

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Barbora Řeháková

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

**Analýza fenolických látek s antioxidačními vlastnostmi v bezkofeinové kávě**

Bc. Barbora Řeháková

Diplomová práce  
2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Řeháková**  
Osobní číslo: **C16622**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Analýza fenolických látek s antioxidačními vlastnostmi v bezkofeinové kávě**  
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. Vypracujte literární rešerši zahrnující způsoby určení antioxidačních vlastností přírodních antioxidantů, se zaměřením na látky obsažené v kávě. Dále se věnujte analýze fenolických látek obsažených v kávě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Zaměřte se také na různé způsoby odstranění kofeinu při přípravě bezkofeinové kávy.
2. Na základě literární rešerše zvolte vhodné spektrofotometrické metody pro určení celkového obsahu látek s antioxidačními vlastnostmi. Metody použijte pro stanovení antioxidačních vlastností extraktů z kávy a výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
3. Vypracujte a optimalizujte metodiku pro rychlou chromatografickou separaci derivátů kyseliny chlorogenové a kofeinu v kávě. Optimalizovanou HPLC separaci využijte pro analýzu sledovaných látek v bezkofeinové kávě a porovnejte jejich obsah se vzorky kávy obsahující kofein.
4. Porovnejte a diskutujte obsah derivátů kyseliny chlorogenové a kofeinu v jednotlivých vzorcích kávy. Monitorujte vliv přípravy bezkofeinové kávy na obsah sledovaných látek v kávě. Věnujte se rovněž úspěšnosti odstranění kofeinu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti: **Ing. Kateřina Pravcová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

**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 9.5.2018

Barbora Řeháková

**Poděkování:**

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za své cenné rady, trpělivost a inspiraci při vedení této diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Pravcové za pomoc s vyhodnocením statistických dat.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je věnována stanovení kofeinu a izomerů kyseliny chlorogenové v kávě pomocí kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Optimalizovaná chromatografická separace byla použita pro analýzu pražených, zelených a bezkofeinových kávových infuzí. Dále byla pozornost věnována metodám pro odstranění kofeinu z kávových zrn. Nejprve byla využita extrakce různými organickými rozpouštědly, z nichž nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí dichlormethanu. Dále byla testována superkritická fluidní extrakce s oxidem uhličitým. V neposlední řadě byla měřena antioxidační aktivita a celkový obsah fenolických látek pomocí spektrofotometrických technik.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Antioxidační aktivita, kofein, káva, kyselina chlorogenová, kapalinová chromatografie, dekofeinizace, ABTS, DPPH, FCM

## **TITLE**

Analysis of Phenolic Compounds with antioxidant properties in decaffeinated coffee.

## **ANNOTATION**

The aim of this thesis was the determination of caffeine and chlorogenic acid isomers in coffee by liquid chromatography with spectrophotometric detection. Optimized chromatographic separation was used for analysis of roasted, green and non-caffeine coffee infusions. Further, the attention was paid to methods for removing caffeine from coffee beans. First, the extraction with various organic solvents was used, from which the best results were obtained with dichloromethane. In addition, supercritical fluid extraction with carbon dioxide was tested. Last but not least, the antioxidant activity and total phenolic content were measured by spectrophotometric techniques.

## **KEYWORDS**

Antioxidant activity, caffeine, coffee, chlorogenic acid, liquid chromatography, decaffeination, ABTS, DPPH, FCM

# OBSAH

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ .....</b>	<b>10</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>12</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>13</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>15</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Historie kávy .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Kávovník a jeho pěstování .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Druhy kávovníku .....</b>	<b>18</b>
1.3.1 <i>Coffea arabica</i> .....	18
1.3.2 <i>Coffea canephora</i> .....	20
1.3.3 <i>Coffea liberica</i> .....	20
<b>1.4 Technologie zpracování kávy.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Sběr kávy .....	21
1.4.2 Zpracování zrn .....	22
1.4.3 Loupání a leštění zrn.....	24
1.4.4 Vývoz zrna a doprava .....	25
1.4.5 Pražení .....	25
1.4.6 Chlazení upražených kávovníkových zrn .....	28
1.4.7 Mletí.....	28
<b>1.5 Bezkofeinová káva (dekofeinizace).....</b>	<b>29</b>
1.5.1 Proces dekofeinizace.....	29
1.5.2 Způsoby odstranění kofeinu z kávových zrn .....	29
<b>1.6 Složení kávy .....</b>	<b>31</b>
1.6.1 Deriváty kyseliny chlorogenové .....	32
1.6.2 Minerální látky.....	33
1.6.3 Proteiny, peptidy a volné aminokyseliny.....	33
1.6.4 Trigonelin.....	33
1.6.5 Lipidy .....	34
1.6.6 Sacharidy .....	35
1.6.7 Kofein .....	35
<b>1.7 Fenolické sloučeniny .....</b>	<b>36</b>



1.7.1 Metoda FCM.....	36
<b>1.8 Antioxidanty .....</b>	<b>37</b>
1.8.1 Metody založené na eliminaci radikálů .....	38
1.8.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek .....	39
<b>1.9 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....</b>	<b>40</b>
1.9.1 Instrumentace .....	41
<b>1.10 Analýza kávových zrn .....</b>	<b>42</b>
1.10.1 Stanovení obsahu kofeinu a derivátů chlorogenových kyselin v kávě .....	42
1.10.2 Metody stanovení celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity .....	43
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>44</b>
<b>2.1 Přístroje a zařízení.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2 Chemikálie.....</b>	<b>45</b>
<b>2.3 Analyzované vzorky.....</b>	<b>46</b>
<b>2.4 Pracovní postup.....</b>	<b>50</b>
2.4.1 Příprava vzorků, standardů a kalibračních řad.....	50
2.4.2 Spektrofotometrické metody.....	51
2.4.3 HPLC .....	52
2.4.4 Dekofeinizace .....	53
<b>2.5 Statistické zpracování experimentálních dat .....</b>	<b>54</b>
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
3.1.2 Měření antioxidační aktivity vzorků kávy .....	56
3.1.3 Stanovení celkového množství fenolických látek.....	61
3.1.4 Stanovení kofeinu a izomerů chlorogenových kyselin v kávě pomocí HPLC .....	63
3.1.5 Optimalizace separačních podmínek .....	63
3.1.6 Kvantitativní stanovení kofeinu a chlorogenových kyselin.....	66
<b>3.2 Studium dekofeinizace a její optimalizace.....</b>	<b>75</b>
3.2.1 Organická rozpouštědla .....	75
3.2.2 Superkritická fluidní extrakce.....	78
<b>4 ZÁVĚR .....</b>	<b>80</b>
<b>5 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>82</b>
<b>6 PŘÍLOHY .....</b>	<b>90</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1:</b> Květy kávovníku arabského .....	17
<b>Obrázek 2:</b> Plody kávovníku arabského.....	18
<b>Obrázek 3:</b> Rozdíly odrůdy arabika (vlevo) a robusta (vpravo).....	20
<b>Obrázek 4:</b> Pražička .....	26
<b>Obrázek 5:</b> Tvar a barva kávovníkového zrna v průběhu pražení.....	27
<b>Obrázek 6:</b> Hrubost mleté kávy.....	28
<b>Obrázek 7:</b> Izomery kyseliny kafeoylchinové.....	32
<b>Obrázek 8:</b> Trigonelin .....	33
<b>Obrázek 9:</b> Kafestol (vpravo), kahweol (vlevo).....	34
<b>Obrázek 10:</b> Kofein .....	35
<b>Obrázek 11:</b> HPLC/UV systém (vlevo) a použitá kolona Ascentis Express F5 (vpravo).....	45
<b>Obrázek 12:</b> Spektrofotometr Shimadzu UV-2450.....	45
<b>Obrázek 13:</b> Fotografie analyzovaných vzorků pražené kávy .....	49
<b>Obrázek 14:</b> Vialky s roztokem ABTS .....	51
<b>Obrázek 15:</b> Zařízení superkritické fluidní extrakce.....	53
<b>Obrázek 16:</b> Závislost úbytku A na množství přidávaného vzorku .....	55
<b>Obrázek 17:</b> Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu.....	56
<b>Obrázek 18:</b> Antioxidační aktivita infuzí připravených ze vzorků bezkofeinových pražených zrn .....	57
<b>Obrázek 19:</b> Antioxidační aktivita infuzí připravených ze vzorků zelených zrn.....	57
<b>Obrázek 20:</b> Antioxidační aktivita infuzí připravených ze vzorků pražených zrn.....	58
<b>Obrázek 21:</b> Rozdílné stupně pražení.....	59
<b>Obrázek 22:</b> Závislost změny A na množství přidávaného vzorku.....	60
<b>Obrázek 23:</b> Kalibrační křivka závislosti změny A na množství kyseliny gallové.....	60
<b>Obrázek 24:</b> Stanovení celkového množství fenolických látek v extraktu bezkofeinových pražených kávovníkových zrn .....	61
<b>Obrázek 25:</b> Stanovení celkového množství fenolických látek v extraktu zelených kávovníkových zrn.....	62
<b>Obrázek 26:</b> Stanovení celkového množství fenolických látek v extraktu pražených kávovníkových zrn.....	62
<b>Obrázek 27:</b> Vliv průtoku na separaci vzorku P2 .....	64

<b>Obrázek 28:</b> Vliv teploty kolony na separaci vzorku P2.....	64
<b>Obrázek 29:</b> Separace směsi standardů .....	65
<b>Obrázek 30:</b> Separace směsi standardů .....	66
<b>Obrázek 31:</b> Analýza kofeinu a derivátů chlorogenové kyseliny pomocí HPLC/UV systému u zelených kávových zrn.....	68
<b>Obrázek 32:</b> Analýza kofeinu a izomerů kyseliny chlorogenové v pražených bezkofeinových zrnech.....	69
<b>Obrázek 33:</b> Analýza kofeinu a chlorogenových kyselin pomocí HPLC/ UV systému u pražených kávových zrn .....	70
<b>Obrázek 34:</b> Analýza kofeinu a izomerů chlorogenových kyselin vzorku P36 ve formě pražených a zelených kávovníkových zrn .....	70
<b>Obrázek 35:</b> Analýza kofeinu a chlorogenových kyselin pomocí HPLC/UV systému v kávě COLOMBIA v bezkofeinové, pražené, zelené a zelené bezkofeinové formě.....	71
<b>Obrázek 36:</b> Cattelův graf a grafy komponentních vah .....	72
<b>Obrázek 37:</b> Grafy komponentního skóre .....	73
<b>Obrázek 38:</b> Grafy faktorové analýzy .....	74
<b>Obrázek 39:</b> Dendrogram analyzovaných vzorků zelené, pražené a bezkofeinové pražené kávy.....	74
<b>Obrázek 40:</b> Optimalizace procesu dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla – chloroform .....	75
<b>Obrázek 41:</b> Optimalizace procesu dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla - ethylacetát .....	76
<b>Obrázek 42:</b> Optimalizace procesu dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla - dichlormetan .....	77
<b>Obrázek 43:</b> Dekofeinizace dichlormetanem u vzorku Z6.....	77
<b>Obrázek 44:</b> Účinek organického rozpouštědla na zelená zrna kávy.....	78
<b>Obrázek 45:</b> Dekofeinizace pomocí superkritické fluidní extrakce při změně průtoku CO <sub>2</sub> . 79	79
<b>Obrázek 46:</b> Dekofeinizace pomocí superkritické fluidní extrakce – statické.....	79

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Procentuální obsah složení zelených kávových zrn .....	31
<b>Tabulka 2:</b> Hlavní třídy fenolických sloučenin ve vyšších rostlinách .....	37
<b>Tabulka 3:</b> Seznam analyzovaných vzorků zrnkové pražené kávy a jejich charakteristika ...	46
<b>Tabulka 4:</b> Seznam analyzovaných vzorků zrnkové zelené kávy .....	48
<b>Tabulka 5:</b> Seznam analyzovaných vzorku bezkofeinové kávy a jejich charakteristik .....	49
<b>Tabulka 6:</b> Koncentrační rozsahy standardů .....	51
<b>Tabulka 7:</b> Parametry kalibračních závislostí, koeficienty determinace ( $R^2$ ), meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé standardy .....	67

## SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
AA	antioxidační aktivita (antioxidant activity)
AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamid) dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2, 3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
C18	oktadecylsilikagel
CFQA	kafeoylferuoylchinová kyselina
CGA	chlorogenové kyseliny
CQA	kafeoylchinové kyseliny
3 – CQA	kyselina neochlorogenová
4 – CQA	kyselina kryptochlorogenová
5 – CQA	kyselina chlorogenová
CoQA	<i>p</i> -kumaroylchinová kyselina
CV	cyklická voltametrie (cyclic voltammetry)
diCQA	dikafeoylchinová kyselina
DPPH	1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl
ESR	elektronová spinová rezonanční spektrometrie (elektron spin resonance)
FCM	Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda
FRAP	snížení antioxidační kapacity pomocí železitých iontů (ferric reducing antioxidant power)
FQA	feruoylchinová kyselina
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-transform infrared spectroscopy)
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

LC	kapalinová chromatografie (Liquid chromatography)
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar electrokinetic chromatography)
NIR	blízká infračervená spektrometrie (near infrared spectroscopy)
NO•	radikál oxidu dusnatého
TBARS	látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou (thiobarbituric acid reactive substances)
TEAC	celková antioxidační aktivita vztažená ke standardní látce – Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin
TRAP	antioxidační parametr popisující celkový záchyt radikálů (total radical-trapping antioxidant parameter)
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
ORAC	kapacita absorbovat volné radikály kyslíku (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV-VIS	spektroskopie v UV/VIS oblasti (ultraviolet-visible spectroscopy)

## ÚVOD

Slovo káva vzniklo z arabského výrazu „gahwah“. Arabové názvem „gahwah“ v 17. století označovali nápoje rostlinného původu [1].

Káva je hlavní komoditou ve světové ekonomice. Mezi nejrozšířenější druhy patří *Coffea arabica* a *Coffea canephora* (robusta). Robusta se považuje za méně kvalitní druh kávy a používá se převážně jen ve směsích. Výhodou daného kávovníku je příjemná chuť i vůně. Preference různých druhů kávových nápojů je spojena se sociálními zvyklostmi a venkovskými kulturami [2].

Přibližně jednu desetinu světové produkce tvoří kávová zrna zbavená kofeinu. Postupy výroby této kávy jsou technologicky a tím i ekonomicky velmi náročné. V průběhu procesu navíc dochází k odstranění některých chuťových a vonných složek [1].

Káva obsahuje více než 2000 různých složek, přičemž některé z nich existují v malých množstvích včetně sacharidů, dusíkatých látek, lipidů, minerálů, kyselin a esterů. Dnes je káva považována za funkční potravinu, především kvůli vysokému obsahu sloučenin s antioxidačními a dalšími příznivými biologickými vlastnostmi [3].

Antioxidanty jsou přírodní látky, které se nachází v některých potravinách, jako je ovoce, zelenina, káva, čaj. Velkou a velmi významnou skupinu látek s antioxidačními účinky tvoří polyfenoly. Mezi nejzastoupenější polyfenol v kávě patří kyselina chlorogenová. Jedná se o kombinaci kyseliny kávové a chinové [4].

Chlorogenové kyseliny jsou látky s vysokou antioxidační aktivitou. Množství chlorogenových kyselin je nepřímo spojeno s kvalitou šálku. Vysoké množství v zelené kávě může způsobit nežádoucí příchut' v důsledku produktů oxidace, vzniku fenolů a katecholů. Obsah chlorogenových kyselin u druhů *Coffea canephora* a *Coffea arabica* se značně liší. Je to asi 4,0 – 8,0 % v *Coffea arabica* a 6,0 – 11,5 % v *Coffea canephora var. robusta* [5].

Studie prokázaly pozitivní vliv konzumace kávy na různé zdravotní problémy, jako jsou psychoaktivní odezvy (pozornost, náladovost), neurologické podmínky (Parkinsonova nemoc), metabolické poruchy (diabetes, žlučové kameny) a funkce jater. Tyto příznivé účinky jsou důsledkem především kofeinu a chlorogenových kyselin [3, 5, 6].

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Historie kávy

Existují dva příběhy o původu kávy. První příběh pochází od arabského lékaře a alchymisty Rhazese z 10. století, který se jako první zmiňuje o léčivých účincích kávy a nazývá ji „bunca“. Druhý příběh vypráví o etiopském pastevci koz, který si všiml veselého chování stáda po požití červených bobulí. Účinky popsal mnichům z nedalekého kláštera, kteří připravili z kávových zrn nápoj. Odtud došlo k rozšíření mezi prostý lid [7].

Pravlastí kávy je Etiopie (provincie Kaffa), kde se dodnes nachází divoce rostoucí keře kávovníku. Z dané oblasti byl ve 13. a 14. století přenesen válečníky do Jemenu a kultivován. Pěstování kávy bylo až do začátku 19. století výsadou převážně obyvatelů Arabského poloostrova. Pro místní zemědělce se stala káva nejvýznamnějším zdrojem příjmů. Ovšem Holanďanům patří největší zásluha rozšíření pěstování kávy i v jiných oblastech světa. Ti tajně přivezli na počátku 17. století kávová semena z Jemenu. Rozhodli se pro pěstování kávovníků ve svých koloniích a kultivovat první keře v Indii, Indonésii a později na Jávě. Do Střední Ameriky byl v roce 1720 přivezen první kávovník francouzskými kolonisty, odkud se pak rozšířil do Brazílie a ostatních zemí Jižní Ameriky. V 19. století prožívá kávová kultura svůj největší rozmach [7].

## 1.2 Kávovník a jeho pěstování

Kávovník, který patří do rodu *Coffea* je velmi početnou skupinou nižších tropických a subtropických rostlin, který řadíme mezi stálezelené ovocné dřeviny čeledi mořenovitých (*Rubiaceae*). Tato čeleď zahrnuje 450 rodů a 6500 druhů [1, 8, 9].

Jejich vzrůst se pohybuje od nízkých keřů až k patnáctimetrovým stromům v závislosti na přírodních podmínkách, druhu a nadmořské výšce. První úroda kávovníku začíná zhruba 4 roky po výsadbě. Jejich produktivita se odhaduje na 30 až 40 let, životnost i na 100 a více let. Jedna rostlina je schopna vyplodit půl až jeden kilogram kávových surových plodů za rok [1]. Podle podnebí rostou kávovníky buď v podrostu vyšších stromů, chráněné před ostrým sluncem, nebo na přímém slunci v oblastech, kde slunce nepálí tak silně. Ke svému růstu potřebují teplejší klima, proto jsou pěstovány po celém světě v oblasti rovníku, takzvaném „kávovém pásu“, který se nachází mezi obratníky Raka a Kozoroha. Jedná se o státy



Střední a Jižní Ameriky, Karibiku, rovníkové Afriky, Madagaskaru, Indie a Jihovýchodní Indie. Odtud plody putují zpracované do dalších zemí celého světa [10].

Kávovníkové listy jsou zeleno-žluté barvy s voskovitým povrchem. Okraje listů bývají mírně zvlněné. Vrch a konec listu bývá vždy špičatý, což je charakteristickou vlastností všech druhů kávovníku. Obsah kofeinu je v kávovníkových listech nejvyšší [1, 10].

Kávovník v době květenství má bílé či žluté voňavé květy podobné jasmínu (Obrázek 1). Červené plody kávovníku nazýváme kávové třešně. Zajímavostí je, že rostlina může mít zároveň květy, tak zralé i nezralé plody [1, 10].



**Obrázek 1: Květy kávovníku arabského [11]**

Plodem je oválná, asi 1,5 cm velká většinou dvousemenná peckovice. Vnější vrstvu peckovice tvoří blanitá slupka (exokarp) určující barvu třešně (Obrázek 2). Směrem do středu následuje dužina (mezokarp). V dužině se nacházejí dvě zelená kávová zrna, která jsou k sobě otočená plochou stranou. Každé zrno je obaleno speciální rohovitou vrstvou nazvanou pergamen (endokarp). Dále jsou zrníčka potažena stříbřitou blankou-osemením (integument). V některých případech se v plodu vyvine jen jedno zrníčko, potom mluvíme o perlové kávě [1, 12].

Brazílie patří mezi největší producenty kávy na světě, vyprodukuje kolem 30 % celosvětové produkce. Na druhém místě je Vietnam s 18 %, dále Kolumbie, Indonésie, Etiopie, Mexiko, nebo také Uganda. Dané země patří mezi největší vývozce kávy na světě, ale existují i jiní pěstitelé, jako je Kostarika, Jamajka a Jižní Amerika [13].



**Obrázek 2: Plody kávovníku arabského [14]**

### **1.3 Druhy kávovníku**

Pro potravinářské účely se pěstují zejména dva druhy, a to arabika (*Coffea arabica*) a robusta (*Coffea canephora*). Kávovníků existuje celá řada, je to například *Coffea liberica* nebo *Coffea excelsa*. Druhy kávy se poté dělí na jednotlivé odrůdy, jejichž název je odvozen od místa pěstování [1, 9, 10, 13].

#### **1.3.1 *Coffea arabica***

Arabika je považována za nejkvalitnější kávu, která tvoří zhruba 80 % celosvětové produkce hlavně pro svou lahodnou chuť a aroma. Obsahuje méně kofeinu než robusta a její chuť je méně či více kysele zbarvená. Chuťové vlastnosti jsou ovlivňovány různými faktory, jako je zpracování, způsob a délka pražení, či samotná příprava kávy [10, 13].

Kávovník roste v nadmořských výškách 600 až 2000 metrů, v průměrné teplotě 20 °C a vysoké vlhkosti. Kávovník arabský je stálezelený keř až nízký strom dorůstající výšky 3–5 metrů. Za příznivých podmínek rozkvétá a plodí již po třech letech, přičemž přiměřené výnosy lze očekávat od 6 roku po výsadbě [9, 10].

V důsledku vzrůstající oblíbenosti kávy roste i počet druhů vzniklých šlechtěním či křížením. Kromě základní odrůdy *Coffea typica*, známe například *Coffea bourbon*, *maragogipe*, *mundo novo* nebo *Coffea geisha* [1, 10].

### **Coffea typica**

Jedná se o základní druh arabiky, ze kterého se vyvinula celá řada odrůd. Typika pochází z Etiopie. Jedná se o odrůdu, která byla klasifikována prvně jako kávovník arabský. Typika má velmi nízkou produkci, je však známa pro svou sladkou chuť s výraznou kyselinkou. Daná odrůda dorůstá výšky zhruba 4 metrů [1, 10].

### **Coffea bourbon**

Pochází z Brazílie, odkud se dostala na plantáže ostatních pěstitelských zemí Latinské Ameriky. Je charakteristická svým pyramidovitým tvarem. Dorůstá výšky 2 metrů a je odolná vůči velkému suchu. Má poměrně malé plody žluté až červené barvy, které rostou blízko sebe. Rychle dozrávají a při nepříznivém počasí rychle opadávají. Tato odrůda je výjimečná svým nízkým obsahem kofeinu 0,4 – 0,8 %. Její obliba vzrůstá díky ovocné chuti doprovázené sladkými tóny. Výnosnost odrůdy bourbon je vzhledem k typice o 30 % vyšší, sklizeň však bývá menší, než u ostatních odrůd [10].

### **Coffea maragogipe**

Maragogype vznikla mutací odrůdy typika v Brazílii. Jedná se o mohutný typ kávovníku s výrazně většími listy. Kávová zrna u tohoto plodu se řadí mezi největší na světě. Daná odrůda se prokazuje s vyváženou ovocnou chutí s nízkou aciditou a lehkým kouřovým charakterem [10].

### **Coffea mundo nuovo**

Jedná se o přírodní hybrid typiky a bourbonem, pěstovaný převážně v Kolumbii a Brazílii. Tato odrůda je odolná vůči chorobám. Uzrává o něco později než ostatní druhy [10].

### **Coffea geisha**

První zmínky o této odrůdě pochází z Etiopie, ta se vyznačuje výrazně sladkou chutí s tóny lesního ovoce [10].

### ***1.3.2 Coffea canephora***

Mezi druhý nejčastěji pěstovaný kávovník patří *Coffea canephora*. Světová produkce představuje 30 až 35 %, avšak podíl se neustále zvyšuje z důvodu náchylnosti kávovníku arabiky k různým chorobám. Mezi největší producenty patří Vietnam a Brazílie [1, 10].

Rostlina kávovníku dorůstá až 13 metrů a vyžaduje teplotu do 30 °C. Pěstuje se v nižších nadmořských výškách 200–600 metrů nad mořem. Kávovník robusta poskytuje první úrodu již 2 roky od výsadby [10].

Hlavními rozdíly mezi kávou odrůdy arabika a robusta je kvalita a vyšší obsah kofeinu. Kvalita robusty je mnohem nižší, má velmi často hořkou a zemitou chuť. Robusta obsahuje dvojnásobné až čtyřnásobné množství kofeinu (1,7 – 4 %) než arabika (0,8 – 1,4 %). Třetím významným rozdílem je tvar zrna. Zrna robusty bývají oproti arabice vypouklejšího a zaoblenějšího tvaru s rovnou rýhou uprostřed (Obrázek 3). Zbarvení robusty bývá bledě zelené s našedlými odstíny, naproti tomu zrno arabiky je ploché a protáhlé s pokřivenou rýhou. Arabika má jemně zelenou barvu, v některých případech s namodralým tónem [10]



**Obrázek 3: Rozdíly odrůdy arabika (vlevo) a robusta (vpravo) [15]**

### ***1.3.3 Coffea liberica***

Pochází z Afriky, pěstuje se v Jižní a Střední Americe, Indonésii nebo Polynésii. Daný druh zaujímá asi 1 % světové spotřeby kávy [1].

Jedná se o silnou, mohutnou dřevinu, dorůstající do výšky až 20 metrů. Semena mají hořkou, trpkou chuť, proto se používají převážně do směsí [1].

## **1.4 Technologie zpracování kávy**

Výrobu kávy lze rozdělit do několika etap: sběr kávy, zpracování zrn, sušení, loupání, leštění, třídění a přebírání, přeprava a pražení kávy [1, 10, 13].

### **1.4.1 Sběr kávy**

Po uzrání plodů kávovníku přichází na řadu sběr. Kvalita sběru plodů kávovníku je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují jakost kávy. Plody kávovníků se začínají sklízet v době, kdy jsou dostatečně vyzrálé, což se projeví u většiny odrůd červeným zbarvením. Doba sklizně se liší v závislosti na klimatických podmínkách. Nejprve dochází ke sběru na plantážích s nižší nadmořskou výškou, neboť kávovníkové bobule zde dozrávají mnohem rychleji, poté sběrači postupují do vyšších poloh. Kávovníková zrna z nižších poloh jsou méně kvalitní, a proto na trzích levnější. Ve vyšších polohách kávovníková zrna zrají mnohem pomaleji, což se projeví vstřebáním některých látek (například sacharidů) do zrn [1, 10].

#### **1.4.1.1 Ruční sběr**

První možností ručního sběru je tzv. pásová metoda. Při dané technice se celá úroda posbívá jedním přechodem sběračů přes plantáž. Tímto způsobem se zpravidla sklízí druh robusta. Druhá metoda, tzv. výběrová, vyžaduje několik přechodů přes plantáž v intervalech optimálních pro postupné dozrávání kávových třešní, neboť kávové bobule na každém keři nedozrávají ve stejnou dobu [1, 10, 16].

Obě metody jsou časově náročné, proto je takto sbíraná káva dražší, ale také kvalitnější. Při tomto způsobu sběru nedochází k poškození kávovníků ani zelených, ještě nezralých plodů. Ruční způsob sběru zamezuje načasování nevhodných plodů, které by potom mohly zničit celou sklizeň. Říká se, že takto závadná zrna mají „lišku“ [1, 10].

Ruční metody sběru kávovníkových plodů jsou využívány hlavně v zemích s levnou pracovní silou, jako je Střední Amerika a Jižní Amerika, Etiopie, Keňa, Indie a v mnoha dalších [1].

### **1.4.1.2 Česání**

Další možností ručního sběru je tzv. stripping, česky česání. Sběrači berou do ruky celou větev kávovníku. Začínají od kmene stromu nebo keře až po okraj větve. Při této metodě jsou z rostliny ručně setřeseny všechny plody, které se na větvi nacházejí, včetně plodů nezralých a poškozených. Nasbírané plody se musí dále třídít. Strippingem sbírají kávové plody zejména farmáři v Brazílii. Tato metoda je sice rychlá, ale již není šetrná k samotným kávovníkům [1].

### **1.4.1.3 Strojový sběr**

Možnost strojového sběru využívají zemědělci na velkých plantážích v nižších nadmořských výškách, kde je rovná půda. Speciální stroj podobný kombajnu jezdí přes kávovníky nebo mezi řádkami vysázených kávovníků a strhává všechny kávovníkové bobule, listy a větvičky. Daná metoda dosahuje stejných výsledků jako stripping, jen je o něco rychlejší a méně šetrnější ke kávovníkům i plodům samotným. Tento způsob sběru se využívá ve velkém v Brazílii, Austrálii a v dalších zemích [1, 16].

## **1.4.2 Zpracování zrn**

Po sběru plodů se kávovníkové bobule zpracovávají a jsou z nich získávána zelená kávovníková zrnka. Toto zpracování má značný vliv na kvalitu, chuť i cenu kávovníkových zrn. Existují dvě základní metody způsobu izolace kávovníkových zrn: suché a mokré zpracování nebo méně běžná kombinace suché a mokré metody (polopromyté zpracování). Metody zpracování se liší nejen technikou, ale i různým stupněm náročnosti na práci a energii [1].

### **1.4.2.1 Suchý způsob zpracování**

Suchý způsob zpracování patří mezi nejjednodušší a nejlevnější metody zpracování kávovníkových zrn. Suchá metoda zpracování se využívá především pro méně kvalitní zrna. Zralá zrna se nejprve zbaví zeminy a dalších nečistot. Poté se rovnoměrně rozprostřou na betonový či cihlový povrch a jsou vystavena přímému slunečnímu svitu. V průběhu sušení se zrna v pravidelných intervalech opětovně rozprostírají, aby se zabránilo fermentačním pochodům [1, 10, 12, 17, 18].

Na některých plantážích zemědělci využívají mechanické sušičky k urychlení procesu sušení. Zhruba po čtyřech týdnech intenzivního sušícího procesu klesne obsah vlhkosti každé bobule na 12 %. Vnější obal kávovníkových bobulí zhnědne a stane se křehkým. Když jsou zrna suchá, následuje loupání vysušené vnější slupky s dužinou, které se provádí pomocí speciálních loupacích strojů [1, 10, 12, 13, 17].

Následuje čištění a třídění podle velikosti a kvality na mechanicky ovládaných vibračních sítích. Usušená zrna se po vyloupání skladují měsíc, nebo dva měsíce, a poté putují do celého světa [1].

Zrna kávy, která farmáři zpracují tímto způsobem mají silnější a výraznější tělo. V průběhu sušení pronikají různé látky ze slupky a dužiny do zrn, které se pak projeví sladkou, medovou, oříškovou či čokoládovou chutí. Tento postup zpracování se využívá především v Brazílii, Arábii a Indii [1, 10, 13, 19].

Výhodou této metody je jednoduchost nebo také nízké náklady na realizaci. Nevýhodou je vysoká časová náročnost, neschopnost oddělení uschlých, nahnilých či jinak znehodnocených semen nebo také vyšší náchylnost k mikrobiálnímu napadení [1, 10].

#### **1.4.2.2 Mokrý způsob zpracování**

Proces zpracování mokrou cestou je metodou mnohem náročnější. Výsledkem procesu je získání kvalitních zrn arabiky velmi šetrným způsobem. Na jeden kilogram zelených kávovníkových zrn spotřebují zemědělci 120 až 160 litrů vody. Mokrý způsob zpracování zajistí kávě svěžší ovocnou, květinovou a kyselejší chuť [1, 10, 13, 18].

Kávovníkové bobule se nejprve nashromáždí ve vodních nádržích, kde dojde k zbavení nečistot a k dokonalému oddělení seschlých, nedozrálých či poškozených plodů od bobulí plně vyzrálých, což má velký vliv na konečnou jakost kávy. Ihned po promytí následuje strojní krok, kde se oddělí vnější obal a část dužiny od semene v pergamenové slupce. Důležité je, aby k oloupání došlo do 24 hodin od sklizně. Pokud k oloupání nedojde včas, slupka s dužinou přisychá k zrnům, čímž jdou oddělit od kávovníkového zrna obtížněji, v takovém případě může dojít i k poškození zrn [1, 10, 12, 17].

Po odstranění dužiny se kávová zrna nasypou do kvasných nádrží, kde probíhá proces fermentace. Působením enzymů dochází k rozpuštění zbytků dužiny a k odstranění lepkavé vrstvičky obklopující kávová zrna. Délka fermentace trvá přibližně 12-72 hodin. Dobu kvašení ovlivňuje řada faktorů jako je množství mikroorganismů v nádrži, okolní teplota, ale

také síla zbytku dužiny a pergamenu. Při překročení požadovaného časového rozpětí by zrna mohla začít hnit a mohlo by dojít k znehodnocení celé várky [1, 10, 13].

Po tomto způsobu zpracování následuje finální promývání semen vodou v tzv. pračkách. Po mokrému zpracování obsahují zrna 50 % vlhkosti, aby mohla být káva skladovatelná je nutné snížit vlhkost na 11 %, aby se zrna mohla uskladnit a neplesnivěla. Tato káva se rozloží na betonové desky a nechá sušit na slunci [1, 10, 13].

### **1.4.2.3 Polopromytý způsob zpracování**

Posledním způsobem zpracování je kombinací suché a mokré metody. Sklizené kávovníkové třešně putují z plantáže přímo do vodní lázně, kde probíhá selekce zralých a nezralých plodů. Takto vyříděné plody se přepraví do loupacích strojů, kde jsou postupně zbaveny vrchní slupky i části dužiny. Poté pěstitelé nechávají zrnka schnout na slunci, podobně jako je tomu u suché metody zpracování. I u tohoto způsobu je nutné zrna v pravidelných intervalech promíchávat. Dokonce několikrát denně, aby nezačala plesnivět [1, 10].

Svrchní obaly zrna obsahují nejvyšší procento sacharidů, které se postupem času uvolní z dužiny do zrn. Po usušení dojde k odstranění zbytku dužiny ručním, nebo mechanickým způsobem. Takto zpracovaná kávovníková zrna jsou nasládlá, plná s výrazně jemným tělem neobsahující příliš kyselé tóny [1, 10, 17].

Při dané metodě nedochází k promývání větším množstvím vody, což znatelně snižuje náklady. Další výhodou je zpracování kávovníkových zrn přímo na plantáži [1, 10, 17].

### **1.4.3 Loupání a leštění zrn**

Po zpracování všemi způsoby se před exportem ze zrněk odstraňuje pergamenová slupka. K odstranění pergamenové slupky dochází pomocí speciálních strojů. U zrn zpracovaných mokrou metodou dochází k odstranění obtížněji než u zrn zpracovaných suchou metodou. Následně jsou zrna tříděna podle velikosti, barvy a hustoty. Při třídění dochází k odstranění defektních zrn. Na menších farmách probíhá třídění ručně, větší továrny využívají k třídění stroje [1, 10, 16, 17].

Pergamen neboli stříbrná blanka, která na kávovníkových zrnech po oloupání zůstala se odstraňuje leštěním. To dodá zrnům lesklý a příjemný povrch. K leštění dochází pomocí speciálně konstruovaných strojů, která mohou zrna spálit. Někteří odběratelé vyžadují na zrnech zbytek pergamenu [1, 10, 13].



Po zpracování zrna čeká jednoměsíční až dvouměsíční pauza, kdy si musí po zpracování „sednout“. V době před vývozem obsahují zhruba 10–13 % vlhkosti. Zrna arabiky se vyvázejí dříve než zrna robusty [1, 10].

#### **1.4.4 Vývoz zrna a doprava**

Každý rok se průměrně vyprodukuje 5–6 milionů tun zelené kávy a každý rok vývoz narůstá. Do celého světa putuje nejvhodnějším způsobem. Nejčastěji lodní dopravou, nákladními auty a dnes i letecky [1,13].

Roztříděná zelená káva se balí před exportem do jutových pytlů (žoků) a takto připravená se uloží do kontejnerů. Během přepravy může dojít k poškození kávy různými škůdci, ale také vlhkem nebo plísní. Poté káva putuje přímo do pražírén nebo na kávovou burzu [1, 13].

Každá odrůda kávy má svou specifickou a typickou chuť. Z tohoto důvodu vznikly směsi různých druhů arabiky, případně v kombinaci s robustou, nejčastěji v poměru 70:30. Takové směsi označujeme jako vícedruhové [1].

#### **1.4.5 Pražení**

Jedná se o chemický proces, jehož výsledkem je tvorba tmavého pigmentu, kávového aroma a jiných vlastností spojených s pražením kávy. První pokusy o pražení kávy spočívaly pálením semen na přímém ohni, později na železných pánvích. Kultivovaného procesu pražení se začalo využívat okolo roku 1700 v západní Africe a na Arabském poloostrově [1, 10, 17, 20].

Míra pražení závisí na zvyklostech v jednotlivých zemích, například Severské země vyhledávají světle praženou kávu, naopak Francie, Itálie a státy jižní Ameriky upřednostňují tmavě praženou kávu (Obrázek 5).

##### **1.4.5.1 Proces pražení**

Každá pražírna má svou pražičku (Obrázek 4), kde dochází k pražení. Pražičky mohou mít kapacitu od několika desítek kilo, až po stovky kilo kávy. Dnešní doba umožňuje pražit kávu doma, a proto obchody s kávou nabízejí také domácí malé pražičky [10].



**Obrázek 4: Pražička [21]**

Pražička se skládá z trychtýřového zásobníku, do kterého se sype určitá a přesná dávka zelených kávových zrn. V daný okamžik musí pražička pracovat za vysokých teplot, okolo 200°C. Zelená zrna putují do bubnu pražičky, který se točí po celou dobu pražení tak, aby se zabránilo přepražení a dosáhlo rovnoměrného upražení zrn. Ve chvíli, kdy zelená zrna spadnou do bubnu, dojde k snížení teploty pražičky. Pražení probíhá 10 až 15 minut. Zhruba po 9 minutách je slyšet takzvané první prasknutí (first crack) [10, 16, 17].

Po prvním „cracku“ praská buněčná struktura a v zrně se začínají odehrávat důležité chemické a fyzikálně chemické reakce. V důsledku vysokých teplot uniká ze zrna veškerá vlhkost a mění se velikost zrna zhruba o 40 %. Dále dochází k úniku oxidu uhličitého a degradaci proteinů na jednodušší peptidy. Škroby, které jsou přítomné v zrně, se mění na jednoduché sacharidy, a ty reagují s bílkovinami za vzniku takzvaných melanoidů. Při teplotě 160–220 °C dochází k barevné změně kávovníkového zrna z původně světlezelené až na tmavohnědou barvu. Nyní se vytváří již zmíněné melanoidy, látky s antioxidačními vlastnostmi. Ke konci procesu pražení dochází k pronikání kávového oleje na povrch zrněk. Jedná se o chemický proces nazvaný pyrolýza. Tyto oleje jsou ve vodě rozpustné a jsou nosičem chuti a vůně kávy. V této fázi vznikají první těžké aromatické kyseliny, skutečná chuťová vlastnost zrna, ale i finální vůně. Většina látek obsažených v upraženém zrně je ve vodě rozpustná, díky tomu dochází k extrakci do šálku [1, 5, 10, 13, 17, 22].

Po 5–6 minutách od prvního „cracku“ dochází k druhému prasknutí (second crack). Pokud se zrna praží déle než do druhého prasknutí, jsou přepálená. Přepálená káva způsobuje nahořklou chuť a zbavuje kávu originální chutě odrůdy kávy [10, 13],

## Stupně pražení

Příklady pojmenování používaných stupňů pražení:

- a) Light Cinnamon – velmi světle hnědé zrno s výrazně kyselými tóny
- b) Cinnamon – světle hnědé zrno s chutí toustů, výrazně kyselé tóny
- c) New England – světle hnědá barva s kyselou chutí, odpadá chlebová chuť, v této fázi začíná první crack
- d) American, Light City – tmavší světle hnědá barva, sladší chuť, končí první crack
- e) City Plus, Medium – středně hnědá barva zrn, vysoká koncentrace důležitých chutí najednou
- f) Full City – středně tmavá hnědá barva, povrch pokryt částečně olejovými skvrny, sladce hořké tóny
- g) Light French – tmavší hnědá zrna s výrazně velkými olejovými flíčky, hořko–sladká chuť s karamelovými tóny, zrnka ztrácejí kyselost
- h) French – tmavě hnědá zrna, vysoká koncentrace oleje na povrchu, lehce spálené tóny, kyselost mizí
- i) Italian – velmi tmavá kávová zrna, silnější spálené tóny, žádná kyselost
- j) Spanish – hodně tmavá zrna, téměř černá, olejovitý povrch, prázdná, hořká, spálená chuť



Obrázek 5: Tvar a barva kávovníkového zrna v průběhu pražení [23]

### 1.4.6 Chlazení upražených kávovníkových zrn

Po upražení se kávová zrna vypustí z pražicího bubnu do speciálního kruhového tanku a káva se zprudka ochladí proudem chladného vzduchu [10].

### 1.4.7 Mletí

Extrakce samotných kávovníkových zrn je zcela neúčinná, proto je pro přípravu nápoje nutné zrna umlít. Dosahuje se tím rychlejšího vyluhování kávy v horké zálivce. V současné době jsou k dispozici různé druhy a technologie pro mletí kávy. Historické kávomlýnky byly nahrazeny ručními a elektrickými mlýnky [1].

Mletím se otevírají buňky kávových zrn a tím se uvolňují éterické oleje a plyny, které postupně mizí a káva tak ztrácí svou typickou plnou chuť a vůni. U extrémně pomleté kávy dochází k narušení kávového tuku, který pak rychle žlukne a urychluje zkázu kávovníkového zrna. Z tohoto důvodu je nejvhodnější kávu semlít těsně před jejím použitím. Hrubost umleté kávy je důležitá pro správnou přípravu druhů káv (Obrázek 6). Například hrubě mletá káva se užívá pro přípravu turecké kávy, kdy je extrakce málo intenzivní, ale dlouhotrvající [1, 10]



**Obrázek 6: Hrubost mleté kávy [24]**

Mletá káva je náchylná na skladovací podmínky, neboť kávovníková zrna mají schopnost pohlcovat vlhkost a všechny cizí okolní pachy. Na vzduchu ztrácí těkavé látky i své aroma. Z tohoto důvodu je důležité kávu co nejrychleji zabalit do obalů s inertní atmosférou. Takto připravená káva putuje již ke spotřebitelům [1, 13].

## **1.5 Bezkofeinová káva (dekofeinizace)**

### **1.5.1 Proces dekofeinizace**

Bezkofeinovou kávou se rozumí pražená kávovníková zrna se sníženým obsahem kofeinu. Při přípravě bezkofeinové kávy dochází k odstranění chuťových a aromatických složek. Proces, při kterém se z nepražených (zelených) kávovníkových zrn odstraní téměř veškerý kofein, se nazývá dekofeinizace [1, 13].

Dnes jsou známy na světovém trhu 2 druhy bezkofeinových kávovníkových zrn. První jsou kávová zrna pražená bez kofeinu, u kterých byl kofein odstraněn až na minimální možnou hranici 0,1 % kofeinu. Druhý typem jsou vyšlechtěné odrůdy kávovníků s nízkým obsahem kofeinu, jehož množství nepřesahuje 0,2 % [1, 13].

### **1.5.2 Způsoby odstranění kofeinu z kávových zrn**

Kofein z kávových zrn lze odstranit několika způsoby. Prvním způsobem je nepřímá metoda, při které se využívá odstraňování kofeinu pomocí organických rozpouštědel, mezi které patří dichlormethan, ethylacetát, dále také diethyléter, etanol nebo chloroform. Před samotnou extrakcí rozpouštědlem se zelená kávovníková zrna nejprve 30 minut napařují, čímž dochází k separaci kofeinu od kyseliny chlorogenové, na kterou je v zelené kávě vázán. Napařováním dochází ke zvětšení objemu zrn a otevření pórů, což usnadňuje průchod rozpouštědla a kontakt s extrahovanou látkou. Následuje krok máčení, který vede ke zvýšení vlhkosti až o 20 % (m/m). Namočená kávová zrna jsou poté extrahována rozpouštědlem. Účinnost extrakce kofeinu ze zelených zrn se liší v závislosti na teplotě a typu rozpouštědleh. Po extrakci se kávová zrna opakovaně napařují, aby došlo k odstranění zbytků rozpouštědla [1, 13, 17, 25 - 27].

Za nejlepší rozpouštědlo pro extrakci kofeinu byl do poloviny 70. let považován dichlormetan. Nicméně v posledních letech existují pochybnosti o jeho zdravotní nezávadnosti, a proto se od tohoto extrakčního rozpouštědla opouští [27].

Ethylacetát byl pro dekofeinizaci kávových zrn schválen od roku 1982. Byla popsána kontinuální metoda pro zrychlenou dekofeinizaci zelených kávových zrn zahrnující zvlhčení bobů s následnou extrakcí po dobu 3 až 5 hodin. Zbytkové rozpouštědlo bylo opět odstraněno napařováním [27, 28].

Kromě extrakce rozpouštědlem lze kofein odstranit z kávovníkových zrn pomocí superkritické tekutiny. Daná metoda probíhá nad kritickým bodem daného plynu a za

vysokého atmosférického tlaku. Pro extrakci kofeinu z kávovníkových zrn se nejčastěji používá oxid uhličitý [26]. V první fázi jsou kávovníková zrna napařována stejně jako u extrakce rozpouštědlem. Následně dochází k samotné extrakci superkritickým CO<sub>2</sub>. Metoda využívající k odstranění kofeinu superkritického CO<sub>2</sub> je vysoce technologicky náročný proces dosahující velmi vysokých výtěžků [1, 13, 26, 29].

Poprvé byla popsána studie dekofeinizace pomocí superkritického oxidu uhličitého v polovině šedesátých let. Navrhované procesní podmínky k odstranění kofeinu byly 70-90 °C při rozmezí tlaku 160-220 barů. Zvlhčená zelená zrna byla smíchána se superkritickým CO<sub>2</sub> při navrhovaných procesních podmínkách a po 10 hodinách extrakce byl téměř všechen kofein vyextrahován z kávových zrn [27, 30].

Dalším způsobem odstranění kofeinu je mokrá neboli švýcarská metoda, při které se používá jako extrakční činidlo voda a série filtračních uhlíkových zařízení. Principem této metody je namáčení zrn ve vodě, kdy dochází k vyluhování kofeinu. Nevýhodou je vymývání vonných těkavých látek extrakční vodou. Kofein je ze směsi separován pomocí filtrů s aktivním uhlíkem. Zbytková voda se zbývajícími vonnými těkavými látkami se odpaří na koncentrát, kterým se zrna postříkají, aby došlo k navrácení chutě a aromatu. Bezkofeinová zrna jsou dále sušena ve speciálních nádržích [1, 25, 26].

Bezkofeinová zrna se podílí 10 % na světové produkci kávy. Odstranění kofeinu je technologicky i ekonomicky náročné, navíc dochází společně k odstranění i některých aromatických složek. Proto většina bezkofeinových káv obsahuje chemické příměsi a cizorodé látky, které mají za úkol maskovat původní vlastnosti zrn, které se odstranily při procesu dekofeinizace. Připravená dekofeinová zrna se následně suší, balí a odesílají k pražení [1].

## 1.6 Složení kávy

Káva obsahuje řadu organických a anorganických látek (Tabulka 1), jejichž množství závisí na druhu, původu a způsobu pražení kávových zrn. V tabulce jsou uvedeny orientační hodnoty některých známých látek v hmotnostních procentech obsažených v zelených zrnech kávovníku [1, 9, 12].

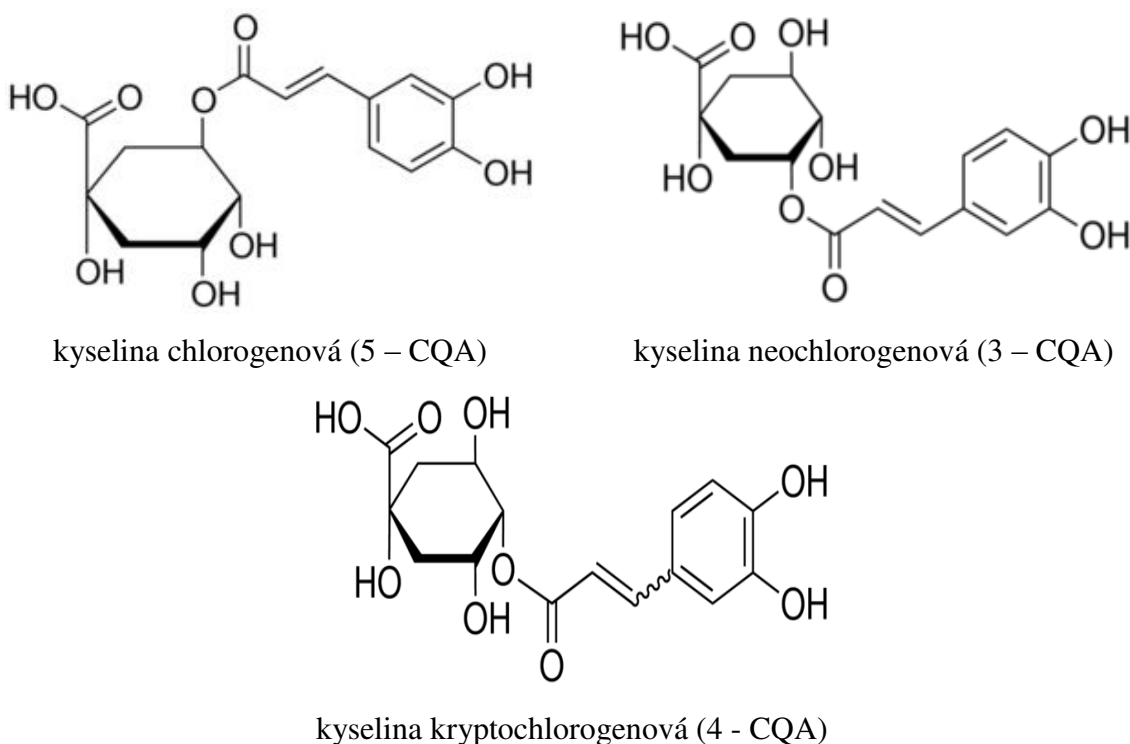
**Tabulka 1: Procentuální obsah složení zelených kávových zrn [1, 8]**

přítomná látka	arabika [%]	robusta [%]
<b>rozpustné sacharidy</b> glukóza, arabinóza, galaktóza, sacharóza	9,0 až 12,5	6,0 až 11,5
<b>nerozpustné sacharidy</b> polymery manózy, galaktózy, arabinózy; celulóza a hemicelulóza	46,0 až 53,0	34,0 až 44,0
<b>KYSELINY A FENOLY</b>	8,8 až 12,4	8,4 až 14,4
<b>těkavé kyseliny</b> kyselina octová, propionová, máslová, valerová	0,1	0,1
<b>netěkavé kyseliny</b> kyselina citrónová, malonová, chinová, kávová	2,0 až 2,9	1,2 až 2,2
<b>chlorogenové kyseliny</b>	6,7 až 9,4	7,1 až 12,0
<b>LIPIDOVÉ SLOUČENINY</b> kafestol, kahweol	15,0 až 18	8,0 až 12,0
<b>vosky</b>	0,2 až 0,3	0,2 až 0,3
<b>oleje</b> převážně estery kyseliny palmitové a linolové	7,6 až 17,8	7,6 až 17,8
<b>DUSÍKATÉ SLOUČENINY</b>	11,0 až 15	11,0 až 15
<b>volné aminokyseliny</b> kyselina glutamová, asparagová, asparagin	0,2 až 0,8	0,1 až 0,8
<b>bílkoviny</b>	8,5 až 12,0	8,4 až 12,0
<b>kofein</b>	0,8 až 1,4	1,3 až 4,0
<b>trigonelin</b>	0,6 až 1,2	0,3 až 0,9
<b>minerální látky</b> draslík, vápník, fosfor, železo, hořčík	3,0 až 5,4	3,0 až 5,4

### 1.6.1 Deriváty kyseliny chlorogenové

Deriváty chlorogenových kyselin (CGA) jsou hlavní třídou fenolických sloučenin s antioxidačními a protizánětlivými účinky. Bohatým zdrojem CGA jsou zelená kávová zrna, luštěniny, ovoce a zelenina. Vznikají esterifikací trans-skořicových kyselin jako je kyselina kávová, ferulová a *p*-kumarová s kyselinou chinovou. Před pražením kávových zrn mohou způsobit deriváty kyseliny chinové nežádoucí příchut' kávy, která je způsobena oxidačními nebo degradačními produkty [8, 12, 17, 32, 33].

Mezi hlavní deriváty patří kyselina kafeoylchinová (CQA), dikafeoylchinová (diCQA) a feruoylchinová (FQA). Méně časté *p*-kumaroylchinová (CoQA) a kafeoylferuoylchinová kyselina (CFQA). Každá z kyselin obsahuje nejméně tři izomery. Izomery kyseliny kafeoylchinové představují 80 % celkového obsahu derivátů chlorogenových kyselin. Mezi hlavní izomery kyseliny kafeoylchinové patří kyselina neochlorogenová (3-CQA), kyselina kryptochlorogenová (4-CQA) a kyselina chlorogenová (5-CQA, Obrázek 7). Chlorogenové kyseliny jsou prekurzorem fenolů a katecholů [8, 12, 17, 32, 33].



**Obrázek 7: Izomery kyseliny kafeoylchinové**



## 1.6.2 Minerální látky

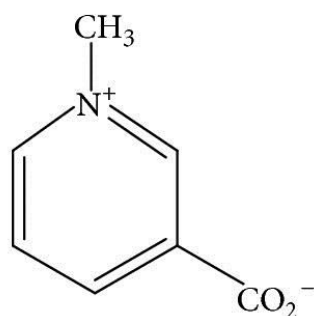
Nejvíce zastoupeným prvkem v kávě je draslík, který představuje 40 % obsahu minerálních látek. Dalším důležitým minerálem v kávě je fosfor, který tvoří 4 %. Zbývající obsah minerálů se skládá přibližně z 30 různých prvků, včetně sodíku, hořčíku, vápníku a síry. Ve stopovém množství jsou zastoupeny zinek, stroncium, křemík, mangan, železo, měď, baryum a jiné. Profil stopových minerálů v kávě bývá ovlivněn vnějšími podmínkami, zejména složením půdy [9, 17].

## 1.6.3 Proteiny, peptidy a volné aminokyseliny

Proteiny, peptidy a volné aminokyseliny jsou nezbytné pro aroma kávy. Dále se podílí při Maillardově reakci. Slouží jako prekurzory pro tvorbu těkavých sloučenin, jako jsou furany, pyridiny, pyraziny, pyrroly, aldehydy a melanoidy. Melanoidy jsou zodpovědné za barvu kávy a do určité míry také antioxidační aktivitu. Celkové dusíkaté sloučeniny (kromě kofeinu a trigonelinu) představují 9–16 % chemické kompozice zelené kávy [17, 34].

## 1.6.4 Trigonelin

Trigonellin (n-methyl-nikotinát, Obrázek 8) je alkaloid, který vzniká pražením zelených kávovníkových zrn. Jedná se o derivát kyseliny nikotinové, látky známé jako niacin. Trigonelin působí na organismus povzbudivě, navíc má antiseptické, hypoglykemické a hypocholesterolemické účinky. Účinkuje též proti migrénám a jako antikarcinogen [1, 17, 36].



Obrázek 8: Trigonelin [35]

### 1.6.5 Lipidy

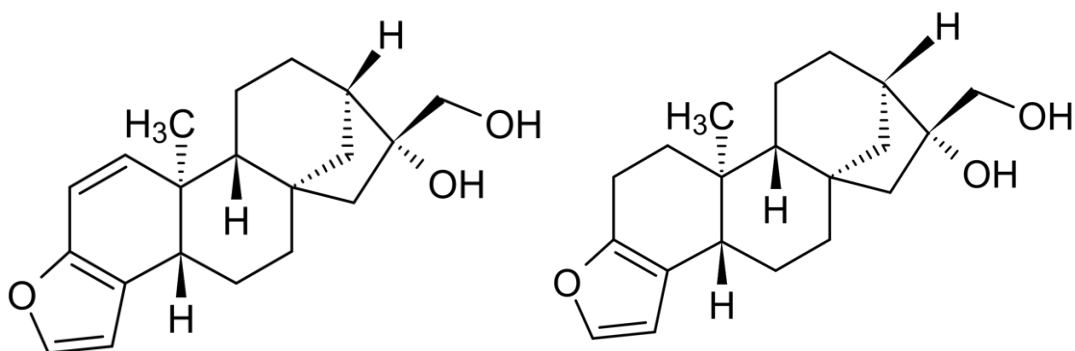
Lipidy jsou hlavní složkou kávy a jejich celkový obsah se liší mezi druhy *Coffea arabica* (15 – 18 %) a *Coffea canephora* (8 – 12 %). Většina lipidů se nachází v endospermu kávových semen, pouze malé množství kávového vosku je umístěno ve vnější vrstvě [17].

Kapalná frakce kávy se skládá převážně z triacylglycerolů (75 %), volných mastných kyselin (1 %), sterolů (2,2 % neesterifikovaných a 3,2 % esterifikovaných), tokoferolů (0,05 %), diterpenů (do 20 % celkové lipidové frakce) a diterpenických alkoholů (kafestol a kahweol).

V kávě převažují nenasycené mastné kyseliny. Triacylglycerovou frakci tvoří převážně kyselina linoleová, olejová a linolenová. Mastné kyseliny jsou nejen důležité pro zdraví, ale také k udržení čerstvosti kávy a k zabránění stárnutí, které je způsobené hydrolýzou a oxidací triacylglycerolů [17].

Kávové sloučeniny kafestol a kahweol jsou pentacyklické diterpenové alkoholy na bázi kauranového skeletu. V roce 1971 byl identifikován kafestol v semenech robusty, zatímco zrna arabiky obsahovala obě sloučeniny. Tyto bioaktivní sloučeniny a jejich deriváty, což představují převážně soli, estery nasycených mastných kyselin a nenasycených mastných kyselin představují přibližně 20 % lipidové frakce kávy [17, 37 - 39].

Kafestol a kahweol (Obrázek 9) jsou sloučeniny, které mohou způsobit zvýšenou hladinu sérového cholesterolu. Obě sloučeniny jsou extrahovány horkou vodou, ale jsou zadržovány papírovými filtry, což vysvětluje, poměrně vysoké množství kafestolu a kahweolu v turecké kávě [17, 34, 37, 38].



**Obrázek 9: Kafestol (vpravo), kahweol (vlevo) [35]**

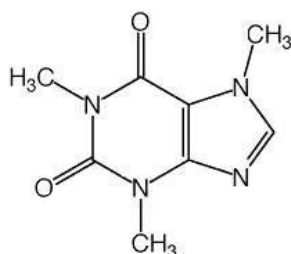
### 1.6.6 Sacharidy

Sacharidy jsou hlavními složkami kávy a tvoří více než 50 % sušiny. V tomto množství najdeme různé polysacharidy, oligosacharidy, disacharidy a monosacharidy, ať už redukující, nebo neredukující. Sacharidy působí jako stabilizátory pěny a přispívají k chuti nápoje, neboť procházejí komplexními změnami (reagují s aminokyselinami) během procesu pražení. Širokou škálu tvoří polysacharidy (arabinogalaktan, galaktomanan a celulóza), představují přibližně 44 % sušiny v druhu *coffea arabica* a 47 % sušiny v *coffea canephora*. Obsah polysacharidů je během pražení snížen z důvodu degradace na nízkomolekulární sacharidy. Dále byly identifikovány oligosacharidy, jako je rafinóza a stachyóza a malé množství jednoduchých cukrů, jako je fruktóza, glukóza, manóza, arabinóza nebo rhamnósa. Sacharóza je hlavní volný cukr přítomný v zelené kávě. Jeho množství je závislé na druhu kávy. Arabika obsahuje až 9 % sacharózy, kdežto robusta přibližně o polovinu méně [17, 40 - 44].

### 1.6.7 Kofein

Kofein (1,3,7 – trimetylxantin, Obrázek 10) je purinový alkaloid stimulující centrální nervový systém. Jedná se o nejrozšířenější psychotropní látku. Je přítomen v širokém spektru potravin, nápojů a rostlin. Hlavními zdroji jsou kávová zrna (*Coffea arabica* a *Coffea canephora*), kakaové boby, čajové listy a kolovník. Lze ho synteticky vyrobit pro použití jako potravinářská přídatná látka, doplněk stravy nebo ve farmaceutických přípravcích, kde syntetický kofein je totožný s přírodním [8, 9, 46 - 48].

Vzhledem k jeho známým povzbuzujícím účinkům se běžně používá k posílení duševní nebo fyzické výkonnosti. Kofein je antagonist adenosinu, který se absorbuje rychle po požití. Dosahuje maximálního účinku během 30 minut. Je metabolizován lidskými játry za vzniku tří hlavních metabolitů, teobrominu, paraxantinu a teofylinu [46 - 48].



Obrázek 10: Kofein [45]

## **1.7 Fenolické sloučeniny**

Fenolické sloučeniny jsou všudypřítomnými složkami vyšších rostlin, které se nacházejí v širokém spektru běžně konzumovaných rostlinných potravin, jako je ovoce, zelenina, obiloviny, luštěniny a v nápojích rostlinného původu, jako je čaj, káva nebo také víno. Tyto sloučeniny jsou sekundárními metabolity rostlin, které chrání před škodlivými vlnovými délkami ultrafialového záření nebo agresi patogenů a mají vysoké antioxidační vlastnosti [49, 50].

Fenolické sloučeniny lze seskupit do různých tříd podle jejich základní chemické struktury (jako je typ a počet fenolových kruhů) a do různých podtříd, kde rozdělení závisí na specifických substitucích v základní struktuře (Tabulka 2). Dalším možným dělením fenolických látek je dle jejich vlastností. Chuťové látky (taniny), barviva (lignany, flavonoidy), přírodní antioxidanty (flavonoidy), nebo také vonné látky (kumariny, benzochinony) [49, 50].

Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin lze stanovit spektrofotometrickou metodou FCM – (metoda Folin – Ciocalteu) [9].

### **1.7.1 Metoda FCM**

Principem metody je redukce komplexu fosfomolybdenanu a fosfowolframanu fenolickými sloučeninami na modré reakční produkty, které jsou sledovány spektrofotometricky při vlnových délkách v rozmezí 550 – 760 nm. Celkový obsah fenolických látek je přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny gallové, která slouží jako standard [51 - 55].

**Tabulka 2: Hlavní třídy fenolických sloučenin ve vyšších rostlinách[53]**

<b>třídy a podtřídy</b>	<b>příklady specifických sloučenin</b>
ne – flavonoidní sloučeniny	
deriváty kyseliny fenolové	
deriváty kyseliny benzoové	kyseliny gallová, protokatechová, p-hydroxybenzoová
deriváty kyseliny hydroxyskořicové	kyselina kumarová, kávová, ferulová, sinapová
hydrolyzované taniny	penta galoyl glukózy
stilbeny	resveratrol
lignany	pinoresinol
flavonoidní sloučeniny	
flavonoly	kaempferol, quercetin
flavony	lutein, apigenin
flavanony	naringin, hesperidin
flavanoly	katechin, gallokatechin
anthokyany	kyanidy, malvidin
kondenzované taniny nebo proantokyanidiny	prokyanidiny
isoflavony	daidzen, genistein

## 1.8 Antioxidanty

Volné radikály vznikající in vivo negativně působí na organismus. Jedná se především o kyslíkové a dusíkové radikály. Ty pozměňují strukturu biologicky významným sloučeninám, jakou jsou lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, a tím dochází ke změně jejich funkce. Dále dochází k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu.

Antioxidanty jsou sloučeniny schopné zpomalit nebo inhibovat oxidační procesy. Podílejí se na obranném mechanismu organismu proti patologickým stavům, které jsou spojeny s exogenními i endogenními radikály [19, 56, 57].

Většina antioxidantů pochází z exogenních zdrojů, kromě kyseliny močové, albuminu, bilirubinu, katalázy či superoxidu dismutázy. Mezi nejdůležitější exogenní antioxidanty řadíme vitamín C, E, karotenoidy, ale také vitamín K a D. Exogenní antioxidanty mohou pocházet jak z přírodních zdrojů (vitamíny, flavonoidy, anthokyany), jejichž zdrojem je nejčastěji zelenina, ovoce, vláknina, čaj, vína, aromatické a léčivé rostliny nebo mohou být syntetické, jako galláty, butylhydroxyanisol a butylhydroxytoluen [19, 56].

Existuje mnoho metod používaných ke stanovení antioxidantní aktivity. Antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodovými kovy. Existují dva principy hodnotící míru

antioxidačního působení. První z nich je metoda hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále metoda posuzující redoxní vlastnosti látek [56, 57].

### **1.8.1 Metody založené na eliminaci radikálů**

Principem metody je schopnost vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo do reakční směsi přidávány. Jedná se o radikály kyslíkové (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion – radikál) nebo radikály syntetické (DPPH, ABTS, galvinoxyl) [56, 57].

#### **1.8.1.1 Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů**

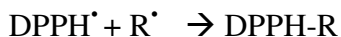
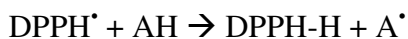
##### **Metoda používající ABTS**

Metoda ABTS je založena na spektrofotometrickém sledování rozpadu radikálkationtu  $ABTS^{\cdot+}$ , který může být generován z ABTS chemickou oxidací, např. peroxidisíranem draselným, manganistanem draselným nebo pomocí enzymů ( $H_2O_2$ /peroxidáza). Měření je založeno na schopnosti antioxidantů tento radikál zhaset. Bez přítomnosti fenolických látek je ABTS poměrně stabilní, ale reaguje s molekulami schopnými předávat vodíkové atomy nebo elektrony, jako jsou fenolické sloučeniny, které způsobí odbarvení modro–zelené barvy roztoku radikálu, měřeného při 734 nm. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je přepočítána na koncentraci standardu Troloxu, z tohoto důvodu je metoda označována také jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [58, 59].

ABTS může být rozpuštěno ve vodných i organických rozpouštědlech, a proto mohou být stanoveny jak hydrofilní, tak lipofilní antioxidanty. Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS se řadí mezi jednoduché a rychlé metody [60].

##### **Metoda používající DPPH**

Tato metoda se používá k měření antiradikálové aktivity čistých látek, ale i různých směsných vzorků. Principem DPPH testu je schopnost stabilního organického radikálu 1,1'-difeny-2-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm. Měří se pokles absorbance po uplynutí určitého času. Při této metodě se po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem ( $R^{\cdot}$ ) původně tmavě purpurový roztok odbarví [56, 57, 61, 62].



### **Metoda používající galvinoxyl**

Principem dané metody je redukce radikálu galvinoxylu ((2,6-di-*terc*-butyl-4-[(3,5-di-*terc*-butyl-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden) methyl] fenoxyl) látkami, které poskytují vodík. Reakce je sledována spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm [56, 57].

### **1.8.1.2 Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů**

#### **Metoda ORAC**

Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity) spočívá ve vytvoření peroxylových radikálů pomocí AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid) a schopnosti testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence  $\beta$ -fykoeritrinu po přidání testované látky [56, 57, 62, 63].

### **1.8.1.3 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace**

Lipidová peroxidace představuje nejvýznamnější patologický pochod v organismu. Daný pochod je vyvolán volnými radikály. Při potlačení lipidové peroxidace mohou látky eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály, tak sekundární radikálové meziprodukty. Pro hodnocení vlivu antioxidantů na lipidovou peroxidaci se nejčastěji využívají metody založené na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny. AAPH je používán jako iniciátor radikálové reakce. Produkty peroxidace jsou sledovány spektrofotometricky při 234 nm [56, 57].

### **1.8.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek**

Neenzymové antioxidanty reagují s oxidanty, redukuje je a tím je inaktivují. Z tohoto důvodu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky a antioxidanty charakterizovat jako redukční činidla [56, 57].

### 1.8.2.1 Metody chemické

#### Metoda FRAP

Jedná se o metodu, která je založena na redukci železitých komplexů, například TPTZ (2,4,6-tripirydyl-S-triazinu) s hexakynoželezitanem draselným  $K_3(Fe(CN)_6)$  nebo chloridem železitým  $FeCl_3$ . Nárůst absorbance se měří spektrofotometricky při 593 nm [56, 57, 62].

### 1.8.2.2 Elektrochemické metody

#### Cyklická voltametrie

Při této metodě se vkládá na pracovní elektrodu potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Výsledným záznamem je cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek je možné vyhodnotit z potenciálu anodického oxidačního píku  $E_A$  (čím je nižší hodnota  $E_A$ , tím látka snadněji odevzdá elektrony) a jeho anodického proudu  $I_A$ . Z výšky píku anodického proudu  $I_A$  lze určit koncentraci látek [56, 57].

#### HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Použitím amperometrických nebo coulometrických detektorů lze detekovat elektroaktivní látky. Principem metody je vkládání kladného potenciálu na pracovní elektrodu a záznam píku v době, kdy je látka oxidována. Retenční čas, ale také potenciál, při kterém dochází k oxidaci umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé antioxidační komponenty TEAC [56, 57].

## 1.9 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) je v současné době jednou z nejpoužívanějších technik pro analýzu jednoduchých molekul organických látek až po peptidy, bílkoviny a polymerní sloučeniny.

K separaci látek využívá mnohonásobně opakovaného procesu distribuce látek mezi kapalnou mobilní a zpravidla tuhoun stacionární fází. Doba, jakou stráví analyt v mobilní nebo stacionární fází, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Uplatňují se mechanismy separace jako je adsorpce, iontová výměna, síťový efekt či další specifické interakce [64].



### 1.9.1 Instrumentace

Nejrozšířenější technikou v HPLC je chromatografie s obrácenými fázemi, kdy je mobilní fáze polární, obvykle tvořená směsí vody a polárního organického rozpouštědla a jako nepolární stacionární fáze bývá používán především chemicky vázaný oktadecylsilikagel a oktylsilikagel, ale existují i fáze s alkyly, aryly či alkylaryly. Separace látek může být v chromatografii provedena buď za izokratického nebo gradientového režimu. U analýzy s izokratickou elucí se složení mobilní fáze po celou dobu analýzy nemění, tudíž je konstantní. Tento režim je vhodný pro vzorky, jejichž látky se velmi málo liší svou retencí. U komplexních vzorků, které obsahují složky s velmi rozdílnou retencí se využívá gradientové eluce. Dochází tedy k časové změně polarity mobilní fáze změnou poměru směsi méně a více polárního rozpouštědla. Gradientová eluce umožňuje rychlejší analýzu velmi složitých směsí látek, a navíc zajišťuje lepší rozlišení píku [64, 65].

V současné době se k čerpání mobilní fáze používají pístová nebo membránová vysokotlaká čerpadla, která zajišťují konstantní průtok mobilní fáze systémem v rozsahu od 0,01 do 10 ml/min. V závislosti na řadě faktorů, včetně rozměrů kolony, velikosti částic stacionární fáze, průtoku a složení mobilní fáze, mohou být generovány tlaky až do 40 – 60 MPa, u ultravysokoučinné kapalinové chromatografie (UHPLC) až do 130 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) musí být stabilní, nesmí docházet k uvolňování látek do mobilní fáze [64, 66 - 69].

Nedílnou součástí kapalinového chromatografu je dávkovací zařízení, umožňující vnesení analyzovaných látek do toku mobilní fáze. Nejpoužívanějším dávkovacím systémem je tzv. šesticetný dávkovací ventil, jehož dávkovací smyčka má objem 3–20  $\mu$ l. Dávkování může být provedeno ručně nebo s využitím autosampleru [68, 69].

V kapalinové chromatografii se především používají náplňové kolony, které jsou zhotoveny z nerezové oceli. Kolony jsou krátké trubice o délce 5 až 25 cm a vnitřním průměru 2 - 4,6 mm vyplněné částicemi sférického tvaru s průměrem 2 až 7  $\mu$ m (čím kratší kolona, tím jemnější náplň). Pokud jsou kolony plněné částicemi menšími než 2  $\mu$ m, v tomto případě dosahují pracovní tlaky až 130 MPa a mluvíme o UHPLC. Kolony jsou většinou plněny anorganickou maticí jako je silikagel, oxid hlinitý nebo také pórovité sklo, na kterou mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze. Jako ochrana hlavní kolony se používá předkolona. Jedná se o kolonku, která je naplněná stejnou stacionární fází jako hlavní kolona a je umístěna mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením [64, 67, 69].

Základem detektoru je měřicí systém, jehož signál závisí na složení mobilní fáze odtékající z kolony obsahující rozseparované látky. Mezi nejpoužívanější detektory v kapalinové chromatografii patří spektrofotometrický, fluorescenční, hmotnostní a elektrochemický detektor [64, 66].

## **1.10 Analýza kávových zrn**

### **1.10.1 Stanovení obsahu kofeinu a derivátů chlorogenových kyselin v kávě**

Pro kvantitativní analýzu bioaktivních sloučenin v kávě se nejvíce využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie [70 - 73], ale také micelární elektrokinetická chromatografie [74 - 77], blízká infračervená spektrometrie nebo nukleární magnetická rezonance [70, 78, 79]. Co se týče méně běžně plynové chromatografie, tak většina studií využívá k analýze plamenově ionizační detektor (GC-FID) za použití kapilární kolony DB (nepolární). Mobilní fází bývá nejčastěji helium. Pro analýzu se používá především gradient teploty [70, 80, 81]. K analýze lze využít i spektrofotometrii, ale stanovení chlorogenových kyselin je v tuto chvíli nemožné z důvodu spektrálního překryvu s kofeinem v oblasti UV-VIS. Z tohoto důvodu se kofein nejprve musí extrahovat za použití řady různých rozpouštědel, jako je benzen, chloroform, trichlorethylen nebo nejčastěji dichlormetan. Účinnost dichlormetanu pro extrakci kofeinu z kávových zrn je 98 – 99 % [82].

Pro simultánní stanovení CGA a kofeinu se nejčastěji používá chromatografie v systémech s obrácenými fázemi se spektrofotometrickou detekcí [71, 74, 75] či ve spojení s hmotnostním spektrometrem [76]. Kofein se nejčastěji detekuje při vlnových délkách 270 – 275 nm a deriváty chlorogenových kyselin při 325 - 330 nm [78, 82]. Pro eluci jednotlivých látek se využívají systémy s gradientovou elucí, kdy jedno rozpouštědlo je voda okyselená kyselinou mravenčí [83, 84], octovou [70, 80] nebo kyselinou trifluorocetovou [85] a druhé je organické rozpouštědlo, nejčastěji acetonitril [85, 86, 87] nebo metanol [71, 83, 88]. U většiny studií bylo pro separaci využito kolony s chemicky vázanou C18 stacionární fází [80, 84, 88]. Speciální příprava vzorků před analýzou obvykle není nutná. K extrakci biologicky aktivních látek z kávových zrn se převážně využívá horké vody, v některých případech i organického rozpouštědla.

### **1.10.2 Metody stanovení celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity**

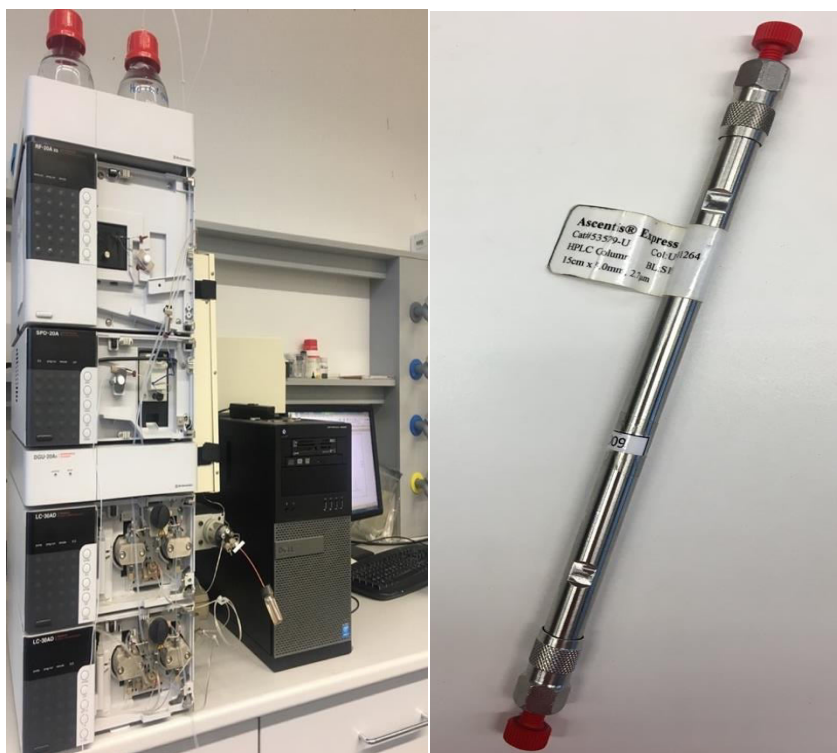
Antioxidační aktivita se měří různými chemickými a fyzikálně-chemickými metodami. Mezi primární metody měření antioxidantů patří ORAC [89, 90], TRAP [90], FRAP [2, 90, 91] DPPH [88, 90, 92, 93], ABTS [2, 89, 91], ESR [89, 92, 93], NO [89] nebo TBARS [90, 92]. Antioxidační aktivita závisí na mnoha parametrech jako je čas, teplota, povaha látek, koncentrace antioxidantů a dalších sloučenin jako je kyselina chlorogenová, ferulová, kávová a kumarová. V pražené kávě jsou syntetizovány melanoidy, které jsou také silnými antioxidanty. Byly provedeny studie, zabývající se obsahem AA v zelené i v pražené kávě odrůdy arabika a robusta. Bylo prokázáno, že antioxidační aktivita zelené kávy robusta je výrazně vyšší než antioxidační aktivita kávy arabika. Tento rozdíl však prakticky zmizí po lehkém pražení [73].

Hlavní skupinou fenolických látek v kávových zrnech jsou chlorogenové kyseliny (CGA), které lze stanovit spektrofotometricky pomocí Folinova činidla nebo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie [2, 94].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a zařízení

- kapalinový chromatograf LC-30AD složený z degaseru DGU-20 A<sub>5</sub>, čerpadel LC-30AD, UV/VIS detektoru SPD-20A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) s dávkovacím systémem s vnější dávkovací smyčkou 2  $\mu$ l (Valcovici, Schenkon, Švýcarsko) a termostatem kolon LCO 102 (Ecom, České Meziříčí, ČR) (Obrázek 11)
- pH metr (Metrohm 827 pH, Švýcarsko)
- analytické váhy Sartorius (Německo)
- kolona Ascentis Express F5 (150 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m) (Supelco, USA), (Obrázek 11)
- kolona Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2  $\mu$ m) (Supelco, USA)
- kolona Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2,7  $\mu$ m) (Supelco, USA)
- kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m) (Phenomenex, USA)
- membránové filtry (PTFE; 0,45  $\mu$ m; 13 mm)
- mikrostřičkačky Hamilton (50  $\mu$ l, Hamilton Company, USA)
- vialky (4; 8 ml)
- mlýnek na kávu HANDY (Tescoma)
- odměrné a běžné laboratorní sklo
- sušárna (Carbolite Apex AX 120)
- spektrofotometr Shimadzu UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) (Obrázek 12)
- kyveta S/G10, optická délka 10 mm (Fisher Scientific, Německo)
- Handy Step (BrandTech, Sci, Německo)
- ultrazvuková lázeň (Kraintek)
- injekční stříkačky (3 ml)



**Obrázek 11: HPLC/UV systém (vlevo) a použitá kolona Ascentis Express F5 (vpravo)**



**Obrázek 12: Spektrofotometr Shimadzu UV-2450**

## 2.2 Chemikálie

- metanol (Sigma-Aldrich)
- kyselina mravenčí 98 % (PENTA, Chrudim, ČR)
- deionizovaná voda upravená přes čistící zařízení Mili-Q (Merck Millipore, Německo)
- kyselina chlorogenová (Sigma-Aldrich)

- kyselina neochlorogenová (Sigma-Aldrich)
- kyselina kryptochlorogenová (Sigma-Aldrich)
- kofein (Zdravotnické zásobování, Praha)
- Trolox (Sigma-Aldrich)
- peroxidisíran draselný (Lachema, Neratovice, ČR)
- kyselina gallová (Sigma-Aldrich)
- DPPH (1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl)(Sigma-Aldrich)
- FCM (Folin-Ciocalteuovo činidlo) (Sigma-Aldrich)
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) (Sigma - Aldrich, USA)
- bezvodý uhličitan sodný (J.T.Baker)
- chloroform (Sigma-Aldrich)
- ethylacetát p.a. (PENTA s.r.o.)
- dichlormethan p.a. (PENTA s.r.o.)

### 2.3 Analyzované vzorky

Pro experimentální část diplomové práce bylo použito 64 vzorků kávy. Vzorky byly rozděleny do tří skupin. Kávy pražené (38 vzorků, Tabulka 3, Obrázek 13), zelené (18 vzorků, Tabulka 4) a bezkofeinové (8 vzorků, Tabulka 5). Vzorky kávy byly zakoupeny v obchodních řetězcích v ČR nebo v rodinné pražárně Kroměříž. Část vzorků byla darována z pražírny BotaCoffee se sídlem v Brně nebo z pražírny PepeCoffee v Hradci Králové.

**Tabulka 3: Seznam analyzovaných vzorků zrnkové pražené kávy a jejich charakteristika**

vzorek č.	název	složení
<b>P1</b>	GAETANO DANIELI ESPRESSO STRONG	100 % arabika
<b>P2</b>	DANIELS COFFEE	100 % arabika
<b>P3</b>	PERU ANDINA RARITAT TCHIBO	100 % arabika
<b>P4</b>	TOP SPOT ESPRESSO	100 % arabika
<b>P5</b>	COFFEESPOT COLUMBIE EXCELSO LA CLAUDINA	100 % arabika
<b>P6</b>	LIZARD COFFEE PAPUA NEW GUINEA	100 % arabika
<b>P7</b>	DELICADO MARILA	100 % arabika

<b>vzorek č.</b>	<b>název</b>	<b>složení</b>
<b>P8</b>	STARBUCKS CHRISTMAS BLEND	100 % arabika
<b>P9</b>	MÖVENPICK CAFFE CREMA	100 % arabika
<b>P10</b>	MÖVENPICK AUTENTICO	směs
<b>P11</b>	LAVAZZA ITALY'S FAVOURITE COFFEE	směs
<b>P12</b>	TCHIBO PRIVAT KAFFE AFRICAN BLUE	100 % arabika
<b>P13</b>	MOKA CAFFEE CLASSICO	70 % arabika
<b>P14</b>	VELLUTO	30 % arabika
<b>P15</b>	MANUEL CAFFEE AROMA PIÙ	40 % arabika
<b>P16</b>	AROMA BAR	80 % arabika
<b>P17</b>	BELLAROM BIO ORGANIC	100 % arabika
<b>P18</b>	MOCHA ITALIA-COSTA	směs
<b>P19</b>	BRASIL SANTOS	100 % arabika
<b>P20</b>	BELLAROM CREMA	100 % arabika
<b>P21</b>	LIMETA	neuvedeno
<b>P22</b>	VÁNOČNÍ SMĚS 2017-COFFEESPOT	100 % arabika
<b>P23</b>	MEXICO SHG EP FINCA LAS CHICHARRAS	100 % arabika
<b>P24</b>	KROMĚŘÍŽSKÉ ESPRESSO-CAFFEE GRAND	70 % arabika
<b>P25</b>	VIETNAM GR. 1 ROBUS WET POLISHED SCR.1	100 % robusta
<b>P26</b>	INDONESIA GREEN	100 % arabika
<b>P27</b>	CAFFE DIEMME MISCELA ORO	100 % arabika
<b>P28</b>	BRAZILA FAZENDA LAGOA	100 % arabika
<b>P29</b>	TCHIBO GUETAMALA GRANDE	100 % arabika
<b>P30</b>	MÖVENPICK ESPRESSO	80 % arabika
<b>P31</b>	BRAZIL SANTOS	100 % arabika
<b>P32</b>	PERU	100 % arabika
<b>P33</b>	COLOMBIA	100 % arabika
<b>P34</b>	GUATEMALA	100 % arabika
<b>P35</b>	COSTA RICA	100 % arabika
<b>P36</b>	BRAZIL	100 % arabika
<b>P37</b>	HONDURAS	100 % arabika
<b>P38</b>	INDIA	100 % robusta

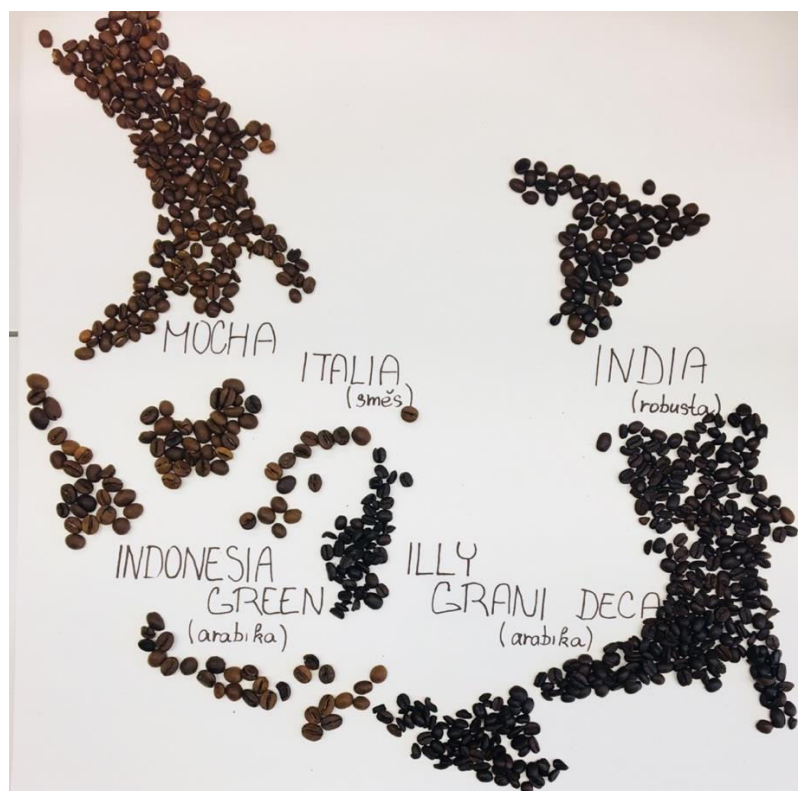
**Tabulka 4: Seznam analyzovaných vzorků zrnkové zelené kávy**

<b>vzorek č.</b>	<b>název</b>	<b>složení</b>
<b>Z1</b>	HONDURAS	100 % arabika
<b>Z2</b>	BRAZILE	neznámé
<b>Z3</b>	BRASIL SANTOS	100 % arabika
<b>Z4</b>	PERU	100 % arabika
<b>Z5</b>	VIETNAM	neznámé
<b>Z6</b>	COLOMBIA SUPREMO	100 % arabika
<b>Z7</b>	GUETAMALA	neznámé
<b>Z8</b>	HONDURAS	100 % arabika
<b>Z9</b>	ETIOPIE	100 % arabika
<b>Z10</b>	BRAZIL	100 % arabika
<b>Z11</b>	COSTA RICA	100 % arabika
<b>Z12</b>	ARABIKA	100 % arabika
<b>Z13</b>	GUATEMALA	100 % arabika
<b>Z14</b>	COLOMBIA	100 % arabika
<b>Z15</b>	INDIA	100 % robusta
<b>Z16</b>	PERU	100% arabika
<b>Z17</b>	COLOMBIA	100 % arabika
<b>Z18</b>	HONDURAS	100 % arabika



**Tabulka 5: Seznam analyzovaných vzorků bezkofeinové kávy a jejich charakteristik**

vzorek č.	název	vzhled	Metoda odstranění kofeinu	složení
B1	LAVAZZA CAFFE DECAFFEINATO	mletá, pražená	CO <sub>2</sub>	60 % arabika
B2	COSTA DECAFFEINATED ESPRESSO COFFEE POD	mletá, pražená	neuveveno	neuveveno
B3	MANUEL CAFFE DECAROMA	zrnková, pražená	neuveveno	neuveveno
B4	ILLY GRANI DECA	zrnková, pražená	neuveveno	100 % arabika
B5	TCHIBO PRIVAT KAFFE COLOMBIA FINO	zrnková, pražená	neuveveno	100 % arabika
B6	BRASIL DECAF FAZENDA DA LAGOA	zrnková, zelená	CO <sub>2</sub>	100 % arabika
B7	KOLUMBIE SUPREMO DECAF	zrnková, pražená	neuveveno	100 % arabika
B8	COLOMBIA	zrnková, pražená	neuveveno	100 % arabika



**Obrázek 13: Fotografie analyzovaných vzorků pražené kávy**

## 2.4 Pracovní postup

### 2.4.1 Příprava vzorků, standardů a kalibračních řad

Všechny druhy pražené kávy byly zpracovány stejným způsobem. Pomocí mlýnku Tescoma byla zrnková pražená káva namleta v den zpracování, neboť mletím dochází k uvolnění aromatických látek, které rychle vyprchají a čerstvost vůně je omezena na několik hodin. Každý druh zrnkové zelené kávy byl vložen před analýzou na 12 hodin do sušárny, jelikož docházelo při procesu dekofeinizace k extrakci zelených zrn rozpouštědlem. Z tohoto důvodu bylo nutné zrna následně zbavit vlhkosti, případně zbytků organických rozpouštědel. Aby bylo možné porovnat obsahy látek a účinnost extrakce dekofeinizovaných zrn, bylo potřeba odstranit vlhkost ze všech analyzovaných zelených zrn. Celý proces navíc usnadnil mletí zrn. Úbytek vlhkosti byl přepočítán na původní hmotnost zelených zrn a poté byla zrna zpracována stejným způsobem. Na analytických vahách bylo naváženo 7 g mleté kávy. Dané množství bylo extrahováno 50 ml horké vody. Po pěti minutách byla směs přefiltrována pomocí skládaného filtračního papíru. Takto připravený vzorek byl naředěn destilovanou vodou pro HPLC analýzu 40x, pro antioxidační aktivitu 20x, poté byla směs přefiltrována pomocí stříkačkového PTFE filtru. Po naředění a přefiltrování byly vzorky připraveny ke stanovení celkového obsahu polyfenolů, antioxidační aktivity a pro HPLC analýzu. Každý vzorek byl u HPLC metody proměřen třikrát, u antioxidační aktivity bylo provedeno pět měření.

Pro výpočet antioxidační aktivity byl použit standard Troloxu o  $c = 10$  mmol/l, který byl rozpuštěn v metanolu. Ke stanovení obsahu fenolických látek byl připraven standard kyseliny gallové o koncentraci  $c = 1$  g/l. Připravené kalibrační roztoky (Tabulka 6) byly přidávány ke 3 ml reakčních směsí místo analyzovaného vzorku.

Pro chromatografickou analýzu byly připraveny zásobní roztoky kyseliny neochlorogenové, chlorogenové a kofeinu o koncentraci  $c = 1$  g/l a kyseliny kryptochlorogenové o koncentraci  $c = 0,7$  g/l. Všechny roztoky byly doplněny okyselenou destilovanou vodou o  $\text{pH} = 2,4$ .

Ze všech uvedených zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky v rozmezí, která jsou uvedena v tabulce 6.

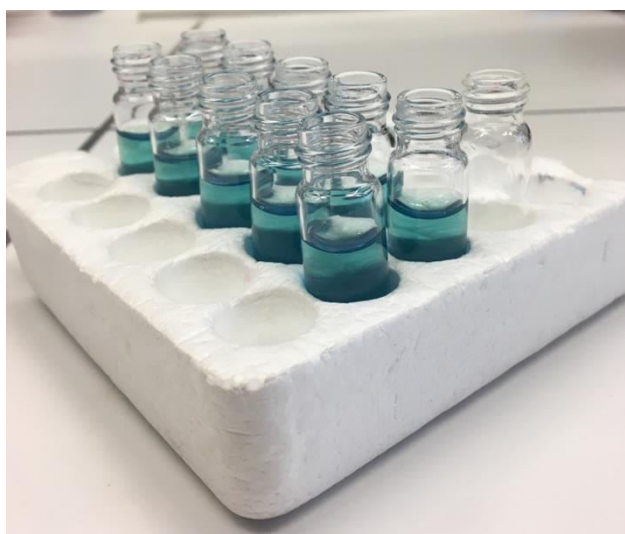
**Tabulka 6: Koncentrační rozsahy standardů**

<b>standard</b>	<b>koncentrační rozsah</b>
Trolox (ABTS)	0,01 – 0,07 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$
Trolox (DPPH)	0,01 – 0,1 $\mu\text{mol}/30 \mu\text{l}$
kyselina gallová	0,005 – 0,03 $\text{mg}/100 \mu\text{l}$
neochlorogenová kyselina	7,5 – 200 $\text{mg}/\text{l}$
krytochlorogenová kyselina	14 – 175 $\text{mg}/\text{l}$
chlorogenová kyselina	7,5 – 200 $\text{mg}/\text{l}$
kofein	7,5 – 200 $\text{mg}/\text{l}$

## 2.4.2 Spektrofotometrické metody

### 2.4.2.1 Metoda ABTS

Tato metoda byla převzata z diplomové práce [65] s mírnou modifikací. Tableta ABTS (10 mg) byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody (3,6 mmol/l), poté bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (0,064 mol/l). Roztok byl ponechán v chladničce za nepřístupu světla po dobu 12 - 16 hodin. Po uplynulé době bylo z tohoto roztoku odpipetováno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Ke 3 ml tmavě modrozeleného roztoku ABTS (Obrázek 14) bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  extraktu vzorku (20x zředěného destilovanou vodou). Vzniklá reakční směs byla důkladně promíchána a ponechána za nepřístupu světla. Po 10 minutách byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Úbytek absorbance byl vyjádřen v procentech a pomocí rovnice regrese kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.



**Obrázek 14: Vialky s roztokem ABTS**

### **2.4.2.2 Metoda DPPH**

Tato metoda byla převzata z diplomové práce [65] s mírnou modifikací. Na analytických vahách bylo naváženo vypočítané množství DPPH a doplněno do odměrné baňky metanolem na výslednou koncentraci  $c = 0,1$  mmol/l. Ke 3 ml tohoto roztoku bylo přidáno 30  $\mu$ l extraktu vzorku (20x zředěného destilovanou vodou). Reakční směs byla ponechána bez přístupu světla 30 minut. Při této době došlo k odbarvení původně fialového roztoku na světle fialový. Tento pokles byl monitorován při vlnové délce 515 nm. Úbytek absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

### **2.4.2.3 Metoda FCM**

Tato metoda byla převzata z diplomové práce [65] s mírnou modifikací. Byl připraven pracovní roztok obsahující 2 M Folin-Ciocalteuovo činidlo a destilovanou vodu v poměru 1 : 9. Pro jednotlivá stanovení byl smíchán 1 ml tohoto činidla, 1 ml destilované vody a 100  $\mu$ l vzorku (20x zředěného destilovanou vodou). Směs byla protřepána a po 5 minutách byl přidán 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5 % hm.) Následně byla směs promíchána a uchována za nepřístupu světla 35 minut. Po 35 minutách byl změřen nárůst absorbance při vlnové délce 750 nm. Nárůst absorbance byl přepočítán pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

## **2.4.3 HPLC**

Ve vzorcích kávy byl stanovován kofein a izomery chlorogenové kyseliny (neochlorogenová, kryptochlorogenová a chlorogenová kyselina).

### **2.4.3.1 Optimální podmínky měření**

Finální separace biologicky aktivní látek byla provedena na koloně Ascentis Express F5 (150 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m). Nástřík vzorků i standardů byl 2  $\mu$ l. Během chromatografické separace byl udržován konstantní průtok mobilní fáze 0,6 ml/min a teplota kolony 40 °C. Mobilní fáze byla složena z metanolu a redestilované vody s přidavkem 98 % kyseliny mravenčí na pH 2,4. Analýza derivátů chlorogenových kyselin a kofeinu probíhala za izokratické eluce 25 % metanol při dvou vlnových délkách 273 nm pro analýza kofeinu a 325 pro deriváty chlorogenových kyselin.

## 2.4.4 Dekofeinizace

### 2.4.4.1 Organická rozpouštědla

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 10 g zelené kávy. Navážené množství vzorku bylo napařováno 30 minut a poté ponořeno do vroucí vody na 10 minut. Po uplynutí 10 minut byla kávová zrna smíchána s dichlormethanem, chloroformem nebo ethylacetátem v poměru 1 : 5 (vzorek : rozpouštědlo). Tato směs byla ponechána při laboratorní teplotě nebo zahřívána na teplotu nižší, než je bod varu rozpouštědla. Extrakce probíhala po dobu 3 – 7 hodin v závislosti na rozpouštědle. Po extrakci byla zrna opět napařena, aby došlo k odstranění zbytků rozpouštědla. Následně byla káva vysušena v sušárně.

### 2.4.4.2 Superkritická fluidní extrakce

Na analytických vahách bylo naváženo 10 g zelené kávy. Před samotným procesem byla kávová zrna napařena po dobu 30 minut a následně namočena do vody. Do extrakční patronky byly odváženy cca 3 g napařeného vzorku. Následně byly nastaveny procesní parametry jako je tlak, teplota a průtok superkritického CO<sub>2</sub>. Po extrakci byl vzorek vložen do sušárny. Na obrázku 15 je znázorněno zařízení extraktoru superkritické fluidní extrakce.



Obrázek 15: Zařízení superkritické fluidní extrakce

## **2.5 Statistické zpracování experimentálních dat**

Pomocí statistického programu QC Expert 2.5 (Trilobyte) byly vyhodnoceny rovnice regrese veškerých kalibračních křivek. Všechny testy byly provedeny na hladině významnosti 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). K identifikaci vlivných bodů byl použit Williamsův, Pregibonův a L-R graf. Odlehlé body byly následně odstraněny. Na základě analýzy studentova t-testu byla zkoumána významnost regresních parametrů. Vícerozměrné statistické metody, analýza hlavních komponent (PCA) a faktorová analýza (FA) byly vyhodnoceny v programu Statistika 12 (StatSoft, ČR).

## 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

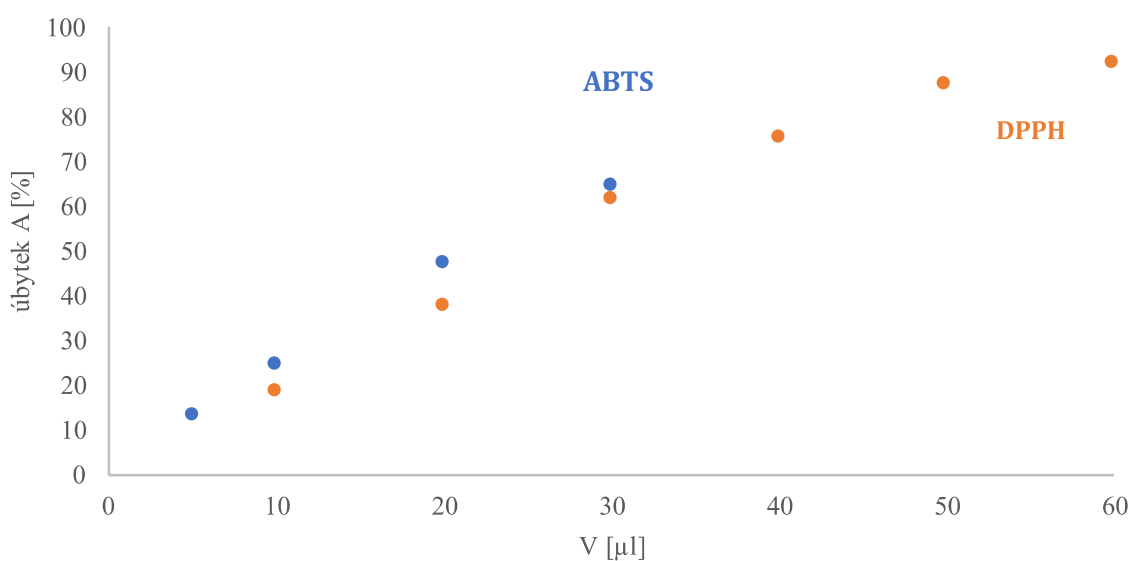
### 3.1.1.1 Stanovení antioxidační aktivity

K měření antioxidační aktivity byly použity reakční roztoky ABTS<sup>•+</sup> a DPPH, které byly připraveny dle postupu uvedených v kapitolách 2.4.2.1 pro ABTS a 2.4.2.2 pro DPPH. Nejprve bylo nutné najít vhodné množství vzorku kávy přidávané k dané reakční směsi, a to postupným zvyšováním objemu extraktu. Ze závislosti úbytku absorbance na objemu vzorku (Obrázek 16) byl vybrán dávkovaný objem 10  $\mu\text{l}$  pro ABTS, 30  $\mu\text{l}$  pro DPPH.

Úbytek absorbance byl vypočten dle následující rovnice:

$$\text{úbytek } A = \frac{A - A_0}{A} \cdot 100$$

kde  $A$  je absorbance v čase  $t = 10$  minut (ABTS), 30 minut (DPPH) od počátku reakce a  $A_0$  je počáteční absorbance v čase  $t = 0$  min.

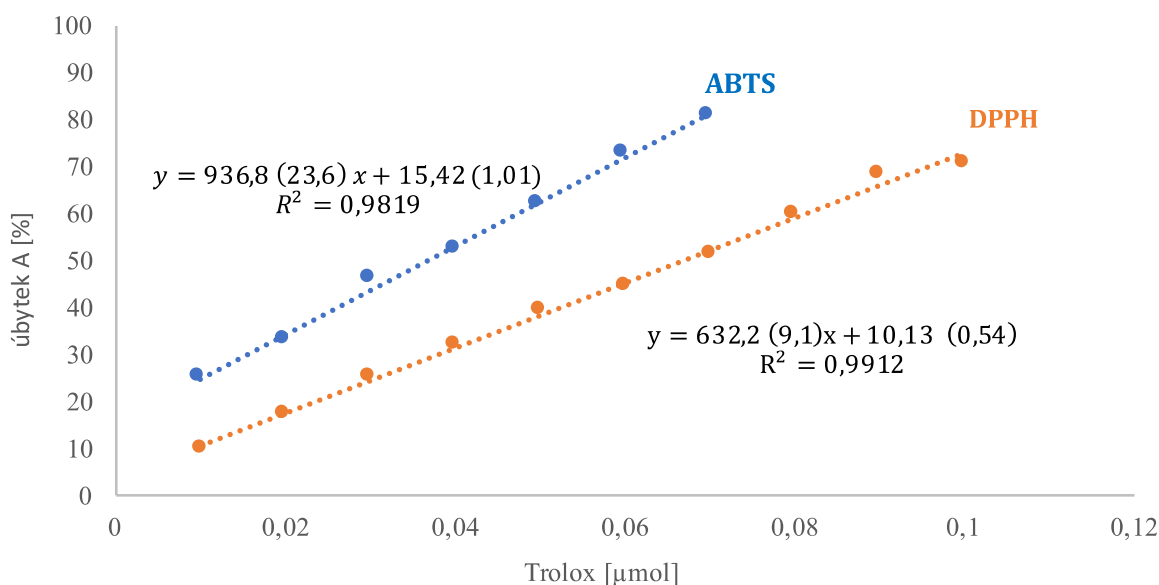


**Obrázek 16: Závislost úbytku A na množství přidávaného vzorku**

Aby bylo možné porovnávat výsledky získané pomocí obou metod, byl u všech vzorků úbytek absorbance přepočten na ekvivalentní množství standardu Troloxu pomocí odpovídající kalibrační křivky (Obrázek 17). Hodnota celkové antioxidační aktivity byla vztažena na 1 g vzorku kávy.

$$TEAC \left( \frac{mmol}{g} \right) = \frac{\text{aktivita vzorku (mmol Troloxu)}}{m (g)} \cdot f_R$$

kde  $m$  je hmotnost analyzovaného množství kávy a  $f_R$  je faktor zahrnující ředění a dávkované množství vzorku.



**Obrázek 17: Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu**

### 3.1.2 Měření antioxidační aktivity vzorků kávy

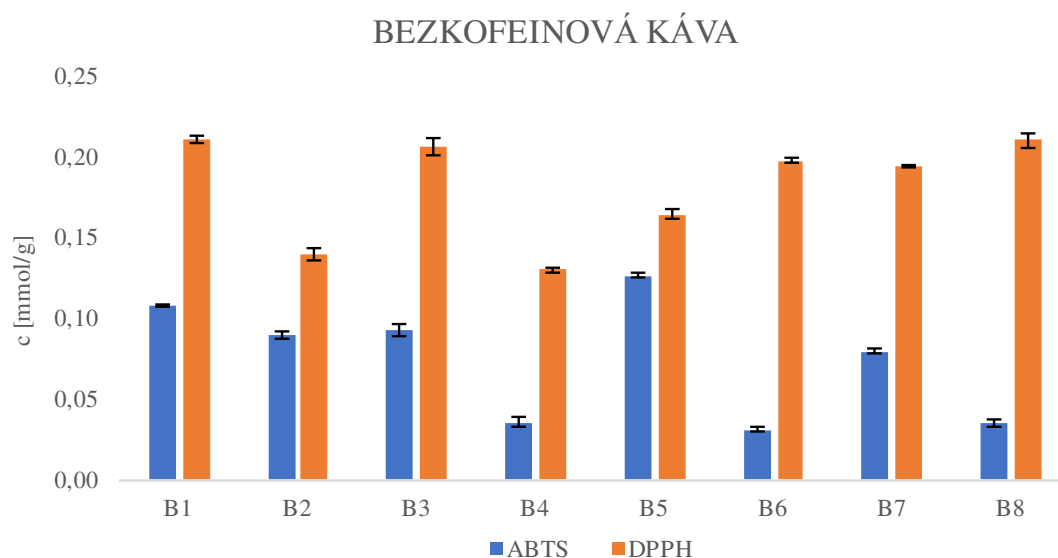
Celkem bylo změřeno 64 vzorků pražené, zelené a bezkofeinové kávy. Před analýzou byl každý vzorek připraven dle postupu, který je uveden v kapitole 2.4.1. Každý vzorek byl měřen 5x. Výsledné průměrné hodnoty TEAC a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v příloze 1- 3,

grafické znázornění je uvedené na obrázcích 18 - 20. Hodnoty DPPH jsou vždy vyšší. ABTS zřejmě nereaguje se všemi složkami přítomnými v kávovém extraktu. Je patrné, že obsah antioxidační aktivity souvisí se složením kávových zrn. Příkladem je vzorek Z15, P25 a P38, kde se jedná o zrna 100 % robusty. Zrna robusty zpravidla způsobí vyšší antioxidační aktivitu.

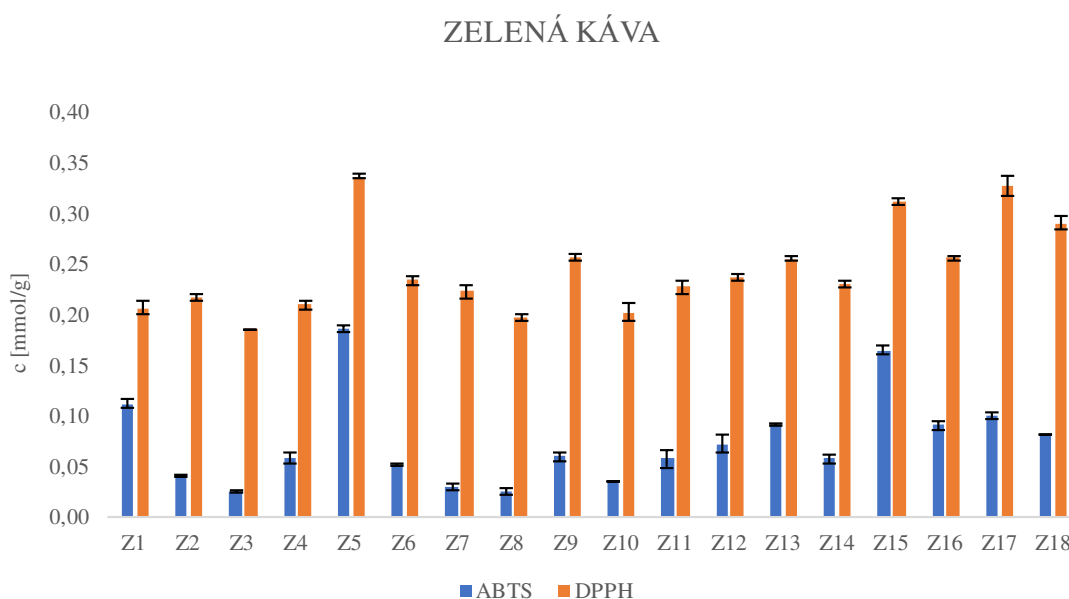
U bezkofeinových káv (Obrázek 18) se hodnoty TEAC naměřené metodou ABTS pohybují v rozmezí 0,031 – 0,126 mmol/g vzorku. Hodnota 0,031 mmol/g patří vzorku B6. Jedná se o vzorek bezkofeinové, zelené kávy. Nízký obsah dokládá tvrzení, že procesem pražení vznikají látky s vyšší antioxidační aktivitou než u vzorků zelených káv. Naopak vyšší obsah u vzorku B5 může být způsoben vyšším stupněm pražení, odrůdou, způsobem zpracování, ale také zemí původu. Hodnoty DPPH jsou v rozmezí 0,130 – 0,211 mmol/g.



U vzorků zelených káv (Obrázek 19) se TEAC pohybují v rozmezí 0,025 – 0,186 mmol/g u ABTS u DPPH v rozmezí 0,185 – 0,336 mmol/g. Nejvyšší hodnoty TEAC u obou metod dosahuje vzorek Z15 a Z5, což je pravděpodobně způsobeno druhem kávy. U vzorku Z15 se jedná o kávu 100 % robusty. U kávy Z5 nebyla známa informace o složení kávových zrn, ale z experimentálně zjištěných hodnot lze předpokládat, že se jedná o zrna kávy robusta. U metody DPPH bylo dosaženo vysokých hodnot i u vzorků Z17 a Z18.

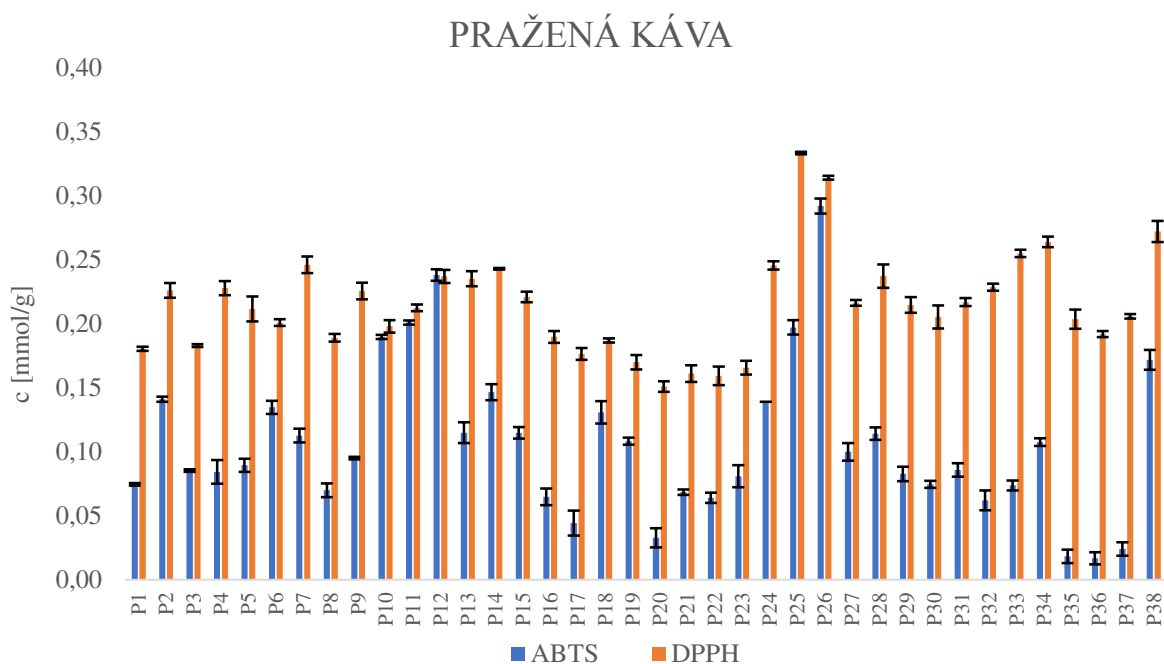


**Obrázek 18: Antioxidační aktivita infuzí připravených ze vzorků bezkofeinových pražených zrn**



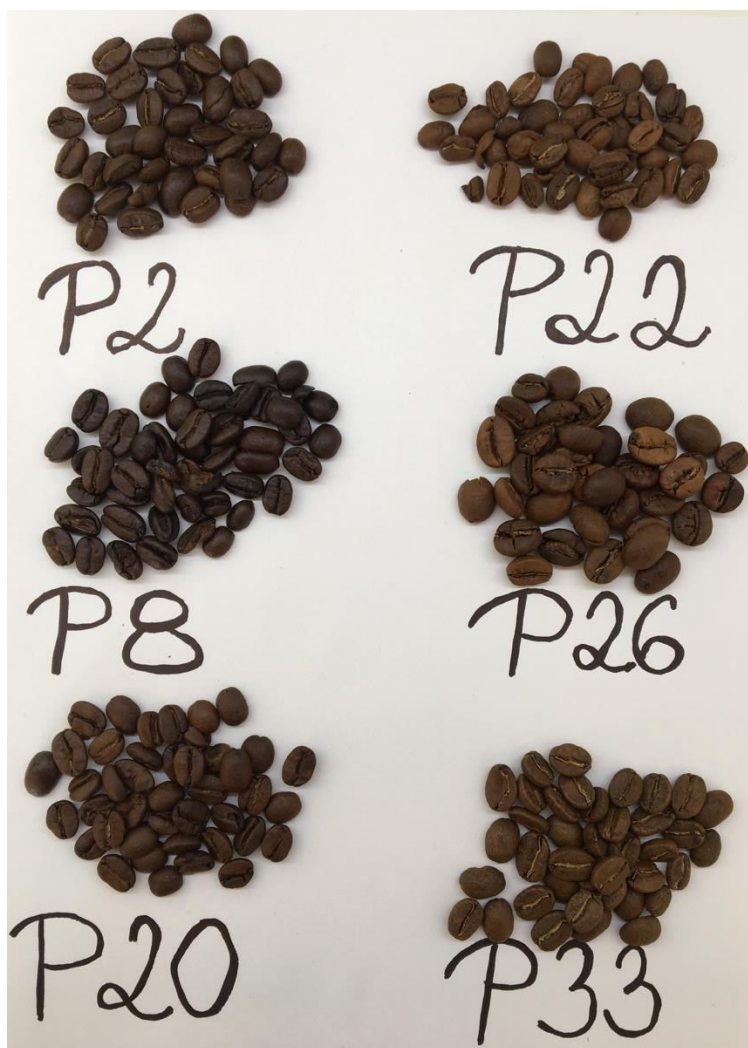
**Obrázek 19: Antioxidační aktivita infuzí připravených ze vzorků zelených zrn**

U vzorků pražených káv bylo analyzováno celkem 38 extraktů metodou ABTS a DPPH (Obrázek 20). Hodnoty ABTS jsou v rozpětí 0,017 – 0,292 mmol/g, u metody DPPH 0,159 – 0,333 mmol/g. Nejvyšší hodnotu TEAC u obou metod vykazuje vzorek P26 nazvaný INDONESIA GREEN i přesto, že se jedná o zrna 100 % arabiky. U tohoto vzorku byl výrobcem deklarován zvýšený obsah chlorogenových kyselin.



**Obrázek 20: Antioxidační aktivita infuzí připravených ze vzorků pražených zrn**

Experimentálně zjištěné hodnoty zobrazují souvislost mezi extrémně tmavými (černými) zrny a světle upraženými vzorky. Tohoto zjištění bylo především sledováno u pražených kofeinových zrn (Obrázek 21). Tento důkaz není zcela prokazatelný u bezkofeinových káv. Bezkofeinová zrna jsou extrémně tmavá a hodnoty antioxidační aktivity jsou poměrně malé. To lze vysvětlit procesem dekofeinizace, při kterém dochází k úbytku především kyseliny chlorogenové, což je látka vykazující silnou antioxidační aktivitu. Na experimentálně zjištěná data bezkofeinových káv může mít také vliv metoda odstranění kofeinu. U analyzovaných vzorků byla známa informace o způsobu odstranění kofeinu (CO<sub>2</sub>) pouze u dvou vzorků káv.



Obrázek 21: Rozdílné stupně pražení

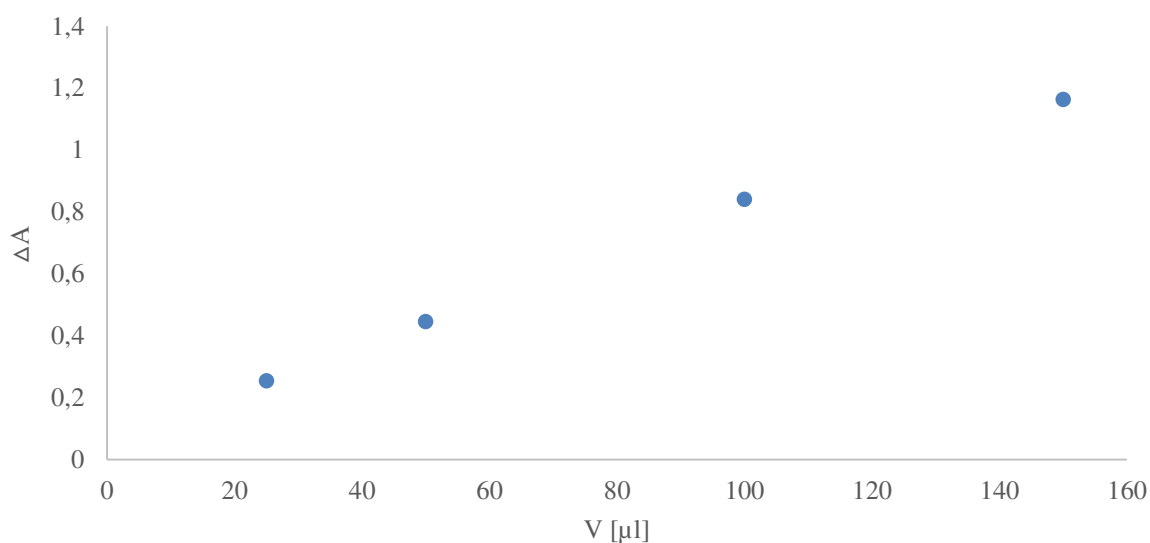
### 3.1.2.1 Stanovení celkového množství fenolických látek

I u této metody byla provedena optimalizace spočívající rovněž ve výběru množství vhodně ředěného vzorku kávy přidávaného k reakční směsi (Obrázek 22). Pro stanovení celkového množství fenolických látek byl vybrán 20x ředěný vzorek kávy, který byl dávkován do roztoku v objemu 100  $\mu\text{l}$ .

Nárůst absorpance byl vypočten dle rovnice

$$\Delta A = A - A_0$$

kde  $A$  je absorpance v čase  $t = 35$  min od počátku reakce a  $A_0$  je počáteční absorpance v čase  $t = 0$  min.

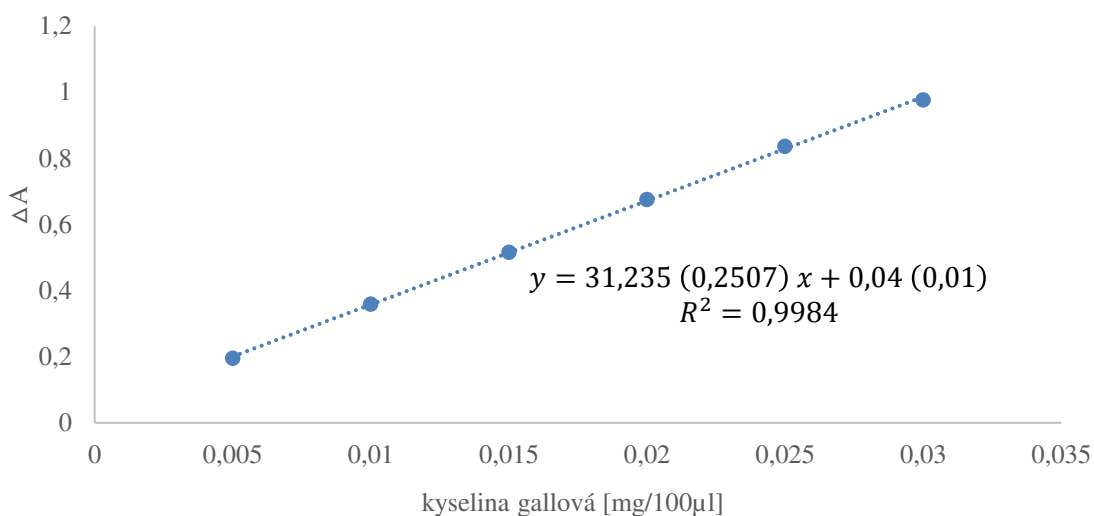


**Obrázek 22: Závislost změny A na množství přidávaného vzorku**

Následně byla sestrojena kalibrační křivka závislosti  $\Delta A$  na množství kyseliny gallové (Obrázek 23). Nárůst absorbance u všech sledovaných vzorků byl pomocí rovnice regrese kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Hodnota celkového obsahu fenolických látek byla vztažena na 1 g vzorku kávy.

$$c \left( \frac{mg}{g} \right) = \frac{\text{aktivita vzorku (mg kyseliny gallové)}}{m (g)} \cdot f_R$$

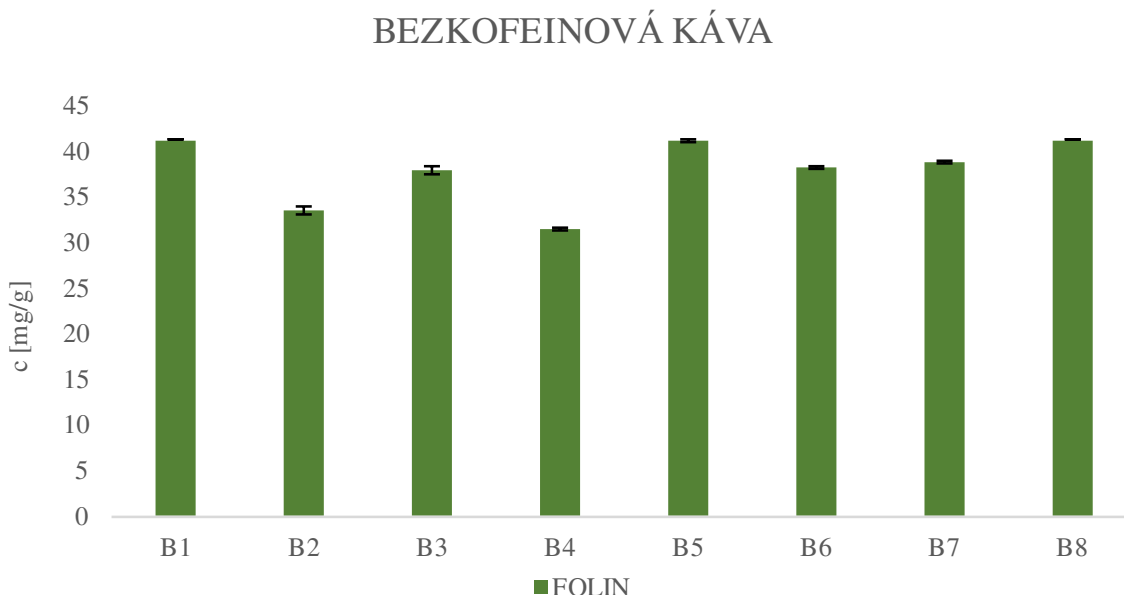
kde  $m$  je hmotnost analyzovaného vzorku kávy a  $f_R$  je faktor zahrnující ředění a dávkované množství vzorku.



**Obrázek 23: Kalibrační křivka závislosti změny A na množství kyseliny gallové**

### 3.1.3 Stanovení celkového množství fenolických látek

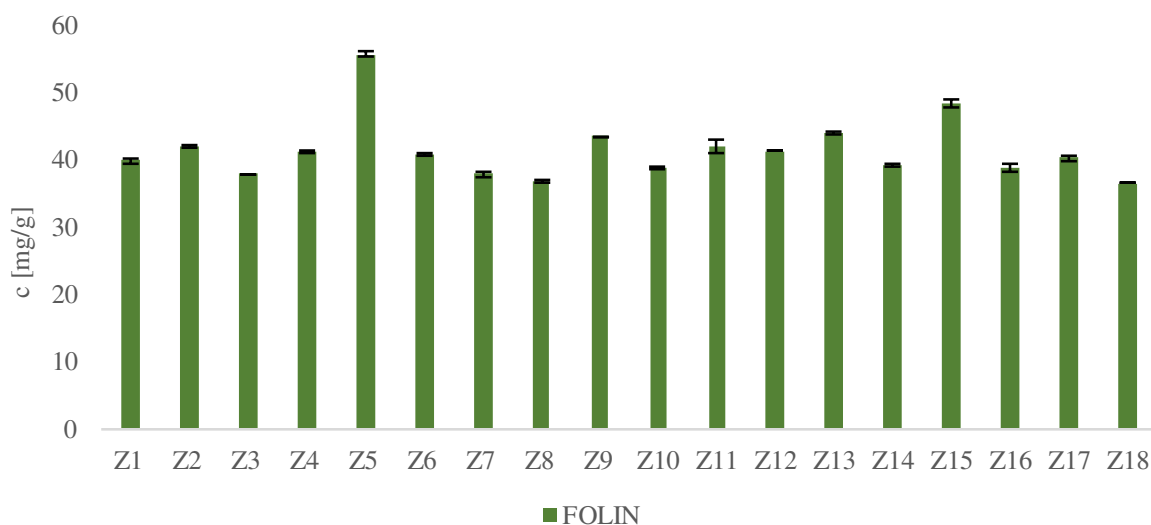
Celkem bylo změřeno 64 vzorků bezkofeinové (Obrázek 24), zelené (Obrázek 25) a pražené kávy (Obrázek 26). Před analýzou byl každý vzorek připraven dle postupu, který je uveden v kapitole 2.4.1. Každý vzorek byl měřen 5x. Výsledné průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v příloze 1, 2, 3.



**Obrázek 24: Stanovení celkového množství fenolických látek v extraktu bezkofeinových pražených kávovníkových zrn**

U bezkofeinových káv se naměřené hodnoty fenolických látek od sebe navzájem příliš neliší (Obrázek 24). Nejnižší hodnotu obsahuje vzorek B2, B4. Vzorek B2 nazvaný COSTA DECAFFEINATED ESPRESSO COFFEE POD byl dodán v podobě mleté kávy. Hrubost namletí by však nemělo mít vliv na množství fenolických látek v připravené infuzi.

## ZELENÁ KÁVA



**Obrázek 25: Stanovení celkového množství fenolických látek v extraktu zelených kávovníkových zrn**

U vzorku zelených káv se hodnoty fenolických látek pohybují v rozpětí 36,43 – 55,58 mg/g. Nejvyšší množství obsahuje vzorek Z5, následně Z15. Zde je vidět vliv složení zrn na stanovovaný obsah. Korelační závislostí byl prokázán vztah mezi metodou DPPH a FCM, což dokládá koeficient determinace  $R^2 = 0,56$  (Příloha 4).

## PRAŽENÁ KÁVA



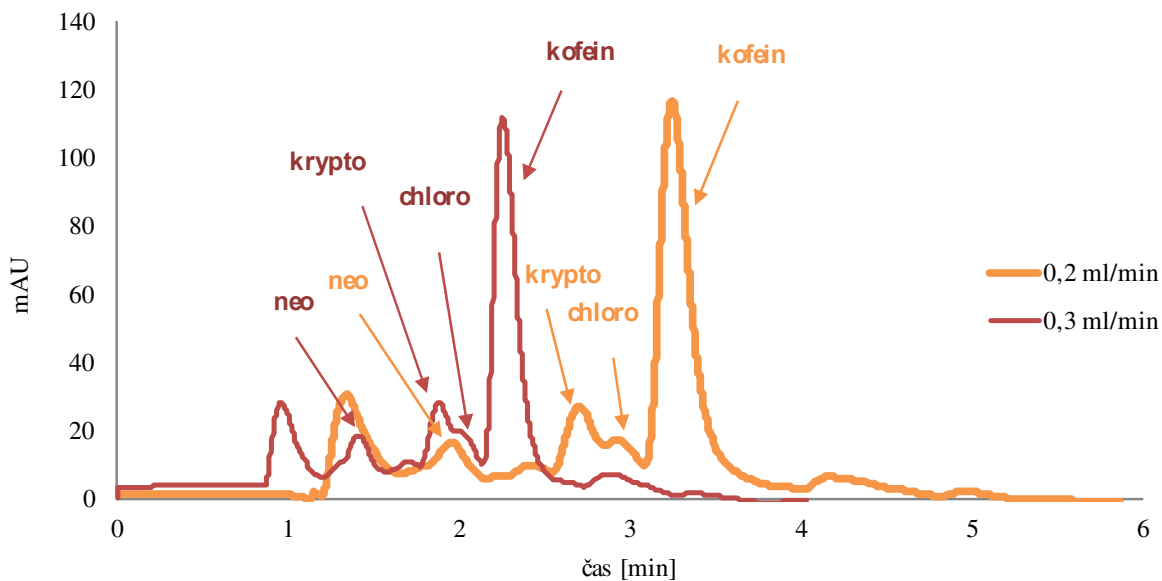
**Obrázek 26: Stanovení celkového množství fenolických látek v extraktu pražených kávovníkových zrn**

Nejvyšší obsah fenolických látek byl pozorován u tří vzorků pražených káv P25, P26 a P38. Jak již bylo zmíněno obsah fenolických látek je závislý na složení kávových zrn. Vzorky P25, P38 charakterizují zrna 100 % robusty. Vzorek P26 nazvaný INDONESIA GREEN vykazuje téměř nejvyšší hodnoty ve všech spektrofotometrických metodách, což je způsobeno vysokým obsahem chlorogenových kyselin, což bylo deklarováno výrobcem. Nejnižší hodnotu lze pozorovat u vzorku P8, který vykazuje i nejnižší hodnoty antioxidační aktivity, což pravděpodobně bylo způsobeno vysokým stupněm pražení.

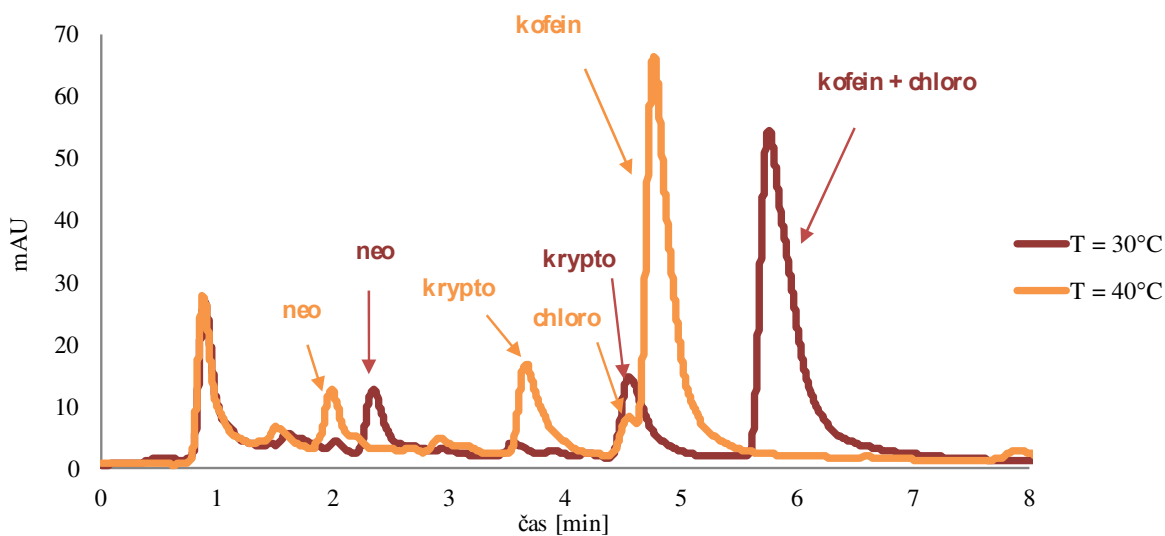
### **3.1.4 Stanovení kofeinu a izomerů chlorogenových kyselin v kávě pomocí HPLC**

#### **3.1.5 Optimalizace separačních podmínek**

Optimalizace separace byla provedena na modelovém vzorku kávy P2 a pomocí směsi standardů. Pro optimalizaci byly nejprve vybrány oktadecylsilikagelové kolony, které se lišily velikostí částic (Ascentis Express 100 x 2,1 mm; 2  $\mu$ m a 2,7  $\mu$ m). Jako mobilní fáze byla využita směs metanolu a vody, která byla okyselena kyselinou mravenčí pro potlačení disociace chlorogenových kyselin. Mezi optimalizované parametry patřila koncentrace metanolu při izokratické eluci (10 – 25 %), průtok mobilní fáze (0,2 až 0,5 ml/min) a teplota kolony (30 až 40 °C). Dále byly testovány různé podmínky gradientové eluce. S využitím izokratické eluce (Příloha 5) ani s využitím různých gradientů (Příloha 6) nedošlo k separaci sledovaných izomerů chlorogenových kyselin a kofeinu ani na jedné z testovaných kolon. Na obrázku 27 je vidět vliv změny průtoku mobilní fáze na separaci biologicky aktivních látek v kávovém extraktu u vybrané gradientové eluce. Jak je z obrázku patrné, dochází k částečné koeluci sledovaných látek. Pro optimalizaci byly kritické zejména páry kyselina chlorogenová s kryptochlorogenovou a kyselina chlorogenová s kofeinem. Na obrázku 28 je zobrazen vliv teploty kolony na separaci vzorku při izokratické eluci. Vyšší teplota ovlivnila pouze rychlost analýzy, avšak nedošlo ke zvýšení rozlišení sledovaných látek, naopak došlo ke koeluci chlorogenové kyseliny s kofeinem.



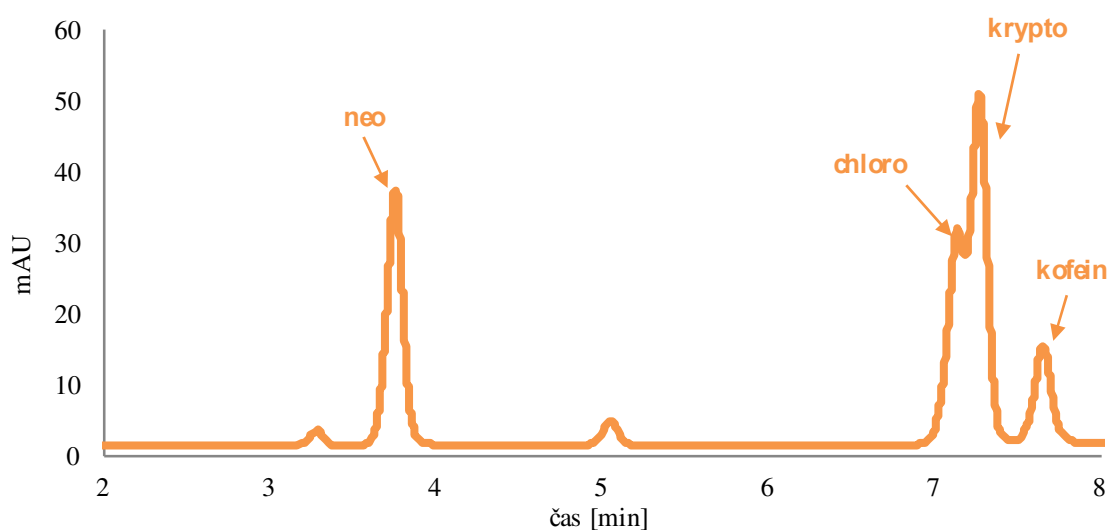
**Obrázek 27: Vliv průtoku na separaci vzorku P2: kolona:** Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2  $\mu$ m); **T** = 30°C, **dávkování** 2  $\mu$ l, **F<sub>m</sub>** = 0,2 ml/min (oranžová); 0,3 ml/min (fialová); **MF:** metanol : H<sub>2</sub>O + kyselina mravenčí (0,1 %), **gradientová eluce:** 0 min-25% B, 6 min-35% B, 7 min-60%, **detekce:** 273 nm



**Obrázek 28: Vliv teploty kolony na separaci vzorku P2: kolona:** Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2  $\mu$ m); **T** = 30°C (fialová), **T** = 40°C (oranžová), **dávkování** 2  $\mu$ l, **F<sub>m</sub>** = 0,3 ml/min, **MF:** metanol : H<sub>2</sub>O + kyselina mravenčí (0,1%), **izokratická eluce:** 15% metanolu, **detekce:** 273 nm

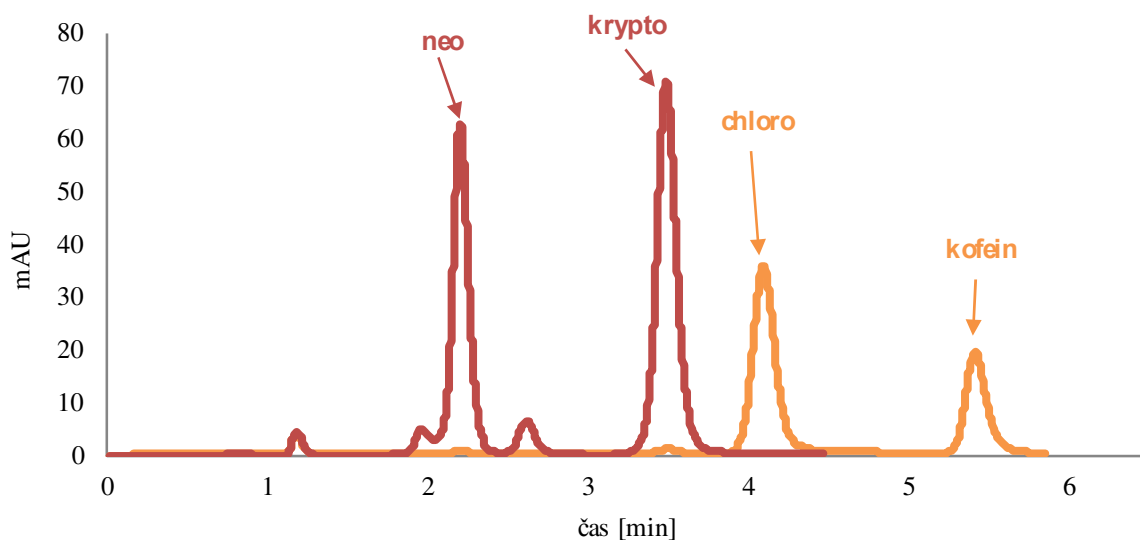


Po nezdařené separaci na klasické oktadecylsilikagelové koloně byla využita kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3,0 mm; 2,7  $\mu\text{m}$ ), která je vhodná zejména pro separaci polárních látek (Obrázek 29). Na této koloně byly opět optimalizovány parametry – průtok a pH mobilní fáze, koncentrace metanolu při izokratické eluci (10, 14, 15, 20, 25 %) a gradienty s různou strmostí a počáteční koncentrací metanolu. Ani na této koloně nedošlo k rychlé separaci studovaných biologicky aktivních látek s rozlišením větším než jednotkovým, proto byla zvoleno kolona s chemicky vázanou F5 fází, která má vysokou rozlišovací schopnost pro polohové izomery. Použití gradientové eluce nepřineslo zlepšení, ani urychlení separace, a proto byla pro separaci zvolena izokratická eluce (Obrázek 30). U této kolony bylo dosaženo separace všech stanovovaných látek s rozlišením více než  $R = 1,2$  za izokratická eluce 25 % metanolu za konstantní teploty 40°C.



**Obrázek 29: Separace směsi standardů: kolona:** Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm; 2,7  $\mu\text{m}$ ); **T** = 40°C, **dávkování** 2  $\mu\text{l}$ , **F<sub>m</sub>** = 0,6 ml/min; **MF** : metanol : H<sub>2</sub>O + kyselina mravenčí (pH = 2,4), **gradientová eluce:** 0 – 5 % za 10 minut; **detekce:** 273 nm

Retenční časy jednotlivých látek byly zprůměrovány. Eluce biologicky aktivních látek byla v následujícím pořadí: kyselina neochlorogenová (neo)  $t_R = 2,19$  min, kryptochlorogenová (krypto)  $t_R = 3,48$  min, chlorogenová (chloro)  $t_R = 4,09$  min a kofein  $t_R = 5,41$  min.



**Obrázek 30: Separace směsi standardů: kolona** Ascentis Express F5 (15 cm x 3,0 mm; 2,7 $\mu$ m), **T** = 40°C, **dávkování** 2 $\mu$ l, **F<sub>m</sub>** = 0,6 ml/min, **MF** : metanol : H<sub>2</sub>O + kyselina mravenčí (pH = 2,4), **izokratická eluce**: 25 % metanol, **detekce**: 273 nm

### 3.1.6 Kvantitativní stanovení kofeinu a chlorogenových kyselin

Po optimalizaci HPLC separace byly proměřeny kalibrační roztoky neochlorogenové, kryptochlorogenové a chlorogenové kyseliny a kofeinu a poté sestrojeny kalibrační křivky závislosti plochy píku na koncentraci jednotlivých standardů. Na základě studentova t-testu byl prokázán absolutní člen kalibrační závislosti u kyseliny chlorogenové a kryptochlorogenové jako nevýznamný, tudíž přímka prochází nulou. U ostatních kalibračních závislostí byl absolutní člen významný. Regresní parametry jednotlivých kalibračních závislostí spolu s jejich směrodatnými odchylkami a koeficientem determinance jsou uvedeny v tabulce 7. Z kalibračních závislostí výšky píku na koncentraci byly stanoveny validační parametry, jako je mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ), které byly vyhodnoceny jako trojnásobek (LOD) a desetinásobek (LOQ) poměru signálu ku šumu (Tabulka 7).

**Tabulka 7: Parametry kalibračních závislostí, koeficienty determinace ( $R^2$ ), meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé standardy**

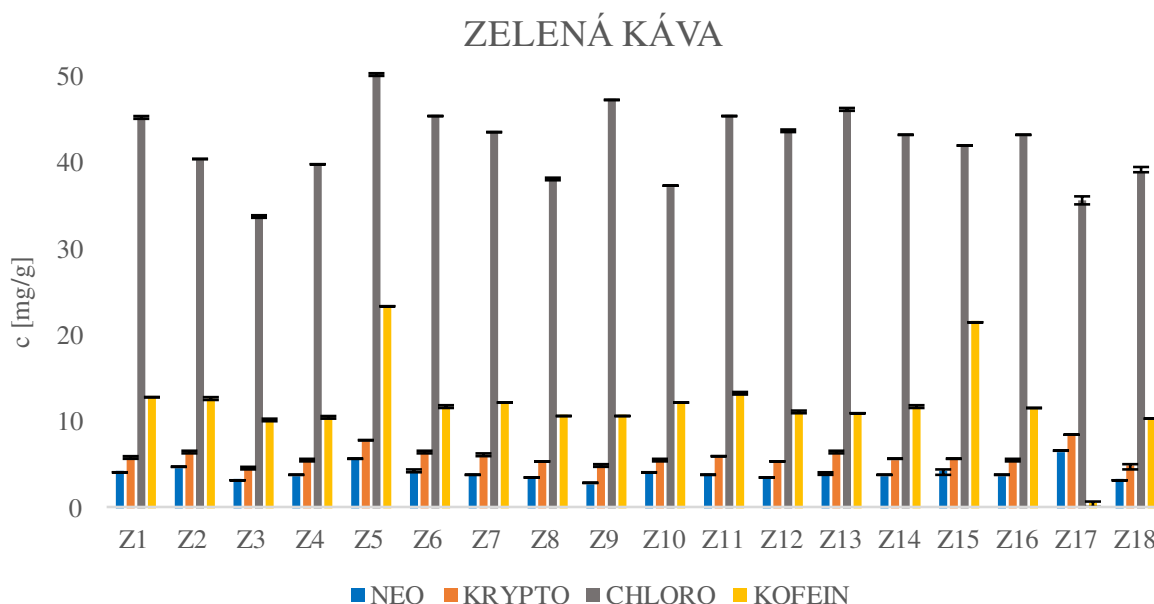
standard	směrnice	úsek	$R^2$	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
chlorogenová kyselina	12,05 ± 0,04	6,35 ± 10,29	0,9998	0,0393	0,0393
neochlorogenová kyselina	13,58 ± 0,08	17,22 ± 4,10	0,9995	0,0215	0,0716
kryptochlorogenová kyselina	13,36 ± 0,02	-5,14 ± 3,13	1	0,0406	0,1352
kofein	11,60 ± 0,03	12,44 ± 2,21	9,9999	0,0430	0,1435

Dále byla stanovena přesnost metody proměřením dvou kalibračních roztoků celkem desetkrát. Správnost byla ověřena standardním roztokem o známé koncentraci studovaných biologicky aktivních látek. Odchyly stanovení u obou kalibračních roztoků nepřesáhly 0,9 %. Pro zjištění opakovatelnosti extrakčního kroku byl vybrán jeden vzorek pražené kávy (P31), u kterého byla extrakce provedena v pěti opakováních v jednom dni. Stejný postup byl proveden i následující týden. Opakovatelnost analytické metody nepřesáhla hodnotu 7 % (Příloha 7).

Pro kvantitativní analýzu studovaných biologicky aktivních látek byly jednotlivé vzorky pražené, zelené a bezkofeinové kávy připraveny dle postupu, který je uveden v kapitole 2.4.1 a ihned po extrakci byl stanoven obsah jednotlivých látek. Výsledné průměrné hodnoty, včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v příloze 8 - 10. Grafické znázornění obsahu studovaných látek v 64 vzorcích kávy je uvedeno na obrázcích 31- 33. Z uvedených obrázků je patrné, že největší rozdíly mezi analyzovanými vzorky kávy jsou v obsahu kyseliny chlorogenové a kofeinu. Obsahy neochlorogenové a kryptochlorogenové kyseliny se liší pouze nepatrně.

Největší obsah kofeinu nalezneme u vzorku Z5 a Z15 (Obrázek 31, Příloha 8). Jedná se o vzorky kávy robusta, které obsahují větší množství kofeinu (2x až 4x více než arabika). Minimální množství kofeinu lze pozorovat u vzorku Z17, jelikož se jedná o zelená bezkofeinová zrna. Z experimentálně zjištěných dat nebylo prokázáno, že zrna robusty ovlivňují množství derivátů kyseliny chlorogenové. Nejvyšší obsah chlorogenové kyseliny obsahuje vzorek Z5. Jedná se o vzorek z Vietnamu neznámého složení. Z experimentálně

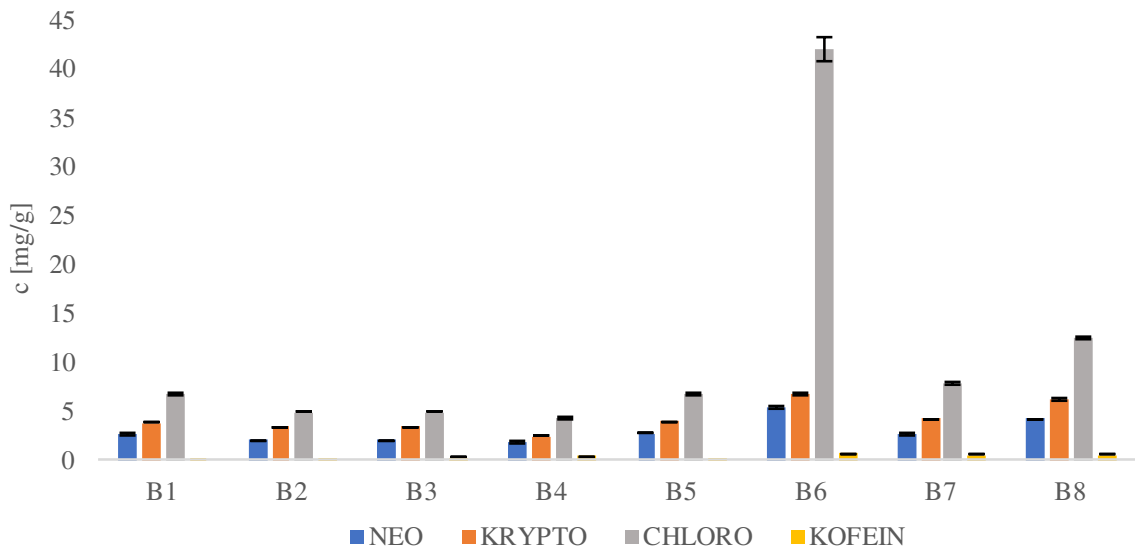
zjištěných dat, z vysokého obsahu kofeinu a antioxidační aktivity, můžeme určit, že se jedná zcela jistě o zrna robusty. U zelené kávy je patrné, že na obsah studovaných látek má vliv způsob zpracování, odrůda a země původu.



**Obrázek 31: Analýza kofeinu a derivátů chlorogenové kyseliny pomocí HPLC/UV systému u zelených kávových zrn**

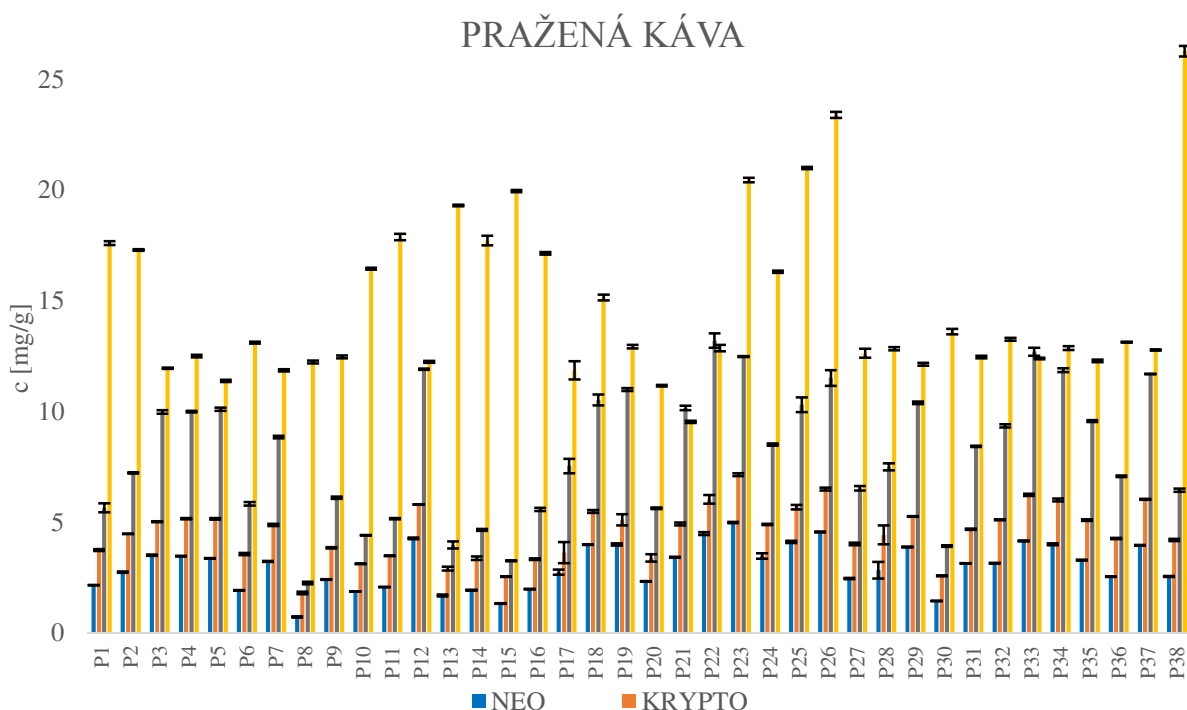
U vzorků bezkofeinových káv bylo experimentálně ověřeno, že zrna obsahují snížený obsah kofeinu (Obrázek 32, Příloha 9). Největší obsahy všech látek obsahuje vzorek B6. To lze odůvodnit tím, že se jedná o zelenou bezkofeinovou kávu, která obsahuje větší množství chlorogenových kyselin oproti kávě pražené. U ostatních vzorků je obsah chlorogenových kyselin srovnatelný, jelikož se jedná o pražená zrna. Vyšší obsah látek můžeme vidět také u vzorku B8. To může být způsobeno šetrnější metodou odstranění kofeinu.

## BEZKOFEINOVÁ KÁVA

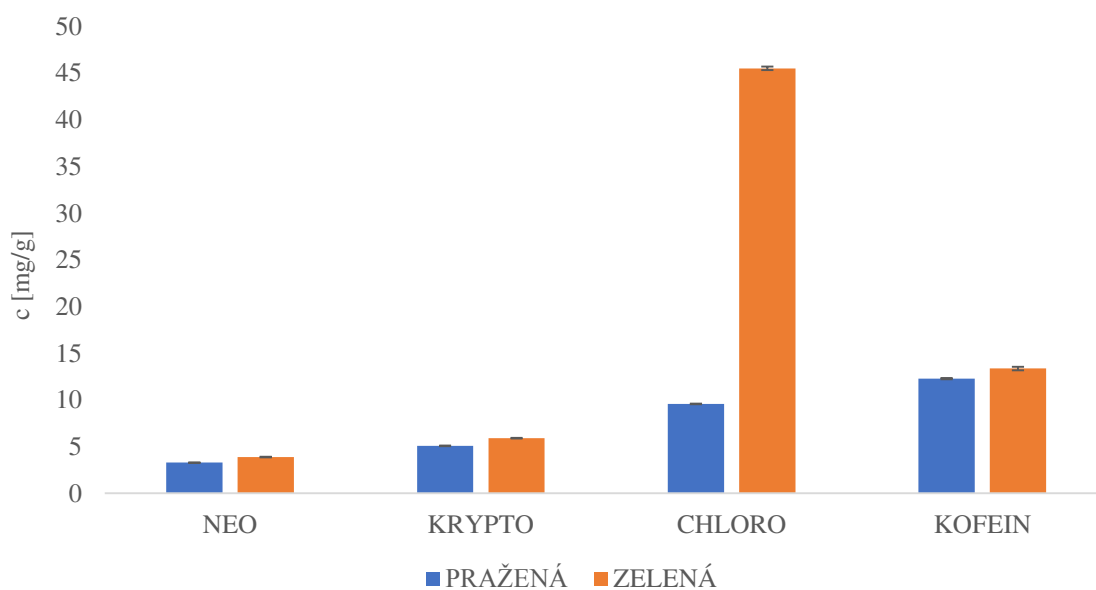


**Obrázek 32: Analýza kofeinu a izomerů kyseliny chlorogenové v pražených bezkofeinových zrnech**

Pražených káv bylo analyzováno celkem 38 vzorků (Obrázek 33, Příloha 10). Největší rozdíly nalezneme opět u obsahu kyseliny chlorogenové (2,26 - 13,21 mg/g) a kofeinu (11,17 – 26,28 mg/g). Největší množství kofeinu bylo stanoveno ve vzorku P38 (INDIA), jedná se o zrna 100 % robusty. Z experimentálních dat bylo zjištěno, že stupeň pražení má vliv na obsahy studovaných látek (čím jsou zrna tmavší, obsahují menší množství derivátů chlorogenových kyselin). To bylo pozorováno u vzorku P8, kde bylo stanoveno nejnižší množství neochlorogenové a kryptochlorogenové kyseliny, neboť se jedná o velmi tmavá zrna. Velkým překvapením byl vysoký obsah kofeinu u vzorku P26. Jelikož se jedná o zrna 100 % arabiky, nebyl takto vysoký obsah kofeinu předpokládán.



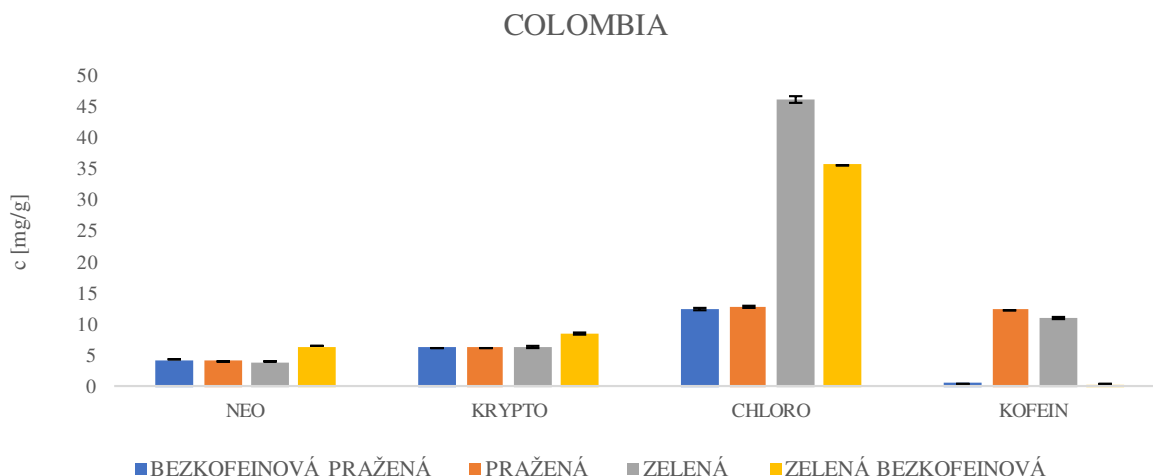
**Obrázek 33: Analýza kofeinu a chlorogenových kyselin pomocí HPLC/ UV systému u pražených kávových zrn**



**Obrázek 34: Analýza kofeinu a izomerů chlorogenových kyselin vzorku P36 ve formě pražených a zelených kávovníkových zrn**

Na obrázku (Obrázek 34, Příloha 11) je zobrazen obsah kofeinu a izomerů chlorogenových kyselin u vzorku P36, který byl analyzován jak ve formě pražené kávy, tak ve formě kávy zelené (Z10). Z obrázku je patrné, že obsahy derivátů kyseliny chlorogenové

(neochlorogenové, kryptochlorogenové) jsou nepatrně vyšší u zelených zrn než u vzorků pražených káv. Dále je viditelný zjevný rozdíl v obsahu kyseliny chlorogenové. Zelená zrna obsahují až 10x více dané látky. Nižší obsah derivátů kyseliny chlorogenové v pražených kávu je způsoben tepelnou úpravou kávových zrn (pražením).

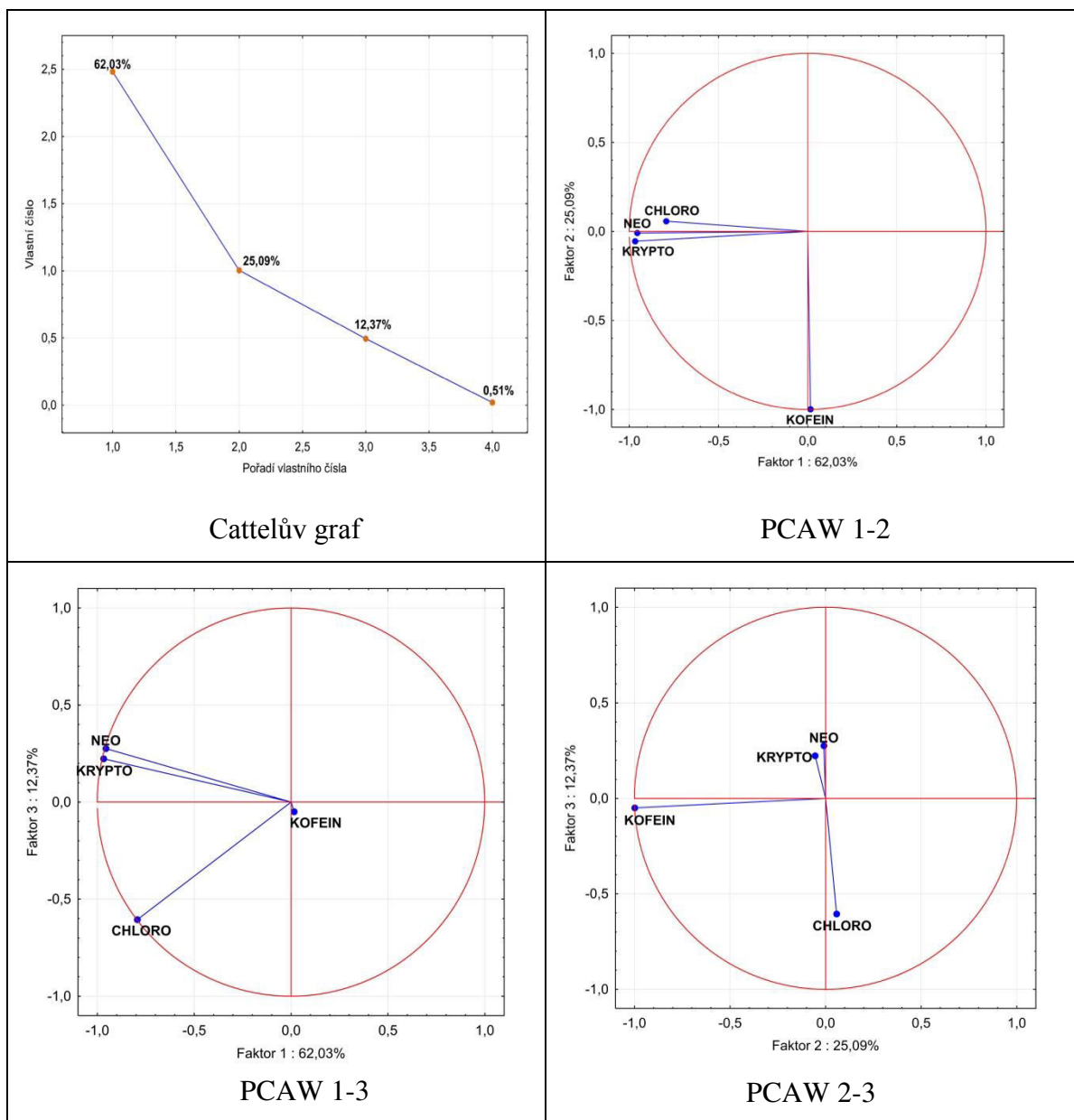


**Obrázek 35: Analýza kofeinu a chlorogenových kyselin pomocí HPLC/UV systému v kávě COLOMBIA v bezkofeinové, pražené, zelené a zelené bezkofeinové formě**

Na obrázku 35, (Příloha 12) je uvedeno porovnání obsahu stanovovaných látek u kávy COLOMBIA ve 4 variantách (kávy zelené, zelené bezkofeinové, pražené a pražené bezkofeinové). Největší rozdíl je patrný v obsahu chlorogenové kyseliny. Zelená zrnka obsahují nejvyšší množství této látky, procesem dekofeinizace dochází k snížení chlorogenové kyseliny zhruba o 25 %. Obsah se dále snižuje pražením zelených zrn. V pražené kávě a v kávě bezkofeinové pražené je obsah chlorogenové kyseliny téměř totožný. V průběhu procesu pražení nedochází k výrazné změně obsahu neochlorogenové, tak kryptochlorogenové kyseliny. Zvýšený obsah kyseliny neochlorogenové a kryptochlorogenové v zelené bezkofeinové kávě může být způsoben přípravou kávy.

Pro porovnání jednotlivých vzorků zelené, bezkofeinové a pražené kávy byly naměřené hodnoty podrobené vícerozměrné statistické analýze. Na obrázku 36 lze vidět Catellův indexový graf, který zobrazuje relativní velikost jednotlivých vlastních čísel a slouží k určení významných hlavních komponent. První dvě komponenty pokrývají 87,12 % celkového rozptylu a spolu se třetí komponentou dokonce 99,5 %. Ze statistického vyhodnocení byla prokázána velmi silná korelace mezi chlorogenovými kyselinami (PCAW 1-2), zatímco jednotlivé izomery chlorogenových kyselin nevykazují žádnou korelaci s kofeinem, jelikož

svírají téměř pravý úhel (Obrázek 36). Z jednotlivých grafů komponentních vah je možné přiřadit první faktor obsahu chlorogenových kyselin, a tedy antioxidační aktivitě vzorku a druhý faktor odpovídá množství kofeinu ve vzorcích. Z obrázku PCAW 1-3 a 2-3 je patrné, že třetí faktor rozlišuje jednotlivé deriváty chlorogenových kyselin.



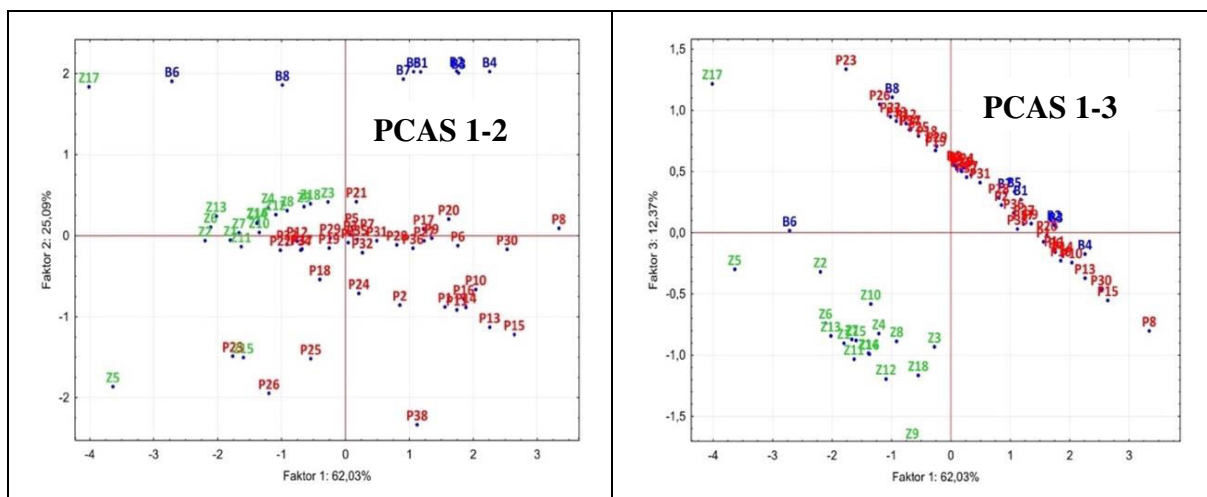
**Obrázek 36: Cattellův graf a grafy komponentních vah**

Z grafu komponentního skóre (Obrázek 37) lze rozlišit jednotlivé vzorky kávy jednak na základě obsahu kofeinu a jednak na základě obsahu chlorogenových kyselin. V horní řadě grafu komponentního skóre PCAS 1-2 jsou pozorovány vzorky bezkofeinových káv (modrá



barva) spolu s kávou Z17, protože se jedná o zelenou, ale rovněž bezkofeinovou kávu. Naproti tomu kávy s vysokým obsahem kofeinu (P23, P25, P26, P38 a Z5) jsou umístěny v dolní oblasti grafu PCAS 1-2. Vysoký obsah kofeinu je typický pro odrůdu kávy robusta (P25 a P38). Ve středové oblasti jsou lokalizovány vzorky kávy zelené (zelená barva) a pražené (červená barva) se srovnatelným obsahem kofeinu. Dále jsou z grafu PCAS 1-2 patrné shluky vzorků kávy zelené a pražené, které se liší celkovým obsahem chlorogenových kyselin. Zelené kávy jsou umístěny v levé polovině grafu, zatímco pražené vzorky kávy v pravé polovině grafu.

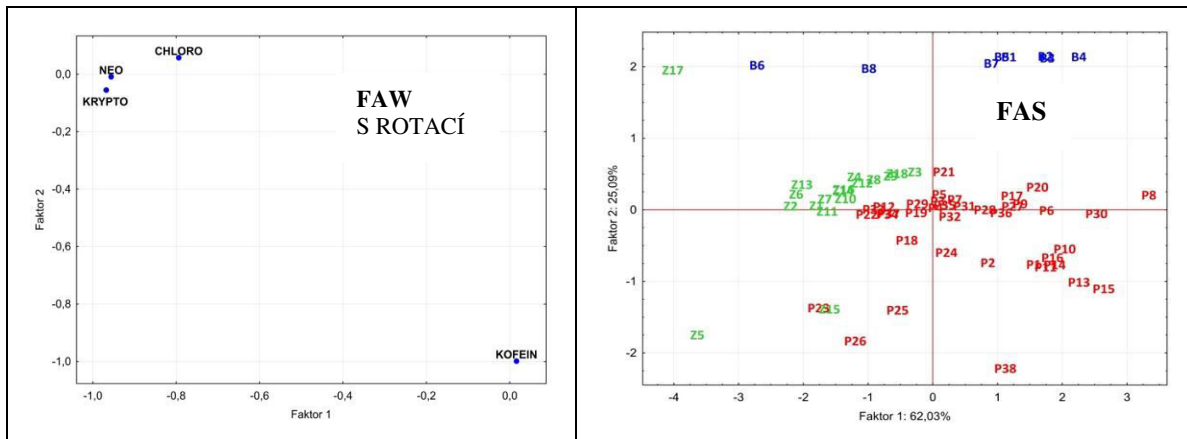
Graf komponentního skóre PCAS 1-3 rozděluje vzorky studovaných vzorků káv do dvou hlavních shluků dle obsahu jednotlivých derivátů chlorogenových kyselin na zelené a pražené. Pražením dochází ke značnému úbytku kyseliny chlorogenové, což způsobuje jednoznačnou klasifikaci vzorků na zelené a pražené zrna. V grafu PCAS 1-3 jsou pozorovány některé odlehle body v rámci jednotlivých shluků. Jedná se o bod B6, který odpovídá zelené, bezkofeinové kávě. Z pražených káv obsahuje káva P23 nejvyšší množství neochlorogenové a kryptochlorogenové kyseliny, zatímco káva P8 obsahuje nejmenší množství těchto kyselin.



**Obrázek 37: Grafy komponentního skóre**

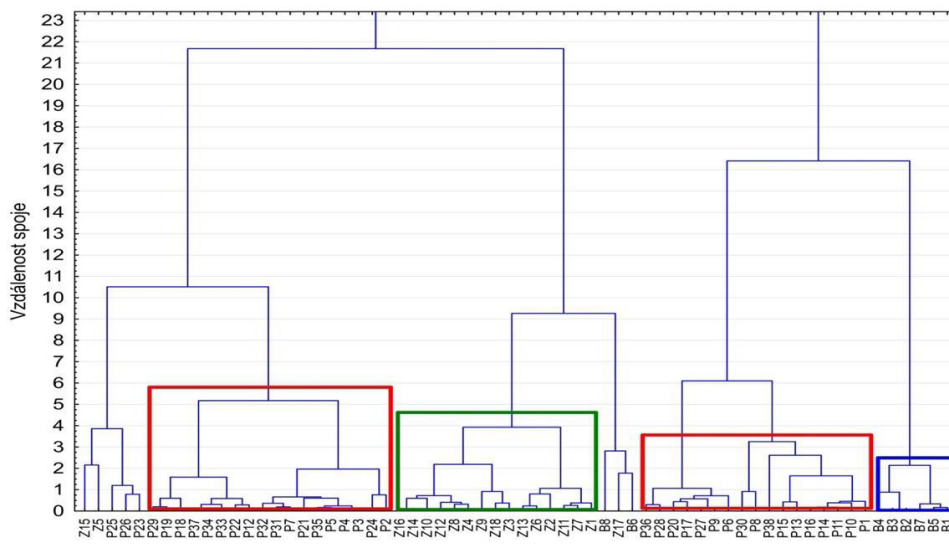
Pro potvrzení výsledků získaných analýzou hlavních komponent byla také provedena faktorová analýza s použitím rotace Varimax normalizovaný (Obrázek 38). Pro vytvoření shluků byla použita Wardova metoda. Graf faktorových vah (FAW) potvrzuje popis dvou hlavních faktorů. Faktor 1 odpovídá obsahu derivátů kyselin chlorogenových, protože tato

proměnná je lokalizována v grafu faktorových vah nejbližte jednotkové hodnotě daného faktoru. Zatímco faktor 2 odpovídá množství kofeinu. Graf faktorového skóre FAS potvrzuje zjištění získané pomocí analýzy hlavních komponent. Tento graf je téměř totožný s grafem PCAS 1-2 na obrázku 37.



**Obrázek 38: Grafy faktorové analýzy**

Na obrázku 39 je zobrazen dendrogram, u kterého jsou jasně zřetelné čtyři shluky (2 shluky pražených káv – červená barva, 1 shluk zelené kávy – zelená barva a 1 shluk bezkofeinové kávy – modrá barva). Výsledky opět potvrzují zjištění pomocí analýzy hlavních komponent a faktorové analýzy.

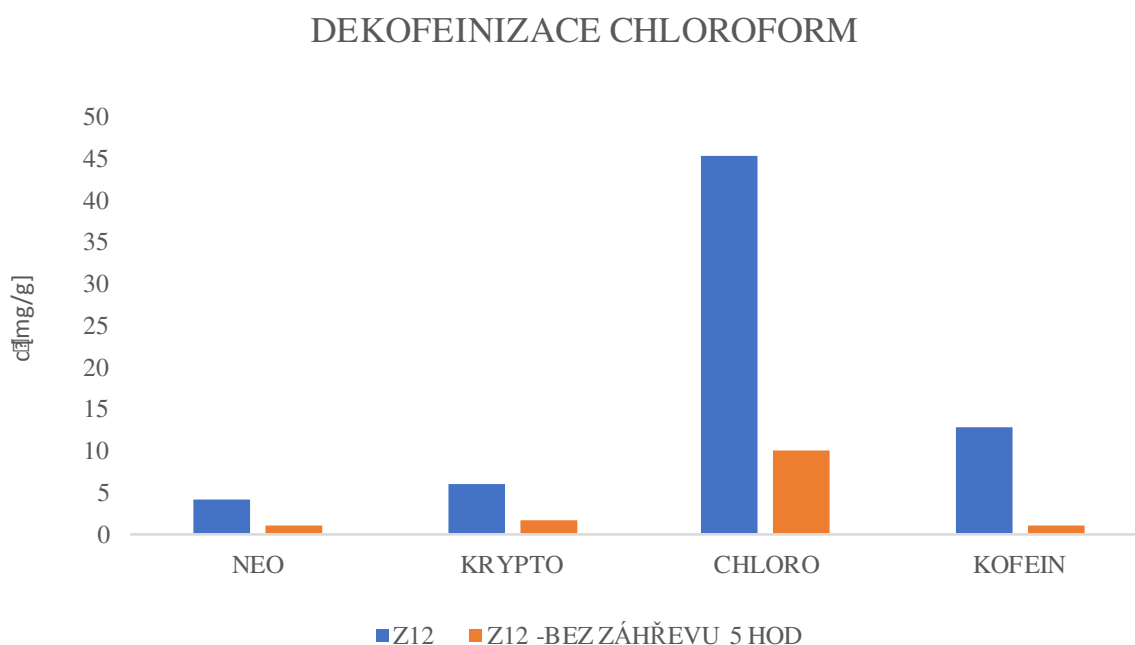


**Obrázek 39: Dendrogram analyzovaných vzorků zelené, pražené a bezkofeinové pražené kávy**

## 3.2 Studium dekofeinizace a její optimalizace

### 3.2.1 Organická rozpouštědla

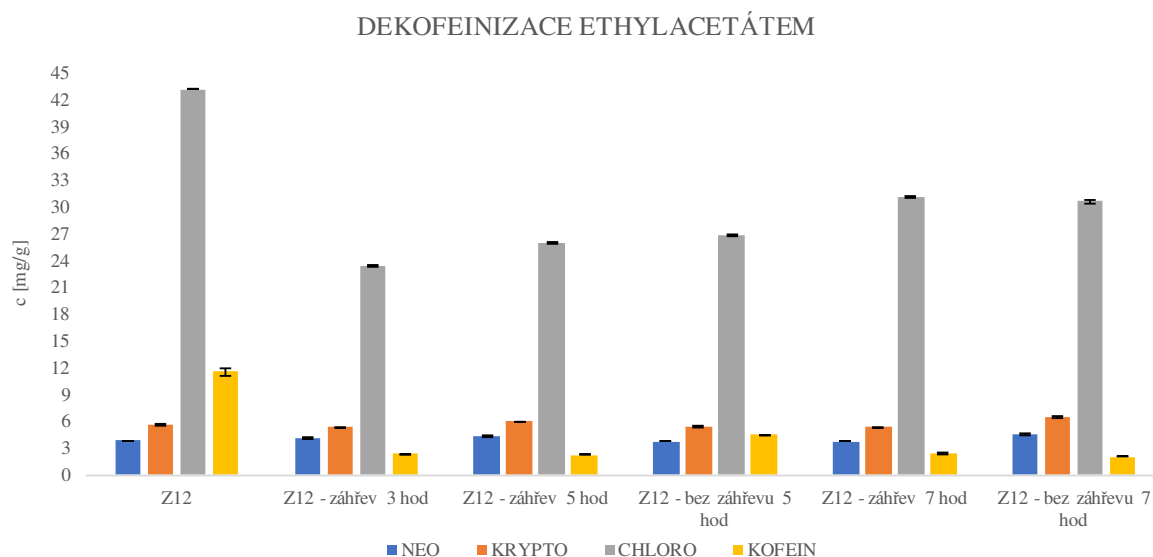
Pro optimalizaci procesu odstranění kofeinu pomocí organických rozpouštědel byla použita zelená napařená zrna kávy Z12. Optimalizace spočívala ve výběru rozpouštědla, teploty a doby samotné extrakce. Nejprve byla provedena extrakce pomocí chloroformu (Obrázek 40, Příloha 13). Zrna byla extrahována po dobu 5 hodin za laboratorní teploty. Z následujícího obrázku lze pozorovat, že užití chloroformu je nevyhovující z důvodu odstranění téměř všech analyzovaných látek na minimální množství. Dalším důvodem nevyužití chloroformu k dekofeinizaci je zčernání zelených kávových zrn po extrakci a následném sušení (Obrázek 44). Z tohoto důvodu byla provedena pouze jedna analýza.



**Obrázek 40: Optimalizace procesu dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla – chloroform**

Následovala optimalizace pomocí ethylacetátu (Obrázek 41, Příloha 14) po dobu 3, 5 nebo 7 hodin za laboratorní teploty nebo teploty nižší, než je bod varu rozpouštědla. V tomto případě teplota nižší než 77°C. Z obrázku lze vidět, že účinnost extrakce kofeinu se příliš neliší při záhřevu 3 až 7 hodin. Následný obrázek zobrazuje také úbytek kyseliny chlorogenové, který se příliš neliší dobou extrakce zelených kávových zrn. Naopak obsah neochlorogenové a kryptochlorogenové kyseliny je téměř totožný s původním obsahem látek. Z grafu vyplívá,

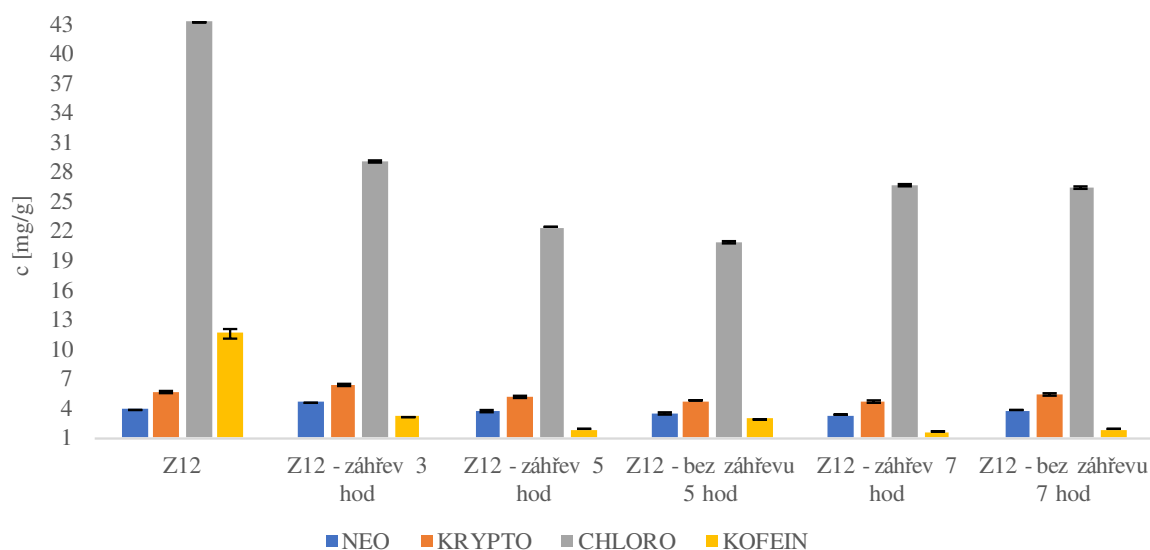
že účinnost extrakce je vyšší při zahřevu organického rozpouštědla. Účinnost extrakce kofeinu z kávových zrn nepřesáhla hodnotu 83 %.



**Obrázek 41: Optimalizace procesu dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla - ethylacetát**

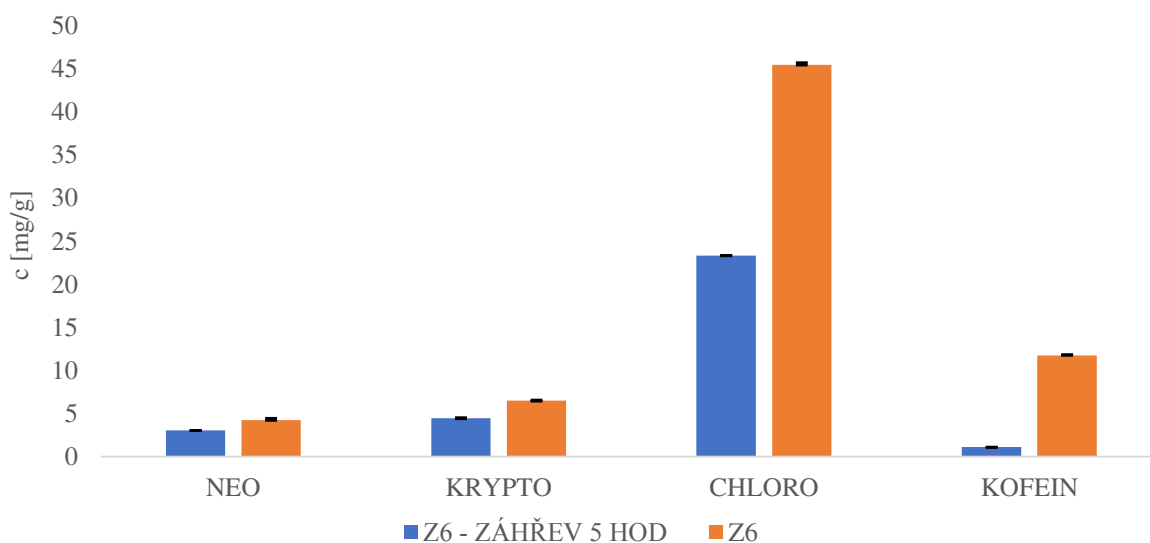
Pro dekofeinizaci zelených zrn bylo také využito dichlormetanu (Obrázek 42, Příloha 15). Mezi optimalizované podmínky patřila především doba a teplota organického rozpouštědla. Na obrázku je vidět úbytek kyseliny chlorogenové, naopak obsahy neochlorogenové a kryptochlorogenové kyseliny se příliš nelišily. Z obrázku je patrný vliv teploty na účinnost extrakce. Nejefektivnější doba pro extrakci kofeinu je zahřevem rozpouštědla 7 hodin. Účinnost odstranění pro tuto dobu byla 85 %, pro zahřev po dobu 5 hodin 83 %. Úbytek kofeinu nebyl tak odlišný, z tohoto důvodu bylo pro odstranění kofeinu z analyzovaných vzorků využito zahřevu dichlormetanu po dobu 5 hodin. Pro zjištění robustnosti metody odstranění kofeinu byl vybrán vzorek zelené kávy Z12, který byl ve třech opakováních extrahován zahříváním dichlormetanem po dobu 5 hodin, jelikož tato doba a typ rozpouštědla byla nejvhodnější. Opakovatelnost analytické metody byla 2,2 %.

### DEKOFEINIZACE DICHLORMETANEM



**Obrázek 42: Optimalizace procesu dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla - dichlormetan**

### DEKOFEINIZACE DICHLORMETANEM



**Obrázek 43: Dekofeinizace dichlormetanem u vzorku Z6**

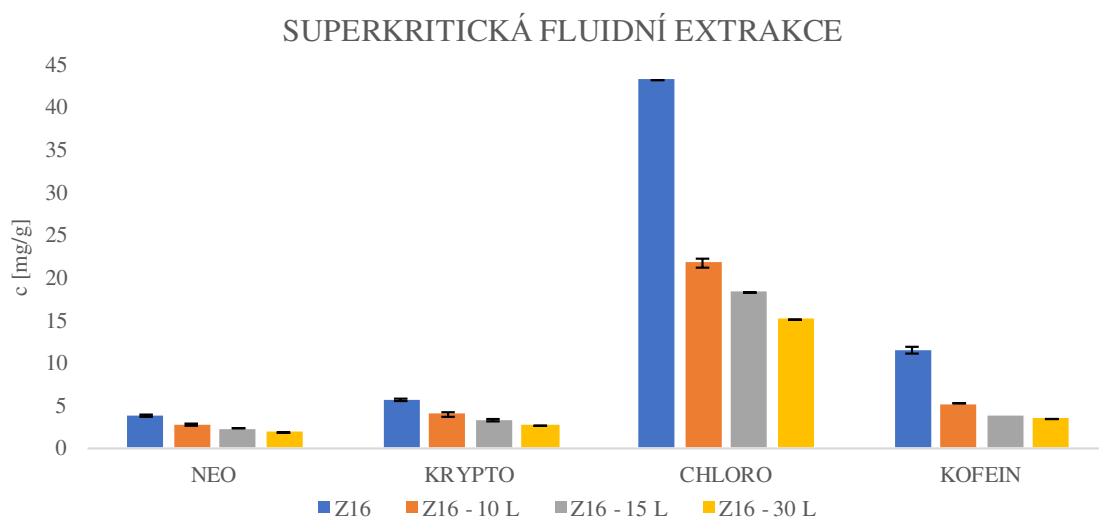
Přesto, že účinnost extrakce je téměř totožná s užitím ethylacetátu, nebylo tohoto rozpouštědla užito, neboť došlo také ke změně barvy kávových zrn (Obrázek 44). U vzorků zelených káv COLOMBIA (Obrázek 43, Příloha 16), BRASIL (Příloha 17) a PERU (Příloha 18) byla provedena dekofeinizace pomocí dichlormetanu po dobu 5 hodin. Účinnost extrakce kofeinu byla u vzorku Z6 - 91 %, Z10 - 86 % a vzorku Z14 - 79 %.



Obrázek 44: Účinek organického rozpouštědla na zelená zrna kávy

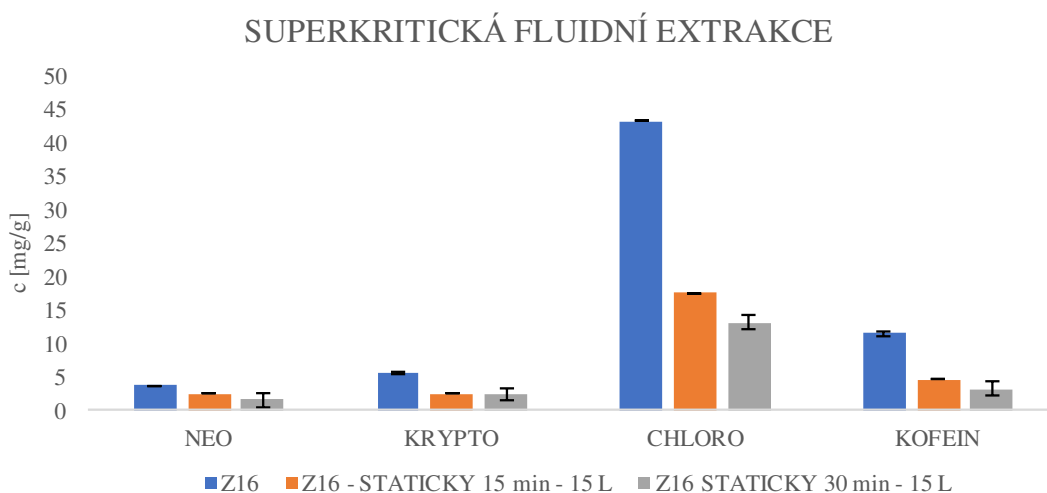
### 3.2.2 SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ EXTRAKCE

K odstranění kofeinu bylo využito také superkritické fluidní extrakce. Pro analýzu byly použity cca 3 g napařené zelené kávy. Pro zjištění optimálních podmínek extrakce docházelo ke změně dynamické a statické extrakce, průtoku  $\text{CO}_2$ , ale i teploty a tlaku.



**Obrázek 45: Dekofeinizace pomocí superkritické fluidní extrakce při změně průtoku CO<sub>2</sub>**

Na obrázku 45 je graficky znázorněn průběh dynamické extrakce lišící se změnou objemu CO<sub>2</sub>. Při porovnání hodnot lze sledovat výrazný lineární pokles látek (Příloha 19). Nejvyšší úbytek je zaznamenán u chlorogenové kyseliny. Obrázek 46 prokazuje, že čím déle extrakce probíhá, tím je proces odstranění účinnější. Experimentálně byla maximální účinnost odstranění kofeinu stanovena na 70 %.



**Obrázek 46: Dekofeinizace pomocí superkritické fluidní extrakce – statické**

Při procesu dekofeinizace bylo využito také statické extrakce (Obrázek 46). Při statické extrakci byla extrakční cela naplněna nadkritickou tekutinou po dobu 15 a 30 minut, poté byl extrakt vypuštěn do sběrné nádoby a následovala dynamická extrakce při stejném objemu CO<sub>2</sub>. Při statické extrakci probíhající 30 minut bylo extrahováno vyšší množství látek to je znázorněno na obrázku 46, (Příloha 20).

## 4 ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce bylo studium antioxidační aktivity, kvantifikace chlorogenových kyselin a kofeinu a v závěru možné metody odstranění kofeinu z kávových zrn.

První část této diplomové práce byla zaměřena na stanovení antioxidační aktivity metodami ABTS a DPPH a stanovení celkového množství fenolických látek v kávě s využitím spektrofotometrických technik. Nejprve byly optimalizovány podmínky pro analýzu studovaných vzorků, následně byla provedena kalibrace s využitím standardů (Trolox – ABTS a DPPH, kyselina gallová – FCM). S využitím kalibračních závislostí byla přepočtena změna absorbance na celkovou antioxidační aktivitu a celkový obsah fenolických látek vztážený na 1 g vzorku kávy. Bylo potvrzeno, že káva obsahující zrna robusty obsahují vyšší podíl antioxidační aktivity než zrna kávy arabiky. Následně bylo zjištěno, že procesem pražení vzrůstá obsah antioxidační aktivity, což může být způsobeno vznikem melanoidů. Z analýzy fenolických látek byl prokázán vztah mezi složením kávových zrn a metodou DPPH.

Druhá část byla zaměřena na stanovení obsahu chlorogenových kyselin a kofeinu v extraktu kávy s následným statistickým vyhodnocením. Byla provedena optimalizace chromatografické separace. Pro analýzu chlorogenových kyselin a kofeinu byla zvolena kolona Acentis Express F5 (150 x 3 mm; 2,7  $\mu$ m). Separace probíhala při izokratické eluci 25 % metanolu ve vodě okyselené kyselinou mravenčí na pH 2,4. Všechny analyzované látky byly separovány do 6 minut. Poté byla provedena kalibrace s využitím standardů neochlorogenové, kryptochlorogenové a chlorogenové kyseliny a kofeinu. S využitím programu QC expert byly vyhodnoceny kalibrační křivky, z nichž byly stanoveny obsahy jednotlivých látek. Analýzou bylo zjištěno, že při procesu pražení dochází k výraznému poklesu především chlorogenové kyseliny, avšak obsah neochlorogenové a kryptochlorogenové kyseliny se výrazně neliší. Ze statistického vyhodnocení byla prokázána velmi silná korelace mezi chlorogenovými kyselinami. Z naměřených hodnot mimo jiné vyplynulo, že procesem dekofeinizace dochází k úbytku chlorogenové kyseliny i pomocí superkritické fluidní extrakce. Měření potvrdilo deklarovaný vyšší obsah kofeinu v odrůdě kávy robusta.

Třetí část byla zaměřena na proces dekofeinizace pomocí organických rozpouštědel, ethylacetátu, chloroformu a dichlormetanu. Byla provedena optimalizace metody v závislosti na čase, teplotě a typem rozpouštědla. Za použití chloroformu docházelo k nejvyšší účinnosti odstranění kofeinu, ale také docházelo k úbytku izomerů chlorogenových kyselin, následně



došlo k zhnědnutí kávových zrn z tohoto důvodu nemělo smysl provádět dekofeinizaci pomocí tohoto rozpouštědla. Prokázalo se, že účinnost extrakce pomocí ethylacetátu se výrazně neliší v závislosti na čase. V případě ethylacetátu jako rozpouštědla účinnost extrakce nepřesáhla hodnotu 83 %. Nejvhodnějším rozpouštědlem pro extrakci kofeinu byl využit dichlormetan, kdy nedocházelo k výraznému úbytku ostatních látek a účinnost extrakce byla nejvyšší. Jelikož většina organických rozpouštědel je toxických a zanechá malou stopu chemických látek v dekofeinovaných zrnkách kávy, opouští se od dané metody pomocí organických rozpouštědel a využívá se superkritické fluidní extrakce. Výhodou dekofeinizace pomocí superkritického oxidu uhličitého je netoxicity a schopnost zachovat vůni a aroma dané kávy. Nejpoužívanější metodou anorganické dekofeinizace je superkritická fluidní extrakce. Tato laboratorní metoda je v závislosti na čase nejúčinnější pro dekofeinizaci zelených kávových zrn. V průběhu mého měření, ale docházelo ke snížení obsahu všech chlorogenových kyselin. Účinnost extrakce nepřesáhla hodnotu 70 %. Naměřené hodnoty v této diplomové práci a parametry normou ovlivnila časová expozice kávových zrn pomocí superkritické fluidní extrakce, neboť z časových důvodů byla zrna exponována maximálně 2,5 hodiny místo prezentovaných 11,5 hodin. Z experimentálně zjištěných dat bylo možné sledovat lineární pokles derivátů chlorogenových kyselin, především kyseliny chlorogenové v závislosti na době extrakce kávových zrn. Z výsledků analýzy lze předpokládat, že při extrakci 11,5 hodin by byly téměř všechny deriváty chlorogenových kyselin z kávových zrn odstraněny.

## 5 SEZNAM LITERATURY

- [1] AUGUSTÍN, J. *U kávy o kávě a kávovinách*. Brno, Jota s.r.o., 2016.
- [2] VIGNOLI, J.A., D.G. BASSOLI a M.T. BENASSI. *Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material*. *Food Chemistry*[online]. 2011, 124(3), 863-868.
- [3] JEON, J. S., HAN-TACK K., Il-Hyung J., Se-Ra H., Moon-Seog OH, Kwang-Hee PARK, Jae-Han SHIM a A.M. ABD EL-ATY. *Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions*. *Journal of Chromatography B*.
- [4] Institut kávy, 2010 [online], [cit. 14.04.2018]
- [5] NAVARRA, G., M. MOSCHETTI, V. GUARRASI, M. R. MANGIONE, V. MILITELLO a M. LEONE. *Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy*. *Journal of Chemistry*.
- [6] Phan Thi Thanh Dieu, Ing., *The influence of the coffee roasting proces and coffee preparation on human physiology*, dezertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.
- [7] [www.kava-kafe.cz](http://www.kava-kafe.cz): *Internetový obchod prodejce a distributora kávy společnosti HK Plus s.r.o.* [online]. 2009 [cit. 2017-12-27].
- [8] JANISSEN, B. a TIEN H. *Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review*. *Resources, Conservation and Recycling* [online]. 2018, 128, 110-117.
- [9] PATAY, É. B.; N. SALI; T.KŐSZEGI; R. CSEPREGI; V. L. BALÁZS; T. S. NÉMETH; T. NÉMETH a N. PAPP. *Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three Coffea species*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [online]. 2016, 9(4), 366-371.
- [10] VESELÁ, P. *Kniha o kávě: průvodce světem kávy s recepty na její přípravu*. Praha: Smart Press, 2010.
- [11] *Cafe+co* [online]. [cit. 2018-01-07].
- [12] ESQUIVEL, P. a V. M. JIMÉNEZ. *Functional properties of coffee and coffee by-products*. *Food Research International* [online]. 2012, 46(2), 488-495.
- [13] BRZOŇOVÁ, L. *Svět kávy*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů pro Českou technologickou platformu pro potraviny, 2012. Jak poznáme kvalitu?

- [14] *Wisconsin public radio* [online]. [cit. 2018-01-07].
- [15] *Pollards* [online]. [cit. 2018-01-07].
- [16] N. SUBEDI, Raghu. [online]. *The Netherlands: Copyright Raghu Nath Subedi, 2010* [
- [17] *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, First Edition. Edited by Yi – Fang Chu. 2012 John Wiley & Sons, Inc. Published 2012 by Blackwell Publishing Ltd.
- [18] DRINNAN, J. *Influence of processing on the flavour of Australian coffee: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation*. Barton, A.C.T: RIRDC, 2007.
- [19] BAGCHI, D.; H. MORIYAMA a A. SWAROOP. *Green coffee bean extract in human health*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2017. ISBN 9781498716376.
- [20] OLIVEROS, N. O.; J.A. HERNÁNDEZ, F.Z. SIERRA-ESPINOSA, R. GUARDIÁN-TAPIA a R. PLIEGO-SOLÓRZANO. *Experimental study of dynamic porosity and its effects on simulation of the coffee beans roasting*. *Journal of Food Engineering* [online]. 2017, 199, 100-112 .
- [21] *Kuban Makina* [online]. [cit. 2018-01-07].
- [22] WILSON, P. S. *Coffee roasting acoustics*. *The Journal of the Acoustical Society of America* [online]. 2014, 135(6).
- [23] *KAVOVARY.CZ* [online]. [cit. 2018-01-07].
- [24] *ČERSTVÁ KÁVA* [online]. [cit. 2018-01-07].
- [25] *Coffee* [online]. [cit. 2017-12-29].
- [26] *Decaffeination: Stimulating Discussion About Stimulant-Free Coffee*[online]. Education & Resources, 2016 [cit. 2017-12-29].
- [27] RAMALAKSHMI, K. a B. RAGHAVAN. *Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How?*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*[online]. 1999, 39(5), 441-456.
- [28] KATZ, S.N. *Decaffeination of Coffee* [online]. New Jersey, USA, 1987.
- [29] DE MARCO, I.; S. RIEMMA a R. IANNONE. *Life cycle assessment of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caffeine from coffee beans*. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2018, 133, 393-400.
- [30] HEILMANN, W. *Technology II: Decaffeination of Coffee*. CLARKE, R. J. a O. G. VITZTHUM, ed. *Coffee* [online]. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001, s. 108-124.
- [31] *KYSELINA CHLOROGENOVÁ* [online]. [cit. 2018-01-07].

- [32] CLIFFORD, M. N.; J. KIRKPATRICK; N. KUHNERT; H. ROOZENDAAL a P. R. SALGADO. *LC-MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids*. Food Chemistry [online]. 2008, 106(1), 379-385
- [33] ABEBE B. *Some biochemical compounds in coffee beans and methods developed for their analysis*. International Journal of the Physical Sciences [online]. 2011, 6(28).
- [34] PREEDY, V. *Coffee in health and disease prevention*. Boston, MA: Elsevier, 2014.
- [35] [online]. [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-trigonelline-one-of-the-chemical-constituents-of-fenugreek\\_258523997](https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-trigonelline-one-of-the-chemical-constituents-of-fenugreek_258523997)
- [36] TAGUCHI, HIROSHI, MUNETO SAKAGUCHI a YOSHIHIDE SHIMABAYASHI. *Trigonelline Content in Coffee Beans and the Thermal Conversion of Trigonelline into Nicotinic Acid during the Roasting of Coffee Beans*[online]. 1985, 49(12), 3467-3471.
- [37] SILVA, J. A., N. BORGES, A. SANTOS a A. ALVES. *Method Validation for Cafestol and Kahweol Quantification in Coffee Brews by HPLC-DAD*. Food Analytical Methods [online]. 2012, 5(6), 1404-1410.
- [38] Food-Info.net> Kahweol and Cafestol Food-Info [online]. Dostupné z <http://www.food-info.net/uk/products/coffee/kahweol.htm>.
- [39] *Antioxidant potential of free diterpenes cafestol and kahweol rich extractives of coffee beans* [online]. Canadian Journal of Basic and Applied Sciences, 2015, 3(3).
- [40] REDGWELL, R. a M. FISCHER. *Coffee carbohydrates*. Brazilian Journal of Plant Physiology [online]. 2006, 18(1), 165-174.
- [41] *Coffeechemistry.com: Carbohydrates in Coffe* [online]. 2015 [cit. 2017-12-07]. Dostupné z: <https://www.coffeechemistry.com/chemistry/carbohydrates/carbohydrates-in-coffee>
- [42] BAGCHI, D., H. MORIYAMA a A. SWAROOP. *Green coffee bean extract in human health*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2017. ISBN 9781498716376.
- [43] Introduction to coffee. RAO, L. J. M. a K. RAMALAKSHMI. *Recent Trends in Soft Beverages* [online]. Woodhead Publishing Limited, 2011, s. 3-25.
- [44] GARG, S. K. Green Coffee Bean. *Nutraceuticals* [online]. Elsevier, 2016, s. 653-667.
- [45] WIKIPEDIE [online]. [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kofein>.
- [46] *Caffeine Toxicity: A Brief Review and Update* [online]. 2017, 18(3), 197-202 [cit. 2017-12-08].

- [47] *Estimation of caffeine intake from analysis of caffeine metabolites in wastewater* [online]. Elsevier B.V. All rights reserved, 2017, 609, 1582-1588.
- [48] TURNBULL, D., J. V. RODRICKS, G. F. MARIANO a F. CHOWDHURY. Caffeine and cardiovascular health. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2017, 89, 165-185.
- [49] ZAIN, M. Z. M., A. S. BABA a A. B. SHORI. *Effect of polyphenols enriched from green coffee bean on antioxidant activity and sensory evaluation of bread*. *Journal of King Saud University-Science* [online]. 2017.
- [50] RAHMAN, Md. J., A. COSTA DE CAMARGO a F. SHAHIDI. *Phenolic profiles and antioxidant activity of defatted camelina and sophia seeds*. *Food Chemistry* [online]. 2018, 240, 917-925.
- [51] BEN AHMED, Z., M. YOUSFI, Johan VIAENE, B. DEJAEGHER, K. DEMEYER, D. MANGELINGS a Y. VANDER HEYDEN. *Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from Pistacia atlantica ssp. leaves*. *Pharmaceutical Biology*[online]. 2016, 55(1), 1185-1194.
- [52] JESZKA-SKOWRON, M. A. SENTKOWSKA, K. PYRZYŃSKA a M. P. DE PEÑA. *Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation*. *European Food Research and Technology* [online]. 2016, 242(8), 1403-1409.
- [53] FARAH, A. a C. M. DONANGELO. *Phenolic compounds in coffee*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* [online]. 2006, 18(1), 23-36.
- [54] ROVER, M. R. a R. C. BROWN. *Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [online]. 2013, 104, 366-371.
- [55] STRATIL, P., B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. *Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals*. *Talanta*[online]. 2007, 71(4), 1741-1751.
- [56] PAULOVÁ H., BOCHOŘÁKOVÁ H., TÁBORSKÁ E., *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*, *Chemické Listy* 98,174 – 179 (2004).
- [57] HORÁČKOVÁ V., *Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity červených a fialových odrůd brambor*, *Chemické Listy* 101, 584–591 (2007).

- [58] CERRETANI, Lorenzo a Alessandra BENDINI. *Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 625-635.
- [59] SOCHOR, Jiri, Marketa RYVOLOVA, Olga KRYSTOFOVA, et al. *Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. Molecules* [online]. 2010, 15(12), 8618-8640.
- [60] RE, R., N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG a C. RICEEVANS. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1999, 26(9-10), 1231-1237.
- [61] *A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk.* 2012, 11(1), 83-89.
- [62] PISOSCHI, A. M. a G. P. NEGULESCU. *Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. Biochemistry & Analytical Biochemistry* [online]. 2012, 01(01).
- [63] PRIOR, R. L., Xianli WU a Karen SCHAICH. *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry*[online]. 2005, 53(10), 4290-4302.
- [64] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 8086369072.
- [65] Bc. HAVLOVA D., *Studium degradace katechinů v zeleném čaji pomocí HPLC s rychlými gradienty a hmotnostně spektrometrickou detekcí*, Pardubice, 2015. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Lenka Česlová
- [66] ZÁRUBA, K. *Analytická chemie.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 9788070809501.
- [67] *A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* [online]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016, 5(2).
- [68] *High Performance Liquid Chromatography*, 2015 [online],[cit. 15.04.2018]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>.
- [69] KUPIEC T., PhD. *Quality-Control Analytical Methods: High - Performance Liquid Chromatography* [online]. International Journal of Pharmaceutical Compounding, 2004, 8(3).

- [70] WELDEGEBREAL, B., M. REDI-ABSHIRO a B. S. CHANDRAVANSI. *Development of new analytical methods for the determination of caffeine content in aqueous solution of green coffee beans. Chemistry Central Journal* [online]. 2017, 11(1).
- [71] P Naveen, HB Lingaraju<sup>1</sup>, M Deepak<sup>1</sup>, B Medhini, K Shyam Prasad<sup>1</sup>. *Method Development and Validation for the Determination of Caffeine: An Alkaloid from Coffea arabica by High-performance Liquid Chromatography Method* [online]. 2018, (10).
- [72] AHMAD BHAWANI, S., S.S. FONG a M. N. MOHAMAD IBRAHIM. *Spectrophotometric Analysis of Caffeine. International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2015, 2015, 1-7.
- [73] YASHIN, A., Y. YASHIN, X. XIA a B. NEMZER. *Chromatographic Methods for Coffee Analysis: A Review. Journal of Food Research* [online]. 2017, 6(4), 60.
- [74] CONTE, Eric D., Eugene F. BARRY a Harry RUBINSTEIN. *Determination of Caffeine in Beverages by Capillary Zone Electrophoresis: An Experiment for the Undergraduate Analytical Laboratory. Journal of Chemical Education* [online]. 1996, 73(12).
- [75] Jozef L. Beckers. *Determination of caffeine in coffee: sense or nonsense?* [online]. Journal of Chemical Education, 2004, 81(1).
- [76] DEL CAMPO, G., I. BERREGI, R. CARACENA a J. ZURIARRAIN. *Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by <sup>1</sup>H NMR spectrometry. Talanta* [online]. 2010, 81(1-2), 367-371.
- [77] JESZKA-SKOWRON, M. A. SENTKOWSKA, K. PYRZYŃSKA a M. Paz DE PEÑA. *Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. European Food Research and Technology.*
- [78] ITO, M., T. SUZUKI, S. YADA, A. KUSAI, H. NAKAGAMI, E. YONEMOCHI a K. TERADA. *Development of a method for the determination of caffeine anhydrate in various designed intact tables by near-infrared spectroscopy: A comparison between reflectance and transmittance technique. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2008, 47(4-5), 819-827.
- [79] SHAN, J., T. SUZUKI, D. SUHANDY, Y. OGAWA a N. KONDO. *Chlorogenic acid (CGA) determination in roasted coffee beans by Near Infrared (NIR) spectroscopy. Engineering in Agriculture, Environment and Food* [online]. 2014, 7(4), 139-142 .

- [80] Liew Siew Ling, Nik Ismail Nik Daud and O. Hassan. *Determination Of Coffee Content In Coffee Mixtures* [online]. Malaysian Journal of Analytical Sciences, 2001, 2001, 7(2), 327 – 332.
- [81] PASIAS, I., I. KIRIAKOU a Ch. PROESTOS. *Development of a Rapid Method for the Determination of Caffeine in Coffee Grains by GC-FID—A Fully Validated Approach. Antioxidants* [online]. 2017, 6(3).
- [82] BELAY, A., K. TURE, M. REDI a A. ASFAY. *Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. Food Chemistry* [online]. 2008, 108(1), 310-315.
- [83] POKHREL, P., S. SHRESTHA, S. K. RIJAL a K. Prasad RAI. *A simple HPLC Method for the Determination of Caffeine Content in Tea and Coffee. Journal of Food Science and Technology Nepal*.
- [84] MOON, Joon-Kwan, Hyui Sun YOO a Takayuki SHIBAMOTO. *Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity. Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- [85] CRAIG, A. P., CH. FIELDS, N. LIANG, D. KITTS a A. ERICKSON. *Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. Talanta* [online]. 2016, 154, 481-485.
- [86] JESZKA-SKOWRON, M., A. ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK a T. GRZEŚKOWIAK. *Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. European Food Research and Technology* [online]. 2015, 240(1), 19-31.
- [87] LIU, Y., X. LI, C. YANG, S. TAI, X. ZHANG a G. LIU. *UPLC-MS-MS Method for Simultaneous Determination of Caffeine, Tolbutamide, Metoprolol, and Dapsone in Rat Plasma and its Application to Cytochrome P450 Activity Study in Rats. Journal of Chromatographic Science* [online]. 2012, 51(1), 26-32.
- [88] RIVELLI, D. P., V. V. da SILVA, C. D. ROPKE, D. V. MIRANDA, R. L. ALMEIDA, T. C. H. SAWADA a S. B. de M. BARROS. *Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of Ilex paraguariensis by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*[online]. 2007, 43(2), 215-222.



- [89] LIANG, N., W. XUE, P. KENNEPOHL a D. D. KITTS. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chemistry* [online]. 2016, 213, 251-259
- [90] YASHIN, A., Y. YASHIN, J. WANG a B. NEMZER. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants* [online]. 2013, 2(4), 230-245
- [91] SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I., A. JIMÉNEZ-ESCRIG a F. SAURA-CALIXTO. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry* [online]. 2005, 90(1-2), 133-139.
- [92] KIM, Ji-Hee, Dong AHN, Jong EUN a Sun MOON. Antioxidant Effect of Extracts from the Coffee Residue in Raw and Cooked Meat. *Antioxidants* [online]. 2016, 5(3)
- [93] TROUP, G. J., L. NAVARINI, F. S. LIVERANI, S. C. DREW a D. HINDERBERGER. Stable Radical Content and Anti-Radical Activity of Roasted Arabica Coffee: From In-Tact Bean to Coffee Brew. *PLOS ONE* [online]. 2015, 10(4)
- [94] CÄMMERER, B. a LOTHAR W. K. *Antioxidant activity of coffee brews. European Food Research and Technology* [online]. 2006, 223(4), 469-474.

## 6 PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Průměrné hodnoty antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek v extraktu vzorků bezkofeinových káv včetně jejich směrodatných odchylek

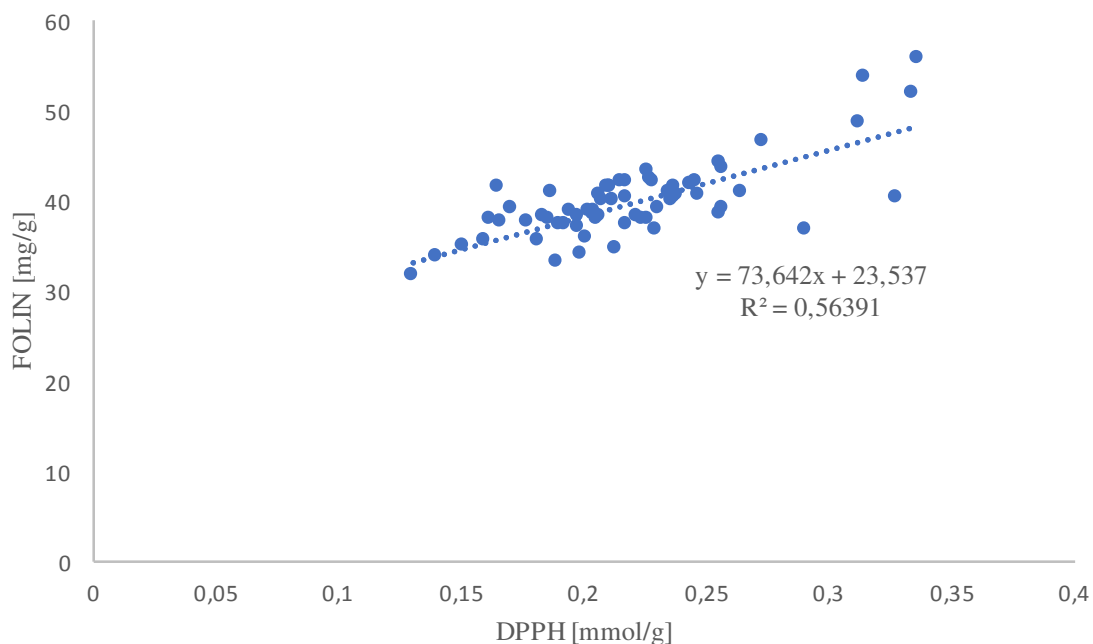
BEZKOFEINOVÁ KÁVA						
označení	ABTS [mmol/g]	SD	DPPH [mmol/g]	SD	FOLIN [mg/g]	SD
B1	0,108	0,001	0,211	0,003	41,246	0,068
B2	0,090	0,003	0,140	0,004	33,499	0,412
B3	0,093	0,004	0,206	0,005	37,898	0,389
B4	0,036	0,003	0,130	0,001	31,505	0,184
B5	0,126	0,002	0,164	0,003	41,155	0,268
B6	0,031	0,001	0,198	0,002	38,152	0,166
B7	0,080	0,001	0,194	0,001	38,685	0,128
B8	0,035	0,002	0,210	0,005	41,259	0,088

**Příloha 2:** Průměrné hodnoty antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek v extraktu vzorků zelených káv včetně jejich směrodatných odchylek

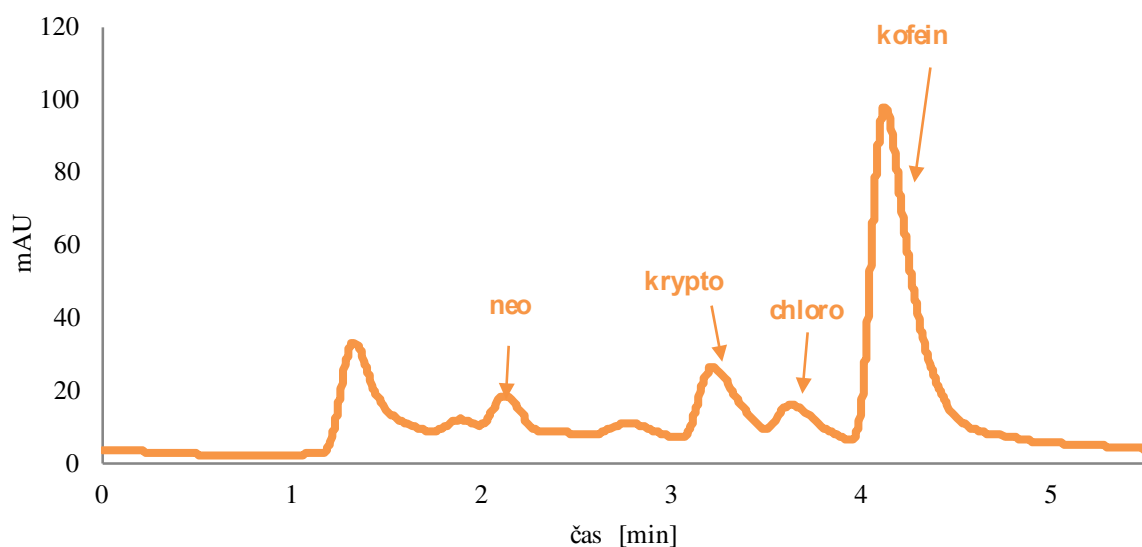
ZELENÁ KÁVA						
označení	ABTS [mmol/g]	SD	DPPH [mmol/g]	SD	FOLIN [mg/g]	SD
Z1	0,112	0,004	0,207	0,006	39,854	0,440
Z2	0,041	0,002	0,217	0,004	41,940	0,091
Z3	0,026	0,001	0,185	0,000	37,836	0,103
Z4	0,058	0,006	0,210	0,005	41,215	0,192
Z5	0,186	0,003	0,336	0,002	55,582	0,367
Z6	0,052	0,002	0,234	0,004	40,780	0,202
Z7	0,031	0,003	0,223	0,007	37,837	0,289
Z8	0,025	0,002	0,197	0,002	36,856	0,158
Z9	0,060	0,005	0,257	0,004	43,489	0,019
Z10	0,035	0,001	0,202	0,009	38,744	0,300
Z11	0,057	0,008	0,227	0,007	42,049	1,070
Z12	0,072	0,009	0,236	0,004	41,225	0,051
Z13	0,091	0,002	0,255	0,003	43,867	0,222
Z14	0,058	0,005	0,230	0,003	39,030	0,217
Z15	0,091	0,005	0,256	0,003	38,775	0,549
Z16	0,165	0,005	0,311	0,004	48,387	0,516
Z17	0,101	0,003	0,327	0,011	40,219	0,340
Z18	0,081	0,000	0,290	0,007	36,433	0,020

**Příloha 3:** Průměrné hodnoty antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek v extraktu vzorků pražených káv včetně jejich směrodatných odchylek

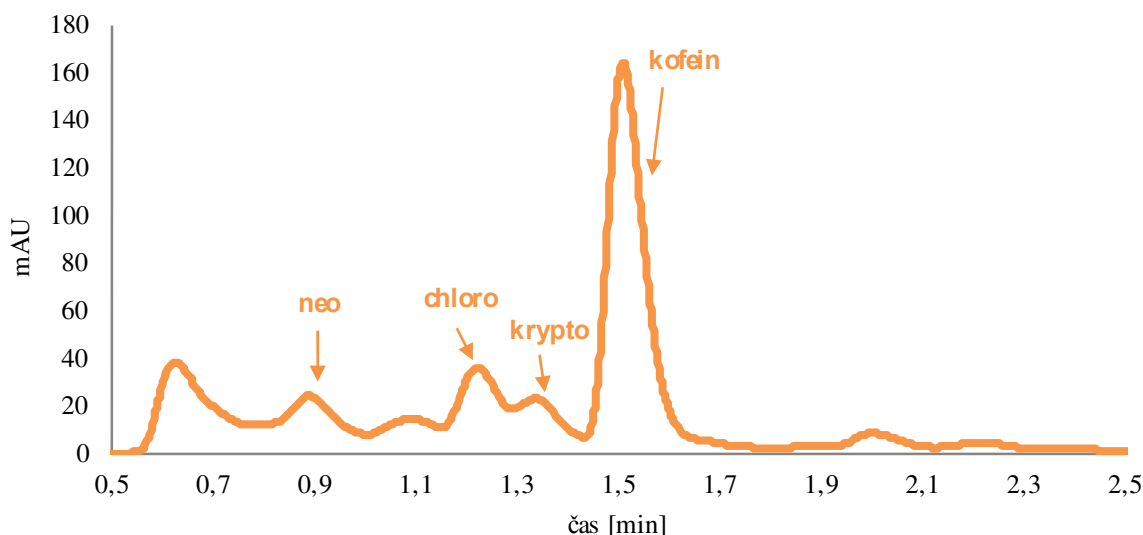
PRAŽENÁ KÁVA						
označení	ABTS [mmol/g]	SD	DPPH [mmol/g]	SD	FOLIN [mg/g]	SD
P1	0,075	0,001	0,180	0,002	35,424	0,119
P2	0,141	0,002	0,226	0,006	43,177	0,416
P3	0,085	0,001	0,183	0,001	37,896	0,337
P4	0,084	0,009	0,228	0,006	41,788	0,146
P5	0,089	0,005	0,212	0,010	39,775	0,483
P6	0,135	0,005	0,201	0,003	35,713	0,249
P7	0,113	0,005	0,246	0,007	40,259	0,262
P8	0,070	0,005	0,189	0,003	32,846	0,224
P9	0,095	0,001	0,226	0,006	37,745	0,082
P10	0,190	0,020	0,198	0,005	33,917	0,123
P11	0,201	0,010	0,212	0,015	34,383	0,022
P12	0,238	0,005	0,237	0,005	40,054	0,169
P13	0,115	0,008	0,235	0,006	39,869	0,114
P14	0,147	0,006	0,243	0,001	41,447	0,704
P15	0,115	0,005	0,221	0,004	38,005	0,234
P16	0,065	0,006	0,190	0,005	37,081	0,356
P17	0,044	0,010	0,176	0,005	37,440	0,357
P18	0,131	0,009	0,187	0,002	40,809	0,521
P19	0,108	0,003	0,170	0,006	38,899	0,190
P20	0,033	0,007	0,151	0,004	34,819	0,315
P21	0,068	0,002	0,161	0,007	37,733	0,534
P22	0,064	0,004	0,159	0,007	35,463	0,388
P23	0,081	0,009	0,166	0,005	37,545	0,339
P24	0,139	0,000	0,245	0,003	41,924	0,732
P25	0,197	0,006	0,333	0,012	51,644	0,155
P26	0,292	0,006	0,314	0,023	53,355	0,852
P27	0,100	0,007	0,216	0,014	37,067	0,059
P28	0,114	0,005	0,237	0,009	40,394	0,903
P29	0,083	0,006	0,215	0,006	41,781	0,710
P30	0,074	0,003	0,205	0,009	37,598	0,691
P31	0,086	0,005	0,217	0,012	40,014	0,665
P32	0,062	0,008	0,229	0,013	36,418	0,728
P33	0,074	0,004	0,255	0,015	38,343	0,317
P34	0,107	0,003	0,264	0,015	40,583	0,224
P35	0,018	0,005	0,204	0,014	38,619	0,282
P36	0,017	0,005	0,192	0,010	37,176	0,678
P37	0,024	0,005	0,206	0,015	40,261	0,356
P38	0,172	0,008	0,272	0,008	46,357	0,940



**Příloha 4:** Závislost mezi celkovým obsahem fenolických látek a celkové antioxidační aktivity stanovenou metodou ABTS



**Příloha 5:** Separace vzorku P2 kolona: kolona: Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2  $\mu$ m); T = 40°C, dávkování 2  $\mu$ l,  $F_m$  = 0,2 ml/min, MF: metanol : H<sub>2</sub>O + kyselina mravenčí (0,2 %), izokratická eluce: 20% metanolu, detekce: 273 nm



**Příloha 6: Separace vzorku P2: kolona:** Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2  $\mu$ m); T = 40°C, **dávkování** 2  $\mu$ l, **F<sub>m</sub>** = 0,4 ml/min, **MF:** metanol: H<sub>2</sub>O + kyselina mravenčí (0,1 %), **gradientová eluce:** 0 min – 15 % metanolu, 1 min – 20 %, 6 min – 25 %, 8 min – 60 %, **detekce:** 273 nm

**Příloha 7: Robustnost metody v rámci jednotlivých dnů a celého měření**

	NEO	KRYPTO	CHLORO	KOFEIN
1. den	5,2818	2,5451	3,6879	4,4925
2. den	5,0149	6,7494	2,4534	3,6232
v rámci celého měření	5,8743	6,0623	6,8235	4,6192

**Příloha 8: Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v extraktu zelených zrn**

ZELENÁ KÁVA								
označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
Z1	4,230	0,017	5,863	0,055	45,319	0,158	12,886	0,110
Z2	4,723	0,091	6,466	0,036	40,430	0,030	12,642	0,218
Z3	3,215	0,073	4,529	0,133	33,822	0,250	10,170	0,083
Z4	3,757	0,029	5,519	0,121	39,734	0,230	10,443	0,080
Z5	5,729	0,078	7,776	0,050	50,186	0,217	23,348	0,247
Z6	4,248	0,231	6,503	0,066	45,452	0,277	11,762	0,094
Z7	3,893	0,035	6,089	0,078	43,627	0,366	12,245	0,071
Z8	3,465	0,079	5,330	0,063	38,051	0,474	10,688	0,056
Z9	2,835	0,011	4,880	0,091	47,362	0,478	10,740	0,300
Z10	4,078	0,032	5,604	0,195	37,307	0,336	12,202	0,131

Z11	3,886	0,035	5,895	0,034	45,495	0,183	13,377	0,190
Z12	3,432	0,028	5,376	0,008	43,708	0,065	11,104	0,275
Z13	4,030	0,096	6,516	0,221	46,191	0,539	10,967	0,159
Z14	3,795	0,052	5,623	0,024	43,189	0,233	11,653	0,085
Z15	4,197	0,356	5,709	0,026	42,069	0,343	21,583	0,096
Z16	3,794	0,023	5,593	0,115	43,183	0,011	11,552	0,416
Z17	6,539	0,020	8,536	0,049	35,618	0,078	0,462	0,010
Z18	3,211	0,074	4,768	0,190	39,146	0,038	10,364	0,142

**Příloha 9:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v bezkofeinové kávě

<b>BEZKOFEINOVÁ KÁVA</b>								
označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
B1	2,611	0,082	3,902	0,035	6,734	0,042	0,070	0,009
B2	2,086	0,011	3,424	0,007	4,962	0,007	0,120	0,012
B3	2,056	0,022	3,400	0,014	4,910	0,033	0,265	0,010
B4	1,934	0,102	2,521	0,074	4,368	0,144	0,376	0,039
B5	2,797	0,014	3,914	0,019	6,806	0,059	0,048	0,045
B6	5,288	0,151	6,777	0,157	41,888	1,211	0,676	0,033
B7	2,737	0,093	4,257	0,055	7,974	0,163	0,537	0,026
B8	4,287	0,013	6,222	0,011	12,445	0,108	0,507	0,011

**Příloha 10:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v pražené kávě

<b>PRAŽENÁ KÁVA</b>								
označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
P1	2,163	0,004	3,746	0,046	5,656	0,200	17,614	0,083
P2	2,745	0,027	4,479	0,011	7,236	0,031	17,299	0,031
P3	3,521	0,029	5,029	0,025	9,982	0,077	11,956	0,029
P4	3,474	0,010	5,163	0,032	10,000	0,041	12,510	0,063
P5	3,368	0,019	5,151	0,038	10,110	0,071	11,389	0,049
P6	1,931	0,012	3,559	0,050	5,831	0,078	13,118	0,041
P7	3,231	0,025	4,881	0,044	8,851	0,059	11,867	0,053
P8	0,722	0,028	1,806	0,060	2,258	0,062	12,243	0,321
P9	2,412	0,014	3,847	0,030	6,110	0,045	12,474	0,065
P10	1,874	0,013	3,127	0,019	4,417	0,008	16,452	0,045
P11	2,074	0,011	3,483	0,014	5,162	0,029	17,888	0,143
P12	4,275	0,035	5,806	0,013	11,913	0,026	12,254	0,043
P13	1,694	0,046	2,902	0,086	3,972	0,158	19,313	0,546
P14	1,931	0,024	3,384	0,079	4,653	0,042	17,728	0,222
P15	1,334	0,011	2,549	0,012	3,263	0,017	19,953	0,051
P16	1,980	0,016	3,333	0,038	5,587	0,073	17,151	0,056
P17	2,744	0,114	3,631	0,481	7,543	0,324	11,868	0,411

P18	3,987	0,014	5,487	0,070	10,526	0,240	15,156	0,128
P19	3,999	0,050	5,116	0,249	10,994	0,063	12,930	0,080
P20	2,332	0,013	3,394	0,162	5,627	0,037	11,172	0,037
P21	3,420	0,017	4,921	0,067	10,169	0,101	9,539	0,052
P22	4,491	0,066	6,036	0,192	13,207	0,320	12,874	0,143
P23	4,984	0,029	7,148	0,067	12,482	0,021	20,458	0,102
P24	3,481	0,126	4,903	0,027	8,513	0,054	16,317	0,055
P25	4,116	0,046	5,679	0,101	10,311	0,337	21,003	0,046
P26	4,564	0,027	6,495	0,066	11,520	0,358	23,400	0,287
P27	2,459	0,029	4,024	0,057	6,536	0,103	12,641	0,203
P28	2,838	0,378	4,433	0,423	7,504	1,117	12,835	0,073
P29	3,882	0,025	5,259	0,015	10,404	0,058	12,139	0,059
P30	1,452	0,014	2,585	0,022	3,932	0,037	13,616	0,121
P31	3,144	0,010	4,688	0,026	8,427	0,029	12,469	0,059
P32	3,155	0,017	5,108	0,023	9,356	0,075	13,271	0,063
P33	4,157	0,027	6,246	0,050	12,707	0,178	12,398	0,034
P34	4,010	0,045	6,011	0,061	11,872	0,084	12,867	0,083
P35	3,292	0,016	5,102	0,034	9,572	0,043	12,290	0,063
P36	2,545	0,010	4,267	0,028	7,079	0,036	13,135	0,022
P37	3,964	0,009	6,035	0,023	11,701	0,013	12,784	0,033
P38	2,556	0,024	4,206	0,050	6,448	0,077	26,281	0,237

**Příloha 11:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek vzorku P35 ve formě pražených a zelených kávových zrn

označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
pražená	3,292	0,016	5,102	0,034	9,572	0,043	12,290	0,063
zelená	3,886	0,035	5,895	0,034	45,495	0,183	13,377	0,190

**Příloha 12:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v kávě COLOMBIA v bezkofeinové pražené, zelené, pražené a zelené bezkofeinové formě

označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
bezkofeinová pražená	4,287	0,013	6,222	0,011	12,445	0,108	0,507	0,011
pražená	4,157	0,027	6,246	0,050	12,707	0,178	12,398	0,034
zelená	4,030	0,096	6,516	0,221	46,191	0,539	10,967	0,159
zelená bezkofeinová	6,539	0,020	8,536	0,049	35,618	0,078	0,462	0,010

**Příloha 13:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek získané procesem dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla-  
CHLOROFORM

<b>DEKOFEINIZACE CHLOROFORM</b>								
<b>označení</b>	<b>NEO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KRYPTO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>CHLORO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KOFEIN [mg/g]</b>	<b>SD</b>
Z1	4,230	0,017	5,863	0,055	45,319	0,158	12,886	0,110
Z1 bez záhřevu 5 hod	1,208	0,089	1,752	0,106	9,941	0,106	1,025	0,171

**Příloha 14:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek získané procesem dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla-  
ETHYLACETÁT

<b>DEKOFEINIZACE ETHYLACETÁT</b>								
<b>označení</b>	<b>NEO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KRYPTO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>CHLORO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KOFEIN [mg/g]</b>	<b>SD</b>
Z16	3,794	0,023	5,593	0,115	43,183	0,011	11,552	0,416
Z16 záhřev 3 hod	4,048	0,063	5,349	0,021	23,475	0,115	2,310	0,022
Z16 záhřev 5 hod	4,308	0,035	5,984	0,024	26,041	0,099	2,241	0,038
Z16 bez záhřevu 5 hod	3,745	0,013	5,400	0,047	26,846	0,053	4,459	0,012
Z16 záhřev 7 hod	3,711	0,028	5,353	0,020	31,129	0,151	2,358	0,038
Z16 bez záhřevu 7 hod	4,525	0,031	6,427	0,162	30,564	0,119	2,023	0,035



**Příloha 15:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek získané procesem dekofeinizace pomocí organického rozpouštědla-DICHLORMETAN

DEKOFEINIZACE DICHLORMETAN								
označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
Z16	3,794	0,023	5,593	0,115	43,183	0,011	11,552	0,416
záhřev 3 hod	4,546	0,021	6,390	0,107	29,044	0,218	3,131	0,046
záhřev 5 hod	3,694	0,048	5,088	0,082	22,359	0,053	1,800	0,023
bez záhřevu 5 hod	3,368	0,066	4,712	0,022	20,793	0,058	2,828	0,009
záhřev 7 hod	3,298	0,025	4,575	0,088	26,559	0,089	1,558	0,039
bez záhřevu 7 hod	3,749	0,020	5,398	0,049	26,345	0,083	1,834	0,012

**Příloha 16:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v extraktu zeleného vzorku Z6, u něhož byla provedena dekofeinizace pomocí DICHLORMETANU

ZELENÁ KÁVA – DEKOFEINIZACE DICHLORMETAN								
označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
Z6 záhřev D 5 hod	3,041	0,032	4,479	0,066	23,345	0,037	1,118	0,023
Z6	4,248	0,231	6,503	0,066	45,452	0,277	11,762	0,094

**Příloha 17:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v extraktu zeleného vzorku Z10, u něhož byla provedena dekofeinizace pomocí DICHLORMETANU

ZELENÁ KÁVA – DEKOFEINIZACE DICHLORMETAN								
označení	NEO [mg/g]	SD	KRYPTO [mg/g]	SD	CHLORO [mg/g]	SD	KOFEIN [mg/g]	SD
Z10 záhřev D 5 hod	3,567	0,025	4,694	0,034	24,436	0,085	1,681	0,024
Z10	4,078	0,032	5,604	0,195	37,307	0,336	12,202	0,131

**Příloha 18:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v extraktu zeleného vzorku Z14, u něhož byla provedena dekofeinizace pomocí DICHLORMETANU

<b>ZELENÁ KÁVA – DEKOFEINIZACE DICHLORMETAN</b>								
<b>označení</b>	<b>NEO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KRYPTO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>CHLORO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KOFEIN [mg/g]</b>	<b>SD</b>
Z14 záhřev D 5 hod	3,714	0,028	4,847	0,110	26,398	0,271	2,345	0,020
Z14	3,795	0,052	5,623	0,024	43,189	0,233	11,653	0,085

**Příloha 19:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v extraktu zeleného vzorku Z16, u něhož byla provedena dekofeinizace pomocí superkritické fluidní extrakce při změně průtoku CO<sub>2</sub>

<b>SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ EXTRAKCE</b>								
<b>označení</b>	<b>NEO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KRYPTO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>CHLORO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KOFEIN [mg/g]</b>	<b>SD</b>
Z16	3,794	0,023	5,593	0,115	43,183	0,011	11,552	0,416
Z16 - 10 L	2,824	0,098	3,941	0,253	21,717	0,629	5,174	0,008
Z16 - 15 L	2,329	0,028	3,248	0,132	18,345	0,020	3,885	
Z16 - 30 L	1,866	0,026	2,675	0,005	15,103	0,003	3,469	0,006

**Příloha 20:** Průměrné obsahy kofeinu a chlorogenových kyselin včetně směrodatných odchylek v extraktu zeleného vzorku Z16, u něhož byla provedena dekofeinizace pomocí superkritické fluidní extrakce při změně časové statické extrakce

<b>SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ EXTRAKCE</b>								
<b>označení</b>	<b>NEO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KRYPTO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>CHLORO [mg/g]</b>	<b>SD</b>	<b>KOFEIN [mg/g]</b>	<b>SD</b>
Z16	3,794	0,023	5,593	0,115	43,183	0,011	11,552	0,416
Z16 staticky 30 min 15 L	1,630	0,040	2,482	0,026	13,198	0,056	3,316	0,009
Z16 staticky 15 min 15 L	2,611	0,011	2,570	0,067	17,565	0,054	4,672	0,065