

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Monika Pulchartová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

KÁVOVÉ TŘEŠNĚ JAKO MATERIÁL PRO PŘÍPRAVU NÁPOJE
ZA STUDENA

Diplomová práce

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Pulchartová**
Osobní číslo: **C21436**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Kávévé třešně jako materiál pro přípravu nápoje za studena**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Uveďte přehled základních živin a dalších důležitých biologicky aktivních látek v kávových třešních. Popište využití produktů z kávových třešní při výrobě potravin. Použijte k tomu zahraniční odborná periodika.
2. Připravte nálevy z kávových třešní (cascara) za studena (různé teploty) a charakterizujte základní chemické a fyzikální vlastnosti nápojů.
3. Výsledky statisticky zpracujte a určete, zda teplota přípravy zásadním způsobem určuje charakter nápoje. Diskutujte s dostupnou literaturou.

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

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

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Kávové třešně jako materiál pro přípravu nápoje za studena jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 8. 5. 2023

Monika Pulchartová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala panu doc. Ing. Liborovi Červenkoví, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích mé diplomové práce. Chtěla bych poděkovat i doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za čas a rady, jež mi věnovala při měření dat týkajících se mé diplomové práce. Velké díky patří i mé rodině za to, že mě podporovala a vytvořila mi vhodné podmínky pro psaní mé práce.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá chemickými a fyzikálními vlastnostmi různě připravených nálevů kávovníkových třešní. V teoretické části jsou popsány kávovníkové třešně a jejich biologicky aktivní látky. Dále jsou popsány další vedlejší produkty průmyslu zpracování kávy a jejich případné využití. V závěru teoretické části jsou uvedeny metody, které byly využity v praktické části. Praktická část se zabývá přípravou nálevů kávovníkových třešní při různých teplotách louhování a jejich následnou analýzou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kávovníková třešeň, nápoj *cascara*, antioxidační aktivita, HPLC, ICP-MS

TITLE

Cold-brew beverage prepared from coffee cherries

ANNOTATION

This thesis examines the chemical and physical properties of infusions of coffee cherries prepared in various ways. In the theoretical part, coffee cherries and their biologically active substances are described. There is also a section about other by-products of the coffee processing industry and their potential use. At the end of the theoretical part, the methods that were used in the practical part are presented. The practical part concentrates on the preparation of infusions from coffee cherries at different leaching temperatures and their subsequent analysis.

KEYWORDS

Coffee cherry, beverage *cascara*, antioxidant activity, HPLC, ICP-MS

OBSAH

| | |
|--|----|
| Seznam tabulek a grafů..... | 10 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 15 |
| 1.1 Kávovník | 15 |
| 1.2 Kávové třešně..... | 16 |
| 1.2.1 Stavba plodu | 17 |
| 1.2.2 Zpracování třešní | 18 |
| 1.2.3 Bezpečnost kávových třešní | 19 |
| 1.2.4 Složení kávových třešní..... | 20 |
| 1.2.5 Výluh třešní (nápoj <i>cascara</i>) | 21 |
| 1.2.6 Chemické složení nápoje <i>cascara</i> | 22 |
| 1.2.7 Další využití kávových třešní | 23 |
| 1.2.8 Stříbrná slupka..... | 25 |
| 1.3 Použité metody..... | 26 |
| 1.3.1 Měření barevnosti | 26 |
| 1.3.2 Spektrometrie | 29 |
| 1.3.3 Stanovení antioxidační aktivity | 29 |
| 1.3.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek (Folin-Ciocalteuova metoda) | 31 |
| 1.3.5 Stanovení flavonoidů..... | 31 |
| 1.3.6 Stanovení antokyanů | 32 |
| 1.3.7 Kapalinová chromatografie | 32 |
| 1.3.8 ICP-MS..... | 34 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 36 |
| 2.1 Použité chemikálie | 36 |
| 2.2 Přístroje a pomůcky..... | 38 |
| 2.3 Vzorek kávových třešní..... | 39 |
| 2.3.1 Příprava nálevů za tepla..... | 39 |
| 2.3.2 Příprava nálevů za studena | 40 |
| 2.4 Měření kyselosti | 40 |
| 2.5 Měření indexu lomu | 41 |
| 2.6 Měření barevnosti..... | 41 |
| 2.7 Stanovení celkového obsahu fenolických látek | 41 |
| 2.8 Stanovení obsahu flavonoidů | 41 |
| 2.8.1 Stanovení obsahu flavonoidů v prostředí octanu sodného (Metoda 1) | 42 |

| | |
|---|----|
| 2.8.2 Stanovení flavonoidů v prostředí dusitanu sodného (Metoda 2)..... | 42 |
| 2.9 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH..... | 42 |
| 2.10 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS..... | 43 |
| 2.11 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP..... | 44 |
| 2.12 Stanovení antokyanů | 44 |
| 2.13 Analýza kapalinovou chromatografií..... | 45 |
| 2.14 Analýza pomocí ICP-MS | 46 |
| 2.15 Statistické vyhodnocení | 46 |
| 3 VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 47 |
| 3.1 Kyselost a obsah cukrů..... | 47 |
| 3.2 Měření barevnosti..... | 47 |
| 3.3 Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů | 49 |
| 3.4 Antioxidační aktivita nápoje <i>cascara</i> | 50 |
| 3.5 Obsah antokyanů..... | 52 |
| 3.6 Analýza pomocí HPLC | 52 |
| 3.6.1 Optimalizace separace | 52 |
| 3.6.2 Kalibrační řada a validace metody | 54 |
| 3.6.3 Vliv teploty vody na obsah látek v nápoji <i>cascara</i> | 55 |
| 3.7 Obsah minerálních látek v nápoji <i>cascara</i> | 56 |
| 3.7.1 Makroprvky | 57 |
| 3.7.2 Mikroprvky..... | 57 |
| 3.7.3 Toxické prvky..... | 58 |
| 3.8 Analýza hlavních komponent..... | 60 |
| 4 ZÁVĚR..... | 62 |
| Použitá literatura | 63 |
| Seznam příloh | 76 |

Seznam tabulek a grafů

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Kyselost a obsah cukrů v nápojích <i>cascara</i> | 47 |
| Tabulka 2: Barevnost nápojů <i>cascara</i> v barevném prostoru $L^*a^*b^*$ a C^*h° | 48 |
| Tabulka 3: Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů..... | 49 |
| Tabulka 4: Stanovení antioxidační aktivity | 51 |
| Tabulka 5: Výsledky validace správnosti metody pro stanovení kofeinu a chlorgenových kyselin..... | 55 |
| Tabulka 6: Stanovení obsahu kofeinu a chlorgenových kyselin..... | 56 |
| Tabulka 7: Obsah makroprvků v nápoji <i>cascara</i> | 57 |
| Tabulka 8: Obsah mikroprvků v nápoji <i>cascara</i> | 58 |
| Tabulka 9: Obsah toxických prvků v nápoji <i>cascara</i> | 59 |
| Graf 1: Projekce proměnných do faktorové roviny | 60 |
| Graf 2: Projekce případů do faktorové roviny | 61 |

Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek č. 1. Stavba plodu kávové třešně | 17 |
| Obrázek č. 2 Barevný prostor CEILab se znázorněním odstínu (h°) a pestrosti (C^*)..... | 28 |
| Obrázek č. 3 Schéma kapalinového chromatografu | 34 |
| Obrázek č. 4 Vzorek kávových třešní | 39 |
| Obrázek č. 5 Extrakt z kávových třešní | 40 |
| Obrázek č. 6 Chromatogram optimalizace separace při 273 a 325 nm | 53 |
| Obrázek č. 7 Výsledný chromatogram optimalizace při 273 a 325 nm..... | 54 |

Seznam zkratek

| | |
|-----------------------|---|
| ABTS | 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) |
| AlCl ₃ | Chlorid hlinitý |
| C ₈ | Oktylsilikagel |
| C ₁₈ | Oktadecyl-silikagel |
| CCD detektor | charge-coupled device, zařízení citlivé na elektrický náboj |
| CGA | Kyselina chlorgenová |
| CH ₃ COONa | Octan sodný |
| CIE | Commission internationale de l'éclairage (Mezinárodní komise pro osvětlování) |
| CT | Označení vzorku připraveného pomocí horké destilované vody |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| DPPH | 1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazyl |
| EC ₅₀ | Medián ekvivalentní koncentrace |
| EFSA | Evropský úřad pro bezpečnost potravin |
| FC činidlo | Činidlo Folin & Ciocalteu's phenol reagent |
| FRAP | ferric reducing-antioxidant power (redukční síla antioxidantu) |
| HCl | Kyselina chlorovodíková |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| IC ₅₀ | Poloviční maximální inhibiční koncentrace |
| ICP – MS | Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu |
| KCl | Chlorid draselný |
| LC | Kapalinová chromatografie |

| | |
|---------------------------------|--|
| MeOH | methanol |
| MPa | Megapascal, jednotka tlaku |
| Na ₂ CO ₃ | Uhličitan sodný |
| Na ₂ NO ₃ | Dusičnan sodný |
| NaNO ₂ | Dusitan sodný |
| NaOH | Hydroxid sodný |
| NP-HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi |
| OTA | Ochratoxin A |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| S5 | Označení nálevu připraveného pomocí destilované vody o teplotě 5 °C |
| S10 | Označení nálevu připraveného pomocí destilované vody o teplotě 10 °C |
| S15 | Označení nálevu připraveného pomocí destilované vody o teplotě 15 °C |
| S20 | Označení nálevu připraveného pomocí destilované vody o teplotě 20 °C |
| TPTZ | 2,4,6,-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) |
| Trolox | kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová |
| UHPLC | Ultravysoko účinná kapalinová chromatografie |
| UV | ultraviolet (ultrafialová část spektra) |
| VIS | visible (viditelná část spektra) |

Úvod

Káva je jedním z nejoblíbenějších nápojů na světě. Konzumují ji lidé napříč kontinenty, ve všech možných podobách, s různorodými variantami přípravy. Při jejím zpracování však vzniká spousta vedlejších produktů, jako jsou kávové třešně, stříbrná slupka, pergamen, květy, listy a další. Je potřeba se naučit zpracovávat tyto odpadní části a zkusit vymyslet způsoby vícenásobného použití. Každý vedlejší produkt průmyslu kávy se dá využít, ať v průmyslovém, zemědělském nebo potravinářském odvětví. Kávová sedlina, zbytek upražené kávy, rozemletý na malé částičky, se po extrakci dá využít jako hnojivo, kávové třešně můžeme použít na přípravu nápoje zvaného *cascara* nebo je můžeme použít na výrobu extraktů do jogurtu.

V dnešní době se stala trendem příprava kávy za studena. Pomletá káva se maceruje ve studené vodě 8–24 hodin. Podobně se připravuje výluh z kávových třešní, který se nazývá *cascara*. Cílem této práce bylo připravit nápoj *cascara* pomocí studené vody o teplotě 5, 10, 15 a 20 °C. Vlastnosti nálevů z kávových třešní byly porovnány s nálevem připraveným pomocí horké vody. Předmětem mého zkoumání byla barevnost, kyselost, antioxidační aktivita, obsah fenolických látek, flavonoidů a antokyanů, kvantifikace kofeinu a chlorgenových kyselin pomocí HPLC – DAD a prvková analýza metodou ICP/MS.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kávovník

Kávovníky rostou v oblasti kolem rovníku. Dorůstají do výšky 5 až 15 metrů. Botanicky jsou kávovníky zařazeny do řádu *Rubiales*, čeledi *Rubiaceae* (mořenovitě) a kmene *Coffeae*. Spousta druhů roste divoce nebo plantážním způsobem. Káva má celosvětově více než 100 druhů, nejvíce pěstované druhy jsou *Coffea arabica* a *Coffea canephora*.

Rod *Coffea arabica* je samosprašnou rostlinou, jejíž zrníčka jsou podlouhlá a úzká. Doba zrání kávovníku je 9 až 11 měsíců. Daří se jim v teplotách 15–24 °C, v nadmořských výškách 900 m. n. m. a výše. Rostliny jsou často napadány kávovým broukem (*Hypothenemus hampei*) a listy ničí kávovníková rez (*Hemileia vastatrix*). Káva z tohoto druhu je ovocná a disponuje zajímavými chuťovými tóny.

Rod *Coffea canephora* je odolnější vůči škůdcům. Tento rod není samosprašný. Má okrouhlejší a širší zrníčka. Rostliny dozrávají za 6 až 9 měsíců, vyhovuje jim nižší nadmořská výška a snáší vyšší teploty. Tento rod je pěstován spíše na získání většího množství kávy [1–3].

Kávové plantáže mohou být produktivní až 30 let. K prvnímu rozkvětu a produkci plodů dochází zhruba tři roky po vyklíčení. Ovoce roste výrazně 0–2 měsíce po odkvětu. Vývoj perispermu nastává 2,5–3 měsíce po odkvětu, zatímco endosperm pokračuje v postupném růstu asi pět měsíců po odkvětu [4].

Květ kávovníku dorůstá do hvězdicovitého tvaru s bílou barvou. Každý rok vyprodukuje dospělý kávovník 30 000–40 000 květů. Opylovači květů, kteří produkují sekret podobný klihu, chrání rostlinu před dehydratací a parazitujícím hmyzem. Květy rostou v trsech, kvetou pouze několik dní a kolem sebe šíří příjemnou, intenzivní a pronikavou vůni. Z usušených květů lze uvařit i čaj. Kromě vysokých hodnot celkového obsahu fenolů, obsahují sušené květy i kofein a trigonelin.

Listy kávovníku jsou lesklé a voskované, zbarvené do zelena. Při stárnutí se barva listů mění na tmavě zelenou nebo hnědou. Listy některých odrůd mohou být až 50 cm dlouhé. Listy kávovníku se používají na přípravu čaje v různých státech světa, například v Keni a Etiopii. Kávové listy prochází různými způsoby zpracování, než jsou vhodné pro přípravu čaje. Dochází k jejich napařování, válcování a sušení. Listy obsahují sacharidy, bílkoviny, aminokyseliny, organické kyseliny a také velké spektrum dalších látek jako jsou flavonoidy, alkaloidy, terpeny,

třísloviny, fenolové kyseliny, fytoosteroly a karotenoidy. Obsah kofeinu v listech se spolu se stářím kávovníku značně mění.

Plody kávovníku se nazývají bobule, opticky jsou podobné našim třešním. Ze zelené barvy dozrávají do odstínů červené, fialové i žluté. V každé bobuli se většinou nachází dvě kávová zrna [1, 3, 4].

Kávový pergamen je lignocelulózový materiál, který byl navržen jako antifungální aditivum s potenciálním využitím pro konzervaci potravin. Extrakty pergamenu byly také navrženy jako biosložky s antioxidační aktivitou. Nedávná literatura ukazuje potenciál tohoto vedlejšího produktu jako slibné nízkokalorické funkční složky pro obohacení dietní vlákniny v potravinách pro regulaci krevní glukózy a snížení koncentrace sérových lipidů. Při posuzování potravinové bezpečnosti pergamenu byl detekován mykotoxin ochratoxin A v množství 2,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Byla zkoumána akutní toxicita surového pergamenu u potkanů s jednorázovou dávkou 2000 mg/kg tělesné hmotnosti a nebyly pozorovány žádné zjevné známky toxicity, abnormálního chování nebo úmrtnosti [3].

1.2 Kávové třešně

Káva se stala vysoce obchodovanou globální komoditou a vyniká jako jeden z celosvětově nejrozšířenějších nápojů, který představuje důležitý pilíř ekonomiky v mnoha rozvojových zemích. Produkce kávy v roce 2018/2019 dosáhla přibližně 10 milionů tun. Je třeba poznamenat, že tuto spotřebu představují pouze kávová zrna, která tvoří pouhých 20 % z celkové hmotnosti kávových bobulí. Zbývajících 80 % odpovídá vedlejším produktům vznikajícím při zpracování kávy.

Mezi vedlejší produkty řadíme kávové slupky, dužinu, sliz, pergamen a stříbrnou vrstvu. Při zpracování kávových třešní se nejprve odstraní slupka a dužina, jejichž složení a vlastnosti silně závisí na metodách posklizňového zpracování. Kávová třešeň obsahuje slupku, dužinu, sliz, pergamen a možná i část stříbrné vrstvy, což představuje téměř 45 % celkové hmoty kávových třešní. Obecně jsou slupky a dužina kávy považovány za látky znečišťující životní prostředí a jejich akumulace povede k vážným problémům s životním prostředím, pokud se s nimi nebude správně zacházet, zejména s ohledem na sladkovodní ekosystémy. Vedlejší produkty z kávového průmyslu se v posledních letech dostaly do předmětu zkoumání mnoha odborníků. Vedlejší produkty získaly velké uplatnění v biotechnologických a zemědělských aplikacích, včetně výroby kompostu a biopaliv. Také byly ověřeny jako potravinové složky,

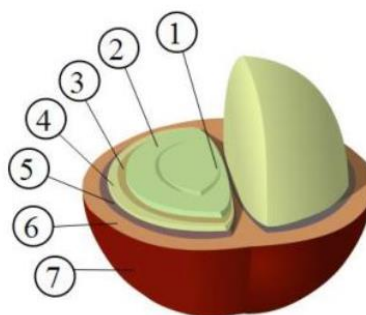
obsahující vysoce hodnotné látky (bílkoviny, vlákninu, polysacharidy, kofein a mnoho dalších) [3, 5–7].

1.2.1 Stavba plodu

Plody kávové třešně se skládají z centra, semínka, stříbrné vrstvy, pergamenu, obalu semínka a exokarpu. Vnější slupka neboli exokarp označuje vnější vrstvu kávové třešně. Dužina kávovníkových třešní se označuje jako sliz, v nezralém plodu tvoří tato vrstva tuhou část. Obal semínka je znám i pod názvem oplodí. Pod oplodím se nachází stříbrná vrstva neboli stříbrná slupka. Všechny vrstvy jsou názorně ukázány na obrázku č. 1.

Plod kávy

1. Centrum - řez
2. Semínko
3. Stříbrná vrstva
4. Pergamen (tenká kožovitá vrstva)
5. Obal semínka
6. Dužina
7. Exocarp (venkovní vrstva)



Obrázek č. 1. Stavba plodu kávové třešně¹

Obsah sloučenin chlorofylu, karotenoidů a antokyanů se snižuje během zrání plodu. Třešně pokrývají jednu třetinu denního dýchání kávovníků a přispívají přibližně 12 % k jejich celkovému požadavku na produkci uhlíku. Tento krok je potřebný ve fázi dozrávání zrn, kdy se zvyšuje obsah cukru v třešních. Stanovení sušiny u plodů v různých stádiích zrání ukázalo, že přezrálé plody měly nejvyšší hodnotu stupňů Brix.

Během zrání se v třešni nejvíce vyskytují tyto látky: fruktóza, glukóza a kyselina chinová. Dochází i ke změně barvy ze zelené na žlutou. Tuto změnu způsobuje nárůst karotenoidů. V některých případech jsou za barvu odpovědné i flavonoidy. Přeměna barvy třešně ze žluté na červenou způsobí nahromadění antokyanů. U některých odrůd zůstává zbarvení žluté, u jiných druhů může být barva zralé třešně černá nebo černo-žlutá.

V pozdějších fázích vývoje třešně dochází k mnoha procesům, například k nárůstu koncentrace sacharózy, k degradaci chlorofylu, k syntéze karotenoidů, a také se zvyšují těkavé sloučeniny

¹ Zdroj: Coffee Bean Structure. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2007 [cit. 2020–12–09]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coffee_Bean_Structure.svg?uselang=cs

(estery, aldehydy, ketony a alkoholy). Během zrání dochází i ke změně koncentrací kyseliny jablečné, citrónové, šťavelové a chinové [16–18].

Zrna, která se vyvíjí uvnitř třešně, jsou dále používána pro výrobu pražené kávy, kávových nápojů, rozpustné kávy a mnoha dalších potravin. Kofein se stal nejrozšířenější chemickou látkou v kávě. Vytváří silné aroma, díky kterému je káva jedním z nejoblíbenějších nápojů na světě. Odpovídá i za hořkou chuť. Vysoký obsah kofeinu se nachází i v kávových třešních [3, 4].

Kávové třešně lze využít v různých oblastech, například v dermatologii. Slupky a dužina kávy jako přírodní zdroj těchto sloučenin mají v kosmetickém průmyslu potenciál chránit pokožku před stárnutím a před poškozením způsobeným UV zářením. Odpad z kávy potřebuje vhodné zacházení, protože jeho obsah může znečišťovat přírodu. Tento problém lze vyřešit recyklací vedlejších produktů z kávy. Tyto produkty se mohou stát kosmetikou, která má vysokou hodnotu, je účinná (překonává kožní problémy), levná a snadno zpracovatelná. Můžeme předpokládat, že kávová dužina a slupky mohou být v budoucnu jedním z alternativních léků k překonání kožních problémů [2, 19].

1.2.2 Zpracování třešní

Suché neboli naturální zpracování se řadí mezi tradiční metody, které jsou nejjednodušší a šetrné k životnímu prostředí. Třešně se rovnoměrně rozprostřou na afrických postelích a suší se 2–4 týdny na slunci, dokud jejich vlhkost neklesne pod 12 %. Poté se třešně mechanicky zbaví slupek a z kávových zrn se odstraní ostatní vrstvy (dužina, pergamen, část stříbrné slupky). Kávové slupky získané suchým zpracováním obsahují téměř 45 % kávové třešně.

Mokrý zpracování je drahé z hlediska nároků na zařízení a na cenu vody. Zrna jsou kvalitnější, jelikož složky zrn jsou lépe zachovány a počet vadných semen je menší. Nejprve se pomocí rozvlákňovače odstraní slupka a dužina pokrývající kávová zrna. Ze 100 kg zralých třešní odpovídá 39 kg slupce a dužině. Sliz se eliminuje fermentací 24–72 hodin, ze 100 kg zralých třešní vznikne 22 kg slizu. Poté se zrníčka pokrytá pergamenem umyjí, scedí a usuší, dokud vlhkost nedosáhne 10 %. Nakonec se pergamen odstraní pomocí loupacího stroje. Zelená zrna jsou exportována do různých zemí světa a následujícím krokem je jejich pražení. Při pražení se odloupe stříbrná vrstva. Nakonec se upražená zrna melou a zpracovávají na kávu [3, 6, 7].

1.2.3 Bezpečnost kávových třešní

Kávová třešeň byla schválena Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFS) 29. 4. 2021 jako bezpečná potravin. Koncentrace kontaminantů (například těžkých kovů, reziduí pesticidů, organických kontaminantů) závisí především na výrobním procesu. Konzumace nápojů vyrobených pomocí kávovníkových třešní přispívá k celkovému dietnímu příjmu kofeinu u běžné populace. Konzumace nápojů, které obsahují kofein a přesahují 200 mg/l, se nedoporučuje dětem a těhotným i kojícím ženám. Koncentrace těžkých kovů (olovo, kadmium, rtuť, arsen) je nižší než maximální úroveň stanovená pro jiné potraviny nebo doplňky stravy. Koncentrace aflatoxinu B1, B2, G1, G2 a ochratoxinu A byla nižší než pro ostatní potraviny [21].

Omezení používání kávových vedlejších produktů souvisí s jejich obsahem kofeinu. Kávové vedlejší produkty mají různé koncentrace kofeinu. Přesto se v zelených a pražených kávových zrnech nachází nejvyšší obsah této bílé a krystalické látky. Ačkoli by v této oblasti měly být provedeny další studie, dosud publikované výsledky naznačují, že obsah kofeinu nemusí být považován za bezpečnostní problém při použití vedlejších kávových produktů jako složek potravin. Obsah kofeinu v potravinách formulovaných s kávovými vedlejšími produkty by měl být pod bezpečnostní úrovní Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) pro denní spotřebu kofeinu 400 mg pro běžnou populaci a 200 mg pro kojící ženy. U dětí a dospívajících nejsou dostupné informace dostatečné pro odvození bezpečné úrovně příjmu kofeinu.

Byla potvrzena nepřítomnost pesticidů a mykotoxinů (aflatoxin B1 a enniantin B). Hodnoty ochratoxinu A (OTA) uváděné ve všech vedlejších produktech byly pod limitem stanoveným Evropskou komisí (5 µg/kg). OTA je mykotoxin produkovaný *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum*, který má tendenci se bioakumulovat v potravním řetězci. Tento mykotoxin může vyvolat renální toxicitu, nefropatii a imunosupresi. Káva je považována za sekundární zdroj OTA v lidské stravě. OTA je v kávě přítomen již před skladováním, protože může dojít ke kontaminaci vlivem klimatických podmínek, při pádu kávových plodů na půdu, během přepravy a tak dále. Proto jsou kritickými kroky vedoucími k akumulaci tohoto mykotoxinu sklizeň a posklizňová manipulace s kávovými třešněmi. I když je kávový nápoj připraven z vysoce kontaminovaných zelených zrn, proces transformace kávy je schopen snížit množství OTA, které představuje riziko pro lidské zdraví.

Typ přípravy nápoje však ovlivňuje obsah ochratoxinu A, který je někdy vyšší, než se očekává u pražené kávy. Extrakce pražené kávy obsahující OTA horkou vodou po dlouhou dobu (např.

filtrovaná káva) vykazovala vyšší obsah OTA ve srovnání s extrakcí studenou vodou nebo s espressem. Přestože pražení může snížit obsah OTA, stále existuje toxikologický problém.

Vliv pražení kávy na obsah OTA je kontroverzní téma. Proto by měly být v celém řetězci zpracování kávových zrn zavedeny přísné kontroly kvality, aby se snížila OTA a zajistila bezpečnost zelených kávových zrn a kávových vedlejších produktů [3, 6, 22–24].

1.2.4 Složení kávových třešní

Obsah bílkovin v kávových třešních je v rozmezí od 8 do 11 % na bázi sušiny, s relativně vysokým obsahem aminokyselin, jako je kyselina glutamová (7,7 % z celkového obsahu bílkovin) a kyselina asparagová (7,1 %). Kyselina glutamová zodpovídá za transport glutaminu a dalších aminokyselin krví a její přítomnost snižuje potřebu konzumace cukru a alkoholických nápojů. Kyselina asparagová se podílí na metabolismu DNA a RNA, ale také na ochraně jater a posílení imunitního systému. Vedlejší produkty kávového průmyslu jsou tedy zdrojem aminokyselin, které lze hodnotit jako dietní fytochemikálie užitečné pro člověka [7–9].

Kávovníková slupka obsahuje těkavý olej, který se skládá nejméně z 55 těkavých molekul. Hlavní chemické složení tohoto oleje je butylhydroxy aldehyd, kyselina 1,2-benzendikarboxylová a další. Součástí oleje jsou uhlovodíkové a kyslíkaté složky, přičemž dominují složky aromatické. Těkavé složky vykazovaly antibakteriální, antifungální a antioxidační potenciál, které jsou užitečné při léčbě infekčních onemocnění [7, 10].

Hlavními složkami čerstvých kávových slupek jsou kofein, taniny a chlorgenové kyseliny. Jejich přítomnost brání rozmanitému použití čerstvých kávových slupek kvůli jejich ekotoxikologickým obavám. Čerstvá kávová slupka se nehodí jako potrava pro zvířata, jelikož má antinutriční vlastnosti a obsahuje přebytek fenolových kyselin. Kyselina chlorgenová má fytotoxické účinky schopné snižovat klíčivost semen a růst rostlin, a proto nemůže být distribuována v půdě jako půdní hnojivo. Kromě toho kofein a taniny negativně ovlivňují vodní organismy, jako jsou řasy, ježovky a ryby, u kterých se vyvíjejí morfologické a behaviorální abnormality [11, 12].

Ze skupiny alkaloidů se v kávové slupce vyskytuje kofein, theobromin a theofylin. Obecně má kofein pozitivní účinky na člověka. Jeho struktura se podobá adenosinu a může plnit funkci adenosinového receptoru, který napomáhá k uvolnění a spánku. Kofein může také pomáhat v boji s obezitou a cukrovkou, stejně jako se symptomy Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby.

Mezi negativní účinky kofeinu patří dopad na životní prostředí, zvířata, rostliny, růst hub a bakterií. Pro savce a vodní organismy je toxický [7, 13–15].

Kávová dužina obsahuje některé živiny, jako například 35–50 % sacharidů (celulóza), 5,2–10 % bílkovin, 20–30,8 % vlákniny, 3–10,7 % minerálních látek, 84,2 % vody, 4,1 % cukru, 2,5 % tuku, 1,3 % kofeinu, mastné kyseliny (kyselina eruková, kyselina linolová, kyselina olejová, kyselina palmitová), kyselinu šťavelovou, trísloviny a fenolové sloučeniny (kyselina chlorgenová, flavonoly, anthokyanidiny, katechin, rutin, taniny a kyselina ferulová).

Zvýšená spotřeba kávy vede k nárůstu množství odpadu, který je třeba likvidovat, což způsobuje problémy s životním prostředím kvůli obsahu kofeinu, polyfenolů a taninů. Tanin je sekundární metabolit, který se vyskytuje v některých rostlinách. Taniny jsou schopny se vázat na proteiny. Způsobuje to jejich odolnost vůči degradaci enzymem proteázou. Hladiny taninu ovlivňují barvu čaje. Čím tmavší je barva nápoje *cascara*, tím nižší je obsah taninu. Ovšem extrahovaný kofein a tanin z kávového odpadu by mohly být použity jako bioaktivní sloučeniny pro energetické nápoje a energetické tyčinky, zatímco polyfenoly by se mohly být využít jako zdroj antioxidantů. Kávová dužina se dá využít pro přípravu cenných bioproduktů (mouka, aromatické sloučeniny, nápoj *cascara*) [21, 25, 26].

Podle studie Nemzer a kol. byly celé kávové třešně sušeny a rozemlety na prášek. Následně byly extrahovány směsí methanolu a vody, odstředěny, naředěny a analyzovány. Nejhojnější skupinou sloučenin byla kyselina 3-kafeoylchinová, 4-kafeoylchinová a 5-kafeoylchinová. Dále se zde nachází kofein, kyselina pantotenová, trigonelin, cholin, xantin a sacharóza. Z organických kyselin byly v kávové třešni identifikovány tyto kyseliny: kyselina jablečná, citrónová a chinová. V třešních se dále nachází i fenolové kyseliny, vzniklé esterifikací kyseliny chinové s těmito látkami: s kyselinou vanilovou, kumarovou, ferulovou, protokatechovou a s jejich deriváty. Byly identifikovány i deriváty kyseliny kávové a samotná kyselina kávová. Dále byly v třešních identifikovány deriváty kyseliny benzoové: kyselina protokatechuová a protokatechualdehyd. Pomocí hmotnostní detekce byly detekovány i flavonoidy, které představují nejvíce bioaktivní fytohemikálie se silnými antioxidačními vlastnostmi. V této studii byl identifikován rutin, kvercetin, kaempferol a další [27, 28].

1.2.5 Výluh třešní (nápoj *cascara*)

Bylo provedeno mnoho studií zaměřených na zkoumání podmínek vaření čaje, ale existuje omezený počet studií zabývajících se vlastnostmi výluhu z třešní. Při přípravě pomocí vysoké teploty vody měl extrakt vyšší obsah kofeinu. Několik studií prokázalo, že příprava pomocí

studené vody může naopak obsah kofeinu zmenšit, což vede ke snížení hořkosti a zvýraznění ovocného aroma s vysokou antioxidační kapacitou. Avšak bioaktivní sloučeniny a senzorické vlastnosti nápoje *cascara* jsou vysoce ovlivněny způsobem přípravy, zejména teplotou extrakčního činidla a časem louhování [29–31].

Nápoj *cascara* se označuje jako zdroj zdraví prospěšných bioaktivních sloučenin. Extrakt byl popsán jako sladký, květinový nápoj, který se podobá čaji a připomíná sušené ovoce [32]. Jednou ze skupin látek, pro které je tento nápoj tak ceněný, jsou antioxidační látky. Dále se kávové třešně mohou přidávat do jogurtů nebo mohou sloužit jako surovina pro výrobu medu či bezlepkových chlebů [5, 25].

1.2.6 Chemické složení nápoje *cascara*

Ve výluhu sušených kávových třešní bylo identifikováno až 219 sloučenin, mezi které patří izomery chlorgenových kyselin, flavonoidy, alkaloidy, alkoholy, estery, aldehydy, ketony, pyraziny, furany, eikosanoyl-5-hydroxytryptamid, atraktyligenin a deriváty karboxyatraktyligeninu. Ve slupce bylo identifikováno velké množství pektických polysacharidů i neutrálních cukrů, jako jsou rhamnóza, arabinóza a galaktóza. Kofein, trigonelin a kyseliny chlorgenové jsou některé z hlavních sloučenin přítomných v zelených kávových zrnech. Kofein zvyšuje bdělost prostřednictvím stimulace centrálního nervového systému, krevního oběhu a dýchání. Kofein má však některé škodlivé účinky na lidské zdraví, například nespavost a mírná závislost na kofeinu, což vede k vývoji výrobků z kávy bez kofeinu. Podle US Food and Drug Administration je kofein obecně bezpečný v mírném množství (<400 mg denně) [5, 6, 25, 33, 34].

Po analýze těkavých látek bylo identifikováno asi 18 vonných látek. Nejvíce zastoupenými vonnými látkami byly β -damascenon (medový, sladký) a sotolon (karamelový, javorový). Bylo identifikováno 11 z 18 pachových látek, konkrétně trans-2-nonenal, kyselina 3-methylbutanová, β -damascenon, guajakol, 2-fenylethylalkohol, β -ionon, furaneol, 3-methylfenol, sotolon, kyselina 2-fenylactová a vanilin. Tyto látky jsou také odpovědné za aroma černého čaje. Některé vonné látky podobného aroma byly identifikovány v jiných plodech, například β -ionon a 2-fenylethylalkohol můžeme nalézt v hlohu.

Byly studovány i některé hlavní netěkavé sloučeniny kvůli jejich příspěvku k chuti a funkčnosti nápoje. Bylo zjištěno, že nápoj *cascara* obsahuje vysoký podíl manózy a fruktózy. Galaktóza byla také nalezena v relativně vysokých koncentracích. Byly objeveny nízké koncentrace

glukózy ve srovnání s ostatními cukry. Důvodem mohou být drobné fermentace během sušení vlhké buničiny. Mechanismus kolísání obsahu cukru by však vyžadoval další zkoumání [25].

Kromě jejich potenciálu jako zdroj antioxidantů si extrakty obohacené kyselinou chlorgenovou získaly značnou pozornost kvůli svým zdravotním přínosům, včetně jejich spojení s antidiabetickými vlastnostmi a hepatoprotektivními, hypoglykemickými a antivirovými aktivitami. Extrakt z kávových slupek bohatý na polyfenoly významně zlepšil postprandiální hyperglykémii zvýšením uvolňování glukagonu podobného peptidu a snížením oxidačního stresu spojeného s antidiabetickými účinky. Kvůli vysokému množství kyseliny chlorgenové a kofeinu mohou mít přírodní extrakty z kávových třešní potenciální roli jako alternativa k molekulám syntetických antidiabetických a anti-Alzheimerových léků.

Další sloučeniny, které v kávové třešni můžeme najít, jsou: trigonelin a theobromin, jež se běžně vyskytují i v kávových zrnech; fenolové kyseliny (kys. gallová, protokatechuová a kyselina 3-kafeoylchinová), kyselina kávová, kyselina chinová, melanoidy a mnoho dalších [5, 6, 25, 33, 34]. V nápoji *cascara* se nachází i tyto minerály: hořčík, draslík, sodík, vápník i železo. Z aniontů byly zastoupeny chloridy, fosforečnany, dusičnany i sírany. Z vitamínů najdeme v extraktu z kávových slupek především vitamín C (kyselina askorbová) [35].

Nápoj *cascara* je obohacen o antokyany, které obsahují silné inhibitory enzymů α -glukosidázy a α -amylázy. Protože tyto enzymy hrají důležitou roli v řízení metabolismu glukózy, bylo navrženo použití antokyanových extraktů z nápoje *cascara* jako antidiabetika ke zlepšení postprandiálního metabolismu glukózy v krvi. Tyto antidiabetické vlastnosti byly také studovány u nových bezlepkových chlebů a jogurtů obsahujících extrakt z kávových třešní, které po in vitro trávení vykazovaly inhibici proti α -glukosidáze. Antioxidační vlastnosti tohoto extraktu při 1 mg/ml byly také potvrzeny v lidských jaterních buňkách. Tento extrakt může být potenciálním prostředkem pro prevenci buněčného poškození vyvolaného oxidačním stresem [6].

1.2.7 Další využití kávových třešní

Kávové třešně se v současnosti v zemích produkujících kávu používají ke kompostování. Další aplikace navržené pro tento vedlejší produkt jsou výroba biopaliva, enzymů, dřevotřískových desek a krmiva pro zvířata. V potravinářském průmyslu různé studie navrhuje nápoj *cascara* pro jeho použití jako zdroj antokyanů a dietní vlákniny. Mimo jiné Velez a Lopez si

v roce 2015² patentovali metodu získání medu nebo prášku z kávových třešní. Tento prášek se hodí pro použití v produktech pro lidskou nebo zvířecí spotřebu, v léčivech a v kosmetice nebo jako surovina pro výrobu palivového lihu. Na druhou stranu, extrakt ze suchých kávových třešní (rozemleté a usušené při 50 °C) [36] byl navržen pro jeho použití při přípravě slaných sušenek s vysokým obsahem vlákniny. Tyto sušenky byly obohaceny o fenolické sloučeniny, které měly antioxidační kapacitu. Nápoj *cascara* má velký potenciál jako zdroj přírodních barviv. Například extrakt z kávových třešní byl použit při vývoji bezlepkových chlebů, aby poskytl typický vzhled celozrnného chleba a aby zvýšil nutriční a senzoričnou kvalitu. Přídavek izolované dietní vlákniny z kávových třešní (3,0 % a 4,5 %) umožnil zvýšení výtěžnosti těsta, větší pevnost strouhanky a vyšší elasticitu strouhanky. Díky tomu měl výsledný bezlepkový chléb zlepšené nutriční vlastnosti („zdroj bílkovin a vysoký obsah vlákniny“), fyzikálně-chemické vlastnosti a dobrý senzoričkový profil. Nápoj *cascara* byl také navržen pro použití ve zdravých a udržitelných jogurtech. Extrakt má vlastnost inhibovat α -glukosidázu, což může ovlivnit regulaci metabolismu sacharidů a zvýšit signály sytosti střev. Byl vyvinut „instantní nápoj *cascara*“, založený na práškovém vodném extraktu. Extrakční odpad, nerozpustná frakce získaná po vodné extrakci nápoje *cascara*, může být také znovu využita v sektoru potravinářského průmyslu. Tato nerozpustná frakce vzniká také při výrobě komerčně dostupných „nápojů *cascara*“. Dále je možné kávovou dužinu zpracovat jako džem, šňávu, koncentrát a želé. V současné době nejsou v literatuře žádné konkrétní údaje o toxicitě třešňových dužin [3,6].

Kávové slupky mohou mít i průmyslové využití. Mohou sloužit jako pevné palivo, ale tato metoda produkuje obrovské množství popela, jenž má vedlejší účinky na životní prostředí. Popel získaný spalováním kávových slupek (které se shromažďují z popelových skládek) je bohatý na alkalické kovy a kovy alkalických zemin. Tento popel by mohl nahradit vzácné a drahé živce, tradičně používané jako tavidlo v keramických přípravcích na bázi jílu. Výsledky ukazují, že přidání 25–40 % popela do běžné keramické směsi na bázi jílu mělo nejlepší výsledek v kvalitě keramiky [37].

Bylo zkoumáno i částečné nahrazení dřeva při výrobě dřevotřískových desek pomocí kávových slupek. Deska, vyrobená z kávových slupek i ze dřeva, má výborné ohybové vlastnosti a vyšší

²Velez, A. R., Lopez, J. C. J.; Process for obtaining honey and/or flour of coffee from the pulp or husk and the mucilage of the coffee bean; U.S. Patent Publication No. 20150017270; 2015 Jan. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US9635877B2/en>

hodnoty tepené vodivosti než deska z dřevotřísky. Tyto desky by mohly nahradit běžně používané panely, protože jsou levnější, mají nižší hmotnost a jsou biologicky rozložitelné [38].

Kávová slupka má dobrý potenciál pro výrobu bioethanolu. Dostupnost celulózy, hemicelulózy a ligninu v kávových slupkách je podobná jako u jiných zemědělských zbytků, jako je bagasa z cukrové třtiny, ječná a pšeničná sláma, rýžové slupky a další. Kávové slupky jsou generovány ve velkém množství, mají toxickou povahu a vysoké procento fermentovaného cukru a sacharidů. Z tohoto důvodu se hodí pro výrobu bioalkoholu [39, 40].

Díky produktům fermentace, která probíhá v kávových slupkách, je možné získat organické kyseliny, enzymy, bioaktivní sloučeniny (některé fenolické látky a molekuly antibiotik), vlákninu a antokyanidy. Využití kávových slupek v zemědělství může být mnoho, ale vysoký obsah fenolových kyselin a mutagenní účinek kofeinu naznačují, že recyklaci kávových slupek v zemědělství by měly předcházet detoxikační procesy schopné snížit koncentraci toxických složek. Kávové slupky jsou vhodným substrátem pro pěstování hub pro svou dostupnost a nízkou cenu [41–45].

Kávové třešně mohou sloužit jako půdní doplněk, hnojivo a zdroj dřevěného uhlí, vyrobeného pyrolýzou organických materiálů. Kvalita tohoto dřevěného uhlí závisí na povaze surovin a na teplotě. Kyselé půdy, které se hojně vyskytují v tropických oblastech, mají nedostatek živin pro rostliny, jako je dusík, fosfor, draslík, vápník a hořčík, a v důsledku toho mají nízkou míru produkce rostlin [46, 47].

Kávové slupky byly doplněny kravským hnojivem a vápnem. Směs byla kompostována po dobu 3 měsíců a poté byla doplněna o 0,1 % (w/w) účinných mikroorganismů (*Azotobacter sp.* a *Bacillus megaterium*). Zjistilo se, že kvalita získaného kompostu je lepší než u některých bioorganických hnojiv přítomných na zemědělském trhu. Tento kompost byl aplikován na kávové pole. Výsledky ukázaly, že se zlepšil růst kávovníku, obsah živin v listech vzrostl a úrodnost půdy se zvýšila [7, 48].

1.2.8 Stříbrná slupka

Kávová stříbrná slupka tvoří tenký obal, který se nachází přímo kolem dvou zrnk kávové třešně. Ve velkém množství se hromadí jako vedlejší produkt procesu pražení. Stříbrná slupka se z velké části skládá z vlákniny (60–80 %). Obsahuje mnohem více vlákniny než kávové třešně. Příslušné vláknité složky jsou celulóza, hemicelulóza a lignin. Hlavní monosacharidy ve slupce jsou xylóza, galaktóza, arabinóza a manóza. Relevantní množství celkové dietní

vlákniny je rozpustné. Díky tomu může být slupka použita při vývoji funkčních potravin. Rozdíl v obsahu dietní vlákniny mezi dvěma druhy kávovníku (*C. arabica* a *C. canephora*) není významný. Obsah bílkovin ve stříbrné slupce se pohybuje kolem 18 %. Vysoká hodnota popela získaného ze stříbrné slupky je připisována minerálům. Ostatní živiny, jako jsou tuky a redukující sacharidy, se nacházejí v nižších koncentracích [3, 16, 20, 50].

Stříbrná slupka obsahuje fenolické sloučeniny (kyselinu chlorgenovou a 5-hydroxymethylfurfural) a má vysokou antioxidační aktivitu. Obsah antioxidantů ve stříbrné slupce, stanovených podle metod ABTS a DPPH, je srovnatelný s hořkou čokoládou, bylinkami a kořením. Ve slupce můžeme nalézt i produkty Maillardovy reakce, které vznikají při procesu pražení kávy. Obsah kofeinu se pohybuje mezi asi 0,8 a 1,4 g/100 g. Extrakty ze stříbrné slupky obsahují také další bioaktivní sloučeniny, jako jsou kyselina 5-kafeoylchinová, kyselina chlorgenová a flavonoidy (rutin). Stříbrná slupka by mohla být zdrojem kyseliny lignocerové, myristové a behenové [49, 51].

Stříbrná slupka obsahuje kromě výše uvedeného množství kofeinu také akrylamid. Hrozí také riziko kontaminace mykotoxiny, zejména ochratoxinem A (18,7–34,4 µg/kg). Ve studii subakutní toxicity, ve které potkani dostávali perorálně 1 g/kg tělesné hmotnosti vodného extraktu stříbrné slupky, nebyly pozorovány žádné negativní účinky na sekreci hormonů a antioxidační nebo protizánětlivé biomarkery [3, 16, 20, 50].

Stříbrná slupka by mohla sloužit jako zdroj antioxidační vlákniny v potravinách. Extrakty ze slupky se hodí jako přírodní barviva a jako zdroj dietní vlákniny v sušenkách. Existují také aplikace stříbrné slupky v antioxidačních nápojích [49, 51].

1.3 Použité metody

1.3.1 Měření barevnosti

Kvalita potravin se posuzuje podle chuti, textury, vzhledu (tvaru i struktury), ale hlavně podle barvy. Barva je vlivný a užitečný indikátor kvality a životnosti produktu. Měření barevnosti se používá pro charakterizaci a kvalifikaci kompoziční analýzy nebo pro sensorické hodnocení. Například syntéza karotenoidů (zejména lykopenu a β-karotenu) odpovídá za pigmentaci rajčat. Ze zelené barvy se mění barva plodu na charakteristickou červenou neboli chloroplasty se mění na chromoplasty [52, 53].

Vývoj této techniky začal v sedmnáctém století nápadem, že oční čočka musí nějakým způsobem promítat obraz pozorovaného objektu do zadní části oka. Touto studií se zabýval

Isaac Newton a prováděl různé experimenty s lomem světla. Usoudil, že paprsky světla dodávají duze barevné zbarvení. Další experimenty z devatenáctého století ukázaly, že oko lidí s normálním barevným viděním musí mít alespoň tři pigmenty sítnice, které jsou schopny detekovat v krátké, střední a dlouhé vlnové oblasti viditelného spektra. Na přelomu dvacátých a třicátých let objevili korelaci citlivosti oka ve vztahu k vlnové délce. Byl stanoven takzvaný „standardní pozorovatel.“ V důsledku toho sestavili první systém pro pozorování barvy, specifikovaný komisí Internationale de l’E’clairage (CIE), tzv. 2 ° systém zorného pole měření barev CIE 1931. Od té doby výzkum dále pokračuje a prochází mnoha vylepšeními. Zlepšila se formulace barev, predikce shody barev a kontrola vzhledu různých materiálů. V potravinářském průmyslu se používá pro výzkum a studium funkčnosti produktů [52, 54].

Každý světelný zdroj vyzařuje energii do svého okolí v podobě elektromagnetického záření. Toto záření dělíme na několik druhů: gama záření, paprsky X, ultrafialové, viditelné, infračervené, mikrovlnné a vlny televizní či rozhlasové. Záření dopadne na povrch objektu, dojde k pohlcení jedné části paprsků a k odrazení druhé části paprsků do okolního prostoru. Viditelné světlo (bílé světlo) se pohybuje od 380 nm do 760 nm. Látky, které pohlcují světlo v této oblasti, se lidskému oku jeví jako barevné.

Světelné zdroje mohou být primární nebo sekundární. Primární zdroje představují vlastní světlo předmětu (slunce, oheň, elektrické zdroje světla, ...), zatímco sekundární zdroje světla jsou cizí zdroje, které svítí odraženým nebo procházejícím světlem. Pokud bereme v úvahu sekundární zdroje, můžeme říct, že na procesu vidění se podílí tři složky: zdroj světelného záření, pozorovaný předmět a pozorovatel [54, 55, 56].

Systém měření barev CIE (ASTM 2000, CIE 1986) transformuje reflexní nebo transmisní spektrum objektu do trojrozměrného prostoru díky systému rozložení síly osvětlovače a funkce porovnání barev. Základem systému je trichromatický princip, ale místo skutečných barev (červené, zelené a modré, na jejichž základě smícháním vznikají ostatní barvy), používá systém „imaginární barvy“ X, Y a Z [52]. Soubor imaginárních barev se zakládá na experimentálních údajích, tyto barvy se chovají aditivně, hodnota Y odpovídá jasu barvy a hodnoty všech tří složek jsou kladné [54, 57]. Každá barva může mít jedinečné umístění v systému souřadnic, pokud jsou definovány dva pojmy: osvětlovač a pozorovatel.

$$x = \frac{X}{(X+Y+Z)} \quad (\text{Rovnice 1})$$

$$y = \frac{Y}{(X+Y+Z)} \quad (\text{Rovnice 2})$$

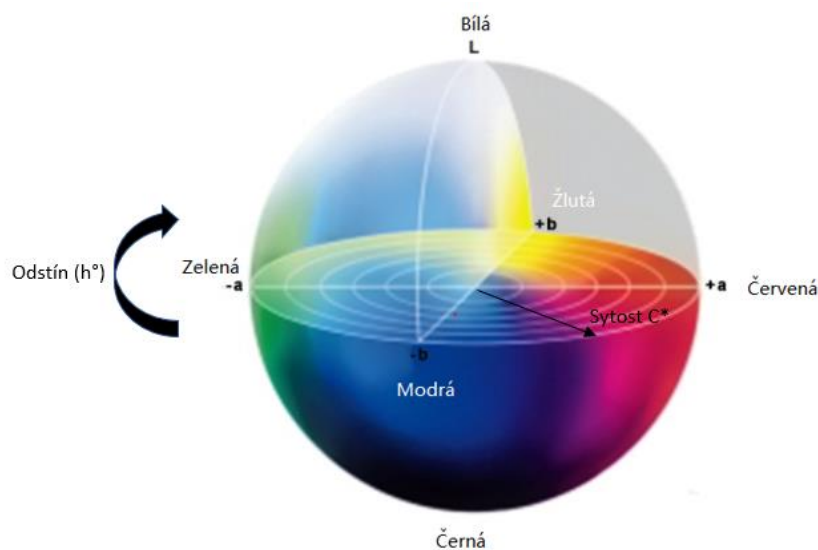
$$z = \frac{Z}{(X+Y+Z)}$$

(Rovnice 3)

Pojem reflektance vyjadřuje poměr množství světla, které se od objektu odrazilo, vůči množství světla, které na objekt dopadlo. Pojem transmitance vyjadřuje množství světla určité vlnové délky, které prošlo daným předmětem. V praxi se transmitance měří vzhledem ke slepému vzorku, aby se eliminoval vliv absorpce a odrazu světla. Slouží k tomu optika měřicího přístroje. Transmitance závisí na vlastnostech pozorovaného objektu, na materiálu absorbující látky, na vlnové délce prošlého světla, nebo na koncentraci absorbující látky. Záleží i na materiálu a tloušťce stěny kvivety [58].

Barevnost můžeme měřit díky kolorimetrům a spektrofotometrům. Hlavní součásti těchto přístrojů jsou zdroj světla (halogenová výbojka), monochromátor (pouze u spektrofotometru), komora pro umístění vzorku a detektor. Tyto dva přístroje se od sebe liší jedinou vlastností. Kolorimetr dokáže měřit pouze jednu nebo několik přesně definovaných vlnových délek, zatímco pomocí spektrofotometru měříme jakoukoliv vlnovou délku monochromatického světla nebo úsek vlnových délek.

Na základě těchto výzkumů byl vytvořen roku 1976 barevný prostor CIE $L^*a^*b^*$, jenž dokáže vypočítat, jak jsou dvě barvy navzájem od sebe vzdáleny. Souřadnice L^* definuje světlost od černé do bílé. Souřadnice a^* popisuje škálu červeno-zelených barev a souřadnice b^* odpovídá žluto-modrým barvám. Každá barva může mít konkrétní souřadnice v tomto systému, který je zároveň znázorněn na obrázku č. 2. Ze souřadnic a^* a b^* lze vypočítat souřadnici C^* , jež představuje pestrost barev. Měrný odstín h° (Hue) je daný úhlem [54–56].



Obrázek č. 2 Barevný prostor CIE Lab se znázorněním odstínu (h°) a pestrosti (C^*)

1.3.2 Spektrometrie

Principem metody je měření absorbance analytu v závislosti na délce elektromagnetického záření. Každá látka má svoji specifitu, jelikož dokáže absorbovat určitou vlnovou délku. Tato vlastnost závisí na struktuře energetických hladin látky. Vlnové délky, které látka dokáže absorbovat, jsou kvalitativním ukazatelem. Kvantitativním ukazatelem se stala velikost absorbance. Vztah mezi absorbancí a koncentrací dané látky popisuje Rovnice 4. V této rovnici A značí absorbanci, ε značí molární absorpční koeficient, l značí optickou délku kyvety a c je látková koncentrace [59, 61, 62].

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad \text{Rovnice 4}$$

K měření se využívají přístroje zvané spektrofotometry, skládají se z několika částí, jsou to: zdroje záření, monochromátor, kyveta a detektor. Detektory jsou různé, nejčastěji se využívají fotodiody, fotonásobiče a CCD detektory [60]. Tyto přístroje dělíme na jednopaprskové a dvoupaprskové. Jednopaprskové přístroje proměří nejprve samotné rozpouštědlo a poté vzorek. U dvoupaprskových zařízení se paprsek dělí na dva, jeden paprsek měří vzorek a druhý měří samotné rozpouštědlo zároveň. Měření samotného rozpouštědla se provádí z toho důvodu, že i samotné rozpouštědlo může absorbovat.

Při průchodu paprsku vzorkem, se jedna část záření absorbuje a druhá část záření jím prochází. Původní záření má intenzitu I_0 a prošlá část záření se značí I . Transmittance se vyjadřuje jako poměr těchto dvou intenzit [61]. Během měření se musí umožnit průchod paprsku vzorkem, homogenní distribuce molekul ve vzorku a zároveň nesmí dojít k rozptylu světla či k dalším reakcím během měření. Pokud jsou tyto podmínky dodrženy, zaručí nám správnost metody [59, 62].

Měření se využívá ke stanovení kvality látek, k identifikaci látek a k proměření celého absorpčního spektra dané látky. Výsledné spektrum se porovnává se spektry jiných látek, některá se mohou shodovat a některá ne. Je třeba danou látku potvrdit i jinou analytickou metodou [61, 62].

1.3.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační látky hrají důležitou roli v rámci ochrany potravin. Jednou z nejdůležitějších funkcí je inhibice oxidačních procesů. Snižují tak riziko onemocnění a podporují lidské zdraví. Během reakce antioxidantů s volnými radikály, které vznikly autooxidací mastných kyselin,

vzniká hydroperoxid nebo jiný neradikálový lipidový produkt. Antioxidant ve formě radikálu nepokračuje v autooxidační reakci, jelikož je sám o sobě dost stabilní [64].

Mezi nejznámější antioxidanty v potravinách patří například vitamíny A, E, C, B3 (niacin), karotenoidy, flavonoidy (rostlinná barviva), polyfenoly, některé sloučeniny selenu, zinku, manganu a antioxidanty na bázi aminokyselin (taurin).

Stabilitu antioxidantů ovlivňuje složení (záleží na obsahu mastných kyselin, popřípadě na kontaminaci kovovými ionty), zpracování, balení i skladování suroviny [64, 65].

1.3.3.1 Metoda s využitím kationtu radikálu ABTS

Během této metody dochází k produkci modrozeleného chromoforu $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) prostřednictvím oxidační reakce mezi ABTS a persíranem draselným. Vzniká radikál kation 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny). Po přidání antioxidantů k radikálu dochází k jeho redukci, jelikož přijme elektron nebo atom vodíku od těchto látek. Absorpční maximum radikálu je 415, 645, 734 a 815 nm. Odbarvování roztoku (úbytek absorbance) se značí jako procento inhibice radikál kationtu ABTS. Metoda se používá pro antioxidanty rozpustné ve vodě i v tucích, pro čisté sloučeniny i pro potravinové extrakty [66].

1.3.3.2 Metoda DPPH

Tento test je založený na redukci radikálu DPPH (1,1-difenyyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazyl). Alkoholický roztok této látky má fialovou barvu. Po přidání vzorku, který obsahuje antioxidační látky, dochází k redukci roztoku radikálu, který přijme elektron nebo atom vodíku. Reakce je doprovázena změnou roztoku, která se měří v absorpčním maximu (517 nm). Předpokládá se, že antioxidační aktivita se rovná elektrodonorové kapacitě, redukční síle antioxidantu.

Tato technika patří mezi jednoduché a nenáročné. Citlivost této metody může být ovlivněna řadou faktorů, například typ a množství použitého rozpouštědla, přítomnost volných funkčních skupin schopných výměny vodíkových protonů, kovových iontů a čerstvost DPPH činidla. Také antokyany mohou ovlivnit výsledky i jejich interpretaci, jelikož absorbují ve stejném spektru jako Folin-Ciocaltovo činidlo [67].

1.3.3.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP (ferric reducing antioxidant power)

Během této metody dochází k redukci komplexu Fe^{3+} -TPTZ (Fe^{3+} -2,4,6-tris(2-pyridyl-1,3,5-triazin) antioxidant). Redukcí vzniká Fe^{2+} -TPTZ, jehož množství odpovídá nárůstu absorbance při 593 nm. Reakci doprovází i změna barvy, z bezbarvé až mírně nahnědlé přechází zbarvení na modré, a to díky železnatým komplexům. Tato metoda není schopna detekovat polyfenolové sloučeniny a thioly, které reagují pomalu [68, 69].

1.3.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek (Folin-Ciocalteuova metoda)

Tato metoda se používá ke stanovení celkové antioxidační aktivity, přesněji k analýze fenolických složek v extraktech z bylin, koření, ovoce, obilovin, luštěnin a mnoha dalších. Tato metoda se zakládá na redukci Folin-Ciocalteuova činidla (FC činidlo) fenolickými sloučeninami za alkalických podmínek. Toto činidlo obsahuje komplexy fosfomolybdenu a kyseliny fosfowolframové, jenž jsou redukovány za vzniku modře zbarveného chromoforu s maximální absorbancí při 765 nm.

Výsledky této metody mohou být vyjádřeny jako ekvivalentní množství katechinu, kyseliny kávové nebo kyseliny chlorgenové. Nejčastěji se však jako standard využívá kyselina gallová.

Tento test patří k jednoduchým, reprodukovatelným a robustním. Ovšem je citlivý na pH, reakční dobu a teplotu. Často dochází i k nadhodnocení výsledků, jelikož k redukci přispívají i nefenolická redukční činidla, jako jsou například redukující cukry a určité aminokyseliny [5, 35, 67].

1.3.5 Stanovení flavonoidů

Obsah těchto sloučenin je považován za důležitý parametr pro hodnocení vzorků potravin a léčiv. Lze rozlišit dva postupy stanovení flavonoidů, které jsou založené na tvorbě komplexu hliníku.

1.3.5.1 Metoda v prostředí octanu sodného (Metoda 1)

Do vzorku se přidá 2–10% roztok chloridu hlinitého. V přítomnosti okyseleného vzorku pomocí roztoku kyseliny nebo octanu se vytvoří žlutý komplex flavonoid- Al^{3+} . Komplexy se proměří spektrofotometricky změřením absorbance při vlnové délce 404–430 nm. Jako standardy pro vyjádření výsledků se využívají flavonoly (katechin, kvercetin, rutin, galangin, atd.). Tato metoda je selektivní pro flavonoly a flavony (luteolin).

1.3.5.2 Metoda v prostředí dusitanu sodného (Metoda 2)

Druhá metoda využívá pro stanovení flavonoidů vznik nitrosloučeniny (nitrace aromatického kruhu s katecholovou skupinou) následované tvorbou komplexu s hlinitým kationtem. Po přidání 2% chloridu hlinitého dochází ke vzniku žlutého komplexu. Po zalkalizování roztoku se barva změní na červenou. Intenzita tohoto zbarvení se měří při vlnové délce 510 nm. Výsledky se vyjadřují jako ekvivalent katechinu. Tato metoda je specifická pro rutin, luteolin, katechiny a fenolové kyseliny [70].

1.3.6 Stanovení antokyanů

Antokyanové pigmenty jsou důležité pro kvalitu potravin, přispívají k barvě a vzhledu. Zájem o tyto látky se zvyšuje, jelikož by mohly být zdraví prospěšné. Antokyany jsou zodpovědné za červené, fialové a modré odstíny přítomné v ovoci, zelenině a obilovinách. Existuje 6 běžných antokyanů (pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin a malvidin), jejichž struktury se mohou lišit glykosidickou substitucí v polohách 3 a 5. Další variace nastávají acylací cukerných skupin organickými kyselinami.

Spektrofotometrické stanovení antokyanů spočívá v měření změny absorbance při 2 různých hodnotách pH. Využívá se jejich zbarvení, které při změně pH může i zaniknout. Vzorek se umístí do dvou roztoků o různém pH, do pufrů o hodnotě 1,0 a 4,5. U každého roztoku je proměřena absorbance nejvíce zastoupeného antokyanu. V přírodě se nejčastěji vyskytuje kyanidin-3-glukosid, jehož maximální absorbance se měří při 520 nm [71].

1.3.7 Kapalinová chromatografie

Chromatografie se řadí mezi separační metody, kdy dochází k rozdělení složek obsažených ve vzorku na základě opakované distribuce mezi mobilní a stacionární fází. U kapalinové chromatografie je mobilní fáze kapalina a stacionární fáze je zpravidla pevná a je umístěná v koloně. Po rozdělení unáší mobilní fáze jednotlivé složky do detektoru, kde jsou monitorovány. Kapalinovou chromatografií můžeme využít jak pro kvalitativní analýzu, tak pro kvantitativní analýzu.

V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je mobilní fáze čerpána vysokotlakými čerpadly, která v současnosti umožňují čerpat kapalinu až do tlaků 80 MPa a v případě ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) to jsou až tlaky 150 MPa. Vyšší odolnost čerpadel vůči provozním tlakům umožňuje použití malých částic stacionární fáze, čímž dochází ke zvýšení separační účinnosti a také ke zkrácení doby analýzy. Mezi její

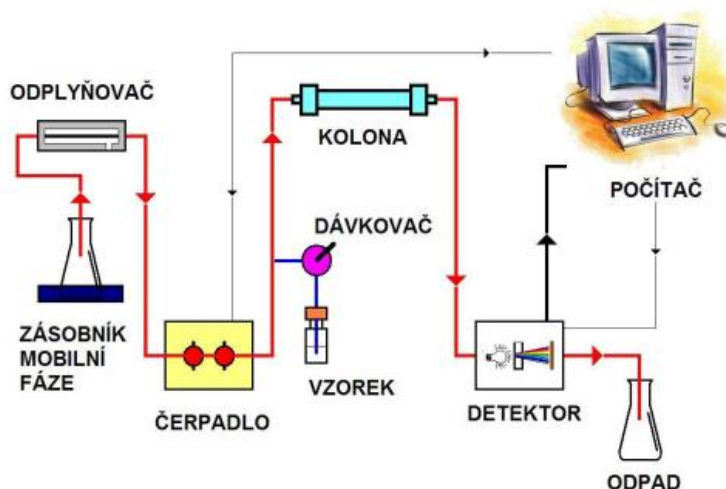
hlavní výhody patří malý objem dávkovaného vzorku a široká oblast použitelnosti. Nevýhodou této techniky je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace.

V případě, že složení mobilní se v průběhu separace nemění, mluvíme o isokratické eluci, která je vhodná pro separaci látek s podobnou retencí. V případě, že separujeme látky, které mají velmi rozdílné retenční faktory, je nutné využít gradientovou eluci, kdy dochází v průběhu separace ke zvyšování koncentrace silnějšího elučního činidla. S využitím gradientové eluce dochází u složitých směsí látek ke zkrácení doby analýzy a ke zvýšení citlivosti jejich detekce.

Podle typu mobilní a stacionární fáze rozlišujeme různé chromatografické systémy. V systému s normálními fázemi (NP-HPLC) probíhá separace mezi nepolární mobilní fází a polární stacionární fází. Mezi nepolární rozpouštědla řadíme hexan, heptan nebo dichlormethan ve směsi s nízkým alkoholem. Stacionární fází tvoří nejčastěji silikagel nebo chemicky modifikovaný silikagel (např. aminopropyl silikagel). V systému s obrácenými fázemi se využívá polární mobilní fáze a nepolární stacionární fáze. Nejběžnější stacionární fází je chemicky modifikovaný oktadecyl silikagel (C_{18}), dále se využívá oktyl silikagel (C_8) nebo jinak upravené stacionární fáze (např. pentafluorfenyl silikagel). Mobilní fází tvoří směs vody a organického rozpouštědla jako je acetonitril nebo methanol. Separaci zásadním způsobem ovlivňuje jak volba stacionární, tak volba mobilní fáze [72, 74, 75].

Na obrázku č. 3 je znázorněno schéma kapalinového chromatografu. Mobilní fáze je čerpána ze zásobníků vysokotlakého čerpadla. Pro zajištění reprodukovatelného průtoku je nutné mobilní fází nejprve odplynit pomocí ultrazvuku, probublávání heliem nebo pomocí degaseru. Dále je vedena mobilní fáze přes dávkovací systém, kde dochází k nadávkování vzorku, a to pomocí šesticestného dávkovacího ventilu buď ručně nebo s využitím autosampleru. Vzorek je dále unášen na kolonu, kde dochází k separaci. Kolony jsou ocelové trubice o různém průměru a délky a jsou naplněné stacionární fází o různé velikosti částic. Nejčastěji jsou využívány částice o průměru cca 3 μm a mohou být buď porézní, nebo povrchově porézní. U povrchově porézních částic dochází ke zmenšení difúzní vrstvy a ke zvýšení účinnosti separace. Účinnost separace může být zvýšena i použitím menších částic, ale pokud jsou částice menší než 2 μm , je nutné použít speciální instrumentaci, která odolává vysokým tlakům (UHPLC). Po separaci je eluát veden do detektoru, který by měl mít malý vnitřní objem, stabilní a reprodukovatelný signál, lineárně závislý na koncentraci, dále vysokou citlivost, co nejnižší mez detekce a příznivou cenu. Detektory dělíme na univerzální (měří index lomu, tepelnou vodivost atd.) a selektivní (měří absorbanci při určité vlnové délce, elektrolytický proud atd.).

Mezi běžné detektory patří spektrofotometrické detektory, fluorimetrické, refraktometrické, elektrochemické a hmotnostní spektrometr [73–75].



Obrázek č. 3 Schéma kapalinového chromatografu³

1.3.8 ICP-MS

Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS) byla poprvé představena roku 1980. Její vývoj se značně posunul a dnes patří tato technika k základnímu vybavení laboratoří, které se zabývají prvkovou analýzou. Díky této technice je možné provést téměř kompletní prvkovou i izotopovou analýzu vzorků i širokého rozsahu koncentrací. Tato metoda má i izobarické a polyatomické interference a vliv matrice vzorku.

Kapalný vzorek je nasáván pomocí peristaltické pumpy do zmlžovače, kde vzniká aerosol, který prochází mlžnou kolonou dále do přístroje. Rozpouštědlo se v plazmatu odpařuje, dochází k atomizaci vzorku a ionizaci atomů. Ionty jsou dále unášeny do hmotnostního spektrometru, který na rozdíl od ICP (tlak 760 torr) pracuje za hlubokého vakua (10^{-5} – 10^{-6} torr). Rozhraní tvoří dva kónusy a hnací silou je tlakový gradient. Pomocí fokusačních elektrod jsou ionty fokusovány do paprsku iontů, který se usměřňuje do hmotnostního analyzátoru. Zde jsou ionty rozděleny podle jejich hmotnosti a náboje (m/z).

Nejpoužívanější analyzátor je kvadrupólový analyzátor. Tvoří ho čtyři kovové tyče, na které se aplikuje napětí. Na protilehlé tyče se aplikuje kladné napětí a na druhý pár je aplikováno

³ Zdroj: CVAČKA, J. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie: Instrumentace [přednáška]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 19.10. 2020 In: web.natur.cuni.cz [online]. [cit. 27. 3. 2023] Dostupné z: http://www.mu-j-web.cz/vyuka/HPLC/HPLC_soubory/03_HPLC%20instrumentace_2020-21.pdf

záporné napětí. Díky kombinaci vysokofrekvenčního střídavého napětí umožňuje průchod pouze určitým iontům o určité hodnotě m/z . Takto je možné analyzovat celé hmotnostní spektrum. K detekci iontů slouží iontový násobič [76–78].

Argonové indukčně vázané plazma (ICP) je tvořeno v plazmovém hořáku z křemenného skla, který se skládá ze tří do sebe vnořených trubic. Vnější trubicí proudí chladicí plyn, prostřední je veden pomocný plyn a vnitřní trubicí vede nosný plyn, který unáší aerosol do plazmatu. Díky volným elektronům z externího zdroje (Teslův induktor) dochází k zážehu ICP. Volné elektrony jsou unášeny vysokofrekvenčním proudem a ionizují další elektrony. ICP, patřící mezi ionizační zdroje pro elementární analýzu, bych charakterizovala jako zdroj s vysokou teplotou plynu a elektronů a s vysokou hustotou elektronů; dále je pro něj charakteristická dlouhá doba setrvání aerosolu vzorku v plazmatu a vypaření a atomizace a ionizace atomů probíhá téměř v inertním prostředí. ICP se řadí k robustním metodám.

Ve spojení s ICP-MS byl použit elektronový násobič jako detektor. Tento detektor využívá buď kontinuální nebo diskretní dynodu, pracuje ve dvou módech. První mód se nazývá mód čítání pulzů, kdy se používá iontový tok do 10^6 iontů za sekundu. V druhém módu, tzv. analogovém módu, se používá rozsah $10^4 - 10^9$ countů za sekundu a signál se registruje jako elektrický proud [79–83].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

| | |
|---|--|
| 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina | (TCI, Tokyo, Japonsko) |
| Chlorid železitý | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| Chlorgenová kyselina | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| Činidlo Folin & Ciocalteu's phenol reagent | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| Destilovaná voda | (Univerzita Pardubice, ČR) |
| Dusitan sodný p. a. | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |
| Hexahydrát chloridu hlinitého | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |
| Hexahydrát chloridu železitého | (PENTA, s.r.o., Praha, ČR) |
| Hydroxid sodný | (PENTA, s.r.o., Praha, ČR) |
| Katechin hydrát 98 % | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| Kofein | (Výrobní léčebných přípravků, Praha, ČR) |
| Kvercetin hydrát ≥ 95 % | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| Kyselina gallová | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |
| Kyselina chlorovodíková 35 % | (PENTA, s.r.o., Praha, ČR) |
| Kyselina dusičná | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |
| Kyselina mravenčí | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |
| Kyselina octová 99,8 % | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |
| Methanol $\geq 99,9$ % | (Honeywell, Morristown, USA) |
| Octan sodný bezvodý p.a. | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Peroxid vodíku | (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) |
| Peroxodisíran draselný | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| Tertrahydrát chloridu železnatého | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |
| Standardy pro HPLC | (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo) |

Mezi standardy patří: fenolické látky: deriváty kyseliny benzoové (kys. gallová, syringová, vanilová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová); deriváty kyseliny skořicové (kyselina ferulová, gentisová, kávová, *p*-kumarová, sinapová); flavonoidy (epikatechin, katechin); glykosidické estery (kyselina chlorgenová, neochlorgenová, kryptochlorgenová); glykosidy (rutin) a fenolické aldehydy (vanilin).

2.2 Přístroje a pomůcky

| | |
|--|--|
| Analytické váhy KERN ABS-N_ABJ-NM | (KERN & Sohn GmbH, Německo) |
| Analyzátor vlhkosti KERN DLB 160-3A | (KERN & Sohn GmbH, Německo) |
| ICP-MS Agilent 7900 | (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) |
| Kapalinový chromatograf | |
| - Čerpadla mobilní fáze LC-20ADXR | (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) |
| - Degaser DGU-20A3R | (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) |
| - Autosampler SIL-20ACXR | (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) |
| - Detektor fotodiodového pole SPD M30A | (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) |
| - Termostat kolon LCO 102 single | (Ecom, Praha) |
| - Kolona YMC – Triart C18; stacionární fáze: oktadecyl; délka 150 mm; Průměr 3 mm; zrnitost 3 μm; $F_M = 0,4$ ml/min | (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland) |
| Laboratorní váhy KERN 440-35N | (KERN & Sohn GmbH, Německo) |
| Mikrovlnná pec Speedwave XPERT | (Berghof, Eningen, Německo) |
| pH metr SCHOTT | (SCHOTT AG, Mainz, Německo) |
| Stolní refraktometr AR3/AR4 | (Mettler - Toledo, s.r.o., Česká republika) |
| Spektrofotometr UltraScan VIS | (HunterLab, USA) |
| Spektrofotometr UV-VIS Shimadzu UV-2600 | (Shimadzu, Japonsko) |
| Termostat BSK ET 618 | (Fischer Scientific, Pardubice, ČR) |
| Automatické pipety + běžné laboratorní vybavení | |

2.3 Vzorek kávových třešní

V této diplomové práci byl použit vzorek kávových třešní pocházejících ze Střední Ameriky, ze státu Costa Rica. Vzorek pochází ze stanice jménem Hacienda Sonora. Tato stanice leží na úpatí sopky Poas v regionu Central Valley. Farma se rozkládá přibližně na 100 ha a funguje na 100 % obnovitelné energie, získané hydroelektrickým generátorem. Kávovníky pokrývají 45 ha půdy. Káva se zde sklízí v nadmořské výšce 1200–1300 metrů nad mořem od října do března.

Po ručním sběru se kávové třešně promyjí v čisté vodě a následně se suší na afrických postelích nebo na terase farmy. Třešně se velice často obracejí, aby došlo k rovnoměrnému sušení. Následně se třešně skladují dva měsíce. Po uplynutí této doby putují třešně do mlýna, kde jsou vyloupnuta zelená zrníčka kávy. Kávové třešně se dále zpracovávají a prodávají pod názvem *cascara* [84]. Vzorek kávových třešní je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4 Vzorek kávových třešní

2.3.1 Příprava nálevů za tepla

Na analytických vahách bylo naváženo 9 gramů sušených kávových třešní. Na elektrické plotýnce byla přivedena k varu destilovaná voda v kádince. Pomocí odměrného válce bylo odměřeno 300 ml horké destilované vody. Horkou vodou byly spařeny navážené kávové třešně. Po uplynutí 8 minut byl nálev zfiltrován přes skládaný filtr. Takto byly připraveny celkem tři

nálevy a označeny jako CT. Následně byla u filtrátů proměřena barevnost, kyselost a obsah cukrů. Na obrázku č. 5 jsou zachyceny kávové třešně i extrakt.



Obrázek č. 5 Extrakt z kávových třešní

2.3.2 Příprava nálevů za studena

Tato příprava spočívá v louhování kávových třešní v chladné vodě po dobu 24 hodin. Bylo naváženo přibližně 9 gramů do kádinek a přidáno 300 ml destilované vody, vytemperované na teplotu 20, 15, 10 a 5 °C. Nálev se louhoval v termostatu po dobu 24 hodin při dané teplotě. V kádince bylo umístěno míchadlo a vzorek se promíchával při rychlosti 200 otáček za minutu. Po uplynutí 24 hodin byly vzorky zfiltrány přes skládaný filtr a byly podrobeny měření barevnosti, kyselosti a obsahu cukrů. Vzorky jsou označeny jako S20, S15, S10 a S5, kde čísla značí teplotu louhování.

2.4 Měření kyselosti

Všechny vzorky připravené za tepla i za studena byly proměřeny hned po přípravě. Bylo změřeno pH nálevu pomocí pH metru, který byl zkalibrován na dva pufry o hodnotě pH = 4,0 a pH = 10,0. Bylo odměřeno 50 ml vzorku, do kterého byla ponořena skleněná elektroda. Následně byl vzorek titrován roztokem NaOH o koncentraci $c = 0,25$ [mol/l]. Titrace byla ukončena při hodnotě pH = 8,1.

2.5 Měření indexu lomu

U všech vzorků byl pomocí refraktometru změřen index lomu. Pomocí tabulek⁴ byly odečteny stupně Brix a obsah refraktometrické sušiny.

2.6 Měření barevnosti

Barevnost byla změřena pomocí spektrofotometru UltraScan VIS (geometrie $d/8^\circ$, zdroj světla D65, 400–700 nm) v režimu celkové transmitance (TTRAN). Vzorek byl měřen v křemenné květu s optickou dráhou 50 mm (objem 100 ml). Barevnost kávových třešní byla změřena ve dvou barevných prostorech: L^* , a^* , b^* a C^* , h° .

2.7 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Postup k tomuto stanovení byl převzat z diplomové práce Hlouškové Terezy [63] s malou úpravou. Optimalizace reakčního času této metody je uvedena v příloze 1.

Ke stanovení bylo do zkumavky s víčkem napipetováno 1,0 ml 5× naředěného vzorku, 6,0 ml destilované vody a 0,5 ml FC činidla. Tato reakční směs byla ponechána 5 minut v temnu a v klidu. Následně byl přidán 1,0 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Po zamíchání směsi byla uložena na půl hodiny do temna při laboratorní teplotě. Po uplynutí daného času byla proměřena absorbance při 765 nm. Stejným způsobem byly připraveny i slepé pokusy, kde byl vzorek nahrazen destilovanou vodou.

Byla připravena kalibrační řada v rozmezí 10–100 mg/l ze zásobního roztoku kyseliny gallové. Kalibrační řada byla proměřena stejným způsobem jako vzorky.

Celkový obsah fenolických látek byl získán z rovnice regrese, sestavené kalibrační řady s kyselinou gallovou. Kalibrační řada s kyselinou gallovou je uvedena v příloze 2. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové (mg Gal/l).

2.8 Stanovení obsahu flavonoidů

Pro stanovení flavonoidů se využívají dvě spektrofotometrické metody, založené na vzniku komplexu hliníku. Postup k tomuto stanovení byl převzat ze článku Pěkal a kol (2014) [70].

⁴ Žáček Z., Žáček A.; Potravinařské tabulky; 1994; 100-101; Spectrum. ISBN 80-04-24474-2.

2.8.1 Stanovení obsahu flavonoidů v prostředí octanu sodného (Metoda 1)

Nejprve byl připraven roztok 1,0M HCl, 2% AlCl₃ a 1,0M octan sodný. Dále byl připraven zásobní roztok kvercetinů navážením 0,05 g do 100 ml odměrné baňky. Kvercetin byl rozpuštěn v MeOH a baňka byla po rozpuštění doplněna po rysku.

Byla připravena směs, která se skládala z 1,0 ml vzorku, 0,5 ml destilované vody, 0,5 ml 1,0M HCl, 0,5 ml 1,0M octanu sodného a 0,5 ml 2% AlCl₃. Dané roztoky byly 10 minut inkubovány v temnu a poté byla proměřena absorbance roztoků při vlnové délce 425 nm.

Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí 0–50mg/l. Kalibrační řada byla připravena stejným způsobem jako vzorky a byla proměřena při vlnové délce 425 nm.

Obsah flavonoidů byl vypočten pomocí rovnice regrese sestavené kalibrační řady s kvercetinem. Tato kalibrační řada je znázorněna v příloze 3.

2.8.2 Stanovení flavonoidů v prostředí dusitanu sodného (Metoda 2)

Do reakčních zkumavek byly nadávkovány tyto objemy: 1,0 ml vzorku a 0,6 ml 5% NaNO₂. Poté byla směs ponechána 5 minut v klidu. Po uplynutí daného času byl do reakčních zkumavek přidán 1,0 ml 2% AlCl₃. Po šesti minutách byl přidán 1,0 ml 1,0M NaOH. Reakční směs byla umístěna do temna. Po uplynutí deseti minut byla proměřena absorbance při 510 nm. V případě slepého pokusu byl chlorid hlinitý nahrazen destilovanou vodou, jinak byl postup stejný jako u měřených vzorků.

Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku katechinů v rozmezí 0–70 mg/l. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,05 mg do 100 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku. Byla proměřena absorbance reakčních roztoků při vlnové délce 510 nm.

Obsah flavonoidů byl následně vypočten pomocí rovnice regrese sestavené kalibrační řady s katechinem. Tato kalibrační řada je uvedena v příloze 4. Výsledek byl vyjádřen jako ekvivalent katechinů (mg Kat/l).

2.9 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Postup k tomuto stanovení byl převzat z diplomové práce Hlouškové Terezy [63]. Optimalizace reakčního času je uvedena v příloze 5.

Byl připraven methanolickeý roztok radikálu DPPH. Bylo naváženo 12,5 mg činidla do 500 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku čistým methanolem. Dále byl připraven zásobní

roztok Troloxu o koncentraci 1,0 g/l. Z takto připraveného zásobního roztoku byly připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrace 10–70 mg/l. Tato kalibrační řada je uvedena v příloze 6.

Do reakčních zkumavek bylo napipetováno 5,0 ml roztoku radikálu a bylo přidáno 0,5 ml kalibračního roztoku Troloxu o dané koncentraci. Roztok byl ponechán 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí daného času byl daný roztok proměřen. Byl zaznamenán úbytek absorbance při vlnové délce 517 nm. Stejným způsobem byly proměřeny i vzorky, které nahradily 0,5 ml zásobního roztoku Troloxu. Byl připraven slepý pokus, který namísto extraktu obsahoval čisté extrakční činidlo. Slepý pokus byl proměřen stejně jako vzorky. Naměřené hodnoty byly přepočítány na procento inhibice (Rovnice 5). Antioxidační aktivita vzorků byla vyjádřena ve formě ekvivalentů Troloxu vypočtením z rovnice regrese kalibrační řady závislosti inhibice na koncentraci Troloxu. Kalibrační řada závislosti inhibice na koncentraci Troloxu je uvedena v příloze 6.

$$\text{Inhibice (\%)} = \frac{A_{sl} - A_{vz}}{A_{sl}} \cdot 100 \quad (\text{Rovnice 5})$$

A_{sl} absorbance slepého pokusu, A_{vz}absorbance vzorku

2.10 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Nejprve byl připraven roztok kation-radikálu ABTS⁺. Ve vialce s víčkem byla rozpuštěna tableta ABTS (10 mg) v 5 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 0,1 ml 0,064M peroxidisíranu draselného. Tato směs byla ponechána při laboratorní teplotě 12–16 hodin. Po uplynutí daného času bylo odpipetováno 2,5 ml roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Poté byl připraven zásobní roztok Troloxu do 100 ml odměrné baňky. Připravený roztok odpovídal koncentraci 1 g/l. Z takto připraveného roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí koncentrace 0–70 mg/l.

Do zkumavky s víčkem byly napipetovány 3,0 ml roztoku kation-radikálu ABTS⁺ a bylo přidáno 0,5 ml kalibračního roztoku o dané koncentraci. Roztok byl ponechán 30 minut ve tmě. Optimalizace reakční doby je uvedena v příloze 7. Poté byl proměřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Stejným způsobem byly proměřeny i vzorky, kde nahradily 0,5 ml kalibračních roztoků. Byl připraven i slepý pokus, který místo extraktu obsahoval čisté extrakční činidlo. Úbytek absorbance byl přepočítán na procento inhibice roztoku pomocí Rovnice 5. Pomocí kalibrační závislosti, která je uvedena v příloze 8, bylo procento inhibice

přepočítáno na ekvivalentní množství Troloxu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě ekvivalentů mg Troloxu/ml nápoje.

2.11 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Postup byl převzat z článku Benzie a Strain [68] s malou úpravou. Optimalizace reakčního času této metody je uvedena v příloze 9.

Nejprve byla připravena reakční směs, která obsahovala 20 mM chlorid železitý, 10 mM roztok TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) ve 40mM HCl a 0,3 M octanový pufr o pH 3,6. Uvedené látky byly smíchány v poměru 1: 1: 10. Dále byl připraven zásobní roztok Troloxu navážením 0,05 g do 100 ml odměrné baňky, po rozpuštění byl doplněn po rysku.

Vzorky byly 10× naředěny. Do reakční zkumavky byly napipetovány 3,0 ml reakční směsi, následně bylo přidáno 0,3 ml naředěného vzorku. Po 30 minutách inkubace byl proměřen úbytek absorbance při vlnové délce 593 nm. Byl připraven i slepý pokus, který vznikl smícháním 3,0 ml reakční směsi a 0,3 ml destilované vody.

Ze zásobního roztoku Troloxu byla připravena kalibrační řada v rozmezí 5–80 mg/l. Z každé koncentrace bylo odpipetováno 0,3 ml do reakčních zkumavek. K tomu byly přidány 3,0 ml reakční směsi a zkumavky byly ponechány 30 minut v klidu při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla proměřena absorbance při vlnové délce 593 nm. Graf kalibrační přímky je uveden v příloze 10.

Antioxidační aktivita byla vyjádřena ve formě ekvivalentu Troloxu (mg/l), a to vypočtením z rovnice regrese kalibrační křivky závislosti absorbance roztoků na koncentraci Troloxu. Tato kalibrační řada je znázorněna v příloze 10.

2.12 Stanovení antokyanů

Postup ke stanovení byl převzat ze článků Lee a kol. (2005) [71].

Byl pipetován 1 ml vzorku do zkumavky se 4,0 ml roztoku KCl o pH = 1, který byl předpřipraven navážením 0,9 g KCl do 480,0 ml destilované vody, s následnou korekcí pH pomocí 5,0M HCl na pH = 1,0 a doplněním po rysku na výsledný objem 500 ml. Tentýž vzorek byl napipetován do zkumavky, kde byl roztok 4,0 ml CH₃COONa o pH = 4,5. Tento roztok byl připraven navážením 27,2 g CH₃COONa do 480 ml, s následnou úpravou pH pomocí 5,0M HCl na pH = 4,5 a doplněním po rysku na výsledný objem 500 ml. Zkumavky byly umístěny

do temna na 20 minut, pak byly proměřeny jejich absorbance při dvou vlnových délkách 510 a 700 nm. Koncentrace antokyanů byla vypočítána podle Rovnice 6.

$$c = \frac{[(A_{520}-A_{700})_{pH\ 1,0}-(A_{520}-A_{700})_{pH\ 4,5}] \cdot MW \cdot DF}{\varepsilon \cdot l} \quad (\text{Rovnice 6})$$

c = koncentrace antokyanů [g/l]; A hodnota absorbance; MW molekulová hmotnost [g/mol]; DF = faktor ředění; l = délka dráhy [cm]; ε = molární extinkční koeficient

2.13 Analýza kapalinovou chromatografií

K separaci byla použita sestava kapalinového chromatografu od firmy Shimadzu skládající se ze dvou vysokotlakých čerpadel, degaseru, autosampleru, termostatu a detektoru s diodovým polem. Jednu složku mobilní fáze tvořila deionizovaná voda s přídavkem kyseliny mravenčí a druhou složku methanol. Objem nástřiku vzorku byl 2 μ l, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min a vlnové délky pro monitorování 273 nm a 325 nm.

Pro separaci byla použita kolona YMC – Triart C18 a gradientová eluce s následujícím programem: 0 minut – 10% methanolu, 6 min. – 33% methanolu, 9 min. – 33% methanolu, 13 min. – 55% methanolu, 18 min. – 90% methanolu. Následoval návrat na původní podmínky gradientu a ustálení podmínek. Stanovení chlorgenových kyselin bylo provedeno jako suma tří kyselin (kyselina neochlorgenové, kryptochlorgenové a chlorgenové kyseliny) vztažené k nejvíce zastoupené kyselině chlorgenové.

Pro identifikaci látek přítomných v extraktech byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 g/l v metanolu u těchto standardů: kofein, kyselina gallová, syringová, vanilová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, kyselina ferulová, gentisová, kávová, *p*-kumarová, sinapová, epikatechin, katechin, kyselina chlorgenová, kyselina neochlorgenová, kyselina kryptochlorgenová, rutin, vanilin. Pro kvantifikaci chlorgenových kyselin a kofeinu byla ze zásobního roztoku vhodným naředěním připravena kalibrační řada. Pro kofein byla připravena kalibrační řada v rozmezí koncentrací 5–100 mg/l. Tato kalibrační řada je znázorněna v příloze 11. Kalibrační řada chlorgenových kyselin byla připravena v rozmezí 0,5–10 mg/l. Kalibrační řada chlorgenových kyselin je znázorněna v příloze 12.

Měření bylo provedeno celkem 3 \times a vzorky byly před měřením 5 \times naředěny.

2.14 Analýza pomocí ICP-MS

Vzorek kávových třešní byl zmineralizován v mikrovlnné peci Speedwave XPERT s výkonem 2000 W. Rozklad vzorku byl proveden ve třech replikách. Do každé teflonové rozkladné nádoby bylo naváženo okolo 0,1 g a bylo přidáno 5 ml 16% HNO₃ a 2 ml 30% H₂O₂. Mineralizace proběhla při teplotě 200 °C, která byla držena 35 minut. Teplotní program je uveden v publikaci Kováčik a spol. (2022) [93].

Analýza vzorků byla provedena pomocí kvadrupólového ICP-MS Agilent 7900. Spektrometr je vybaven kolizní celou využívající kolizní plyn He k eliminaci spektrálních interferencí. Pracovní podmínky spektrometru jsou uvedeny v publikaci Kováčik a spol. (2022) [93].

2.15 Statistické vyhodnocení

Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 365. K vyhodnocení výsledků analýz kávových třešní byl použit program STATISTICA 14 (StatSoft ČR s. r. o.). Byla provedena jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Zvoleným faktorem byla teplota destilované vody použité na přípravu nálevů (označení vzorků CT, S20 atd.). Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr hodnot \pm směrodatná odchylka. Statistická významnost byla zjištěna pomocí vícenásobného párového Duncanova testu na hladině významnosti pravděpodobnosti $p = 0,05$. Pro redukci počtu proměnných byla použita metoda analýzy hlavních komponent (PCA).

Experimentálně naměřená data pro kvantifikaci kofeinu a chlorgenových kyselin byla hodnocena v programu QC Expert 2.9. (Trilobyte, Česko). Data byla proložena lineární regresí. Pomocí grafických diagnostik (Williamsův, Pregibonův, McCulloh-Meeterův a L-R graf) byly detekovány a odstraněny odlehlé body kalibrační křivky.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Kyselost a obsah cukrů

Počáteční pH všech nálevů bylo v rozmezí 4,2–4,6. Výsledky byly vyjádřeny dle Soxhlet-Henkela (°SH) a jsou uvedeny v tabulce 1. Nejvyšší kyselost měl nálev připravovaný pomocí destilované vody o teplotě 20 °C. Celkový efekt vlivu teploty vody na kyselost vzorku byl prokázán ($p < 0,05$). Mezi studenou přípravou se nejvíce lišila kyselost nálevů při teplotě 20 a 5 °C.

Maharani a kol. (2020) zkoumali hodnotu pH nápoje *cascara*. Kávové třešně louhovali v převařené vodě 5, 7, 10, 12 a 15 minut. Kyselost nápoje byla vyšší u nápojů, které se louhovaly déle. I v této diplomové práci byla kyselost vyšší u výluhů louhovaných 24 hodin, než u extraktu připraveného pomocí teplé destilované vody [86].

Obsahy cukrů v nálevech kávových třešní se pohybovaly v rozmezí 0,11–0,43 °Brix (výsledky uvedeny v tabulce 1). Nejsladší nálev byl získán louhováním ve vodě o teplotě 20 °C (°Brix = $0,43 \pm 0,09$; $p < 0,001$). Rozdíl v obsahu cukrů je mezi teplou přípravou a mezi přípravou pomocí vody o teplotě 20 a 15 °C. Pokles v obsahu cukrů mezi přípravou S20 a S15 je statisticky významný ($p < 0,001$).

Tabulka 1: Kyselost a obsah cukrů v nápojích *cascara*

| | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|-------|----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| °SH | $3,19 \pm 0,14^{BC}$ | $3,41 \pm 0,08^A$ | $3,28 \pm 0,02^{AB}$ | $3,31 \pm 0,04^{AB}$ | $3,07 \pm 0,04^C$ |
| °Brix | $0,22 \pm 0,05^B$ | $0,43 \pm 0,09^A$ | $0,11 \pm 0,01^C$ | $0,23 \pm 0,02^B$ | $0,30 \pm 0,00^B$ |

Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (N = 3), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku ($p < 0,05$). CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování.

3.2 Měření barevnosti

Pro nálevy kávových třešní byla jejich barva měřena v odraženém světle, a to v rámci barevných prostorů $L^*a^*b^*$ a $L^*C^*h^\circ$. Výsledné hodnoty pro oba barevné prostory jsou shrnuty v tabulce 2. Naměřené hodnoty pro různé teploty přípravy byly porovnány mezi sebou.

Při porovnání parametru L^* se výrazně odlišoval nálev připravovaný při teplotě vody 5 °C. L^* je spojený se světlostí (poměr mezi bílou a černou barvou). Tento nálev byl nejsvětlejší ($L^* = 80,87 \pm 2,76$; $p < 0,001$). Naopak nejtmavší byl nálev připravený při teplotě vody 10 °C ($L^* = 37,67 \pm 1,31$; $p < 0,001$). Světlost vzorku S10–S20 byla tmavá ($L^* = 37,67–45,91$).

Parametr a^* představuje přechod mezi červenou a zelenou barvou. Nejčervenější byl nálev extrahovaný destilovanou vodou o teplotě 5 °C, kde $a^* = 53,36 \pm 1,50$ ($p < 0,001$). Nápoje připravené zalitím horkou vodou a při teplotách 10–20 °C byly méně červené a podobné. Nejvyšší hodnotu parametru b^* měl opět nálev připravený při teplotě 5 °C. Nálev s hodnotou $b^* = 109,87 \pm 0,19$ obsahoval nejvíce odstínu žluté barvy. Teplota vody při přípravě nápoje *cascara* má vliv na hodnotu parametru b^* ($p < 0,01$). Parametr C^* kopíruje předchozí parametry. Největší hodnotu měl nálev připravený při 5 °C, kde $C^* = 122,15 \pm 0,70$ ($p < 0,01$). Naopak nejmenší hodnotu tohoto parametru měl nálev připravený při teplotě 10 °C. Parametr h° je nejvyšší u přípravy extraktu ze sušených kávových třešní pomocí teplé destilované vody $h^\circ = 72,08 \pm 0,73$ ($p < 0,01$). S klesající teplotou vody během přípravy nálevů jeho hodnoty klesají od 67,68–64,10.

Vliv teploty vody na přípravu nálevů je důležitý, nejvíce se projevuje při přípravě pomocí vody o teplotě 20–5 °C. Nápoj připravený pomocí teplé vody se barevně odlišuje od nápojů připravených pomocí studené vody. Vzorek připravený při 10 °C se svojí barevností lišil, byl tmavší, méně červený a méně žlutý. Na druhou stranu vzorek S5 byl výrazně světlejší, červenější a žlutější než ostatní vzorky.

Tabulka 2: Barevnost nápojů *cascara* v barevném prostoru $L^*a^*b^*$ a C^*h°

| Parametr | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|
| L^* | $63,06 \pm 1,44^B$ | $45,28 \pm 3,86^C$ | $45,91 \pm 3,63^C$ | $37,67 \pm 1,31^D$ | $80,87 \pm 2,76^A$ |
| a^* | $26,60 \pm 1,51^{CD}$ | $28,59 \pm 0,53^{BD}$ | $29,25 \pm 1,01^B$ | $25,95 \pm 0,77^C$ | $53,36 \pm 1,50^A$ |
| b^* | $82,24 \pm 1,09^B$ | $70,54 \pm 4,53^C$ | $71,73 \pm 4,27^C$ | $60,24 \pm 1,68^D$ | $109,87 \pm 0,19^A$ |
| C^* | $86,44 \pm 1,51^B$ | $76,13 \pm 4,38^C$ | $77,47 \pm 4,17^C$ | $65,59 \pm 1,68^D$ | $122,15 \pm 0,70^A$ |
| h° | $72,08 \pm 0,73^A$ | $67,88 \pm 0,94^{BC}$ | $67,78 \pm 0,99^{BC}$ | $66,69 \pm 0,66^C$ | $64,10 \pm 0,63^D$ |

Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka ($N = 3$), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku ($p < 0,05$). CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování.

Torres-Valenzuela a kol. (2019) zkoumali průběh sušení vlhké kávové třešně. Během sušení se zvýšil parametr L^* . Suché vzorky byly tmavší než vlhká kávová slupka. Může to souviset s procesy hnědnutí a se vznikem melanoidinů. Parametr a^* , který odpovídá za červeno-zelené zbarvení, se zvyšoval během sušení. Usušené kávové slupky měly červenější barvu než vlhký vzorek. Parametr b^* nebyl během sušení výrazně ovlivněn. Parametr h° se během sušení snížil.

Tento parametr odpovídá za úhel barvy, který ukazuje na červenější usušený vzorek než čerstvý vzorek. Celková změna barvy byla malá, lidským okem nepostřehnutelná [85].

3.3 Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů

Výsledky stanovení celkového obsahu fenolických látek jsou vyjádřeny v mg kyseliny gallové na litr nápoje. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Nejvyšší obsah fenolických látek obsahoval nálev připravený při teplotě 10 °C. Obsahoval $367,89 \pm 42,22$ mg kyseliny gallové na litr nápoje. Teplota vody přípravy nápoje *cascara* ovlivňuje obsah fenolických látek. Mezi hodnotami obsahu fenolických látek u přípravy pomocí horké vody a studené vody je statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Nápoj připravený zalitím horkou vodou měl celkově menší obsah fenolických látek.

Maharani a kol. 2021 zkoumali obsah fenolických látek, měnící se s dobou louhování kávových třešní. Vzorek třešní spařili v horké vodě a louhovali ho po dobu 5, 7, 10, 12 a 15 minut. Nejvyšší obsah fenolických látek, stanovených pomocí Follin-Ciocalteuovy metody, obsahoval výluh kávových třešní louhovaný po dobu 10 minut $103,989$ mg/kg (jako standard použili kyselinu gallovou). Obsah stanovený ve studii Maharani a kol. 2020 byl nižší než obsah fenolických látek v nálevu připraveném pomocí teplé destilované vody [86]. Také Muhammad a kol. (2023) potvrdili, že při vyšší teplotě vody přípravy nápoje *cascara* dochází ke snížení obsahu fenolických látek. Porovnávali výluh z kávových třešní, který byl připraven pomocí horké vody (70, 80, 90 °C) spolu s druhým výluhem, který byl připraven pomocí studené vody (5 °C). Při přípravě pomocí horké vody louhovali vzorek ve vodě po dobu 4 minuty. Při studené přípravě louhovali vzorek po dobu 12 hodin. Celkový obsah fenolických látek v nápoji *cascara* se pohybuje v rozsahu 19,2–24 mg kyseliny gallové na gram kyseliny gallové [87]. Nízké hodnoty mohou být způsobeny kratší dobou louhování kávových třešní.

Tabulka 3: Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů

| Metoda | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|--------|----------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| TPC | $230,39 \pm 42,37^B$ | $330,39 \pm 16,28^A$ | $361,64 \pm 5,79^{AC}$ | $367,89 \pm 42,22^{ABC}$ | $354,61 \pm 11,84^A$ |
| FM 1 | $7,59 \pm 1,68^B$ | $12,90 \pm 2,29^A$ | $13,04 \pm 1,27^A$ | $11,83 \pm 1,92^A$ | $13,64 \pm 1,55^A$ |
| FM 2 | $3,81 \pm 3,61^A$ | $11,63 \pm 3,35^A$ | $7,47 \pm 2,48^A$ | $7,47 \pm 2,48^A$ | $7,47 \pm 2,48^A$ |

Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (N = 3), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku ($p < 0,05$). CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování; TPC značí celkový obsah fenolických látek [mg standardu/l]; FM 1 značí metodu 1 pro stanovení flavonoidů [mg standardu/l]; FM 2 značí metodu 2 pro stanovení flavonoidů [mg standardu/l].

Výsledky stanovení flavonoidů v prostředí octanu sodného (Metoda 1) jsou vyjádřeny v mg kvercetinu/l *cascary*, jak je uvedeno v tabulce 3. Tato metoda je selektivní pro flavonoly a flavony [70]. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi obsahem flavonoidů v nápoji *cascara* připravený za horka a při teplotách 5–20 °C ($p < 0,05$). Při těchto teplotách byla zjištěná koncentrace flavonoidů v rozsahu 11,83—13,84 mg kvercetinu/l. Při přípravě za studena nebyl zjištěn vliv teploty na obsah flavonoidů. Neves a kol. (2019) extrahovali kávové třešně pomocí vody a stanovili obsah flavonoidů v podobném rozsahu. Vzorky byly louhovány ve vodě o teplotě 100 °C. Celkem 5 vzorků bylo připraveno jiným způsobem. Pro přípravu nálevu kávových třešní použili tyto metody: ponoření slupek do vody (infuze), výluh s mechanickým mícháním, výluh bez mechanického míchání, ultrazvuková extrakce a extrakce pomocí elektrického kávovaru. Výsledky stanovení celkového obsahu flavonoidů byly vyjádřeny jako miligram ekvivalentů kvercetinu na 100 g vzorku a pohybovaly se v rozsahu 7,1–8,47 mg/100 g vzorku [89].

Metoda stanovení flavonoidů v prostředí dusitanu sodného (Metoda 2) je specifická pro rutin, luteolin, katechiny a fenolové kyseliny [70]. Vliv teploty vody pro přípravu extraktu z kávových třešní nemá vliv na obsah těchto látek ($p > 0,05$). Mefsin a kol (2022) mimo jiné zkoumali i vliv pražení kávových slupek na obsah flavonoidů. Třešně byly pomlety na jemný prášek a extrahovány ethanolem. Pomocí této metody stanovení flavonoidů v prostředí dusitanu sodného stanovili obsah flavonoidů v nepražené kávové slupce $54,26 \pm 0,13$ mg kyseliny gallové na gramy jemného prášku [90]. Jejich výsledek je vyšší než výsledek stanovený v této diplomové práci. Může to být z důvodu účinnější extrakce i pomletí vzorku na jemný prach.

3.4 Antioxidační aktivita nápoje *cascara*

Výsledky stanovení antioxidační aktivity s využitím radikálu DPPH jsou vyjádřeny jako mg Troloxu/l extraktu a jsou prezentovány v tabulce 4. Statisticky bylo prokázáno, že teplota vody použitá při přípravě nálevu ovlivňuje antioxidační aktivitu ($p < 0,05$). Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt připravený pomocí vody o teplotě 10 °C $109,72 \pm 5,53$ mg Troloxu/l. Naopak nejnižší obsah antioxidačních látek vykazoval extrakt připravený při teplotě 20 °C. Nebyl zjištěn rozdíl mezi antioxidační aktivitou (DPPH) mezi vzorkem připraveným zalitím horkou vodou a vzorky připravenými za studena.

Maharani a kol. (2020) zkoumali vliv doby louhování na antioxidační aktivitu nápoje *cascara*. Jako standard použili kyselinu gallovou. Jejich výsledky antioxidační kapacity nápoje

připraveného pomocí horké vody se pohybovaly v rozsahu 61,013–87,300 % antioxidační aktivity.

Neves a kol. (2019) stanovili obsah antioxidační aktivity pomocí metody DPPH v rozsahu 2,73–4,71 EC₅₀ (mg/ml). Vzorčky byly louhovány ve vodě o teplotě 100 °C. Celkem 5 vzorků bylo připraveno jiným způsobem. Pro přípravu nálevu kávových třešní použili tyto metody: ponoření slupek do vody (infuze), výluh s mechanickým mícháním, výluh bez mechanického míchání, ultrazvuková extrakce a extrakce pomocí elektrického kávovaru [89].

Tabulka 4: Stanovení antioxidační aktivity

| c ₀ [mg Trolox/l] | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| DPPH | 74,54 ± 13,85 ^{ABC} | 55,00 ± 6,90 ^C | 45,62 ± 0,00 ^{BC} | 109,72 ± 5,53 ^A | 80,02 ± 32,57 ^{AC} |
| ABTS | 143,83 ± 14,26 ^C | 176,11 ± 15,25 ^B | 207,74 ± 11,22 ^A | 101,86 ± 6,39 ^D | 88,95 ± 8,80 ^D |
| FRAP | 6,71 ± 1,85 ^B | 32,34 ± 5,69 ^A | 39,64 ± 7,75 ^A | 42,55 ± 10,13 ^A | 30,63 ± 6,98 ^A |

Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N = 3), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku (p < 0,05). c₀ značí obsah antioxidantů, CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování; DPPH – metoda s využitím radikálu DPPH; ABTS – metoda s využitím radikálu ABTS; FRAP – metoda využívající redukce komplexu TPTZ.

Pro stanovení antioxidační aktivity byla použita další metoda, využívající redukci radikálu ABTS^{•+} v přítomnosti antioxidantů. Vliv teploty vody na obsah antioxidantů je statisticky významný (p < 0,001), avšak nebyl prokázán žádný trend s teplotou přípravy za studena. Také nelze tvrdit, že by vzorek připravený za horka měl odlišnou antioxidační aktivitu ve srovnání se vzorky připravenými za studena. Nejvyšší obsah obsahoval extrakt S15 207,74 ± 11,22 mg/l. Naopak nejmenší obsah byl stanoven u extraktu připraveného při 5 °C. Duangjai A. a kol (2016) porovnávali antioxidační kapacitu vodných extraktů kávových třešní, které se lišily způsobem zpracování. Ze všech zpracování byl nakonec připraven usušený a rozemletý prášek kávových třešní. Tento prášek byl extrahován horkou vodou, následně byl louhován 2 minuty a poté byla změřena antioxidační aktivita extraktu pomocí metody ABTS dle článku Re a kol. (1999) [66]. Antioxidační aktivita extraktů se pohybovala v rozsahu 18–27 IC₅₀ µg/ml [91]. V článku Manasa a kol. (2021) postupovali podle stejného článku (Re a kol. (1999) [66]). Jako standard pro metodu ABTS použili Trolox. Extrakt z kávové dužiny byl podroben louhování v isopropylalkoholu při teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny. Následně byl extrakt odstředěn a izopropylalkohol byl odpařen. Dále byl pomocí chemických činidel odstraněn pektin. Hodnota antioxidační aktivity v tomto článku byla EC₅₀ = 30,76 ± 1,02 µg/ml [92]. Hodnoty antioxidační aktivity se výrazně lišily od hodnot získaných v této diplomové práci. Může to být několika

krokovým zpracováním kávové dužiny, rozdílným druhem kávovníku, ze kterého třešně pocházeli i rozdílnou lokací růstu kávovníku. Důvodem vyššího obsahu antioxidantů v této diplomové práci může být i delší doba extrakce.

Metodou FRAP byly zjištěny výrazně vyšší (až 6×) antioxidační vlastnosti nápojů *cascara* připravených za studena ve srovnání s horkou přípravou. Teplota přípravy 5–20 °C neměla vliv na obsah antioxidačních látek měřených metodou FRAP. Ve studii Manasa a kol. (2021) měřili i antioxidační aktivitu pomocí metody FRAP. Antioxidační aktivitu stanovili na $6,38 \pm 0,20$ M Troloxu Eq./100g [92].

3.5 Obsah antokyanů

U žádného z připravených výluhů nebyl zjištěn obsah antokyanů. Iriondo-DeHond a kol. (2020) také neodhalili žádné antokyaniny, domnívají se, že tyto sloučeniny mohly být degradovány sušením na slunci [36]. Na druhé straně Ramirez-Coronel a kol. (2004) potvrdili přítomnost antokyanů v kávové třešni i tři dny po usušení. V této práci byl vzorek namlet na jemný prášek, což mohlo zvýšit účinnost extrakčního procesu [88]. Emille a kol. (2006) analyzovali čerstvé kávové slupky. Nejprve je extrahovali v kyselině chlorovodíkové při teplotě 8 °C po dobu 18 hodin. Následně roztok zfiltrovali, odplynili a vakuově zpracovali. Tuto směs rozmixovali pomocí mixéru a zfiltrovali. Tento postup několikrát opakovali, dokud pevný zbytek třešní nebyl úplně bílý. Extrakty ze všech kroků smíchali a zakoncentrovali. Následně podrobili vzorek kyselá i alkalická hydrolyze. Pomocí HPLC–DAD stanovili průměrný obsah monomerních pigmentů v kávové slupce na 19,2 mg pigmentu na 100 g čerstvých slupek. Nejvíce zastoupeným antokyanidem byl kyanidin-3-rutinosid [44].

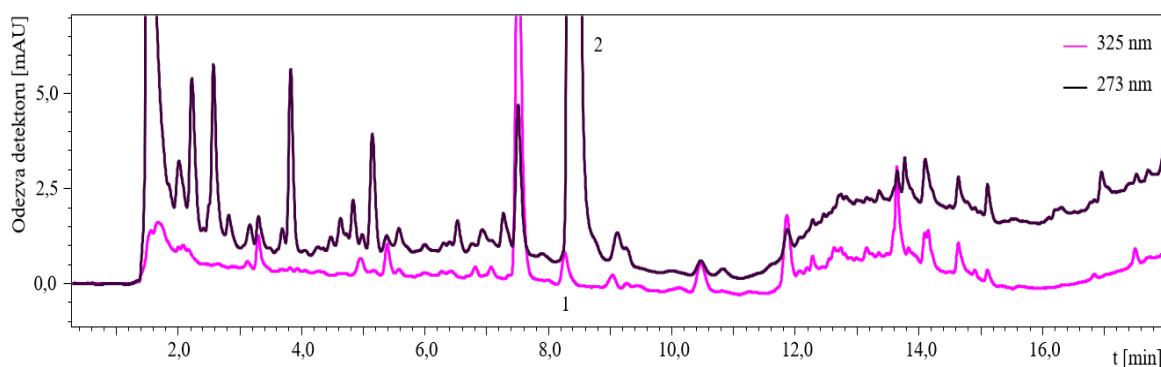
3.6 Analýza pomocí HPLC

3.6.1 Optimalizace separace

Nejprve byla provedena optimalizace separace s cílem rozdělit co nejvíce obsažených látek. Z důvodu plánované kvantitativní analýzy kofeinu a chlorgenových kyselin byla optimalizace dále zaměřena na rozlišení těchto látek od zbývajících koelujících biologicky aktivních látek. Optimalizována byla použitá stacionární fáze, mobilní fáze a gradientový program.

Pro separaci byla nejprve vybrána kolona Ascentis Express F5, která je vhodná pro separaci polohových isomerů, a tedy i jednotlivých chlorgenových kyselin. Pomocí této kolony však nedošlo k ideální separaci kofeinu a kyseliny chlorgenové žádným z použitých gradientových programů. Kofein byl obsažen ve velkém množství a byla plánována jeho kvantitativní analýza,

bylo nutné oddělit pík kofeinu od ostatních píků eluujících v jeho blízkosti. Píky, které eluovaly v blízkosti kofeinu jsou znázorněny v příloze 13. Dále byla snaha o separaci minoritních složek vzorku pro jejich případnou identifikaci například katechin, epikatechin, rutin, kyselina siringová, kyselina sinapová, vanilin a další. Identifikace těchto látek by vyžadovala využití spojení s hmotnostní spektrometrií, a proto nebyla kompletně provedena. Pro porovnání jednotlivých extraktů bude využít pouze „otisk prstu“. Identifikace bude provedena v rámci další práce na dané téma. Příklad chromatografické separace na koloně Ascentis Express F5 je uveden na obrázku č. 6.



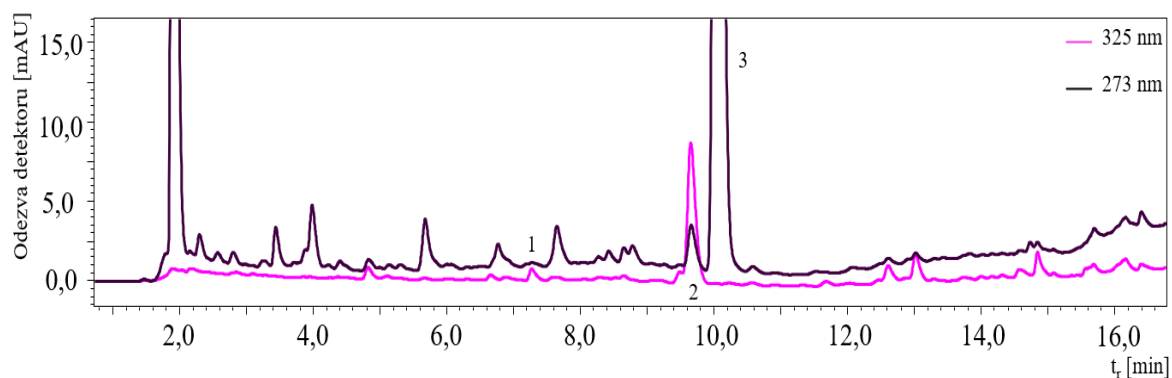
Kolona: Ascentis Express F5; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 5. min. – 25% methanolu, 9. min. – 25% methanolu, 16. min. – 90% methanolu; 18. min. – 10% methanolu; 1 – kyselina chlorgenová, 2 – kofein.

Obrázek č. 6 Chromatogram optimalizace separace při 273 a 325 nm

Další testovanou kolonou byla Ascentis Express C18, kde však nebyla dosažena uspokojivá separace pomocí žádného ze zkoušených gradientových programů. Docházelo k velkému rozmývání píků a bylo tedy dosaženo nízkého rozlišení.

Třetí kolonou použitou v rámci optimalizace separace byla kolona YMC – Triart C18. Hned po první analýze, jejíž chromatogram je znázorněn v příloze 14, bylo vidět, že tato kolona splňuje naše požadavky nejvíce. Píky kofeinu a chlorgenových kyselin bylo možné rozdělit. Další úpravou gradientového programu byla optimalizována separace minoritních biologicky aktivních látek (ukázka této separace je znázorněna v příloze 15), jejichž píky budou dále využity pro porovnání účinnosti extrakce na základě tzv. otisku prstu. Pro tento účel bylo testováno několik gradientových programů. Výsledná optimalizace separace je znázorněna na obrázku č. 7. Jak je z obrázku patrné, kofein je dobře separovaný od kyseliny chlorgenové a došlo i ke zvýšení rozlišení od píků eluovaných za kofeinem. Na základě shody retenčních časů se standardy byla dále identifikována kyselina kryptochlorgenová a neochlorgenová. Retenční čas kyseliny neochlorgenové byl 7,26 minut a kyselina kryptochlorgenová eluovala ve směsi

s kyselinou chlorgenovou v retenčním čase 9,69 minut. Všechny tři isomery byly kvantifikovány společně na standard kyseliny chlorgenové.



Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 6. min. – 33% methanolu, 9. min. – 33% methanolu, 13. min. – 55% methanolu; 18. min. – 90% methanolu, 20. min. – 10% methanolu; 1 - kyselina neochlorgenová, 2 – kyselina chlorgenová ve směsi s kyselinou kryptochlorgenovou, 3 – kofein.

Obrázek č. 7 Výsledný chromatogram optimalizace při 273 a 325 nm

3.6.2 Kalibrační řada a validace metody

Kalibrační řada kofeinu byla proměřena v rozsahu 5–100 mg/l, zatímco kalibrační řada pro kyseliny chlorgenové byla změřena v rozsahu 0,5–10 mg/l. Celkem byla kalibrace provedena na osmi koncentračních hladinách a každý roztok byl proměřen třikrát. Obě lineární regrese byly podrobeny diagnostice v programu QC Expert, pomocí kterého byly odstraněny vlivné body, a byla vyhodnocena významnost obou členů lineární regrese. Zatímco absolutní člen lineární závislosti u kofeinu byl hodnocen jako nevýznamný ($p > 0,05$) a přímka tedy prochází nulou, v případě chlorgenových kyselin byl úsek hodnocen jako významný ($p < 0,05$). Linearita obou kalibračních závislostí byla pro měřený koncentrační rozsah vyhovující. U kalibrační závislosti kofeinu byl koeficient determinance $R^2 = 0,9994$ a u kalibrační závislosti chlorgenových kyselin byl koeficient determinance $R^2 = 0,9997$.

Dále byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti jako trojnásobek či desetinásobek odstupu signálu od šumu. Mez detekce u kofeinu činila 0,022 mg/l a mez stanovitelnosti 0,077 mg/l. U chlorgenové kyseliny byla mez detekce 0,025 mg/l a mez stanovitelnosti 0,073 mg/l.

Dalším stanoveným validačním parametrem byla přesnost metody, která vyjadřuje blízkost shody mezi výsledky nezávislých testů a hodnotí se pomocí směrodatné odchylky (RSD). Správnost metody je míra shody mezi referenční hodnotou a hodnotami výsledků nezávislých

testů a hodnotí se jako výtěžnost. Pro zjištění správnosti metody bylo provedeno 8 měření o třech různých koncentracích. Pro kyseliny chlorgenové byly zvoleny koncentrace 1; 5,5 a 9 mg/l. Pro kofein byly zvoleny koncentrace 10; 56 a 91 mg/l. Hodnotící kritéria byla převzata z *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* [94]. Získané validační hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky validace správnosti metody pro stanovení kofeinu a chlorgenových kyselin

| Správnost (výtěžnost) | | | |
|-----------------------|--------------------|---------------|-----------------------------|
| Látka | Koncentrace [mg/l] | Správnost [%] | Kritérium přijatelnosti [%] |
| Kofein | 10 | 103,20 | 80–110 |
| | 56 | 98,64 | |
| | 91 | 101,67 | |
| Chlorgenové kyseliny | 1 | 96,74 | 80–110 |
| | 5,5 | 100,36 | |
| | 9 | 104,97 | |

Při zjištění opakovatelnosti měření byl proměřen vzorek připravený pomocí horké destilované vody. Vzorek byl připraven 3 × ve dvou nálevkách. Celkem byl vzorek 6 × proměřen a spočítána relativní směrodatná odchylka (RSD). U kofeinu se RSD pohybovala maximálně do 4 %, což je v souladu s validačními materiály, kde je povolena chyba do 5,3 % [94]. U kyselin chlorgenových byla koncentrace o dva řády menší, a proto i RSD byla větší a pohybovala kolem 11 %, což je na hranici hodnoty udávané validačními materiály [94], kde na této koncentrační hladině je povolena chyba měření právě 11 %. Větší chyba měření může být způsobena nízkým obsahem chlorgenových kyselin, chybou v integraci píku nebo z důvodu možné koeluce s další látkou.

3.6.3 Vliv teploty vody na obsah látek v nápoji *cascara*

Při analýze byl testován vliv teploty použité na přípravu nápoje *cascara* na obsah kofeinu a chlorgenových kyselin. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulce 6. Vliv teploty vody na obsah kofeinu je statisticky významný ($p < 0,001$). Vzorek připravený zalitím horkou vodou obsahoval méně kofeinu ($114,14 \pm 1,99$ mg/l) ve srovnání se vzorky připravenými za studena ($122,57$ – $135,72$ mg/l). S klesající teplotou vody pro přípravu nápoje *cascara* (mezi vzorky S20 – S5) klesala koncentrace kofeinu. Pokud si budeme chtít doma připravit nápoj *cascara*, je lepší

použit vodu o teplotě 20 °C. Je tedy možné nechat louhovat náš vzorek v pokojové teplotě po dobu 24 hodin a docílíme tím zvýšení obsahu kofeinu ve výsledném nápoji.

Efekt teploty vody na obsah chlorgenových kyselin je statisticky nevýznamný ($p > 0,05$). Nejvyšší obsah chlorgenových kyselin obsahoval extrakt získaný při teplotě 5 °C ($13,22 \pm 1,45$ mg/l), naopak nejmenší hodnota byla získána při teplotě extrakce 15 °C ($8,19 \pm 0,30$ mg/l).

Tabulka 6: Stanovení obsahu kofeinu a chlorgenových kyselin

| Koncentrace [mg/l] | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Kofein | $114,14 \pm 1,99^D$ | $135,72 \pm 1,98^A$ | $132,39 \pm 2,23^{AB}$ | $128,13 \pm 4,40^{BC}$ | $122,57 \pm 1,74^C$ |
| Chlorgenové kyseliny | $8,37 \pm 0,93^{AB}$ | $10,44 \pm 1,10^{AB}$ | $8,19 \pm 0,30^B$ | $12,02 \pm 1,31^{AB}$ | $13,22 \pm 1,45^A$ |

Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (N = 6), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku ($p < 0,05$). CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování.

Chromatogramy jednotlivých nálevů byly porovnány v oblasti „otisku prstu“. V příloze 16–20 jsou uvedeny chromatogramy jednotlivých nálevů a šipkou je na nich označen pík, minoritní biologicky aktivní látky, jehož koncentrace se s měnící teplotou vody použité na přípravu nápoje měnila. Chromatogramy se liší koncentrací kofeinu (s klesající teplotou vody narůstala plocha píku kofeinu a chlorgenových kyselin). Zároveň se spektra lišila koncentrací jednoho píku označeným na chromatogramu. Při přípravě nápoje *cascara* pomocí studené vody o teplotě 10 a 5 °C jeho koncentrace výrazně vzrostla v porovnání s chromatogramy získaných analýzou nápoje *cascara* při použití teplé vody a vody o teplotě 20 a 15 °C. Pro identifikaci této látky by bylo potřeba další analýzy.

Heeger a kol. (2017) analyzovali kávové třešně pomocí HPLC – DAD. Extrakci kávových třešní provedli v horké vodě. V nápoji *cascara* identifikovali mnoho látek, například chlorgenové kyseliny, kofein, rutin, kyselinu gallovou, kyseliny protokatechové, katechin i epikatechin. Obsah kofeinu stanovili na 226 mg kofeinu/l nápoje. Obsah chlorgenových kyselin stanovených v této studii se pohyboval mezi hodnotami 69,6–85,0 mg/l nápoje. Důvodem rozdílných výsledků může být použití jemné namletých kávových třešní a trojnásobná extrakce horkou vodou [95].

3.7 Obsah minerálních látek v nápoji *cascara*

Pomocí ICP – MS byl změřen obsah minerálních látek v nápoji *cascara*. Výsledky jsou vyjádřeny jako mg prvku na kg vzorku. Minerální látky jsou důležité pro správnou funkci

našeho těla, pro správné vedení nervových vzruchů i pro správné okysličování buněk. Je důležité dbát na denní příjem určitých prvků a jiným prvkům je lepší se vyhýbat.

3.7.1 Makroprvky

Mezi makroprvky řadíme sodík, draslík, vápník a hořčík. Tyto prvky se vyskytují v našem těle ve velkém množství. Teplota vody pro přípravu nápoje *cascara* měla statisticky významný rozdíl jen na obsah sodíku ($p < 0,05$), draslíku ($p < 0,001$) a hořčíku ($p < 0,01$). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. V nápoji připraveném pomocí studené vody o teplotě 10 °C se nachází nejvíce sodíku $115,97 \pm 10,87$ mg/kg vzorku a hořčíku $305,50 \pm 29,98$ mg/kg vzorku. Nejvíce draslíku ($18\,205,33$ – $18\,655,33$ mg/kg) získáme přípravou pomocí studené vody. Teplota vody neměla vliv ($p > 0,05$) na obsah vápníku v nápoji *cascara*. Během přípravy se vylouhovalo nejvíce $387,27 \pm 1,43$ mg/kg vzorku při použití vody o teplotě 10 °C. Tyto prvky se v nápoji nachází v malém množství. Nápoj *cascara* nelze považovat za zdroj makroprvků. Denní doporučený příjem makroprvků je znázorněn v příloze 21.

Tabulka 7: Obsah makroprvků v nápoji *cascara*

| c | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Na | $89,70 \pm 4,57^C$ | $91,60 \pm 8,70^C$ | $95,23 \pm 0,86^B$ | $115,97 \pm 10,87^A$ | $98,83 \pm 5,69^B$ |
| Mg | $184,67 \pm 16,29^C$ | $255,77 \pm 24,03^B$ | $263,47 \pm 10,10^B$ | $305,50 \pm 29,98^A$ | $252,47 \pm 11,37^B$ |
| K | $15604,67 \pm 387,46^B$ | $18655,33 \pm 321,73^A$ | $18879,67 \pm 192,76^A$ | $18361,67 \pm 229,86^A$ | $18205,33 \pm 182,08^A$ |
| Ca | $276,93 \pm 38,39^C$ | $371,63 \pm 72,66^A$ | $371,10 \pm 20,67^A$ | $387,27 \pm 1,43^A$ | $347,73 \pm 13,07^B$ |

Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (N = 3), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku ($p < 0,05$). CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování; c, koncentrace [mg/kg]; písmeno značí zkratky prvků Na – sodík, Mg – hořčík, K – draslík a Ca – vápník.

3.7.2 Mikroprvky

Tyto prvky se vyskytují v organismu ve stopovém množství, ale přesto jsou pro funkci našeho těla důležité. Vliv teploty vody použité na přípravu nápoje *cascara* má statisticky významný vliv na obsah mědi ($p < 0,001$), selenu ($p < 0,05$) a zinku ($p < 0,001$). Teplota vody použitá na přípravu výluhu nemá vliv na obsah chromu, manganu, železa, kobaltu a molybdenu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 8. Efekt teploty vody použité na přípravu nápoje je statisticky nevýznamný ($p > 0,05$). Nejvyšší obsah molybdenu ($0,046 \pm 0,013$ mg/kg) a selenu ($0,010 \pm 0,003$ mg/kg) byl stanoven ve vzorku připraveném pomocí horké vody. Nejvíce chromu ($0,016 \pm 0,005$ mg/kg) a kobaltu ($0,028 \pm 0,017$ mg/kg) obsahoval nálev připravený pomocí vody

o teplotě 20 °C. Výluh připravený pomocí vody o teplotě 15 °C obsahoval nejvyšší hladinu železa ($5,110 \pm 0,503$ mg/kg). Nejvyšší hladina manganu ($4,010 \pm 0,370$ mg/kg) byla nalezena u vzorku připraveného pomocí vody o teplotě 10°C. Nálev připravený pomocí studené vody 5 °C obsahoval nejvíce mědi ($8,117 \pm 0,070$ mg/kg) a zinku ($7,153 \pm 0,330$ mg/kg). V příloze 21 jsou uvedeny doporučené denní limity makro- i mikroprvků.

Nápoj *cascara* připravený z 9 gramů (300 ml vody) je vhodný jako jeden ze zdrojů příjmu kobaltu v potravě. V jednom nálevu se nachází 10,08 % denního příjmu kobaltu. Vypitím 300 ml tohoto nápoje bychom získali 7,29 % z denního příjmu mědi. Obsah ostatních minerálů v nápoji *cascara* byl menší než 1 % denního příjmu daných minerálů.

Tabulka 8: Obsah mikroprvků v nápoji *cascara*

| c | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Cr | $0,008 \pm 0,002^A$ | $0,016 \pm 0,005^A$ | $0,013 \pm 0,008^A$ | $0,010 \pm 0,002^A$ | $0,008 \pm 0,001^A$ |
| Co | $0,025 \pm 0,008^A$ | $0,028 \pm 0,017^A$ | $0,016 \pm 0,001^B$ | $0,015 \pm 0,001^B$ | $0,013 \pm 0,000^C$ |
| Mn | $3,233 \pm 0,279^B$ | $3,843 \pm 0,186^A$ | $3,907 \pm 0,157^A$ | $4,010 \pm 0,370^A$ | $3,967 \pm 0,205^A$ |
| Cu | $3,407 \pm 0,111^D$ | $4,363 \pm 0,278^C$ | $6,540 \pm 0,201^B$ | $6,587 \pm 0,221^B$ | $8,117 \pm 0,070^A$ |
| Mo | $0,046 \pm 0,013^A$ | $0,037 \pm 0,007^B$ | $0,037 \pm 0,004^B$ | $0,036 \pm 0,001^B$ | $0,038 \pm 0,003^B$ |
| Se | $0,010 \pm 0,003^A$ | $0,005 \pm 0,000^B$ | $0,005 \pm 0,001^B$ | $0,006 \pm 0,001^B$ | $0,002 \pm 0,000^C$ |
| Zn | $5,850 \pm 0,778^B$ | $2,907 \pm 0,613^D$ | $3,830 \pm 0,054^C$ | $3,667 \pm 0,668^C$ | $7,153 \pm 0,330^A$ |
| Fe | $3,927 \pm 0,450^C$ | $4,547 \pm 0,098^B$ | $5,110 \pm 0,503^A$ | $4,780 \pm 0,777^B$ | $4,813 \pm 0,198^B$ |

Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (N = 3), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku ($p < 0,05$). CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování; c značí koncentraci prvku [mg/kg]; písmeno značí zkratky prvků Cr – chrom, Co – kobalt, Mn – mangan, Cu – měď, Mo – molybden, Se – selen, Zn – zinek, Fe – železo.

3.7.3 Toxické prvky

Toxické prvky naopak škodí našemu tělu a mohou vyvolat otravu osob i zvířat. Maximální obsah toxických prvků je uveden v příloze 22. Teplota vody použitá na přípravu nápoje má statisticky významný vliv na obsah těchto prvků v nápoji *cascara*: olovo ($p < 0,05$), cín ($p < 0,05$), hliník ($p < 0,001$) a nikl ($p < 0,01$). Teplota vody nemá vliv na obsah kadmia ($p > 0,05$) a arsenu ($p > 0,05$). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9. Při přípravě pomocí studené vody byly nalezeny nejvyšší hladiny toxických prvků. Při použití vody o teplotě 20 °C byl zjištěn nejvyšší obsah cínu ($0,041 \pm 0,003$), kadmia ($0,008 \pm 0,003$) a olova ($0,307 \pm 0,229$). Nejvyšší obsah hliníku ($6,400 \pm 0,216$) byl stanoven při přípravě pomocí vody o teplotě 15 a

5 °C. Při použití vody o teplotě 10 °C byl stanoven ve výluhu nejvyšší obsah arsenu ($0,007 \pm 0,001$). Při přípravě nápoje *cascara* pomocí vody o teplotě 5 °C byl nalezen nejvyšší obsah niklu ($0,375 \pm 0,007$).

Tabulka 9: Obsah toxických prvků v nápoji *cascara*

| c | CT | S20 | S15 | S10 | S5 |
|----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| As | $0,007 \pm 0,001^A$ | $0,007 \pm 0,001^A$ | $0,005 \pm 0,001^B$ | $0,007 \pm 0,001^A$ | $0,005 \pm 0,000^B$ |
| Sn | $0,016 \pm 0,002^C$ | $0,041 \pm 0,003^A$ | $0,029 \pm 0,004^B$ | $0,034 \pm 0,010^B$ | $0,016 \pm 0,002^C$ |
| Al | $3,580 \pm 0,086^B$ | $5,900 \pm 0,408^A$ | $6,400 \pm 0,216^A$ | $5,967 \pm 0,613^A$ | $6,400 \pm 0,082^A$ |
| Cd | $0,007 \pm 0,002^A$ | $0,008 \pm 0,003^A$ | $0,002 \pm 0,000^C$ | $0,004 \pm 0,003^B$ | $0,005 \pm 0,001^B$ |
| Ni | $0,261 \pm 0,064^B$ | $0,267 \pm 0,040^B$ | $0,217 \pm 0,006^B$ | $0,200 \pm 0,021^B$ | $0,375 \pm 0,007^A$ |
| Pb | $0,147 \pm 0,049^A$ | $0,307 \pm 0,229^A$ | $0,066 \pm 0,012^C$ | $0,091 \pm 0,020^B$ | $0,088 \pm 0,006^B$ |

Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (N = 3), různá písmena označující statisticky významný rozdíl v rámci řádku ($p < 0,05$). CT, připravený za tepla (8 min); S, připravené za studena (24 h), číslo značí teplotu (°C) louhování; c značí koncentraci prvku [mg/kg]; písmeno značí zkratky prvků: As – arsen, Al – hliník, Cd – kadmium, Ni – nikl, Pb – olovo.

Vypitím nápoje *cascara* připraveného z 9 g (300 ml) můžeme do těla dostat až 31,5 % denního limitu arsenu, 5,76 % týdenního limitu hliníku, 0,369 % denního limitu cínu a 1,38 % z denního limitu olova. Celkově jsou hodnoty velice malé, museli bychom tohoto nápoje vypít několik litrů, aby nám to uškodilo. Tyto hodnoty by ale mohly znamenat potíže pro lidi s malou hmotností.

Iriondo-DeHond a kol. (2020) analyzovali kávové třešně sušené na slunci po dobu 21 dní. V této studii stanovili obsah draslíku (2284 mg/ 100 g), hořčíku (20,84 mg/100 g), sodíku (266,58 mg/100 g) a vápníku (54,78 mg/100 g). V sušené třešni našli větší obsah makroprvků, než bylo stanoveno v této diplomové práci. Znamená to, že do nápoje se extrahuje menší množství minerálů než se vyskytuje v kávové třešni. Iriondo-DeHond označili kávovou třešň jako zdroj draslíku a hořčíku [35].

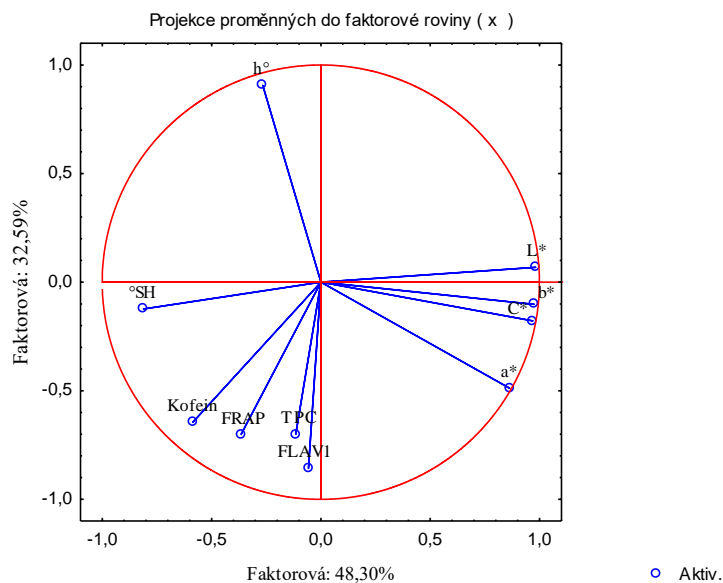
Iriondo-DeHond a kol. (2020) analyzovali kávové třešně a stanovili obsah železa (4,3–15 mg/100 mg), vápníku (54,8–554 mg/100 mg), sodíku (100–266,6 mg/100 g) a hořčíku (20,8–420 mg/100 g). Tato studie byla provedena jako rešerše. Kávové třešně označili jako zdroj sodíku, vápníku a hořčíku [6]. Z této studie vyplývá, že v kávové třešni se vyskytuje 2× více železa než v nápoji připraveném v této diplomové práci. Obsah ostatních prvků (vápník, sodík, hořčík) stanovený v této diplomové práci se vešel do intervalu obsahu prvků v dané studii. Vyšší obsah minerálů v nápoji *cascara* může být ovlivněn zpracováním a druhem kávových třešní, teplotou vody použité na přípravu a postupem přípravy nápoje.

3.8 Analýza hlavních komponent

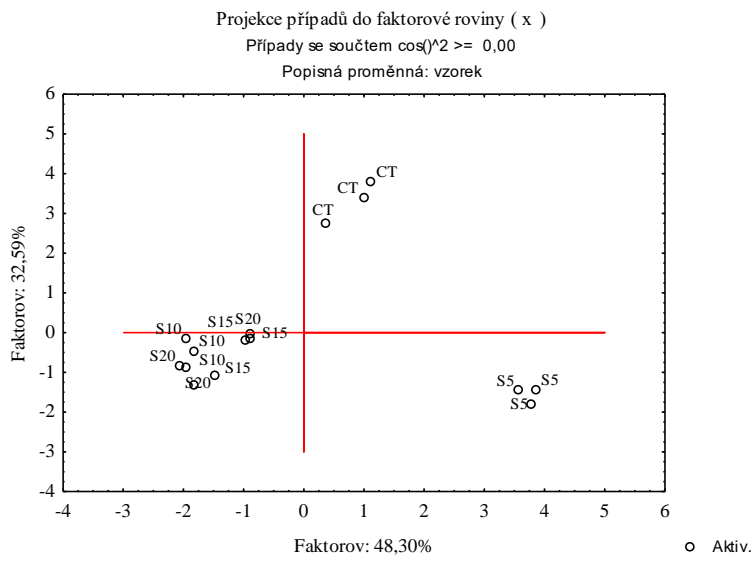
Před vlastní analýzou byla data standardizována pomocí softwaru STATISTICA 14 (StatSoft ČR s. r. o.). Byla provedena vícerozměrná analýza a počet proměnných byl zredukován na dvě. Dvě hlavní komponenty byly dostačující pro popis celkové variability mezi vzorky. Celková variabilita je znázorněna pomocí grafu uvedeného v příloze 23. Variabilita vzorku je vysvětlena z 89,9 %.

Mezi faktory, které korelují s osou x (Graf 1), patří barevnost (parametry: L^* , a^* , b^* a C^*) a kyselost nápojů *cascara* ($^{\circ}\text{SH}$). Mezi faktory, které korelují s osou y, patří: h^* , obsah flavonoidů, celkový obsah fenolických látek, FRAP a obsah kofeinu. Projekce případů do faktorové roviny (x) ukazuje rozdělení vzorků do tří hlavních skupin (Graf 2). Největší rozdíl je mezi skupinou nápojů připravených pomocí teplé vody a pomocí vody o teplotě 5 °C. Naopak mezi skupinami S10, S15 a S20 není významný rozdíl mezi obsahem látek.

Graf 1: Projekce proměnných do faktorové roviny



Graf 2: Projekce případů do faktorové roviny



4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit nálevy z kávových třešní (*cascara*) za studena a charakterizovat chemické i fyzikální vlastnosti nápojů.

Nejprve byly připraveny nálevy kávových třešní v destilované vodě při různých teplotách (5, 10, 15 a 20 °C). Jako kontrolní vzorek byl připraven nálev kávových třešní zalitím horkou vodou. U všech nálevů byla změřena barevnost, kyselost, obsah cukrů a antioxidační aktivita. Dále byla provedena kvantifikace kofeinu a chlorgenových kyselin a byla provedena minerální analýza. Byly zjištěny výrazné rozdíly mezi přípravou pomocí teplé vody a pomocí studené vody. Nálevy připravené pomocí studené vody byly barevnější, obsahovaly více kofeinu, měli větší antioxidační aktivitu zjištěnou pomocí metod DPPH, ABTS i FRAP. Celkový obsah fenolických látek a obsah flavonoidů stanovených metodou v prostředí octanu sodného byl vyšší u nápoje *cascara* připraveného pomocí studené vody. Pomocí HPLC – DAD byl stanoven obsah kofeinu a chlorgenových kyselin. V nápoji nebyl zjištěn obsah anthokyanů. Nálevy kávových třešní obsahovaly pouze malé množství makro- i mikroprvků. Také byly nalezeny stopové koncentrace toxických prvků.

Pomocí studené vody si připravíme nápoj, který je kyselejší, sladší, červenější, žlutější i světlejší. Má vyšší obsah antioxidantů, zjištěných metodou DPPH, ABTS, vyšší obsah kofeinu a vyšší hladiny všech prvků. Nápoj připravený pomocí vody o teplotě 20 °C byl nejkyslejší, nejsladší, měl nejvyšší hladinu kofeinu, nejvyšší obsah chromu, kobaltu, cínu, kadmia i olova. Pro přípravu nápoje s vysokým obsahem antioxidantů (zjištěných metodou FRAP, DPPH) byla zvolena teplota 10 °C. Tento nápoj měl i nejvyšší hladiny hořčíku, sodíku, draslíku, manganu a arsenu. Nápoj připravený pomocí vody o teplotě 5 °C byl nejčervenější, nejsvětlejší a nejžlutější. Obsahoval i nejvíce chlorgenových kyseliny, mědi, zinku a niklu. Zároveň byl tento nápoj nejméně kyselý a byla zde nalezena druhá nejvyšší hladina cukrů. Pro děti a těhotné ženy by bylo vhodnější konzumovat nápoj *cascara* připravený pomocí teplé vody, protože má menší obsah kofeinu i toxických prvků.

Použitá literatura

- [1] Augustín J.; U kávy o kávě a kávovinách; Přeložila Kašpárková Koišová K. a Elbel O.; 2016; Brno; Jota. ISBN 978–80–7462–850–4.
- [2] Lestari W., Hasballah K., Listiawan M. Y., Sofia S.; Identification of antioxidant components of gayo arabica coffee cascara using the GC-MS method; IOP Conference Series: Earth and Environmental Science; 2022 Jan; volume 956; 012011; doi: 10.1088/1755-1315/956/1/012011. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/956/1/012011>.
- [3] Klingel T., Kremer J. I., Gottstein V., Rajcic de Rezende T., Schwarz S., Lachenmeier D. W.; A Review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the European Union; Foods; 2020 May; volume 9 (5); 665; doi: 10.3390/foods9050665. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32455549/>.
- [4] Bastian F., Hutabarat O. S., Dirpan A., Nainu F., Harapan H., Emran T. B., Simal-Gandara J.; From plantation to cup: Changes in bioactive compounds during coffee processing; Foods; 2021 Nov; volume 10 (11); 2827; doi: 10.3390/foods10112827. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8620865/>.
- [5] Zhang J., Sun X., Liu P., Zhang T., Jelderks J. A., Corke H.; Preliminary characterization of phytochemicals and polysaccharides in diverse coffee cascara samples: Identification, quantification and discovery of novel compounds; Foods; 2022 June; volume 11(12); 1710; doi: 10.3390/foods11121710. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35741907/>
- [6] Iriondo-DeHond A., Iriondo-DeHond M., Del Castillo M. D.; Applications of compounds from coffee processing by-products; Biomolecules; 2020 Aug; volume 10 (9); 1219; doi: 10.3390/biom10091219. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825719/>
- [7] Hoseini M., Cocco S., Casucci C., Cardelli V., Corti G.; Coffee by-products derived resources: a review; Biomass and Bioenergy; 2021 May; volume 148; 106009; doi: 10.1016/j.biombioe.2021.106009; ISSN 0961-9534. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953421000465>
- [8] Akram M., Asif M., Uzair M., Naveed A., Madni M. A., Ali Shah Dr. S., Hasan Z., Khan A.; Amino acids: a review article; Journal of Medicinal Plants Research; 2011 May; volume 5(17); 3997-4000; doi: 10.5897/JMPR.9000061. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/260210809_Amino_acids_A_review_article

- [9] No Title The 20 amino acids and their functions. Dostupné z: <https://www.lifepersona.com/the-20-amino-acids-and-their-functions>.
- [10] Al-Yousef H. M., Amina M.; Essential oil of coffee arabica L. Husks: a brilliant source of antimicrobial and antioxidant agents; Biomedical Research; 2018 Feb; volume 29 (1); doi: 10.4066/biomedicalresearch.29-17-867. Dostupné z: <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-17-867>.
- [11] Fernandes A. S., Mello F. V. C., Thode Filho S., Carpes R. M., Honorio J. G., Marques M. R. C., Felzenszwalb I., Ferraz E.R.A.; Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health, Ecotoxicol; Ecotoxicology and environmental safety; 2017 July; volume 141; 30-36; doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.011. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.011>.
- [12] Low J.H., Rahman W. A. W. A., Jamaluddin J.; Structural elucidation of tannins of spent coffee grounds by CP-MAS ¹³C NMR and MALDI-TOF MS; Industrial Crops and Products; 2015 July; volume 69; 456-461; doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.001. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.001>.
- [13] Mazzafera P.; Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding; Scientia Agricola; 2002 Dec; volume 59 (4); doi: 10.1590/S0103-90162002000400030. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000400030>.
- [14] Basheer R., Strecker R. E., Thakkar M. M., McCarley R. W.; Adenosine and sleep–wake regulation; Progress in Neurobiology; 2008 Aug; volume 73 (6); 379-396; doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.06.004. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030100820400125X>.
- [15] Trevitt J., Kawa K., Jalali A., Larsen C.; Differential effects of adenosine antagonists in two models of parkinsonian tremor; Pharmacol Biochem Behav.; 2009 Nov; volume 94 (1); 24-29; doi: 10.1016/j.pbb.2009.07.001. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.001>.
- [16] Arya S. S., Venkatram R., More P. R., Vijayan P.; The wastes of coffee bean processing for utilization in food: a review.; Journal of Food Science and Technology; 2022 Feb; volume 59 (2); 429-444; doi: 10.1007/s13197-021-05032-5. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35185168/>.

- [17] Geromel C., Ferreira L. P., Davrieux F., Guyot B., Ribeyre F., Brígida dos Santos Scholz M., Protasio Pereira L. F., Vaast P., Pot D, Leroy T., Filho A. A., Esteves Vieira L. G., Mazzafera P., Marraccini P.; Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits; *Plant Physiol Biochem.*; 2008 May-June; volume 46 (5-6); 569-579; doi: 10.1016/j.plaphy.2008.02.006. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18420417/>.
- [18] Geromel C., Ferreira L. P., Guerreiro S. M., Cavalari A. A., Pot D., Pereira L. F., Leroy T., Vieira L. G., Mazzafera P., Marraccini P.; Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development; *Journal of Experimental Botany*; 2006 Sept; volume 57 (12); 3243-3258; doi: 10.1093/jxb/erl084. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16926239/>.
- [19] Lestari W., Hasballah K., Listiawan M. Y., Sofia S.; Coffee by-products as the source of antioxidants: a systematic review; *F1000Research*; 2022 Feb; volume 11; 220; doi: 10.12688/f1000research.107811.1. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35646331/>.
- [20] Bobková A., Poláková K., Demianová A., Belej L., Bobko M., Jurčaga L., Gálik B., Novotná I., Iriondo-DeHond A., Castillo M. D. D.; Comparative analysis of selected chemical parameters of *Coffea arabica*, from cascara to silverskin; *Foods* 2022; 2022 Apr; volume 11 (8); 1082; doi: 10.3390/foods11081082. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/8/1082>.
- [21] Turck D., Bohn T., Castenmiller J., De Henauw S., Hirsch-Ernst K. I., Maciuk A., Mangelsdorf I., McArdle H. J., Naska A., Pelaez C., Pentieva K., Siani A., Thies F., Tsabouri S., Vinceti M., Cubbada F., Frenzel T., Heinonen M., Marchelli R., Neuhäuser-Berthold M., Poulsen M., Prieto Maradona M., Schlatter J., van Loveren H., Ververis E., Knutsen H. K.; Safety of dried coffee husk (cascara) from *Coffea arabica* L. as a novel food pursuant to regulation (EU): EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA); 2022 Feb; volume 20 (2); doi: 10.2903/j.efsa.2022.7085. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/7085>.
- [22] European Commission; Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A; 2005 Jan. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:025:0003:0005:EN:PDF>.

- [23] Ferraz M. B. M., Farah A., Iamanaka B. T., Perrone D., Copetti M. V., Marques V. X., Vitali A. A., Taniwaki M. H.; Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting; *Food Control*; 2010 June; volume 21; 872-877; doi: 10.1016/j.foodcont.2009.12.001. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/222929944_Kinetics_of_ochratoxin_A_destruction_during_coffee_roasting.
- [24] Napolitano A., Fogliano V., Tafuri A., Ritieni A.; Natural occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2007 Dec; volume 55 (25); 10499-10504; doi: 10.1021/jf071959+. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18020409/>.
- [25] Pua A., Choo W. X. D., Goh R. M. V., Liu S. Q., Cornuz M., Ee K. H., Sun J., Lassabliere B., Yu B.; A systematic study of key odourants, non-volatile compounds, and antioxidant capacity of cascara (dried *Coffea arabica* pulp); *LWT - Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft-Technol.)*; 2021 Mar; volume 138, 110630; doi: 10.1016/j.lwt.2020.110630; ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110630>.
- [26] Arpi N., Muzaifa M., Sulaiman M. I., Andini R., Kesuma S. I., Published under licence by IOP Publishing Ltd; IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 7th International Conference on Sustainable Agriculture; Chemical characteristics of cascara, coffee cherry tea, made of various coffee pulp treatments; *Food and Energy*; 2019 Oct; volume 709; 012030; doi: 10.1088/1755-1315/709/1/012030. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/350367173_Chemical_Characteristics_of_Cascara_Coffee_Cherry_Tea_Made_of_Various_Coffee_Pulp_Treatments.
- [27] Nemzer B., Abshiru N., Al-Taher F.; Identification of phytochemical compounds in *Coffea arabica* whole coffee cherries and their extracts by LC-MS/MS; *Journal Agric Food Chem*; 2021 Mar; volume 69 (11); 3430-3438; doi: 10.1021/acs.jafc.0c05937. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33689321/>.
- [28] Baeza, G., Sarriá B., Bravo L., Mateos R.; Exhaustive Qualitative LC-DAD-MS(n) Analysis of Arabica green coffee beans: cinnamoyl-glycosides and cinnamoylshikimic acids as new polyphenols in green coffee; *J. Agric Food Chem.*; 2016 Dec; volume 64 (51); 9663-9674; doi: 10.1021/acs.jafc.6b04022. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27981846/>.

- [29] Hoseini M., Cocco S., Casucci C., Cardelli V., Corti G.; Coffee by-products derived resources: a review; *Biomass and Bioenergy*; 2021; volume 148; doi: 10.1016/j.biombioe.2021.106009; ISSN 0961-9534. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953421000465>.
- [30] Fuller, M., Rao, N. Z.; The effect of time, roasting temperature, and grind size on caffeine and chlorogenic acid concentrations in cold brew coffee; *Sci. Rep.*; 2017 Sept; 7(1); 17979; doi: 10.1038/s41598-017-18247-4. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29269877/>.
- [31] Liu Y., Luo L., Liao C., Chen L., Wang J., Zeng L.; Effects of brewing conditions on the phytochemical composition, sensory qualities and antioxidant activity of green tea infusion: A study using response surface methodology; *Food Chemistry*; 2018 Dec; 269; 24-34; doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.130. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30100430/>.
- [32] Zeckel S., Susanto P. C., Erfiani N. M. D.; Market potential of cascara tea from catur village Kintamani Bali; In Paper presented at the international conference on fundamental and applied research (I-CFAR) (Bali, Indonesia); 2019. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/359188272_MARKET_POTENTIAL_OF_CASCA_RA_TEA_FROM_CATUR_VILLAGE_KINTAMANI_BALI.
- [33] Nemzer B., Kalita D., Abshiru N.; Quantification of major bioactive constituents, antioxidant activity, and enzyme inhibitory effects of whole coffee cherries (*Coffea arabica*) and their extracts; *Molecules* 2021; 2021 July; volume 26(14); 4306; doi: 10.3390/molecules26144306. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34299581/>.
- [34] Barrios-Rodriguez Y., Collazos-Escobar G. A., Gultiérrez-Guzmán N.; AFTR-FTIR for characterizing and differentiating dried and ground choffee cherry pulp of different varieties (*Coffea arabica* L.); *Engenharia Agricola*; 2021 Mar; 70-77; doi: 10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v41n1p70-77/2021; ISSN: 1809-4430 (on-line).
Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/eagri/a/rKzKV5QYQwqfrTjc5CHFcdx/?format=pdf>
- [35] Iriundo-DeHond A., Elizondo A. S., Iriundo-DeHond M., Ríos M. B., Mufari R., Mendiola J. A., Ibañez E., Castillo M. D. D.; Assessment of healthy and harmful maillard reaction products in a novel coffee cascara beverage: melanoidins and acrylamide; *Foods*; 2020 May; volume 9(5); 620; doi: 10.3390/foods9050620. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32408584/>.

- [36] Moreno J., Cozzano S., Pérez M. A., Arcia P., Curutchet A.; Coffee pulp waste as a functional ingredient: effect on salty cookies quality; *Journal of Food and Nutrition Research*; 2019 Sept, volume 7(9), 632–638; doi: 10.12691/jfnr-7-9-2. Dostupné z: <http://pubs.sciepub.com/jfnr/7/9/2/index.html>.
- [37] Acchar W., Dultra E. J. V., Segadaes A. M.; Untreated coffee husk ashes used as flux in ceramic tiles; *Applied Clay Science*; 2013 May; volume 75–76; 141–147; doi: 10.1016/j.clay.2013.03.009. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131713000719>.
- [38] Bekalo S. A., Reinhardt H.-W.; Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard; *Materials and Structures*; 2009 Apr; volume 43; 1049–1060; doi: 10.1617/S11527-009-9565-0. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1617/s11527-009-9565-0.pdf>.
- [39] Saha B.C., Cotta M.A., Qureshi N., Nichols N. N.; Fuel ethanol production from agricultural residues: current status and future prospects; *Journal of Biotechnology*; 2010 Nov; volume 150; 12-13; doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.08.048. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165610004396?via%3Dihub>.
- [40] Somashekar K. L., Appaiah K. A. A.; Coffee cherry husk – a potential feed stock for alcohol production; *Int. J. Environ. Waste Manag.*; 2013 Jan; volume 11; 410–419, doi: 10.1504/IJEW.2013.054242. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/264816841_Coffee_cherry_husk_-_A_potential_feed_stock_for_alcohol_production.
- [41] Shankaranand V.S., Lonsane B.K.; Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus Niger* in a solid-state fermentation system; *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 1994 Mar; volume 10(2); 165–168; doi: 10.1007/BF00360879. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24420939/>.
- [42] Machado C. M. M., Oliveira B. H., Pandey A., Soccol C. R.; Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation; Sera T., Soccol C. R., Pandey A., Roussos S.; *Coffee Biotechnology and Quality*; Proc. 3rd Int. Semin. Biotechnol; Coffee Agro-Industry, Londrina, Brazil, Springer Netherlands, Dordrecht, 2000, 401–408, doi: 10.1007/978-94-017-1068-8_37; ISBN 978-94-017-1068-8 (online). Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-017-1068-8_37.

- [43] Fki I., Allouche N., Sayadi S.; The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants; *Food Chemistry*; 2005 Nov; 197-204; doi: 10.1016/j. foodchem.2004.09.014. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604007332>.
- [44] Prata E. R. B. A., Oliveira L. S.; Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins; *LWT - Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)*; 2007 Nov; volume 40(9); 1555–1560; doi: 10.1016/j.lwt.2006.10.003. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.10.003>.
- [45] Kasuya M. C., Luz J. M., Nunes M. D., Silva M. D., Carvalho D. R., Assunção L. S., Paula T. D., Moura C., Bento C. B.; Production of selenium-enriched mushrooms in coffee husks and use of this colonized residue; *Coffee in Health and Disease Prevention*; 2015 Jan; 301-309; doi: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00033-4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095175000334>.
- [46] Dume B., Berecha G., Tulu S.; Characterization of biochar produced at different temperatures and its effect on acidic nitrosol of jimma, southwest Ethiopia; *International Journal of Soil Science*; 2015 June; volume 10(2) 63–73, doi: 10.3923/ijss.2015.63.73. Dostupné z: <https://doi.org/10.3923/ijss.2015.63.73>.
- [47] Deal C., Brewer C. E., Brown R. C., Okure M. A. E., Amoding A.; Comparison of kilnderived and gasifier-derived biochars as soil amendments in the humid tropics; *Biomass and Bioenergy*; 2012 Feb; volume 37; 161–168; doi: 10.1016/j.biombioe.2011.12.017. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411006325>.
- [48] Dzung N. A., Dzung T. T., Thi V., Khanh P.; Evaluation of coffee husk compost for improving soil fertility and sustainable coffee production in rural Central Highland of Vietnam; *Resources and Environment*; 2013 Jan; volume 3; 77–82; doi: 10.5923/j. re.20130304.03. Dostupné z: <http://article.sapub.org/pdf/10.5923.j.re.20130304.03.pdf>.
- [49] Pourfarzad A., Mahdavian-Mehr H., Sedaghat N.; Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology; *LWT - Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft-Technol.)*; 2013 Mar; volume 50; 599–606; doi: 10.1016/J.LWT.2012.08.001. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812003295?via%3Dihub>.

- [50] Iriondo-DeHond A., Aparicio García N., Fernandez-Gomez B., Guisantes-Batan E., Velázquez Escobar F., Blanch G. P., San Andres M. I., Sanchez-Fortun S., del Castillo M. D.; Validation of coffee by-products as novel food ingredients; *Innovative Food Science & Emerging Technologies*; 2019 Jan; volume 51; 194–204; doi: 10.1016/j.ifset.2018.06.010. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856418300444>.
- [51] Garcia-Serna E., Martinez-Saez N., Mesias M., Morales F., Castillo M.; Use of coffee silverskin and Stevia to improve the formulation of biscuits; *Polish Journal of Food and Nutrition Science*; 2014 Jan; volume 64(4); 243–251; doi: 10.2478/pjfn-2013-0024. Dostupné z: <http://journal.pan.olsztyn.pl/Use-of-Coffee-Silverskin-and-Stevia-to-Improve-the-Formulation-of-Biscuits,98399,0,2.html>.
- [52] Ly B. C. K., Dyer E. B., Feig J. L., Chien A. L., Del Bino S.; Research techniques made simple: Cutaneous colorimetry: A Reliable technique for objective skin color measurement; *Journal of Investigative Dermatology*; 2020 Jan; volume 140(1); 3-12; doi: 10.1016/j.jid.2019.11.003; ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X19333974>.
- [53] Pék Z., Helyes L., Lugasi A.; Color changes and antioxidant content of vine and postharvest-ripened tomato fruits; *HortScience*; 2010 Mar; volume 45(3), 466-468; doi: 10.21273/HORTSCI.45.3.466. Dostupné z: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.3.466>.
- [54] PANÁK O., Měření barevnosti; studijní materiál; 2015. Dostupné z: <https://fcht.upce.cz/sites/default/files/public/luva3059/merenibarevnosti.pdf>.
- [55] Minz P., Saini Ch.; Comparison of computer vision system and colour spectrophotometer for colour measurement of mozzarella cheese; *Applied Food Research*; 2021 Nov; volume 1(2); 10020; doi: 10.1016/j.afres.2021.100020. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772502221000202>.
- [56] Sýkora V., Šustová K.; Barevná spektrofotometrie v mlékárenství; *Mlékařské listy* 154; 2016; ročník 27 (1); ISSN: 1212950X. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/154-155/veda_154_4-7.pdf.
- [57] Kohout V.; Historie a elementární základy teorie barev III; *Školská fyzika*; 2013; Brno; Fraus, s. r. o.; číslo 2. Dostupné z: <https://dspace5.zcu.cz/bitstream/11025/22108/1/Kohout.pdf>.
- [58] Pankaj B. P., Umezurike L. O., Al-Said F. A. J.; Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review; *Food and Bioprocess Technology*; 2013 Jan; volume 6(1);

36-60; doi: 10.1007/s11947-012-0867-9. Dostupné z:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-012-0867-9>.

[59] Marczenko Z., Balcerzak M.; Principles of spectrophotometry; analytical spectroscopy library [online]; Analytical Spectroscopy Library; 2000 Dec; 26-38; DOI: 10.1016/S0926-4345(00)80066-8; ISBN 9780444505248. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/bookseries/analytical-spectroscopy-library/vol/10/suppl/C>.

[60] Zhang J. Z.; Optical properties and spectroscopy of nanomaterials; Hackensack N. J.; World Scientific; 2009 July; 11-46; ISBN 978-981-283-664-9.

[61] Hansen S. H., Pedersen-Bjergaard S., Ramussen K. E.; Introduction to pharmaceutical chemical analysis - UV Spectrophotometry [online]; 2012; West Sussex; John Wiley & Sons, s. 89-98; ISBN 978-1-119-95433-0.

[62] Mäntele W., Deniz E.; UV–VIS absorption spectroscopy: LambertBeer reloaded; Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy [online]; 2017 Feb; volume 173; 965-968; doi: 10.1016/j.saa.2016.09.037; ISSN 13861425. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142516305558>.

[63] HLOUŠKOVÁ, T. *Chemické a fyzikální vlastnosti lipového sirupu* [online]; Pardubice; 2021; diplomová práce; Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.

[64] Velíšek J., Hajšlová J.; Chemie potravin I.; 2009; 3. vydání; Tábor; Osis; 158–160; 183–184 s; ISBN: 978-80-86659-15-2.

[65] Khan I. T., Nadeem M., Imran M.; Antioxidant properties of milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge; Lipids in Health and Disease; 2019 Feb; volume 18(1); doi: 10.1186/s12944-019-0969-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>.

[66] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay; Free Radical Biology and Medicine; 1999 May; volume 26 (9–10); 1231-1237; doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3; ISSN 0891-5849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

[67] Shahidi F., Zhong Y.; Measurement of antioxidant activity; Journal of Functional Foods; 2015 Oct; Volume 18 (Part B); 757-781; doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047; ISSN 1756-4646. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.

- [68] Benzie I. F. F., Strain J. J.; The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay; *Analytical Biochemistry*; 1996 July; volume 239(1); 70-76; doi: 10.1006/abio.1996.0292. Dostupné z : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924>.
- [69] Sochor J., Ryvolová M., Kryštofová O., Salaš P., Hubálek J., Adam V., Trnková L., Havel L., Beklová M., Zehnálek J., Provazník I., Kizek R.; Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages; *Molecules* [online]; 2010 Nov; volume 15(12); 8618-8640; doi: 10.3390/molecules15128618. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21116230/>.
- [70] Pękal A., Pyrzyńska K.; Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay; *Food Analytical Methods*; 2014 Oct; volume 7(9); 1776–1782; doi: 10.1007/s12161-014-9814-x. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>.
- [71] Lee J., Durst R. W., Wrolstad R. E.; Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study; *Journal of AOAC INTERNATIONAL*; 2005 Spt-Oct, volume 88(5), 1269-1278; doi: 10.1093/jaoac/88.5.1269. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16385975/>.
- [72] Fanali S., Haddad P. R., Poole C. F., Schoenmakers P., Loyd D.; *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*; 2017; Volume 1 [online]; 2nd edition; Amsterdam; 520 s; ISBN 978-0-12-805393-5. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=1gPAUzhkoqWC&printsec=frontcover&dq=Liquid+Chromatography:+Fundamentals+and+Instrumentation&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwipoInF7MjuAhWLlosKHeMWA8Q6AEwAHoECAYQAg#v=onepage&q=Liquid%20Chromatography%3A%20Fundamentals%20and%20Instrumentation&f=false>.
- [73] Cvačka J.; Vysokoúčinná kapalinová chromatografie: Instrumentace [přednáška]; Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze; 19. 10. 2020; In: [web.natur.cuni.cz](http://www.muji-web.cz) [online]. [cit. 1. 4. 2023]. Dostupné z: http://www.muji-web.cz/vyuka/HPLC/HPLC_soubory/03_HPLC%20instrumentace_2020-21.pdf.
- [74] Kizek R.; Kapalinová chromatografie s různými typy detekce pro analýzu biologicky významných látek [pdf]; Mendelova univerzita v Brně; 2013 July; [online]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-

pumucky/UP_6_Kapalinova%20chromatografie%20s%20ruzny%20typy%20detekce%20pro%20analyzu%20biologicky%20vyznamnych%20latek.pdf.

[75] Fischer J., Česla P.; Kapalinová chromatografie – Interaktivní návod [pdf]; Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice; [online]. Dostupné z:

<https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrum-analyza/kapalinova-chromatografie.pdf>.

[76] Houk, R. S., Fassel V. A., Flesch G. D., Svec H. J., Gray A. L., Taylor C. E.; Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements; Analytical Chemistry; 1980 Dec; volume 52 (14); 2283-2289; doi: 10.1021/AC50064A012. Dostupné z: <https://sci-hub.se/10.1021/ac50064a012>.

[77] Pröfrock D., Prange A.; Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends; Applied Spectroscopy; 2012 Aug; volume 66 (8); 843-868; doi: 10.1366/12-06681. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22800465/>.

[78] Mahoney P. P., Ray S. J., Hieftje, G. M.; Time-of-flight mass spectrometry for elemental analysis; Applied Spectroscopy; 1997 Jan; volume 51 (1), 16A-28A; doi: 10.1366/0003702971938759. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1366/0003702971938759>.

[79] Tanner M., Gunther D.; Short transient signals, a challenge for inductively coupled plasma mass spectrometry: a review; Analytica Chimica Acta; 2009 Feb; volume 633 (1); 19-28; doi: 10.1016/j.aca.2008.11.041. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19110111/>.

[80] Mermet J. M.; Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics; Analytica Chimica Acta; 1991 Oct; volume 250 (1); 85-94; doi: 10.1016/0003-2670(91)85064-Y. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326709185064Y>.

[81] Stewart I. I., Olesik J. W.; Steady state acid effects in ICP-MS; Journal of Analytical Atomic Spectrometry; 1998; 13 (12); 1313-1320 ; doi: 10.1039/A806040A. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1998/ja/a806040a>.

[82] Hattendorf B., Latkoczy C., Günther D.; Laser Ablation-ICPMS; Analytical Chemistry; 2003 Sept; volume 75 (15); 341A-347A; doi: 10.1021/ac031283r. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/9043641_Laser_ablation-ICPMS.

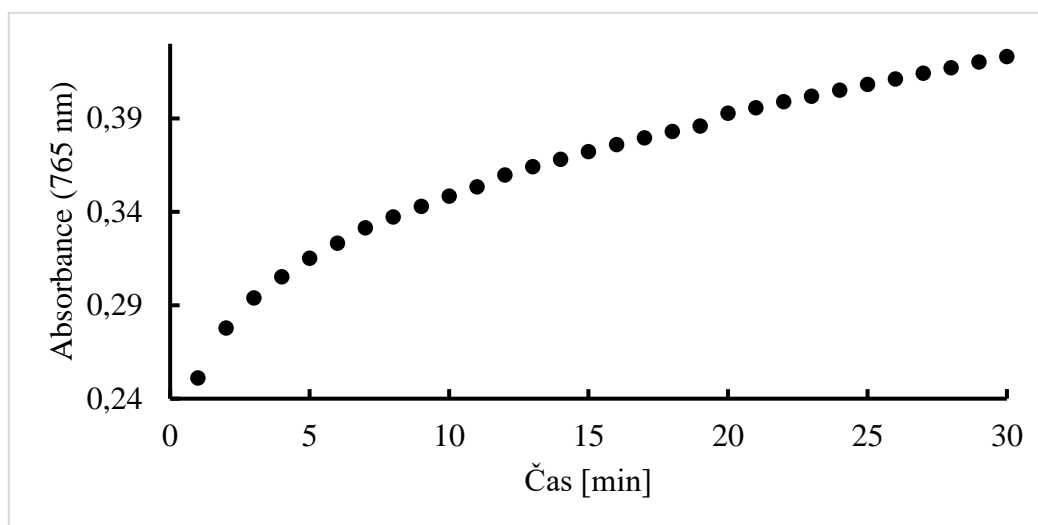
- [83] Cottingham K., ICPMS: It's elemental; analytical chemistry; 2004 Jan; volume 76 (1); 35A-38A; doi: 10.1021/ac0416923. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0416923>.
- [84] Costa Rica Hacienda Sonora Cascara. Sucafina Specialty [online]. Dostupné z: <https://www.sucafina.com/na/offerings/hacienda-sonora-cascara>.
- [85] Torres-Valenzuela L. S., Martínez K. G., Serna-Jimenez J. A., Hernández M. C., Secado de pulpa de café: Condiciones de proceso, modelación matemática y efecto sobre propiedades fisicoquímicas; Inf. Tecnológica; 2019 Mar; 30(2); 189–200; doi: 10.4067/S0718-07642019000200189. Dostupné z: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642019000200189&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- [86] Maharani S., Mustikawati I., Nailufhar L., Istiqomah S.; The effect of brewing time on pH values, polyphenols content, and antioxidant activities of coffee husk tea (cascara tea); Journal of Physics: Conference Series; 2020 Nov; volume 1869(1); 012050; doi: 10.1088/1742-6596/1869/1/012050. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1869/1/012050>.
- [87] Muhammad Y. A., Nofitasati D., Rahmawati A., Eryanti A. Y., Rosmiati M.; Effects of brewing conditions on total phenolic content, antioxidant activity and sensory properties of cascara; Food Chemistry Advances; 2023 Oct; volume 2; 100183; doi: 10.1016/j.focha.2023.100183. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772753X23000035>.
- [88] Ramirez-Coronel M. A., Marnet N., Kolli V. S., Roussos S., Guyot S., Augur C.; Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (Coffea arabica) by thiolysis-high-performance liquid chromatography; Journal of Agric Food Chem.; 2004 Mar; volume 52(5); 1344-9; doi: 10.1021/jf035208t. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14995144/>.
- [89] Neves J. V. G., Borges M. V., Silva D. M., Leite C. X. S., Santos M. R. C., Lima N. G. B., Lannas S. C. S., Silva M. V.; Total phenolic content and primary antioxidant capacity of aqueous extracts of coffee husk: chemical evaluation and beverage development; Food Science and Technology; 2019 June; volume 39(1); 348-353; doi: 10.1590/fst.36018. Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/cta/a/SFRbT7sXJ36kmbdWshrrXKv/?lang=en>.

- [90] Mesfin K., Admassu H., Gobena T., Belayneh T.; The effect of roasting on the antioxidant and antibacterial capacity of coffee cherry husk extract; 2022 May; doi: 10.21203/rs.3.rs-1696460/v1. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/PPR/PPR501352>.
- [91] Duangjai A., Suphrom N., Wungrath J., Ontawong A., Nuengchamnong N., Yosboonruang A.; Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts; Integrative Medicine Research; 2016 Dec; volume 5(4); 324-331; doi: 10.1016/j.imr.2016.09.001. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5390416/>.
- [92] Manasa V., Padmanabhan A., Anu Appaiah K. A.; Utilization of coffee pulp waste for rapid recovery of pectin and polyphenols for sustainable material recycle; Waste Management; 2021 Feb; volume 120; 762-771; doi: 10.1016/j.wasman.2020.10.045. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X20306164?via%3Dihub>.
- [93] Kováčik J., Husáková L., Graziani G., Patočka J., Vydra M., Roupheal Y.; Nickel uptake in hydroponics and elemental profile in relation to cultivation reveal variability in three *Hypericum* species; Plant Physiology and Biochemistry; 2022 Aug; volume 185; 357-367; doi: 10.1016/j.plaphy.2022.06.009. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942822002819?via%3Dihub#appsec1>.
- [94] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements; Official Methods of Analysis [online]. AOAC INTERNATIONAL; 2016 [cit. 2023-4-22]. Dostupné z: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf.
- [95] Heeger A., Kosińska-Cagnazzo A., Cantergiani E., Andlauer W.; Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of cascara beverage; Food Chemistry 221; 2017 Apr; volume 15; 969-975; doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.067. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979301/>.

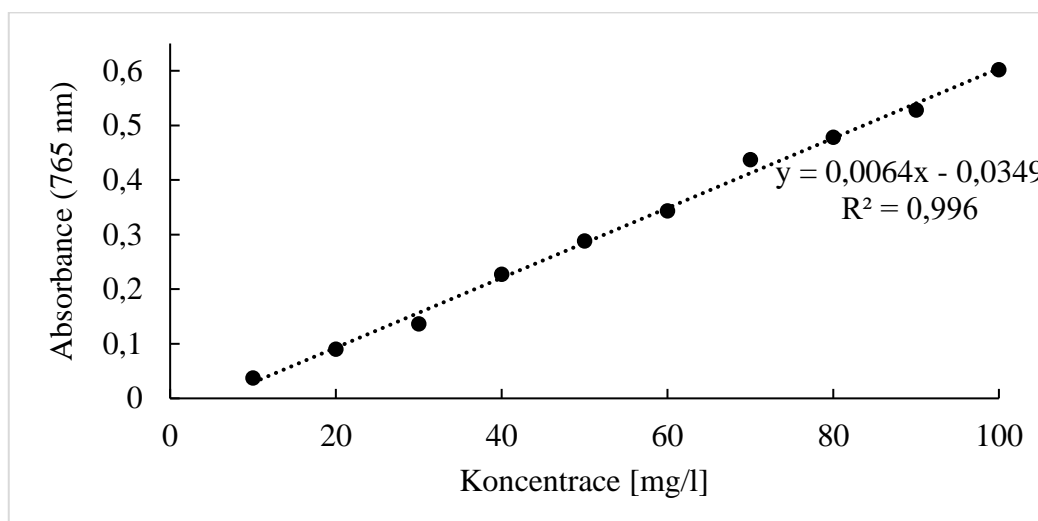
Seznam příloh

| | |
|---|----|
| Příloha 1: Optimalizace metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek | 77 |
| Příloha 2: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek..... | 77 |
| Příloha 3: Kalibrační křivka kvercetinu pro stanovení obsahu flavonoidů (Metoda 1)..... | 77 |
| Příloha 4: Kalibrační křivka katechinu pro stanovení obsahu flavonoidů (Metoda 2)..... | 78 |
| Příloha 5: Optimalizace reakčního času metody DPPH | 78 |
| Příloha 6: Kalibrační řada Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH | 78 |
| Příloha 7: Optimalizace reakčního času metody ABTS | 79 |
| Příloha 8: Kalibrační řada Troloxu pro metodu ABTS..... | 79 |
| Příloha 9: Optimalizace reakčního času pro metodu FRAP | 79 |
| Příloha 10: Kalibrační řada Troloxu pro metodu FRAP..... | 80 |
| Příloha 11: Kalibrační řada stanovení kofeinu pomocí HPLC | 80 |
| Příloha 12: Kalibrační řada stanovení chlorgenových kyselin pomocí HPLC | 80 |
| Příloha 13: Optimalizace separace pomocí kolony Ascentis Express F5 | 81 |
| Příloha 14: Chromatogram první separace na koloně YMC – Triart C18..... | 81 |
| Příloha 15: Optimalizace separace látek v oblasti „otisku prstu“ | 81 |
| Příloha 16: Chromatogram přípravy nápoje <i>cascara</i> pomocí horké vody..... | 82 |
| Příloha 17: Chromatogram přípravy nápoje <i>cascara</i> pomocí studené vody (20 °C)..... | 82 |
| Příloha 18: Chromatogram přípravy nápoje <i>cascara</i> pomocí studené vody (15 °C)..... | 82 |
| Příloha 19: Chromatogram přípravy nápoje <i>cascara</i> pomocí studené vody (10 °C)..... | 83 |
| Příloha 20: Chromatogram přípravy nápoje <i>cascara</i> pomocí studené vody (5 °C)..... | 83 |
| Příloha 21: Tabulka denní doporučených příjmů makro- a mikroprvků | 84 |
| Příloha 22: Tabulka maximálního obsahu toxických prvků | 84 |
| Příloha 23: Graf Vlastní čísla korelační matice a pouze aktivní proměnné..... | 85 |

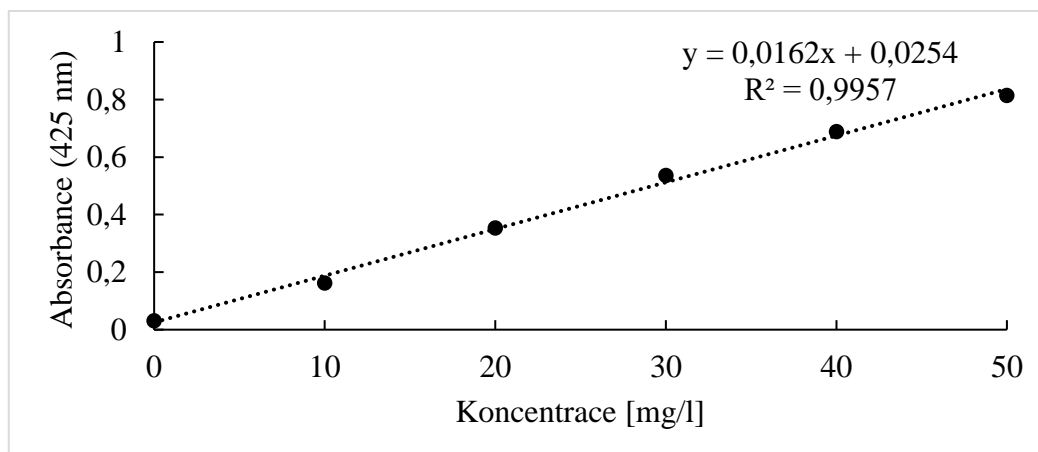
Příloha 1: Optimalizace metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



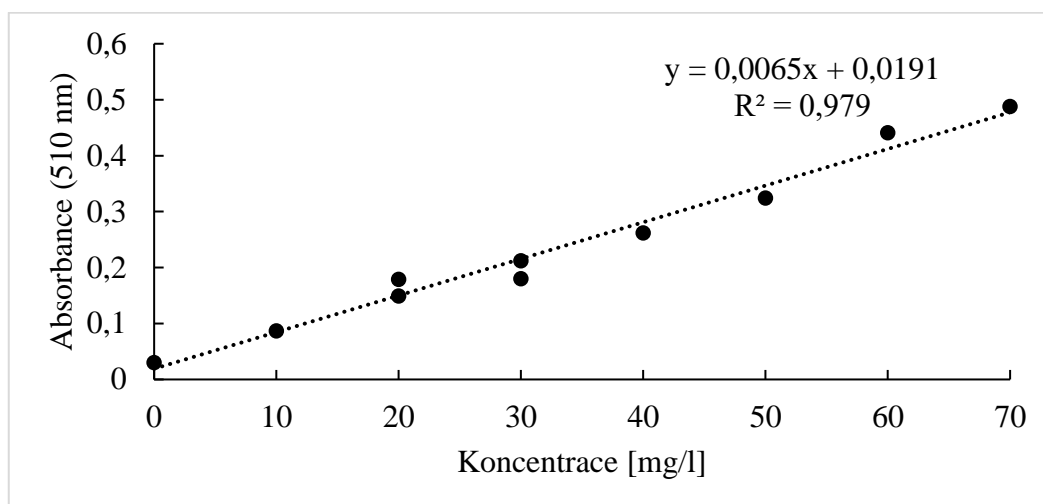
Příloha 2: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



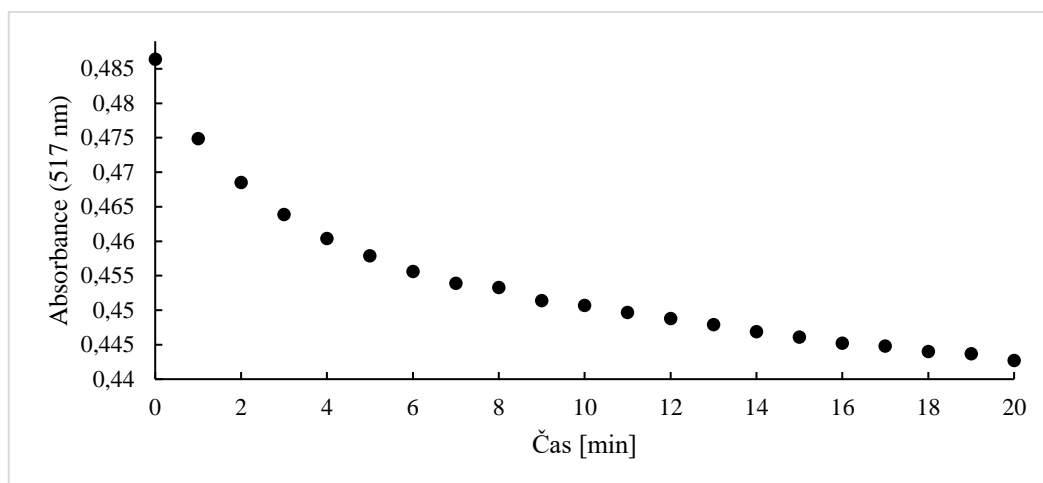
Příloha 3: Kalibrační křivka kvercetinu pro stanovení obsahu flavonoidů (Metoda 1)



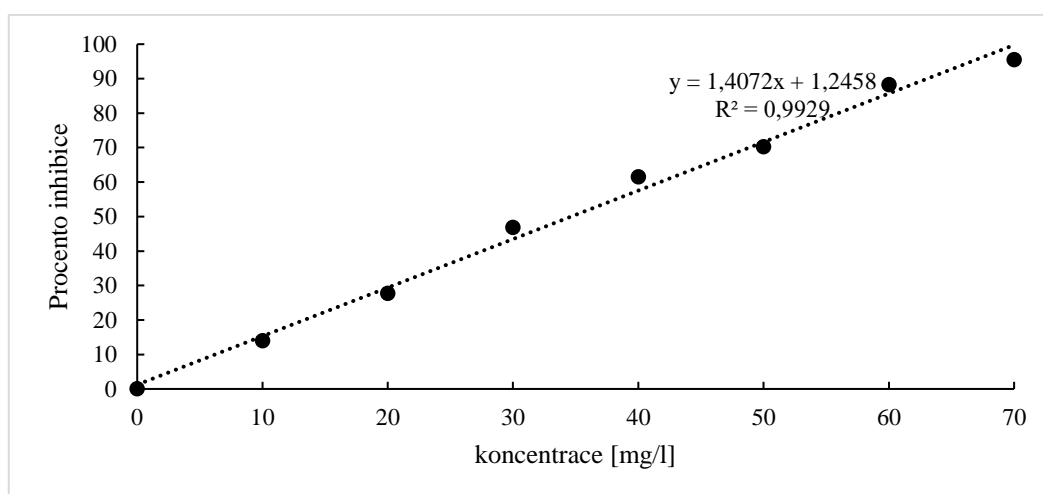
Příloha 4: Kalibrační křivka katechinu pro stanovení obsahu flavonoidů (Metoda 2)



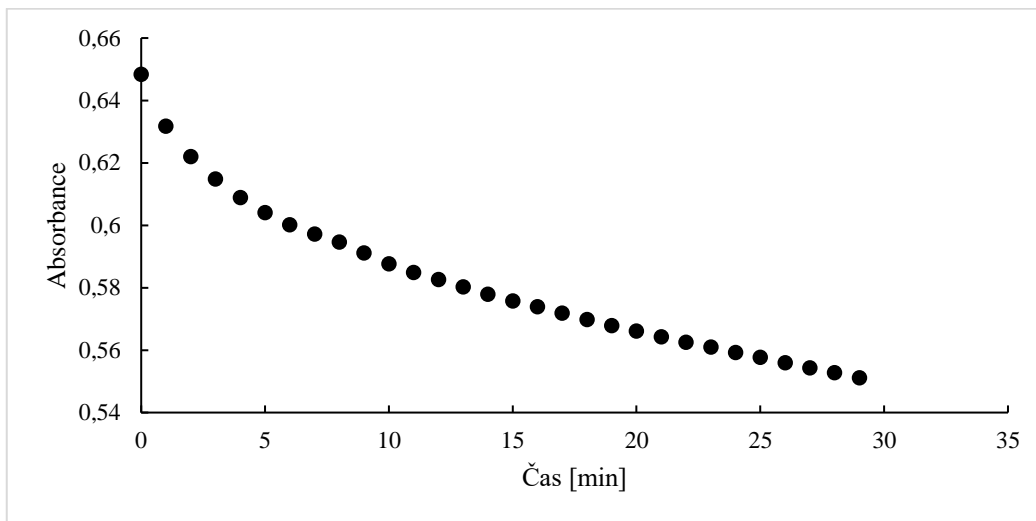
Příloha 5: Optimalizace reakčního času metody DPPH



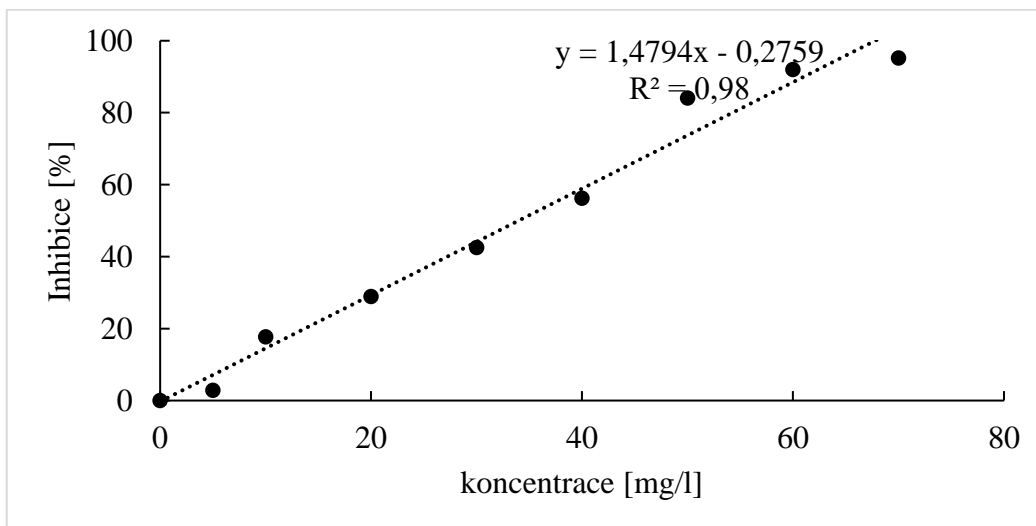
Příloha 6: Kalibrační řada Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH



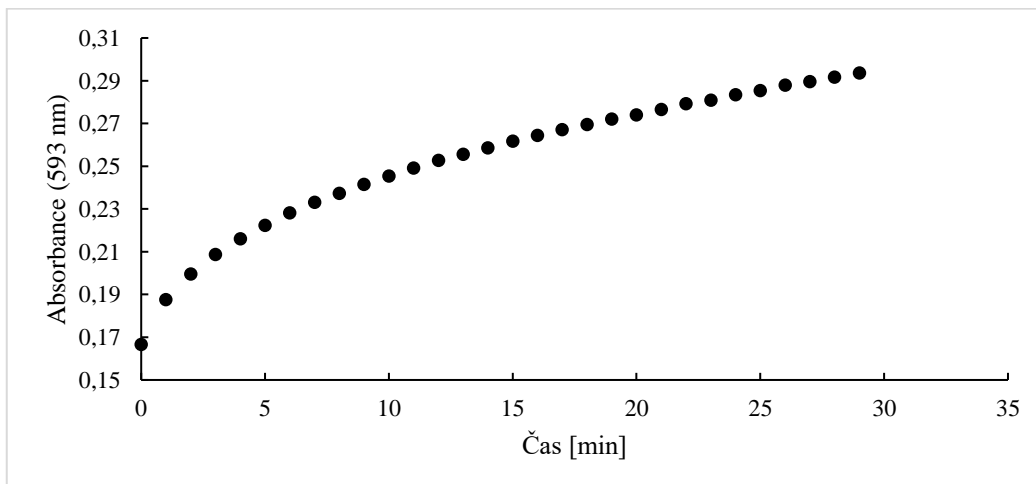
Příloha 7: Optimalizace reakčního času metody ABTS



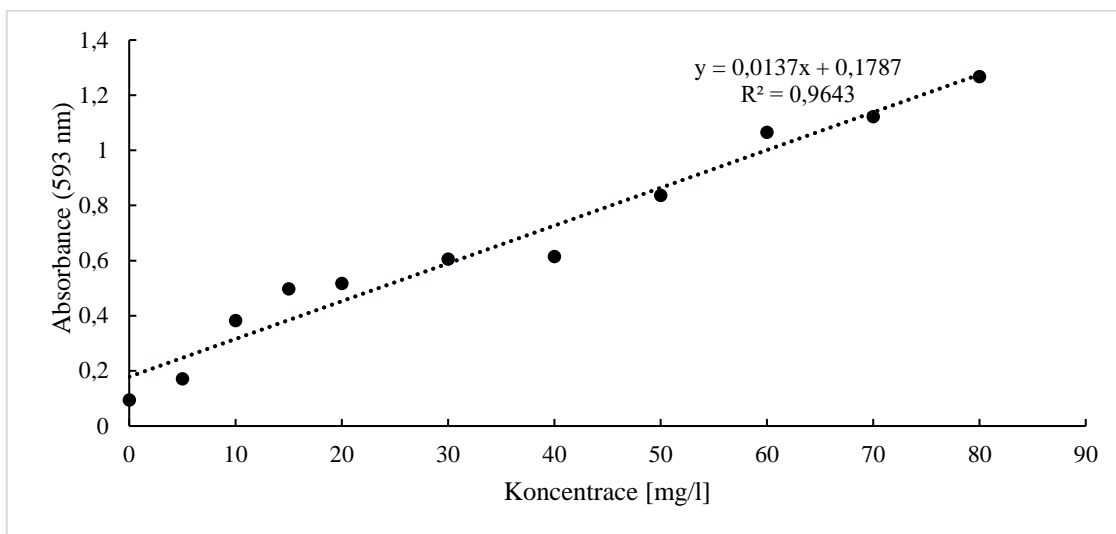
Příloha 8: Kalibrační řada Troloxu pro metodu ABTS



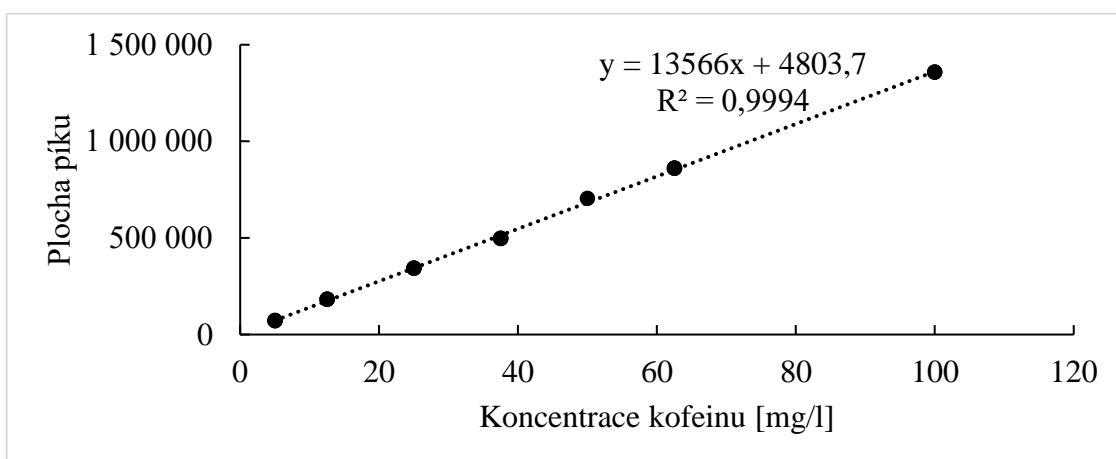
Příloha 9: Optimalizace reakčního času pro metodu FRAP



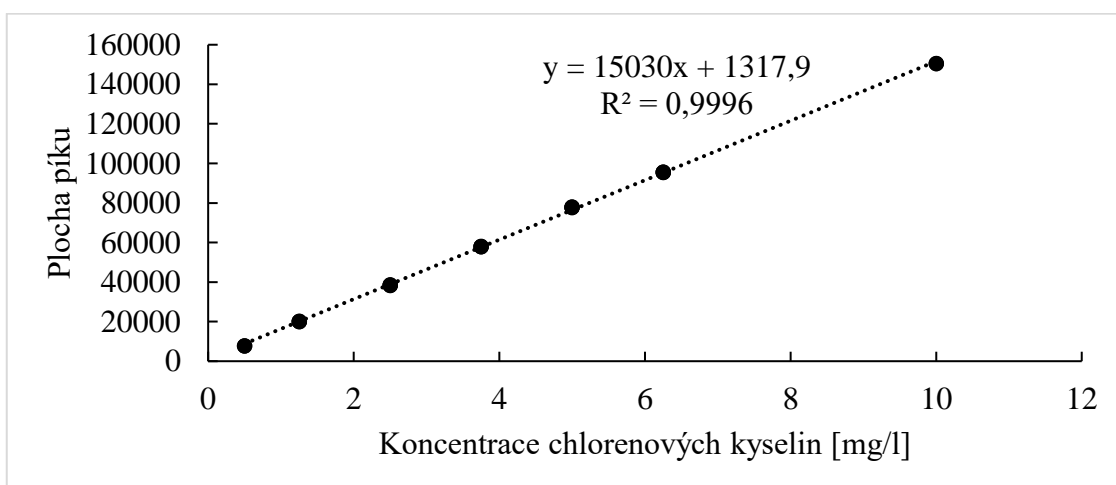
Příloha 10: Kalibrační řada Troloxu pro metodu FRAP



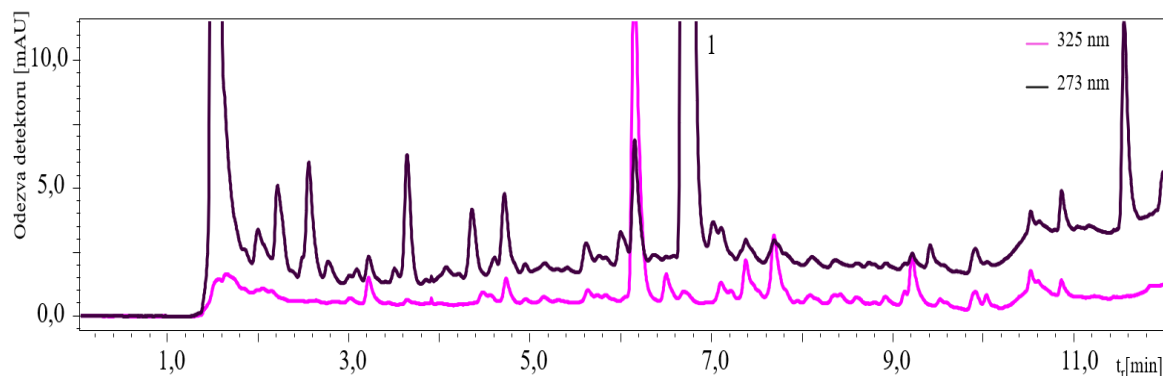
Příloha 11: Kalibrační řada stanovení kofeinu pomocí HPLC



Příloha 12: Kalibrační řada stanovení chlorogenových kyselin pomocí HPLC

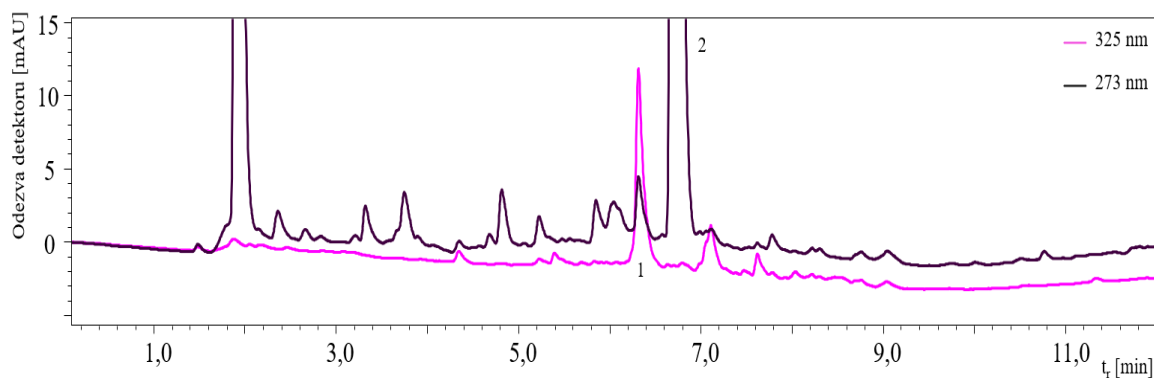


Příloha 13: Optimalizace separace pomocí kolony Ascentis Express F5



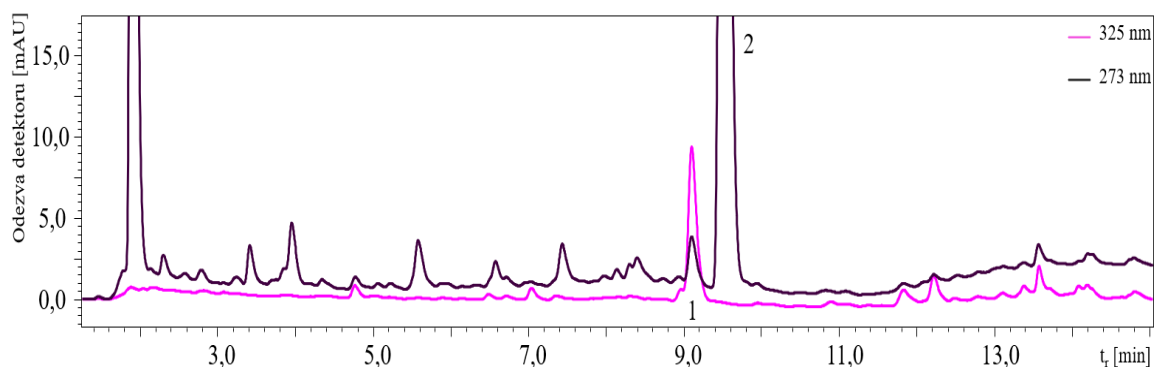
Kolona: Ascentis Express F5; mobilní fáze – mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 15% methanolu, 7. min. - 30% methanolu, 10. min. - 50% methanolu, 12. min. – 90% methanolu; 14. min. – 10% methanolu; 1 – kofein.

Příloha 14: Chromatogram první separace na koloně YMC – Triart C18



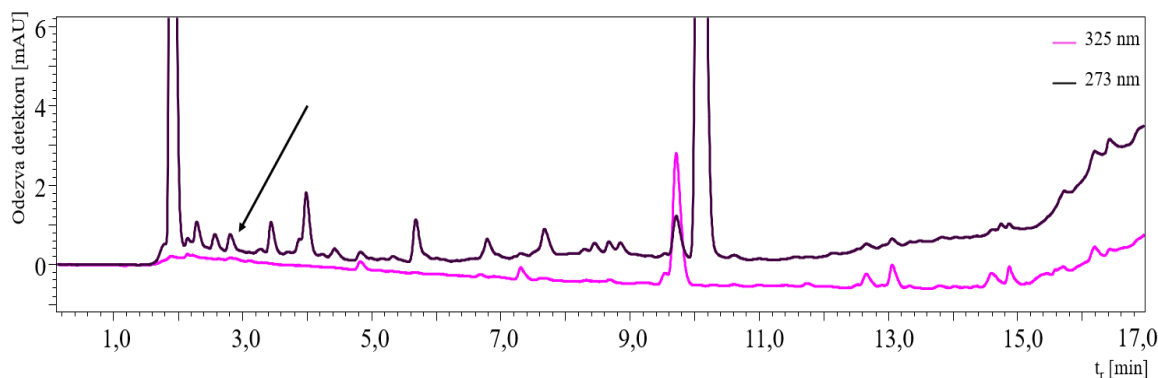
Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 7. min. - 30% methanolu, 10. min. - 50% methanolu, 12. min. – 90% methanolu; 14. min. – 10% methanolu; 1 - kyselina chlorogenová, 2 – kofein.

Příloha 15: Optimalizace separace látek v oblasti „otisku prstu“



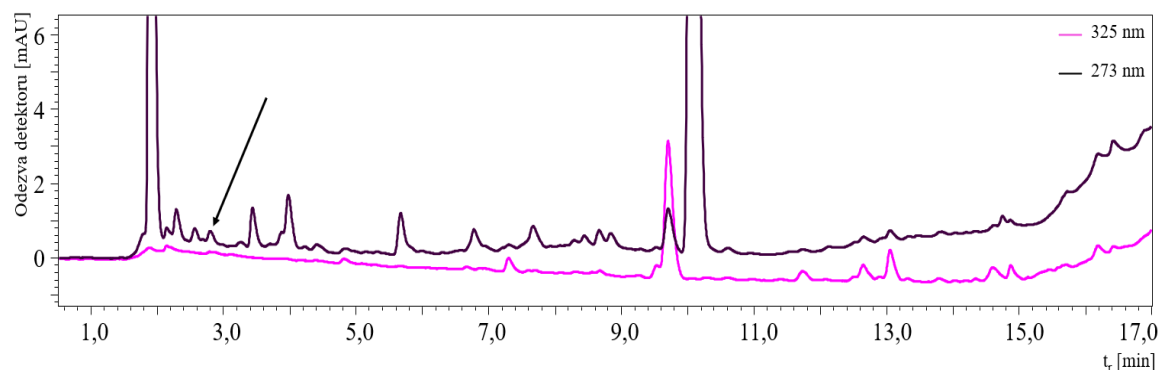
Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%): 0 min. – 10% methanolu, 6. min. - 35% methanolu, 9. min. - 35% methanolu, 15. min. – 90% methanolu; 17. min. – 10% methanolu; 1 - kyselina chlorogenová, 2 – kofein.

Příloha 16: Chromatogram přípravy nápoje *cascara* pomocí horké vody



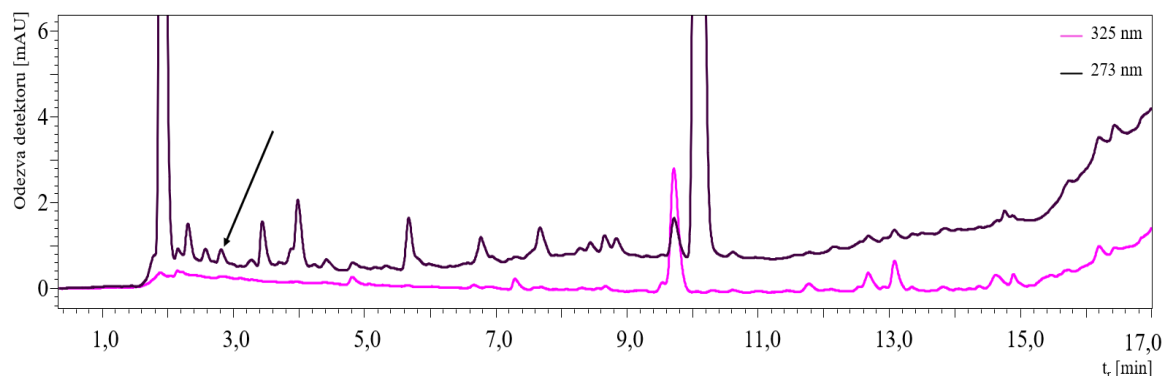
Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 6. min. - 35% methanolu, 9. min. - 35% methanolu, 15. min. – 90% methanolu; 17. min. – 10% methanolu; šipka značí pík, jehož koncentrace se mění s teplotou vody použité na přípravu nápoje *cascara*.

Příloha 17: Chromatogram přípravy nápoje *cascara* pomocí studené vody (20 °C)



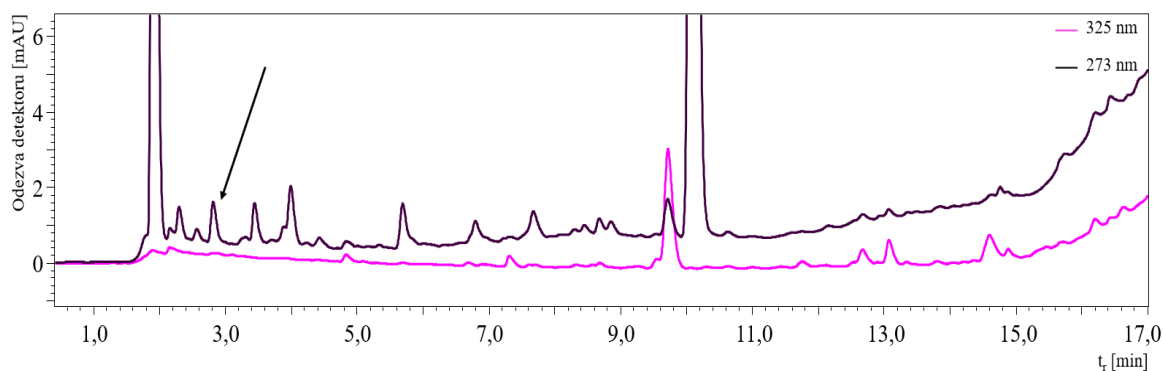
Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 6. min. - 35% methanolu, 9. min. - 35% methanolu, 15. min. – 90% methanolu; 17. min. – 10% methanolu; šipka značí pík, jehož koncentrace se mění s teplotou vody použité na přípravu nápoje *cascara*.

Příloha 18: Chromatogram přípravy nápoje *cascara* pomocí studené vody (15 °C)



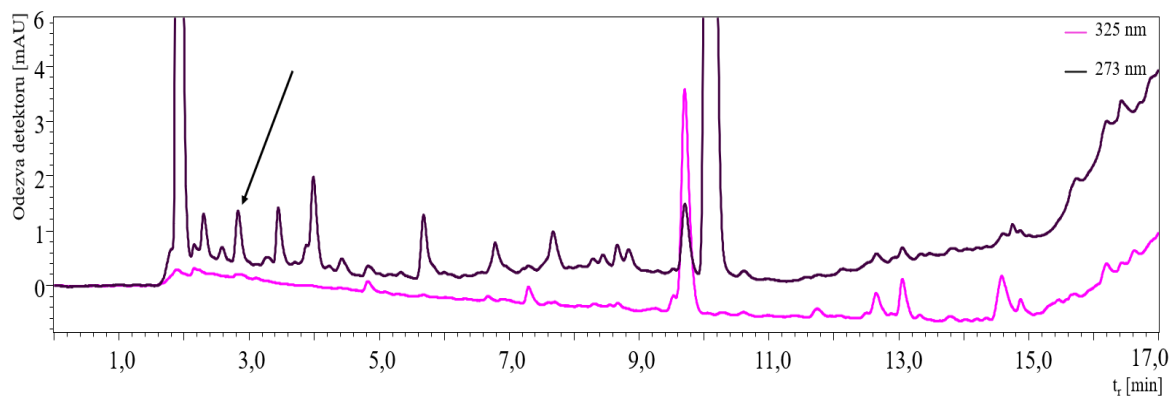
Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 6. min. - 35% methanolu, 9. min. - 35% methanolu, 15. min. – 90% methanolu; 17. min. – 10% methanolu; šipka značí pík, jehož koncentrace se mění s teplotou vody použité na přípravu nápoje *cascara*.

Příloha 19: Chromatogram přípravy nápoje *cascara* pomocí studené vody (10 °C)



Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 6. min. - 35% methanolu, 9. min. - 35% methanolu, 15. min. – 90% methanolu; 17. min. – 10% methanolu; šipka značí pík, jehož koncentrace se mění s teplotou vody použité na přípravu nápoje *cascara*.

Příloha 20: Chromatogram přípravy nápoje *cascara* pomocí studené vody (5 °C)



Kolona: YMC – Triart C18; mobilní fáze – methanol a voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,3%); gradient: 0 min. – 10% methanolu, 6. min. - 35% methanolu, 9. min. - 35% methanolu, 15. min. – 90% methanolu; 17. min. – 10% methanolu; šipka značí pík, jehož koncentrace se mění s teplotou vody použité na přípravu nápoje *cascara*.

Příloha 21: Tabulka denní doporučených příjmů makro- a mikroprvků

| Název minerálu | Doporučená dávka ⁵ |
|-------------------|-------------------------------|
| Makroprvky | |
| Sodík | 500 mg |
| Draslík | 2000 mg |
| Hořčík | 375 mg |
| Vápník | 800 mg |
| Mikroprvky | |
| Chrom | 40 mg |
| Kobalt | 2,5 µg |
| Mangan | 2 mg |
| Měď | 1 mg |
| Molybden | 50 µg |
| Selen | 55 µg |
| Zinek | 10 mg |
| Železo | 14 mg |

Příloha 22: Tabulka maximálního obsahu toxických prvků

| Toxické prvky | |
|----------------------|---|
| Arsen | 0,02 mg/kg ⁶ |
| Cín | 100 mg/kg čerstvé hmotnosti ⁷ |
| Hliník | 1 mg/kg (týdenní limit) ⁸ |
| Kadmium | 0,02 max limit [µg/kg čerstvé hmotnosti] pro nápoje v tekuté formě |
| Nikl | LD50 = 9000 mg/kg ⁹ |
| Olovo | 0,02 max limit [µg/kg čerstvé hmotnosti] pro nápoje v tekuté formě ¹⁰ |

⁵ <https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065067.html>

⁶ [Publications Office \(europa.eu\)](#)

⁷ [LexUriServ.do \(europa.eu\)](#)

⁸ [Hliník – Bezpečnost potravin \(bezpecnostpotravin.cz\)](#)

⁹ [bezpecnostni-list-eu-BL - nikl.pdf \(korinek.cz\)](#)

¹⁰ [L_2021286CS.01000101.xml \(europa.eu\)](#)

Příloha 23: Graf Vlastní čísla korelační matice a pouze aktivní proměnné

