330	54,51±0,881	64,14±0,388
Mexiko	52,00±0,030	69,29±0,073	69,45±1,755	72,42±0,252
Brazílie	68,11±0,047	69,10±0,319	70,52±0,268	65,36±0,982
Toba	50,84±0,152	53,12±0,144	56,19±0,063	53,18±0,197
Flores	62,81±0,789	63,16±0,555	62,16±0,105	60,40±1,087
Bali	60,28±0,401	60,48±0,599	78,95±0,559	64,56±0,369
Honduras	61,93±0,857	86,16±0,606	70,83±1,220	62,50±0,789
Kolumbie	48,17±0,295	58,49±0,187	54,90±0,390	64,48±0,884
Indie	94,64±0,666	113,05±0,266	132,56±0,241	117,21±0,391

Tabulka P8: Koncentrace kofeinu ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3

Kofein - kávovar				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	35,25±0,019	37,75±0,053	40,0±0,416	51,37±0,886
Mexiko	34,10±0,060	48,66±0,648	57,21±0,422	56,87±0,158
Brazílie	49,21±0,265	52,07±0,324	56,99±0,031	55,77±0,022
Toba	33,65±0,183	39,25±0,108	43,58±1,345	57,38±1,031
Flores	44,47±0,292	52,77±0,482	54,41±0,303	55,79±0,089
Bali	42,05±0,281	50,72±0,205	61,20±0,081	57,15±0,241
Honduras	40,78±0,001	43,06±0,001	26,17±0,006	48,53±0,004
Kolumbie	36,58±0,005	29,89±0,002	39,99±0,004	47,01±0,012
Indie	78,49±0,004	83,21±0,002	73,21±0,004	86,51±0,001

Tabulka P9: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3

Kyselina neochlorogenová - káva zalévaná				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	10,78±0,224	31,72±0,328	25,66±0,569	17,95±0,269
Mexiko	15,60±0,062	32,82±0,628	28,34±1,412	17,96±0,440
Brazílie	15,70±0,576	34,15±0,180	29,18±0,217	17,84±0,716
Toba	20,99±0,717	39,75±0,912	24,90±0,615	11,79±0,679
Flores	15,89±0,341	27,38±0,426	19,99±0,275	10,19±0,394
Bali	12,02±0,188	27,12±0,627	32,03±0,108	10,28±1,339
Honduras	12,98±0,255	39,11±1,834	27,47±0,146	12,00±0,348
Kolumbie	8,56±0,052	25,31±0,404	21,25±0,227	11,07±0,571
Indie	12,43±0,600	28,15±0,176	35,26±0,076	16,70±1,932

Tabulka P10: Koncentrace kys. neochlorogenové ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3

Kyselina neochlorogenová - kávovar				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	6,78±0,068	16,69±0,078	17,19±0,025	13,27±1,110
Mexiko	9,53±0,426	21,12±0,129	21,58±0,689	9,69±0,745
Brazílie	10,92±0,093	22,84±0,155	20,80±0,210	13,40±0,612
Toba	8,88±0,087	22,38±0,098	17,88±0,758	12,83±0,066
Flores	12,07±0,671	24,53±0,091	21,53±0,085	10,41±0,187
Bali	8,09±0,211	20,96±0,199	23,42±0,637	8,59±0,049
Honduras	7,20±0,006	16,21±0,006	8,44±0,002	7,87±0,004
Kolumbie	6,15±0,007	18,42±0,006	13,87±0,001	8,12±0,006
Indie	10,25±0,012	19,43±0,012	15,28±0,011	8,43±0,002

Tabulka P11: Koncentrace kys. chlorogenové ve vzorcích káv připravené kávou zalévanou, n=3

Kyselina chlorogenová - káva zalévaná				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	126,35 ±1,272	121,31±0,367	59,49±1,930	33,18±0,329
Mexiko	107,26±0,376	102,77±1,103	63,09±1,622	35,43±0,939
Brazílie	112,05±0,040	95,24±0,543	60,61±0,231	35,22±0,721
Toba	177,35±0,302	128,12±4,298	67,71±2,275	32,45±0,028
Flores	120,69±0,100	111,56± 0,221	66,58± 0,970	26,90±0,679
Bali	133,42±1,569	96,33±1,446	73,24±0,129	24,29±0,327
Honduras	128,39±2,256	133,41±7,121	65,24±1,485	31,42±0,656
Kolumbie	111,29±1,992	95,23±0,672	50,84±0,876	33,19±0,040
Indie	116,10±0,087	101,81±0,411	76,69±1,241	35,69±1,766

Tabulka P12: Koncentrace kys. chlorogenové ve vzorcích káv připravené v kávovaru, n=3

Kyselina chlorogenová - kávovar				
Vzorek	Zelená káva [mg/40 ml]	1.stupeň pražení [mg/40 ml]	2.stupeň pražení [mg/40 ml]	3.stupeň pražení [mg/40 ml]
Peru	78,31±0,218	64,57±0,344	40,78±0,211	23,93±0,126
Mexiko	66,27±0,020	63,32±0,004	43,80±0,282	22,47±0,283
Brazílie	75,97±0,747	65,21±0,290	44,11±0,303	23,00±0,452
Toba	90,49±0,707	76,02±0,976	45,52±1,501	28,10±1,843
Flores	92,47±0,204	81,40±0,207	50,73±0,497	22,99±0,183
Bali	87,35±1,324	76,99±0,242	54,36±0,754	18,36±0,281
Honduras	77,82±0,008	56,79±0,004	22,16±0,004	20,75±0,004
Kolumbie	75,32±0,008	57,02±0,006	33,86±0,007	21,95±0,002
Indie	82,38±0,002	67,07±0,007	38,27±0,0004	23,50±0,005