

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2024**

**Bc. Aneta Horálková**

Univerzita Pardubice  
Fakulta Chemicko-technologická

Stanovení vybraných organických kyselin v kávě

Diplomová práce

2024

Bc. Aneta Horáková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Horálková**  
Osobní číslo: **C22287**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Stanovení vybraných organických kyselin v kávě**  
Téma práce anglicky: **Determination of selected organic acids in coffee**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši týkající se výroby kávy a jejího složení. Dále se zaměřte na fyzikálně chemické vlastnosti vybraných organických kyselin a jejich kvantitativní analýzu s využitím moderních separačních technik.
2. Optimalizujte podmínky pro analýzu organických kyselin pomocí separačních technik HPLC a CZE se spektrofotometrickou detekcí.
3. Optimalizujte podmínky izolace organických kyselin z kávy pomocí SPE techniky.
4. Nalezené optimální podmínky aplikujte pro stanovení organických kyselin ve vzorcích kávy.
5. Dosažené výsledky porovnejte a vyhodnoťte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Soňa Řezková, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

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

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení vybraných organických kyselin v kávě 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: 10. 5. 2024

Aneta Horálková

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Ing. Soně Řezkové, Ph.D. za pomoc v laboratoři, cenné rady i konzultace a zejména za vedení mé diplomové práce. Za spoustu nových zkušeností, velkou pomoc v laboratoři a nepřeborné množství rad vděčím Ing. Michalu Kašparovi. Ráda bych také poděkovala doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za umožnění získat zkušenosti v laboratoři, konzultace a pozitivní přístup při řešení problémů. Velké díky patří pardubické pražírně ZRNO44 za spolupráci a poskytnutí vzorků kávy. Děkuji i celé své rodině a nejbližším, kteří mě během celého studia podporovali.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je zaměřena na stanovení obsahu vybraných organických kyselin ve vzorcích pražených i zelených kávových zrn. Teoretická část je věnována kávě, od jejího pěstování až po metody přípravy kávy a chemického složení. Jsou zde popsány fyzikálně-chemické vlastnosti organických kyselin, jejich výskyt a použití. Dále jsou v teoretické části uvedeny možnosti stanovení organických kyselin ve vzorcích potravin a nápojů včetně úpravy vzorku před analýzou metodou SPE extrakce. Experimentální část se zabývá optimalizací HPLC a CZE metod pro stanovení organických kyselin ve vzorcích kávy a jejich izolací pomocí SPE metody. Na závěr jsou v této práci prezentovány výsledky stanovení organických kyselin ve vybraných vzorcích pražených i zelených kávových zrn.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Pražená káva, zelená káva, organické kyseliny, HPLC, CZE, SPE, HILIC

## **TITLE**

Determination of selected organic acids in coffee

## **ANNOTATION**

This diploma thesis is focused on determination of selected organic acids in roasted and green coffee beans samples. The theoretical part deals with coffee, from its growing to coffee preparation methods and chemical composition. The physicochemical properties, occurrence and the use of organic acids are described here. Furthermore, in the theoretical part, the possibilities of determining acids in food and beverage samples are presented, including sample preparation using the SPE extraction method. The experimental part deals with the optimization of HPLC and CZE methods for the determination of organic acids in coffee samples and the isolation of organic acids using SPE. In conclusion, this thesis includes the results of the determination of organic acids in selected samples of roasted and green coffee.

## **KEYWORDS**

Roasted coffee, green coffee, organic acids, HPLC, CZE, SPE, HILIC

1. TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1.1 Káva a její pěstování .....	15
1.1.1 Druhy kávy .....	16
1.1.2 Zpracování kávy.....	17
1.1.3 Loupání a třídění zrn .....	19
1.1.4 Pražení kávy.....	19
1.1.4.1 Stupně a úrovně pražení kávy .....	20
1.1.5 Aroma kávy.....	22
1.1.6 Mletí kávy.....	23
1.1.7 Metody přípravy kávy .....	23
1.1.8 Chemické složení kávy.....	25
1.2 Organické kyseliny.....	27
1.2.1 Organické kyseliny vyskytující se v kávě .....	28
1.2.2 Stanovení organických kyselin v potravinách a nápojích .....	34
1.2.3 Stanovení organických kyselin v kávě .....	35
1.2.4 Úprava vzorku pomocí extrakce pevnou fází .....	37
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	39
2.1 Přístroje a zařízení.....	39
2.2 Použité chemikálie a rozpouštědla .....	40
2.3 Analyzované vzorky.....	41
2.4 Pracovní postupy.....	42
2.4.1 Úprava vzorků k analýze .....	42
2.4.2 Příprava standardních a kalibračních roztoků.....	43
2.4.3 Stanovení organických kyselin ve vzorcích kávy metodou HPLC-DAD .....	43
2.4.4 Stanovení organických kyselin ve vzorcích kávy metodou CZE-DAD.....	44
2.4.5 Stanovení organických kyselin metodou HILIC.....	45



3.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	46
3.1	Optimalizace HPLC-DAD metody pro vybrané organické kyseliny .....	46
3.2	Optimalizace HPLC-DAD metody pro chlorgenové kyseliny .....	48
3.3	Optimalizace CZE-DAD metody pro vybrané organické kyseliny .....	50
3.4	Optimalizace HILIC metody pro vybrané organické kyseliny .....	52
3.5	Volba podmínek úpravy vzorku.....	53
3.5.1	Volba extrakční metody.....	54
3.5.2	Opakovatelnost a účinnost extrakce .....	56
3.6	Výsledky stanovení vybraných organických kyselin metodou HPLC-DAD .....	58
3.6.1	Záznam analýzy reálného vzorku metodou HPLC-DAD.....	60
3.7	Výsledky stanovení chlorgenových kyselin metodou HPLC-DAD.....	61
3.7.1	Záznam analýzy reálného vzorku metodou HPLC-DAD.....	64
3.8	Výsledky stanovení vybraných organických kyselin metodou CZE-DAD.....	65
3.8.1	Záznam analýzy reálného vzorku metodou CZE-DAD .....	67
3.9	Srovnání dosažených výsledků .....	68
4.	ZÁVĚR.....	70
5.	SEZNAM LITERATURY .....	72
6.	PŘÍLOHY .....	81

## SEZNAM ZKRATEK

AHA	Alfa hydroxykyseliny
CE	Kapilární elektroforéza
CGA	Kyselina chlorgenová
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CTAB	Cetyltrimethylamoniumbromid
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	Detektor diodového pole
GC	Plynová chromatografie
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	Iontově výměnná chromatografie
$K_a$	Disociační konstanta kyselin
LC	Kapalinová sloupcová chromatografie
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotností spektroskopii
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MEPS	Mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím injekční stříkačky
MF	Mobilní fáze
NP-LC	Kapalinová chromatografie s normálními fázemi
OA	Organické kyseliny
PC	Papírová chromatografie
RP-LC	Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
RSD	Residuální směrodatná odchylka
SPE	Extrakce na pevné fázi

SPME	Mikroextrakce na pevné fázi
STD	Roztoky standardních látek
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
UHPLC-DAD	Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole
UV-VIS	Detektor pro oblast ultrafialového a viditelného záření
v/v	Objemový podíl v procentech

## SEZNAM OBRÁZKU

<b>Obrázek 1:</b> Klíčící kávové zrno .....	15
<b>Obrázek 2:</b> Rozříznutá kávová třešeň .....	15
<b>Obrázek 3:</b> Postupně zrající kávová třešeň.....	16
<b>Obrázek 4:</b> Kávová zrna různých typů: pražená arabika, pražená robusta, surová arabika, surová robusta (zleva doprava) .....	17
<b>Obrázek 5:</b> Upražená kávová zrna v chladiči .....	20
<b>Obrázek 6:</b> Stupně pražení kávy .....	22
<b>Obrázek 7:</b> Metody přípravy kávy .....	25
<b>Obrázek 8:</b> Strukturní vzorec kyseliny 5- <i>o</i> -kafeoylchinové (kyselina chlorgenová) .....	28
<b>Obrázek 9:</b> Strukturní vzorec kyseliny citronové .....	29
<b>Obrázek 10:</b> Strukturní vzorec kyseliny jablečné .....	30
<b>Obrázek 11:</b> Strukturní vzorec kyseliny chinové.....	30
<b>Obrázek 12:</b> Strukturní vzorec kyseliny octové .....	31
<b>Obrázek 13:</b> Strukturní kyseliny mravenčí.....	31
<b>Obrázek 14:</b> Strukturní vzorec L-mléčné kyseliny .....	32
<b>Obrázek 15:</b> Strukturní vzorec kyseliny glykolové .....	32
<b>Obrázek 16:</b> Strukturní vzorec kyseliny jantarové .....	33
<b>Obrázek 17:</b> Strukturní vzorec kyseliny fumarové .....	33
<b>Obrázek 18:</b> Strukturní vzorec <i>meso</i> - vinné kyseliny .....	34
<b>Obrázek 19:</b> Strukturní vzorec kyseliny pyrohroznové .....	34
<b>Obrázek 20:</b> Chromatogramy analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřených HPLC-DAD metodou na třech testovaných kolonách .....	46
<b>Obrázek 21:</b> Chromatogram analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou .....	47
<b>Obrázek 22:</b> Chromatogram analýzy směsi standardů chlorgenových kyselin o koncentraci 10 mg/l naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou .....	49
<b>Obrázek 23:</b> Záznam analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 100 mg/l (0,4 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou CZE-DAD metodou .....	51
<b>Obrázek 24:</b> Chromatogram analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený finální HILIC metodou .....	53

<b>Obrázek 25:</b> Chromatogram směsi standardů vybraných organických kyselin po SPE postupu A o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou.....	54
<b>Obrázek 26:</b> Chromatogram směsi standardů vybraných organických kyselin po SPE postupu B o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou.....	55
<b>Obrázek 27:</b> Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích pražené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD.....	58
<b>Obrázek 28:</b> Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích zelené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD.....	59
<b>Obrázek 29:</b> Záznam analýzy pražených kávových zrn vzorku P8 analyzovaného optimalizovanou metodou HPLC-DAD.....	60
<b>Obrázek 30:</b> Záznam analýzy zelených kávových zrn vzorku Z8 analyzovaného optimalizovanou metodou HPLC-DAD.....	61
<b>Obrázek 31:</b> Obsah chlorgenových kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích pražené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD.....	62
<b>Obrázek 32:</b> Obsah chlorgenových kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích zelené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD.....	62
<b>Obrázek 33:</b> Záznam analýzy pražených kávových zrn vzorku P8 analyzovaného optimalizovanou metodou HPLC-DAD.....	64
<b>Obrázek 34:</b> Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích pražené kávy analyzovaných metodou CZE-DAD.....	65
<b>Obrázek 35:</b> Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích zelené kávy analyzovaných metodou CZE-DAD.....	66
<b>Obrázek 36:</b> Záznam analýzy pražených kávových zrn vzorku P8 analyzovaného optimalizovanou metodou CZE-DAD.....	67
<b>Obrázek 37:</b> Záznam analýzy zelených kávových zrn vzorku Z8 analyzovaného optimalizovanou metodou CZE-DAD.....	68

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1 :</b> Senzorické vlastnosti vybraných kyselin vyskytujících se v kávě.....	26
<b>Tabulka 2:</b> Seznam obdržených vzorků .....	41
<b>Tabulka 3:</b> Podmínky pro měření organických kyselin pomocí HPLC-DAD .....	43
<b>Tabulka 4:</b> Podmínky pro měření chlorgenových kyselin pomocí HPLC-DAD.....	44
<b>Tabulka 5:</b> Podmínky pro měření organických kyselin pomocí CZE-DAD .....	44
<b>Tabulka 6:</b> Podmínky pro měření organických kyselin pomocí HILIC.....	45
<b>Tabulka 7:</b> Parametry kalibračních závislostí a limity LOD, LOQ pro jednotlivé standardy organických kyselin analyzovaných HPLC-DAD metodou.....	48
<b>Tabulka 8:</b> Parametry kalibračních závislostí a limity LOD, LOQ pro kyselinu chlorgenovou analyzovanou HPLC-DAD metodou.....	50
<b>Tabulka 9:</b> Parametry kalibračních závislostí a limity LOD, LOQ pro jednotlivé standardy organických kyselin analyzovaných CZE-DAD metodou .....	52
<b>Tabulka 10:</b> Opakovatelnost extrakce B směsi standardů kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) vyjádřená jako RSD plochy píků pro tři opakování.....	56
<b>Tabulka 11:</b> Extrakční účinnost $\pm$ RSD směsí standardů organických kyselin na testovaných koncentračních úrovních: 10 mg/l (0,04 mg/l pro kyselinu fumarovou), 25 mg/l (0,1 mg/l pro kyselinu fumarovou) a 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou).....	57

# ÚVOD

Káva je jeden z nejoblíbenějších nápojů, rozšířených po celém světě. Ve své podstatě se jedná o ovoce, protože kávová zrnka jsou ukryta v kávových třešních, které se mohou konzumovat. Než se káva dostane do našeho šálku tak, jak ji známe, projde dlouhým procesem, který je zakončen pražením. Výslednou chuť, aroma i složení kávy lze ovlivnit pražením, které má několik úrovní a stupňů.

Důležitým nositelem chuti a ukazatelem kvality kávy jsou organické kyseliny. Ty jsou přítomny již v zelených kávových zrnech, zejména kyselina chlorogenová, citronová, jablečná, a procesem pražení vznikají další kyseliny, jako například mravenčí, fumarová, octová nebo vinná.

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro analýzu organických kyselin pomocí separačních technik HPLC a CZE. Dále byl optimalizován postup úpravy vzorku metodou SPE pro izolaci organických kyselin z kávy. Nalezené podmínky byly aplikovány na reálné vzorky zelených i pražených kávových zrn pro identifikaci a kvantifikaci vybraných organických kyselin.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Káva a její pěstování

Káva je jedním z běžně konzumovaných nápojů. Kávová zrna (obrázek 1) rostou na kávovnících, které se pěstují jako malé stromy v tropickém a subtropickém podnebí v nadmořské výšce do 2000 metrů. Některé kávovníky se řadí mezi keře, a jiné mezi stromy, protože mohou být i více než 10 metrů vysoké. Na plantážích však tyto rostliny nedorůstají do takové výšky, protože by je farmáři jen těžko sklízeli a pravidelně je proto zastříhují. Kávovníky mají několikrát do roka drobné bílé květy a z těch postupně rostou plody, které se nazývají třesně (obrázek 2). Kávové třesně se dají jíst a jsou velmi chutné. Slupka i dužina obsahují kofein, tak jako samotná zrníčka uvnitř. Třesně se využívají zejména kvůli zrnkům, ale v některých kavárnách nebo pražírkách lze usušenou slupku zakoupit jako tzv. *cascarú*. Plody zrají 7 měsíců až 1 rok a zemědělci sklízí kávové třesně přibližně jednou ročně, ale záleží na poloze plantáží. Nezralé plody mají zelenkavou barvu, která se při dozrávání mění v červenou až skoro fialovou (obrázek 3). Některé odrůdy mohou mít zralé plody žluté nebo oranžové. Třeseň v sobě ukrývá dvě kávová zrnka, ale pokud má jen jedno, je kulaté a říká se mu perlové zrno<sup>1,2,3,4</sup>.



**Obrázek 1:** Klíčící kávové zrno<sup>1</sup>



**Obrázek 2:** Rozříznutá kávová třeseň<sup>1</sup>





**Obrázek 3:** Postupně zrající kávová třešeň<sup>1</sup>

### 1.1.1 Druhy kávy

Existuje řada různých druhů kávovníků. Mezi nejznámější patří arabika a robusta. Arabika (*Coffea arabica*) představuje 70-80 % světové produkce a nejvíce se pěstuje ve Střední a Jižní Americe, částečně také v Africe a roste i v Austrálii. Robusta (*Coffea canephora*) představuje většinu zbývající produkce a pěstuje se převážně v Asii, částečně v Africe a v menším měřítku také v Jižní Americe. Arabika se řadí mezi lepší a kvalitnější kávy, ale kávovník je náročnější na pěstování. Základním druhem arabiky, ze kterého se vyšlechtila řada dalších odrůd, je druh *Typica* pocházející z Etiopie. *Typica* má kónický tvar a rovný kmen, plody mají červenou barvu. Robusta patří mezi levnější a méně kvalitní kávy. Tento kávovník vyžaduje teplejší a stabilnější klima s teplotou 24-29 °C, jinak je ale mnohem méně náročný na pěstování než arabika. Chuť robusty je naprosto nezaměnitelná, má výraznou hořkou chuť a často i velmi silné, zemité tělo. Chemicky má totiž úplně jinou strukturu než arabika, proto i jinak chutná. Velký rozdíl mezi arabikou a robustou je na první pohled poznat již u samotných zrněk (obrázek 4). Zrnko arabiky je ploché a protáhlé, většinou má zakřivenou rýhu uprostřed. Zrno má jemně zelenou barvu, výjimečně s namodralým tónem. Naproti tomu zrnko robusty je vypouklejší a zaoblenější. Rýha je rovná, barva je bledě zelená

s nahnědlými nebo našedlými odstíny. I po upražení je od sebe lze rozeznat především podle jejich tvaru. Obsah kofeinu se liší v závislosti na druhu kávového zrna. Uvádí se, že kávová zrna arabiky obsahují 10 až 12 mg kofeinu/g, zrna robusty obsahují kofeinu mnohem více a to 19-21 mg kofeinu/g<sup>1,2,4,5,6,7</sup>.



**Obrázek 4:** Kávová zrna různých typů: pražená arabika, pražená robusta, surová arabika, surová robusta (zleva doprava)<sup>5</sup>

### 1.1.2 Zpracování kávy

Po nasbírání je třeba kávové třešně dále zpracovat a to se děje třemi způsoby, mezi které patří suchý, mokrý nebo medový způsob čištění. Zpracování má velký vliv na chuť kávy, ale i na její cenu. Pro výběrovou kávu se volí častěji mokrý způsob, z kterého je káva tzv. čistější. Pokud se ale dodrží správné postupy při suchém nebo medovém zpracování, i taková káva může být velmi chutná<sup>1</sup>.

Suchá metoda patří mezi jednodušší a většinou finančně méně náročné. Nachází využití téměř po celém světě. Kávové třešně jsou ihned po sběru rozprostřeny rovnoměrně například na betonových podlahách, aby se ke všem dostal vzduch a sluneční paprsky. Třešně se suší na slunci po dobu tří až čtyř týdnů a po usušení se nechávají odpočinout přibližně 30-60 dní. Poté přichází na řadu loupání slupek, vnější i vnitřní slupky se mechanicky odstraní, aby se uvolnila kávová zrna („zelená káva“)<sup>1,2,3,4,5</sup>.

Medová metoda se řadí mezi suchou i mokrou a na každé plantáži postupují při zpracování touto metodou trochu odlišně. Na některých putují třešně do vodních lázní, kde probíhá selekce zralých a nezralých plodů. Vytríděné plody se nechávají schnout na slunci. Farmáři

při tomto zpracování spotřebují mnohem méně vody než u mokrého způsobu. Některé plantáže nepoužívají téměř žádnou vodu. Třešním se rovnou oloupou slupky a zrna se suší hlavně s dužinou na povrchu. Zde se metoda může dále dělit podle toho, kolik zbylé dužiny na povrchu zůstalo. Zrna je potřeba pravidelně otáčet, dokonce několikrát denně, aby nezačala plesnivět<sup>1</sup>.

Mokrý způsob je náročnější než ty předchozí, ale ve výsledku je z něho získána často kvalitnější káva. Díky několika postupům během zpracování dochází k výběru opravdu kvalitních zrn velmi šetrným způsobem. Mokrý způsob se využívá na plantážích zejména pro kávu arabika. Vnější slupka třešně se protlačí štěrbinami a dužina obklopující fazole se fermentuje. Fazole, ještě pokrytá vnitřní skořápkou, se suší po dobu 1 týdne na slunci nebo kratší dobu v sušičce. Po mechanickém odstranění vnitřní slupky se boby očistí<sup>1,2,3,4,5</sup>.

### Bezkofeinová káva

Pro získání bezkofeinové kávy se při zpracování postupuje trochu odlišně. Stimulační účinek kávy je způsobem přítomností alkaloidu kofeinu a bezkofeinová káva byla komerčně vyvinuta v Evropě kolem roku 1900. Proces dekofeinace začíná nejprve navlhčením zelené kávy (alespoň na 20 %), aby se usnadnil transport kofeinu přes buněčnou stěnu a došlo ke změkčení fazolí kávových zrn. Poté se zvlhčená zrna uvedou do kontaktu s rozpouštědly. Dříve se používala synteticky připravená organická rozpouštědla. Dnes výrobci používají buď přirozeně se vyskytující rozpouštědla, nebo rozpouštědla odvozená od přírodních látek. Tři nejběžnější příklady jsou oxid uhličitý za nadkritických podmínek, olej extrahovaný z pražené kávy a ethylacetát, jedlý ester přirozeně se vyskytující v kávě. V procesu s oxidem uhličitým jsou kávová zrna namáčena ve vysoce stlačeném CO<sub>2</sub>, který extrahuje kofein. Kofein je odstraněn uhlíkovými filtry. V alternativním procesu CO<sub>2</sub> se používá k vymytí kofeinu perlivá voda, která je dále recyklována a znovu použita pro extrakci kofeinu. Ve všech procesech dochází ke změnám, které ovlivňují vývoj chuti kávy. Tyto změny jsou způsobeny předběžným zvlhčováním i sušením po dekofeinaci<sup>2,5</sup>.

### 1.1.3 Loupání a třídění zrn

Po zpracování všemi způsoby čeká zrna 1 až 2 měsíce pauza, kdy si musí „odpočinout“. V době před vývozem obsahují zrna 11-12 % vlhkosti, takže je bezpečné kávu skladovat a neměla by začít hnit. Před exportem se ještě káva loupe ve speciálních loupacích přístrojích a musí se protřídít. Při třídění dochází k odstranění vadných a defektních zrn. Třídění defektů většinou probíhá ručně a jen větší továrny používají speciální přístroje<sup>1</sup>.

### 1.1.4 Pražení kávy

Chuťové a aromatické vlastnosti kávy se rozvinou během pražení. S úrovní pražení se mění také barva kávových zrn. Chemické a fyzikální změny s tímto procesem jsou velmi složité. Komerční pražení se běžně provádí horkými spalinami buď v rotujících válcích, nebo v systémech s fluidním ložem. Doba pražení je přibližně 10-15 min. Počátečním krokem pražení je eliminace vody a rovnoměrný ohřev. Uvádí se, že počátek reakcí pražení nastává při teplotě 120-150 °C, kdy se kávová zrna mírně smršťují a blednou. Přibližně po 9 minutách je slyšet takzvané první prasknutí – *first crack*. Tím začíná druhý stupeň pražení, kde fazole bobtnají a dochází k chemické dehydrataci, fragmentaci, rekombinaci, depolymerizačním reakcím, Streckerově degradaci a karamelizaci (rozklad cukrů). Mnohé z těchto reakcí jsou Maillardova typu a vedou ke vzniku sloučenin s nižší molekulovou hmotností, jako je oxid uhličitý, volná voda a sloučeniny spojené s chutí a vůní. Dochází ale také ke vzniku melanoidů, to jsou sloučeniny zodpovědné za hnědou barvu. Po překročení teploty 180 °C se tvoří hlavní aromatické sloučeniny. Při reakcích vzrůstá tlak, který dosahuje hodnoty 1,5 až 2,5 MPa. Když zrno téměř zdvojnásobí svůj objem, buněčná struktura praskne a konečná teplota zrna se pohybuje v rozmezí 190-240 °C. V závěrečné fázi dochází k rychlému ochlazení pomocí vzduchu nebo vody jako chladicího média, aby se zastavily exotermická reakce (obrázek 5). Pražená a ochlazená zrna jsou dopravena do zásobníků pro vyrovnání teploty a vlhkosti před mletím. Tento krok skladování se nazývá vytvrzování a umožňuje, aby sacharidová matrice před mletím správně ztvrdla. Zbytkové cizí látky jsou při přepravě do skladovacích zásobníků odstraňovány pomocí vysokorychlostního vzduchového zdvihu, který za sebou nechává těžší nečistoty. Většina lipidů, kofeinu, anorganických solí a polymerních sacharidů se procesem pražení nedegradují<sup>1,2,5,8,9,10,11,12</sup>.





**Obrázek 5:** Upražená kávová zrna v chladiči<sup>1</sup>

#### **1.1.4.1 Stupně a úrovně pražení kávy**

Tyto stupně udává doba a teplota pražení. Pražení kávových zrn a dosažení určitého stupně určuje celkovou chuť kávy, ale ze všeho nejvíc převládají dvě základní charakteristiky a to je kyselost a hořkost. Čím vyšší stupeň pražení, tím se potlačuje kyselost a vystupuje hořkost a naopak. Vlivem vysokých teplot se na povrchu zrn uvolňují oleje, které ovlivňují chuť kávy<sup>13,14,15</sup>.

Podle úrovně se pražení kávy dělí na světlé, střední, středně tmavé nebo tmavé. Světlé pražení nastane, když vnitřní teplota zrna dosáhne 180-205 °C. V tomto okamžiku je slyšet obvykle praskavý zvuk, protože se fazole zvětšují. V této fázi se však zrna příliš nepraží. Vykazují kyselou chuť, nemají na povrchu žádný olej a nejvíce se hodí pro překapávanou kávu. Toto pražení dává zpravidla vyniknout ovocným a karamelovým tónům kávy<sup>15,16</sup>.

Střední pražení je obvykle výsledkem teplot pražení v rozmezí 210-220 °C. Středně pražená zrna mají plnější tělo s důrazem na hořkou složku, která více či méně potlačuje aciditu v chuti<sup>15,16</sup>.

Střední tmavé pražení nastává v rozmezí teplot 225-230 °C. Na této úrovni pražení je vidět, jak se na povrch uvolňuje značné množství olejů. Organické kyseliny se při těchto teplotách začínají spalovat, hořká i sladká chuť je dominantnější<sup>15,16</sup>.

Tmavé pražení nastává při teplotě 240-250 °C. Teploty 250 °C jsou zřídka dosaženy nebo dokonce překročeny, neboť pak může v kávě převažovat chuť podobající se dřevěnému uhlí. Podezřele tmavý odstín připomínající uhel neznačí kvalitu kávy a nepomůže ani našemu zdraví. Tmavě pražená zrna nejsou kyselá a mají hořkou, kouřovou, sladší chuť. Obsahují také méně kofeinu než nižší úrovně pražení<sup>15,16</sup>.

Obvykle jsou zrna z tmavého pražení nejsladší, ale důležitým faktorem sladkosti je výběr zelených fazolek. Pokud zelené fazole na začátku nemají žádný cukr nebo jsou vysoce kyselé, bude těžké získat sladkost pražením. Na konci fáze sušení, při teplotě kolem 150 °C, probíhá Maillardova reakce a vznikají melaniody. Kávová zrna, která ve fázi Maillardovy reakce setrvávají kratší dobu, mají tendenci mít sladší tóny. Při vyšších teplotách dochází ke karamelizaci, což také ovlivňuje sladkost kávy<sup>15</sup>.

Každá pražírna může mít k pražení jiný přístup, neexistuje žádný nejlepší stupeň pražení, neboť výsledný výběr závisí na chuťových preferencích zákazníka. Při světlém pražení (stupně 1 až 4) je káva silně kyselá, začíná mít nahnědlou barvu a má velmi slabou příchut'. Stupně 5 až 7 nesou název skořice a to z jednoduchého důvodu, zrna při tomto stupni získávají skořicové zbarvení. Tato káva má slabé aroma a v její chuti stále převládá kyselost. Při středním pražení (stupeň 8) jsou zrna mírně až středně hnědá, stále převládá kyselá chuť, která však již není tolik pronikavá, protože celková chuť je plnější. Stupeň 9 se nazývá „high“. Vyznačuje se středně hnědým zbarvením zrn a chuť je bohatší, začínají v ní vynikat chuťové složky kávy. O něco tmavší odstín hnědé značí stupeň 10 s názvem „city“. Tento stupeň je vhodný pro přípravu americana, kde je na chuti znát acidita, ale chuť je plnější a bohatší. Stupně 11 a 12 neboli „full city“ lze poznat podle tmavě hnědé barvy zrn, která často mívají olejnatý, mastný vzhled. Chuťově převládá těžší, hořká příchut'. Vienna-Light French je stupeň číslo 13. Jsou to zrna s hořkosladkými tóny a na povrchu se objevují stopy oleje. Stupeň 14 nese název „Dark French“ a zrna jsou zřetelně tmavší, hořkosladká chuť výrazně převyšuje. Těžké pražení je stupeň 15 a je to velmi tmavé pražení, kde hořkost převládá do lehce připálené chuti. Zrno je lesklé a olejnaté. Takto pražená káva je oblíbená na jihu Itálie a Španělska. Poslední stupeň je tzv. před shořením, ten není vhodný pro přípravu kávy, ale lze jej využít jako hnojivo<sup>14,16,17</sup>.



Obrázek 6: Stupně pražení kávy<sup>14</sup>

### 1.1.5 Aroma kávy

Tvorby aromatických sloučenin je složitá. V počátečních a středních fázích pražení pochází značná část těchto sloučenin ze sacharidů (zejména sacharózy a arabinózy), proteinů (včetně aminokyselin a peptidů) a dalších složek kávových bobů (kyseliny chlorogenové, trigonelin, organické kyseliny nebo lipidy). Jak pražení postupuje, vznikají strukturně komplikovanější heterocyklické sloučeniny obsahující síru, kyslík a dusík, přičemž dominují hnědě zbarvené polymerní melanoidy. Aby bylo možné identifikovat, které z toho velkého počtu sloučenin je hlavním přispěvateli ke kávovému aroma, byla použita řada analytických postupů. Z výsledků analýzy vyplynulo, že pouze 20 až 30 sloučenin je zastoupeno v kávě ve větším množství, a dokonce, že pouze přibližně 15 sloučenin mají opravdu zásadní vliv na konečné aroma kávy<sup>2,8</sup>.

### 1.1.6 Mletí kávy

Mletí je jedním z nejdůležitějších kroků v procesu přípravy kávy, během kterého se kávová zrna redukuje na částice o velikosti od několika mikrometrů asi do 1000  $\mu\text{m}$ . Z těchto rozemletých částic se mohou uvolňovat těkavé látky a chemické sloučeniny, které se snadno rozpouštějí ve vodě, což způsobuje charakteristické aroma kávy. V závislosti na velikosti namletých částic se mletá káva rozděluje do pěti skupin a to velmi hrubá, hrubá, střední, jemná a velmi jemná. Průměrná velikost částic musí být správně nastavena pro každý typ kávy. Velmi jemná mletá káva se používá pro přípravu turecké kávy. Jemné mletí je vhodné pro espresso, středně hrubé pro filtrovanou kávu (V60, vakuum pot apod.). Jemněji mletá káva má daleko větší plochu, na kterou voda působí, takže se rychleji louhuje. Hrubé mletí se strukturou podobá přírodnímu hnědému cukru a takové mletí se používá pro přípravu kávy v chemexu nebo elektrickém dripperu apod. A nakonec velmi hrubá káva je využitelná pro přípravu kávy ve french pressu<sup>1,18</sup>.

### 1.1.7 Metody přípravy kávy

K přípravě kávy lze použít mnoho metod a dělí se na dvě základní: překapávaná přes filtr a louhovaná ve vodě. Překapávaná filtrovaná káva je nejoblíbenější metodou po celém světě. V posledních letech se také zvýšila spotřeba kávy s jednou dávkou, jako jsou různé kapsle. Každý způsob přípravy a podmínky jejich extrakce mají velký vliv na senzoryckou kvalitu a množství prospěšných látek v šálku. Do alternativních způsobů přípravy kávy patří například french press, moka konvička, překapávač, aeropress, chemex, vakuum pot, různé typy kávovarů a také nejstarší zástupce pro přípravu klasické turecké kávy, džezva (obrázek 7)<sup>1,18,19,20,21</sup>.

Pomocí french pressu lze dosáhnout výborné chuti kávy a zároveň patří k nejjednodušším metodám. Jedná se o skleněnou konvičku s pohyblivým filtrem, jehož úkolem je oddělit lógr od nápoje<sup>1,19,20,21</sup>.

Další metodou může být příprava kávy pomocí moka konvičky, kterou si oblíbili zejména milovníci espresa, neboť takto připravovaná káva má silnou a vyváženou chuť. Moka konvička funguje na principu vysokého tlaku vodní páry, který vhání vyextrahovanou kávu do horní části konvičky<sup>1,19</sup>.



Pomocí překapávače (tzv. dripperu nebo V60) lze doma připravit překapávanou neboli filtrovanou kávu ve větším množství pomocí papírového filtru<sup>1,19,20</sup>.

Electric dripper (známý také jako batch brew) je vhodný pro ty, kteří vypijí větší množství filtrované kávy. Princip těchto kávovarů je podobný jako u V60 nebo chemexu. Rozdíl je pouze v tom, že horkou vodu dávkuje přístroj. Dokáže vyrobit větší množství filtrované kávy najednou, a pokud se konvice nechá stát na kávovaru, tak ji rovnoměrně ohřívá a z kávy se tak nevytratí důležité chutě<sup>1</sup>.

Aero press nabízí jednoduchou a rychlou přípravu kávy, je podobný metodě french pressu, ale docílí se s ním plnější chuti. Skládá se ze tří hlavních částí a to plastového válce, pístu a sítka s filtrem<sup>1,19,20</sup>.

Za zmínku stojí také chemex. V podstatě se jedná o upravenou nádobu původně používanou v laboratoři, která je vyrobena ze skla a má tvar uprostřed zúžené vázy (tvar přesýpacích hodin). Metoda přípravy spočívá v tom, že se do jeho horní části nalévá voda, která se mísí s umletou kávou a překapává skrze filtr do spodní části nádoby<sup>1,19</sup>.

Vacuum pot u nás zatím není tolik známý, ale lze pomocí něj připravit ještě lepší chuť než pomocí výše jmenovaných metod. Skládá se ze dvou skleněných baněk, které jsou spojeny trubicí, mezi nimi se také nachází filtr. Do spodní baňky se nalije voda, která se pak při zahřívání mění v páru a putuje trubicí nahoru do horní baňky. V horní baňce dochází ke smísení vody a kávy, čímž se káva extrahuje. Když se odebere zdroj tepla, v horní baňce se mění pára na vodu a v dolní baňce vzniká vakuum, které nasaje tekutinu z horní baňky dolů přes filtr a výsledný nápoj je připraven<sup>1,19</sup>.

Džezva je nádobka specifického tvaru, která se tradičně vyrábí z mědi a dnes i z jiných materiálů, především nerezových. Má dlouhé držátko, díky kterému se s džezvou snadno manipuluje a nalézá využití zejména pro přípravu kvalitní turecké kávy<sup>19</sup>.

Další variantou jak připravit kávu je kávovar. Stroje s filtrační vložkou nebo na kapsle patří do automatických jednodávkových kávovarů. Pomocí stroje s filtračními vložkami se káva vaří po šálcích lisováním horké vody s nízkým tlakem přes malé filtrační vložky naplněné mletou kávou. Kapslové stroje pracují s vysokým tlakem a horká voda je protlačována přes malé hliníkové nebo plastové kapsle naplněné mletou kávou. Plně automatické kávovary pracují automaticky stisknutím tlačítka a obsahují kompletní přípravný systém s mlýnkem,

pěchem a pumpami. Kávová zrna se melou na kávovou sedlinu a poté se lisují. Ohřátá voda (asi 90 °C) se tlakem minimálně 900 kPa protlačí kávovým práškem. Kávová sedlina se pak automaticky vhodí do nádoby k tomuto účelu a uvařená káva jde přímo do přiloženého šálku<sup>1,19,20,21</sup>.



**Obrázek 7:** Metody přípravy kávy<sup>22</sup>

### 1.1.8 Chemické složení kávy

Kávová zrna obsahují sacharidy, lipidy, kyseliny, minerály, proteiny a další sloučeniny obsahující dusík jako kofein a trigonellin. Složení se může lišit podle druhu, odrůdy, prostředí, manipulace po sklizni, doby skladování, teploty a vlhkosti. Obecně zelená nepražená káva arabika obsahuje přibližně 60 až 70 % sacharidů, 15-20 % lipidů, 10-15 % bílkovin, cca 11 % kyselin, 3-5 % minerálních látek a 1% kofeinu. Káva robusta má obdobné chemické složení, ale obsahuje více kofeinu a méně sacharidů i lipidů<sup>2,23</sup>.

#### Kyseliny

Kyseliny jsou jednou z nejdůležitějších složek kávy a mají vliv na kvalitu tohoto nápoje. Tvoří až 11 % zelených a 6 % celkové hmoty pražených kávových zrn. V kávě jsou přítomny kyseliny chlorgenové (CGA) a další organické kyseliny (OA), ale mohou se vyskytovat i anorganické kyseliny, jako je kyselina fosforečná. Hlavní kyseliny v zelených kávových zrnech jsou kyseliny chlorgenová, citronová, jablečná a chinová. Kyselina citronová a jablečná se rozkládají na jantarovou, fumarovou, maleinovou a další. Během pražení vznikají další kyseliny a v pražené kávě jsou proto přítomny (společně s chlorgenovou, citronovou, jablečnou i chinovou kyselinou) octová, mravenčí, mléčná, jantarová, fumarová, glykolová, fosforečná nebo vinná kyselina. Sacharóza slouží jako hlavní prekurzor těchto kyselin<sup>23,24,25,26</sup>.

Kromě toho, že jednotlivé kyseliny přispívají ke kyselosti, mají také různé sensorické vlastnosti (tabulka 1). Kyselina citrónová, octová, mravenčí, jablečná, chinová, pyrohroznová, jantarová, fumarová, vinná a mléčná jsou kyseliny kyselé chuti, ale některé mají i jiné aromatické vlastnosti, jako je charakteristické octové aroma kyseliny octové, spálená karamelová chuť kyseliny pyrohroznové nebo štiplavé aroma kyseliny mravenčí. Rovněž mnoho kyselin, jako mravenčí, chinová, jantarová a kávová, má také výraznou hořkou chuť. Organické kyseliny mohou být také přínosem pro sensorickou kvalitu tím, že slouží jako zvýrazňovače chuti, což je vlastnost kyseliny fumarové, vinné a šťavelové<sup>23</sup>.

**Tabulka 1:** Sensorické vlastnosti vybraných kyselin vyskytujících se v kávě<sup>23</sup>

Kyselina	Senzorické vlastnosti
Citrónová	Kyselá, bez zápachu
Octová	Kyselá (více než ostatní), octové aroma
Mravenčí	Kyselá a hořká chuť, štiplavé aroma
Jablečná	Kyselá, bez zápachu
Chinová	Kyselá, hořká ale s nižší intenzitou
Pyrohroznová	Kyselá, aroma spáleného karamelu
Jantarová	Kyselá, hořká, bez zápachu
Šťavelová	Karamelové aroma, zesilovač chuti
Fumarová	Kyselá, bez zápachu, zvýrazňuje ovocné tóny
Vinná	Kyselá, bez zápachu, zvýrazňuje ovocné tóny
Mléčná	Kyselá, štiplavá
Glykolová	Lehké máslové aroma
Kávová	Intenzivní hořká

Kyselina chlorgenová a její deriváty jsou přirozeně se vyskytující sloučeniny, které se hromadí v zrně během zrání kávových plodů. Mají antioxidační účinky a rovněž přispívají k chuti a vůni kávového nápoje. Vznikají esterifikací hydroxylových skupin kyseliny chinové různými fenolovými kyselinami, zejména kyselinou kávovou, kyselinou ferulovou a kyselinou *p*-kumarovou. Protože kyselina chinová má čtyři hydroxylové skupiny dostupné pro esterifikaci, lze biosyntetizovat velké množství izomerů CGA. Tyto kyseliny se během procesu pražení odbourávají, což vede ke vzniku dalších kyselin, laktonů a různých fenolů. Tím se zvyšuje celková hořkost a aroma kávy<sup>3,12,23,27</sup>.

Kyselost kávy byla předmětem několika vědeckých kontroverzí. Pro Mazzafera<sup>28</sup> byla nízká kvalita kávy spojována s vysokou kyselostí a to především kvůli škodlivému kvašení. Franca<sup>29</sup> a kol. naznačují, že kvalita kávy s rostoucí kyselostí klesá. Výsledky Muschlera<sup>30</sup> poukazují na to, že potlačením vzrůstající kyselosti a obsahu sacharózy má káva jemnější chuť. Těkavé kyseliny (octová, propionová, máselná a valerová) se mohou podle Martinezovy<sup>31</sup> skupiny spolupracovníků podílet na nechtěné fermentaci. Fermentace před, během nebo po sklizni totiž způsobuje zhoršení kvality kávových fazolí. Kyselina octová, mléčná, máselná a propionová mají neblahé účinky na kvalitu kávy a naopak kyselost, kterou kávě dodávají kyseliny jablečná a citronová je žádoucí. Rogers<sup>94</sup> a spol. zjistili, že káva arabika obsahuje vyšší koncentraci kyseliny jablečné a citronové v porovnání s robustou, proto je také více ceněna a považována za kvalitnější. Sivetze a Desrosier<sup>32</sup> a také de Siqueira společně s de Abreau<sup>33</sup> se zabývali změnami pH kávy. Autoři uvádějí, že ideální pH kávy je 4,95-5,20, aby byla káva chutná. Fermentaci se pH snižuje a tím klesá i kvalita nápoje<sup>12</sup>.

## 1.2 Organické kyseliny

Největší zastoupení mezi organickými kyselinami mají karboxylové kyseliny, které se snadno skladují, lehce se s nimi manipuluje a v případě potřeby existuje řada osvědčených metod pro jejich přípravu. Karboxylové kyseliny jsou také vhodnými surovinami pro chemickou syntézu dalších sloučenin. Mohou v molekule obsahovat jednu karboxylovou skupinu (monokarboxylové kyseliny) nebo několik karboxylových skupin (polykarboxylové kyseliny). Řada karboxylových kyselin obsahuje současně další funkční skupiny, např. hydroxylovou skupinu (hydroxykyseliny), karbonylovou skupinu (oxokyseliny), aminoskupinu (aminokyseliny), merkaptoskupinu (merkaptokyseliny) a jiné. Kyseliny, které ve své molekule obsahují halogen, nejčastěji jeden nebo více atomů chloru, se nazývají halogenkyseliny<sup>34,35</sup>.

Body varu karboxylových kyselin se zvyšují s molekulovou hmotností a jejich těkavost i charakteristický zápach se snižují s rostoucí molekulovou hmotností. Rozpustnost karboxylových kyselin ve vodě rychle klesá s rostoucí délkou řetězce. Ve vodném roztoku se karboxylové kyseliny (C<sub>4</sub>-C<sub>11</sub>) chovají jako slabé kyseliny<sup>34,36,37</sup>.

Kyselost karboxylových kyselin je podle elektronové teorie podmíněna přítomností karbonylové skupiny, která usnadňuje disociaci hydroxyly za vzniku karboxylátového aniontu (rovnice 1). Sílu kyselin (jejich aciditu) vyjadřuje disociační konstanta K<sub>a</sub> (rovnice 2). Velikost disociační konstanty závisí na teplotě a druhu rozpouštědla (resp. jeho relativní

permitivitě). Acidita karboxylových kyselin leží mezi silnými minerálními kyselinami a kyselinou uhličitou<sup>34,35,36,37</sup>.

**Rovnice 1:** Disociace hydroxyly za vzniku karboxylátového aniontu<sup>35</sup>



**Rovnice 2:** Disociační konstanta kyselin<sup>35</sup>

$$K_a = \frac{[RCOO^-][H_3O^+]}{[RCOOH]}$$

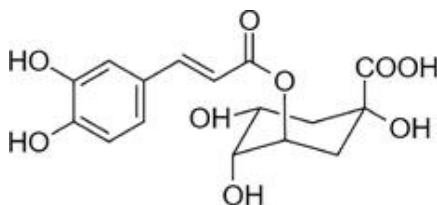
Reaktivita karboxylových kyselin je určena dvěma sousedními atomy kyslíku, konkrétně karbonylovým atomem kyslíku a atomem kyselé hydroxyskupiny. Nejčastějšími chemickými přeměnami karboxylových kyselin jsou reakce vyvolané štěpením vazby O-H karboxylové skupiny (vznik solí), dekarboxylace a reakce probíhající na uhlovodíkovém zbytku<sup>34,35</sup>.

### 1.2.1 Organické kyseliny vyskytující se v kávě

Jak již bylo uvedeno výše, hlavními kyselinami v zelených kávových zrnech jsou kyseliny chlorogenová, citronová, jablečná a chinová a primárními kyselinami v pražené kávě jsou kyselina chlorogenová, chinová, citrónová, jablečná, octová, mravenčí, mléčná, glykolová, jantarová, fumarová, fosforečná a může se vyskytovat také kyselina vinná a pyrohroznová.

#### Kyselina chlorogenová

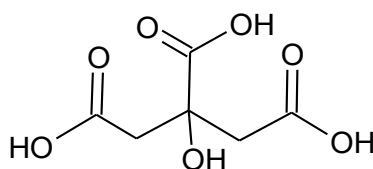
Kyselina chlorogenová je fenolický antioxidant přítomný v kávových zrnech, čaji ovoci, bramborách a zelenině. Má antibakteriální, antimutagení, protinádorové a antivirové účinky. Lidé, kteří pijí více než 1 šálek kávy denně, mohou přijmout až 1 g chlorogenových kyselin. Kyselina chlorogenová je tedy jedním z nejběžnějších, přirozeně se vyskytujících, prospěšných polyfenolů v rostlinách<sup>38,39,40,41</sup>.



**Obrázek 8:** Strukturní vzorec kyseliny 5-*o*-kafeylchinové (kyselina chlorogenová)<sup>23</sup>

## Kyselina citronová

Kyselina citronová je nejvýznamnějším zástupcem trikarboxylových hydroxykyselin. Je přirozenou součástí a běžným metabolitem rostlin a zvířat. Jedná se o bezbarvou látku s příjemnou, i když silně kyselou vůní. Nachází se v ovoci, nejvíce však v citrusových plodech. Kromě ovoce se vyskytuje také téměř ve všech rostlinných a živočišných druzích. Vzhledem ke své funkčnosti a přijatelnosti pro životní prostředí se kyselina citronová a její soli používají v pracích prostředcích, šamponech a kosmetice. Je nejrozšířenější organickou kyselinou v potravinách, nápojích a léčivech. V potravinářském průmyslu se přidává do výroby šumivých nápojů, alkoholických nápojů, chleba, cukrovinek, kečupu, želé, majonézy, konzervovaných ryb nebo taveného sýra. Pro lidský organismus je prospěšná pro urychlení metabolismu a aktivaci Krebsova cyklu. Průmyslově se vyrábí kvašením melasy, např. plísněmi *Aspergillus niger*, nebo se získává z citronové šťávy<sup>35,42,43,44</sup>.

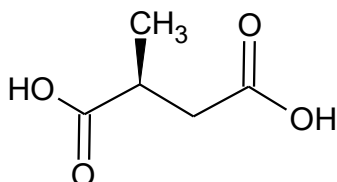


**Obrázek 9:** Strukturální vzorec kyseliny citronové<sup>43</sup>

## Kyselina jablečná

Kyselina jablečná je dikarboxylová kyselina, vyskytující se pouze jako L-(-)-isomer, který vzniká jako meziproduct v citrátovém cyklu. Je hojně obsažena především v ovoci a zelenině. Používá se v potravinářském, chemickém i farmaceutickém průmyslu (léčiva na kašel a zácpu). Běžně se používá jako okyselovadlo potravin a zvýrazňovač chuti, přísada do nápojů, pekařských výrobků a želé (označení E 296), často v kombinaci s kyselinou citronovou. Uvádí se, že chuť kyseliny jablečné se vytváří pomaleji než chuť kyseliny citronové a přetrvává déle, což je důvod, proč je vhodná k maskování pachuti umělých sladidel.

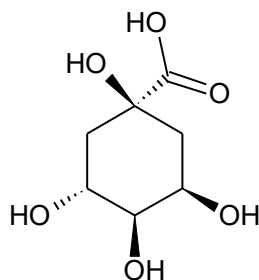
Komerčně se vyrábí dvěma procesy, buď chemickou syntézou hydratací kyseliny maleinové nebo fumarové za vzniku racemické směsi nebo enzymatickým procesem s použitím mikrobiálních buněk obsahujících fumarázu, které poskytují L-izomer kyseliny jablečné<sup>35,42,45,46,47,48</sup>.



**Obrázek 10:** Strukturální vzorec kyseliny jablečné<sup>48</sup>

### Kyselina chinová

Kyselina chinová je alicyklická organická kyselina, která je ve své volné formě široce rozšířená v rostlinách. Může se hromadit ve velkém množství v kávě, čaji a některých druzích ovoce. Tato kyselina je běžnou složkou naší stravy, je schopná přeměny na tryptofan a nikotinamid prostřednictvím mikroflóry gastrointestinálního traktu. Kyselina chinová je však většinou známá pro své konjugáty fenolových kyselin, jako jsou kyselina caffeoylchinové, přičemž hlavním příkladem je kyselina chlorogenová<sup>35,49,50</sup>.

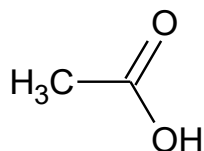


**Obrázek 11:** Strukturální vzorec kyseliny chinové<sup>50</sup>

### Kyselina octová

Kyselina octová je nejběžnější monokarboxylovou kyselinou vyskytující se v potravinách. Jedná se o čirou, bezbarvou, žíravou organickou kyselinu s ostrým štiplavým zápachem. Kyselina octová má široké uplatnění v potravinářském průmyslu (jako okyselovadlo a konzervační prostředek), v textilním průmyslu a farmacii. Kvašením vína se získá 4-12% roztok kyseliny octové známý jako ocet. Jakákoli šťáva obsahující cukr může být

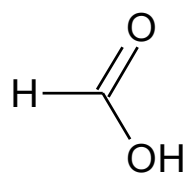
přeměněna na zředěnou kyselinu octovou bakteriálními nebo plísňovými procesy. Kromě aerobní fermentace cukrů se kyselina octová vyrábí chemickou syntézou z butanu nebo methanolu<sup>35,51,52,53</sup>.



**Obrázek 12:** Strukturální vzorec kyseliny octové<sup>35</sup>

### Kyselina mravenčí

Kyselina mravenčí je prvním členem homologické řady alkykarboxylových kyselin. Vyskytuje se jako volná i esterifikovaná především v zelenině, ovoci a také v alkoholických nápojích. Vzniká jako vedlejší produkt vedle ethanolu a kyseliny octové při kvašení některými mikroorganismy. Je to bezbarvá, vysoce žíravá kapalina s intenzivním a štiplavým zápachem. Je zcela mísitelná s vodou a mnoha polárními rozpouštědly, ale s uhlovodíky je mísitelná pouze částečně. Svůj název získala podle mravenců (lat. *Formica*) v jejichž obranných sekretech se přirozeně vyskytuje. Kyselina mravenčí a její soli jsou široce používané chemikálie. Používají se jako přísada do siláže, přidávají se do krmiv pro zvířata, nachází se v palivových člancích. Svě uplatnění nachází také v textilním průmyslu při barvení a někdy se používá jako konzervační činidlo<sup>35,54,55,56</sup>.



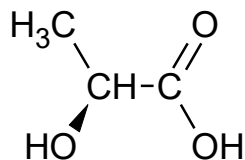
**Obrázek 13:** Strukturální kyseliny mravenčí<sup>35</sup>

### Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je nejjednodušší hydroxykarboxylová kyselina s asymetrickým atomem uhlíku. Vyskytuje se ve dvou opticky aktivních formách. Vzniká během mléčné fermentace, hromadí se v takto upravených mléčných produktech a na fermentovaném, nakládaném nebo soleném ovoci a zelenině. Kyselina mléčná má baktericidní účinky. Používá



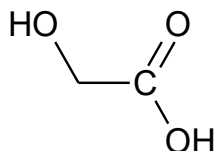
se k okyselení cukrovinek a nealkoholických nápojů v potravinářském průmyslu, dále se využívá v kosmetickém i farmaceutickém průmyslu. Kyselina mléčná je bezbarvá až slabě nažloutlá hyroskopická kapalina, která je produktem anaerobního metabolismu cukrů prakticky ve všech živých organismech<sup>35,42,57,58</sup>.



**Obrázek 14:** Strukturální vzorec L-mléčné kyseliny<sup>57</sup>

### Kyselina glykolová

Kyselina glykolová je nejjednodušší dvouuhlíkatá  $\alpha$ -hydroxykyselina (AHA kyselina) s alkoholovými i kyselými skupinami. Používá se v textilním průmyslu, v potravinářském průmyslu jako dochucovadlo a konzervační prostředek. Je přítomna v mnoha rostlinách bohatých na cukr a spolu s jinými hydroxykarboxylovými kyselinami je prekurzorem lipidů. Působí pozitivně na pokožku, zlepšuje akné a napomáhá zamezit vzniku vrásek i pigmentových skvrn<sup>59,60,61</sup>.

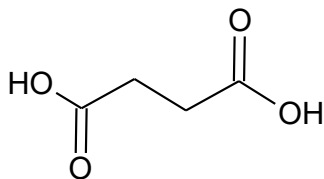


**Obrázek 15:** Strukturální vzorec kyseliny glykolové<sup>59</sup>

### Kyselina jantarová

Jantarová kyselina patří mezi alifatické dikarboxylové kyseliny. Běžně se vyskytuje v živočišných organismech a mikroorganismech. Lze ji nalézt také v zelenině, ovoci (rybíz, jahody), pramenité vodě, kávě, pivě nebo ve víně. Vzniká při alkoholové fermentaci a také při chemické a biochemické oxidaci tuků. Tato kyselina se uplatňuje v mnoha průmyslových odvětvích. Ve farmaceutickém průmyslu slouží jantarová kyselina jako přírodní prolečivo. V zemědělství je známým regulátorem růstu a lze ji použít pro zakořenění rostlin. V potravinářském průmyslu lze kyselinu jantarovou využít

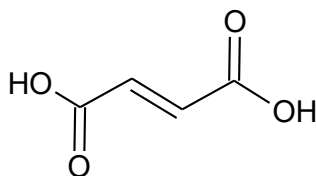
jako zvýrazňovač chuti v nápojích nebo katalyzátor při přípravě koření. Kyselina jantarová může také sloužit jako prekurzor pro výrobu polymerů na biologické bázi.<sup>35,62,63,64</sup>



**Obrázek 16:** Strukturální vzorec kyseliny jantarové<sup>35</sup>

### Kyselina fumarová

Kyselina fumarová patří mezi nenasycené dikarboxylové kyseliny a vzniká v ornithinovém cyklu. Vyskytuje se v malém množství prakticky ve všech živočišných i rostlinných organismech a v některých houbách, Vzniká také jako produkt neenzymatické deaminace asparagové kyseliny. Spolu s isomerní maleinovou kyselinou vzniká pyrolýzou jablečné kyseliny během termických procesů jako třeba při pražení kávy<sup>35</sup>.

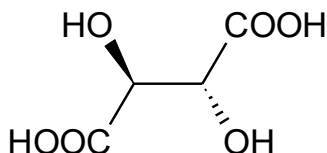


**Obrázek 17:** Strukturální vzorec kyseliny fumarové<sup>35</sup>

### Kyselina vinná

Kyselina vinná je směs dikyseliny a dialkoholu a je to významný zástupce hydroxydikarboxykolých kyselin. V přírodě se vyskytuje prakticky výhradně jako L-(+)-vinná kyselina, ojediněle i jako D-(-)-vinná. V hroznech a dalším ovoci vzniká z D-glukosy. Racemická směs obou isomerů, která se nazývá hroznová kyselina, byla prokázána ve šťávě hroznů. Sůl kyseliny hroznové je špatně rozpustná a vylučuje se jako tzv. vinný kámen během kvašení vína. Kyselina vinná je široce používána ve farmaceutickém průmyslu jako pomocná látka a pufrovací činidlo, v medicíně pro detekci cukrů a aldehydů, v potravinách a nápojích

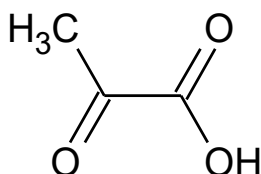
jako okyselovadlo i při výrobě džusů a nealkoholických nápojů. Její největší množství je obsaženo v hroznech. Pro lidský organismus je nepostradatelná svými antioxidačními vlastnostmi<sup>35,42,65,66</sup>.



**Obrázek 18:** Strukturální vzorec *meso*-vinné kyseliny<sup>65</sup>

### Kyselina pyrohroznová

Kyselina pyrohroznová, náležící do skupiny alifatických oxokyselin, je u živočichů i rostlin klíčovou sloučeninou metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů. Kyselina pyrohroznová nachází své uplatnění ve farmaceutickém, potravinářském i agrochemickém průmyslu. V živém organismu je konečným produktem vzniklým jako výsledek oxidace glukózy, která se prostřednictvím Krebsova cyklu oxiduje na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Protože pyrohroznová kyselina hraje klíčovou roli v procesu metabolismu, může být důležitým biomarkerem mnoha onemocnění (např. biomarker pro diabetes 2. typu)<sup>35,67</sup>.



**Obrázek 19:** Strukturální vzorec kyseliny pyrohroznové<sup>35</sup>

### **1.2.2 Stanovení organických kyselin v potravinách a nápojích**

Organické kyseliny v potravinách vznikají díky biochemickým procesům (např. růst bakterií). Přidávají se do potravinových produktů, aby upravily nebo vylepšily jejich chuť, a tak jsou vzorky potravin a nápojů hlavní oblastí, kde se stanovují organické kyseliny. Běžné metody pro stanovení organických kyselin jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)<sup>26,27,68-73,88</sup> pro analýzu netěkavých organických kyselin nebo plynová chromatografie (GC)<sup>74,75,76</sup> pro ty těkavé. Nejčastěji používaným detektorem, ve spojení s HPLC, pro analýzu organických kyselin v potravinách, je v současné době UV-Vis. Elektromigrační techniky,

zejména kapilární elektroforézu (CE)<sup>77-82</sup>, lze také využít pro stanovení organických kyselin. Metoda CE se vyznačuje vysokou separační schopností, dobrou reprodukovatelností, rychlou analýzou a menší spotřebou chemických činidel oproti HPLC. Využitelná je také iontově-výměnná chromatografie (IEC)<sup>68</sup> nebo chromatografie na tenké vrstvě (TLC)<sup>25,70</sup>. Alternativou k separačním metodám mohou být metody spektrofotometrické, spektrální, titrační nebo enzymatické<sup>83-87</sup>.

### 1.2.3 Stanovení organických kyselin v kávě

Gulab N. Jham a spol.<sup>68</sup> se zabývali stanovením kyseliny šťavelové, jablečné, jantarové, fumarové, citronové, vinné a chinové v kávě pomocí HPLC v systému reverzních fází. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C a měření probíhalo při 210 nm. Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok s 1% kyselinou fosforečnou. Carl Isabel Rodrigues a spol.<sup>69</sup> stanovovali v kávě stejnou technikou sedm organických kyselin (octová, citronová, mravenčí, jablečná, pyrohroznová, jantarová, chinová). Vzorky byly upravovány pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). SPE metoda byla aplikována v dalších studiích i na jiné potraviny jako například ovocné šťávy<sup>88</sup>, med<sup>71</sup> nebo pivo<sup>72</sup>.

C. Lentner, F. E. Deatherage a spol. stanovovali organické kyseliny v extraktech kávy v závislosti na stupni pražení pomocí rozdělovací chromatografie na silikagelu a papírové chromatografie. V zelené i pražené kávě byly nalezeny kyseliny octová, propionová, máselná, valerová, jablečná, citrónová, chinová, kávová, chlorgenová, isochlorgenová a neochlorgenová. Kyselina mravenčí byla nalezena pouze v pražené kávě. Převládající kyseliny byly chlorgenová a citrónová. Kyselina kávová a chinová byly přítomny pouze ve stopovém množství<sup>25</sup>.

V další studii byla použita metoda HPLC ve spojení s DAD. Vzorky kávy byly analyzovány v izokratickém režimu s použitím fosfátového pufru upraveného na pH 2,5. Organické kyseliny byly analyzovány při dvou vlnových délkách (210 a 230 nm). Pro kyselinu chlorgenovou a její deriváty byla teplota kolony nastavena na 40 °C, byla použita gradientová eluce s vodou (+0,1% mravenčí kyselina) a methanolem (+0,1% mravenčí kyselina) jako mobilní fáze<sup>26</sup>.

Pomocí metody kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektroskopií (LC-MS/MS) S. Colombari a spol. identifikovali a kvantifikovali 11 chlorgenových kyselin (CGA) v pražené kávě. Výsledky stejného vzorku kávy byly

porovnány s analýzou provedenou ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí diodového pole (UHPLC-DAD). Kolona byla vyhřívána na 40 °C. Byl použit eluční gradient vodné kyseliny mravenčí (0,1% v/v) a jako organická fáze acetonitril při průtoku 0,4 ml/min<sup>27</sup>.

Studie L. Česlové, J. Klikarové a B. Řehákové se zabývala stanovením kofeinu, kyseliny chlorgenové a jejích izomerů (kyselina neochlorgenová a kryptochlorgenová) v pražené, zelené i bezkofeinové kávě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému reverzních fází se spektrofotometrickou detekcí. V použité metodě kyseliny byly separovány během šesti minutové analýzy s velmi dobrým rozlišením<sup>93</sup>.

V další studii byl analyzován obsah kyseliny chlorgenové v zelené kávě a byla srovnávána metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC) s referenční HPLC-UV. Methanolové extrakty káv, standardy kyseliny chlorgenové a slepé vzorky byly aplikovány na TLC destičky s normálními fázemi na silikagelu v objemech 5 a 10 µl. Při HPLC měření byly vzorky káv zředěny methanolem (v/v 1:1). Kvantitativní HPLC měření kyseliny chlorgenové bylo provedeno za podmínek izokratické eluce (95 % A a 5 % B), poté gradientová eluce (5-100 % B). Rozpouštědlem A byl vodný roztok kyseliny octové a rozpouštědlem B byl methanol. Detekce byla provedena při 254 a 325 nm<sup>70</sup>.

W. J. Hughes a T. M. Thorpe a spol. se zabývali stanovením organických kyselin, kofeinu i sacharózy pomocí kapilární plynové chromatografie v dimethylsulfoxidových extraktech pražených a mletých káv. Postup byl také aplikován pro stanovení chlorgenových kyselin. Podle výsledků analýzy byl zpracován přehled různých značek kávy, kde byly uvedeny rozdíly v obsahu kyseliny chlorgenové a sacharózy v jednotlivých vzorcích<sup>74</sup>.

V. Galli a C. Barbas použili pro analýzu organických kyselin v kávě metodu kapilární elektroforézy (CE). Jako základní elektrolyt byl připraven 500mM fosfátový pufr při pH 6,5 s 0,5mM povrchově aktivní látkou cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB). Detekce byla provedena při 200 nm. Na kapiláru bylo vkládáno napětí -10 kV. Teplota kapiláry byla nastavena na 25 °C. Proud generovaný při takových podmínkách byl 115 µA<sup>77</sup>.

### 1.2.4 Úprava vzorku pomocí extrakce pevnou fází

Vzorky potravin mají složitou matici, která obsahuje mnoho dalších látek a to představuje velkou překážku pro přímou analýzu vzorku. Pro zvýšení citlivosti stanovení je nezbytné, aby se vzorek před analýzou upravil, zakonzentroval, a tím se eliminovaly nežádoucí maticové efekty. Při úpravě vzorků pro analýzu potravin, biologických vzorků a vzorků životního prostředí se využívá zejména extrakce na pevné fázi (SPE)<sup>89,90</sup>.

Extrakce a zakonzentrování analytů je v tomto případě založena na distribuci rozpuštěných látek mezi tuhou fází (extrakční kolonka) a kapalnou fází (vzorek obsahující analyt). Separace různých složek vzorku může být výsledkem rozdílných polarit, rozdílů ve velikosti molekul nebo rozdílů s ohledem na kapacitu iontové výměny. Princip spočívá v zachycení sledovaných analytů, které jsou obsaženy v kapalně fázi, na speciálním sorbentu díky silným, ale vratným interakcím mezi analytem a povrchem stacionární fáze. Mezi typické interakce patří hydrofobní van der Waalsovy síly, polární vodíkové můstky, síly dipól-dipól nebo iontově výměnné interakce. Sorbent je umístěn mezi fritami v extrakční minikolonce určené na jedno použití<sup>89,90,91</sup>.

Cílem tohoto postupu je jednak odstranění interferujících látek obsažených v matici a jednak izolace a zakonzentrování stanovovaných látek. Díky jednoduchosti a snadnému použití SPE vyústil zájem o tuto techniku ke komerčnímu používání jednorázových minikolonek. Tyto kolonky jsou plněny různými sorbenty o různé velikosti částic. K přetlačení vzorku a promývacího roztoku přes kolonku je díky velikosti částic možné použít nízkého tlaku. Jako sorbenty se nejčastěji používají modifikovaný i nemodifikovaný oxid křemičitý, polymery a další. Pro obrácenou fázi jsou k dispozici oktadecyl ( $C_{18}$ ), oktyl ( $C_8$ ), ethyl ( $C_2$ ), cyklohexyl, fenyl nebo butyl ( $C_4$ ). Pro normální fázi se používá oxid křemičitý modifikovaný skupinami kyano ( $-CN$ ) amino ( $-NH_2$ ) nebo dioly ( $-COHCOH$ ). Pro adsorpci se využívá silikagel ( $-SiOH$ ), florasil ( $MgSiO_3$ ), oxid hlinitý ( $Al_2O_3$ ). K iontové výměně se používá skupin amino ( $-NH_2$ ), kvartérního aminu ( $N^+$ ), karboxylové skupiny ( $-COOH$ ), aromatické sulfonové kyseliny ( $ARSO_2OH$ ) nebo polyethyleniminu ( $-(CH_2 CH_2NH)_n-$ )<sup>91,92</sup>.

Velmi důležitým kritériem umožňující vysokou opakovatelnost analytických výsledků je zajištění konstantní kvality různých šarží jednorázových SPE kolonek. K tomuto účelu se jako charakteristika SPE kolonky používá kapacita kolonky. Kapacita se vyjadřuje jako poměr mg analytu na g sorbentu a znamená, že za stejných podmínek různé šarže

kolonek adsorbují a desorbují stejné množství analytu. Stejnou kvalitou šarží dnes většinou firmy garantují certifikovaným procesem výroby SPE kolonek<sup>91</sup>.

Metoda SPE zahrnuje čtyři po sobě jdoucí kroky<sup>91</sup>.

1. Kondicionace sorbentu. V tomto kroku se SPE kolonka připraví na interakci se vzorkem. Často se provádí methanolem, vodou nebo pufrům. Jde o nezbytný krok pro reprodukovatelnou sorpci analytů.
2. Aplikace vzorku. Vzorek se pomocí vakuu prosaje přes kolonku. Sledované analyty se zachytávají v úzké zóně na sorbentu. Část interferujících látek z matrice projde kolonkou přímo do odpadu, část se adsorbuje.
3. Promytí. Zachycené interferující látky matrice jsou odstraněny z povrchu stacionární fáze.
4. Eluce. V tomto kroku dochází k selektivní desorpci analyzovaných látek pomocí vhodného rozpouštědla.

Mezi hlavní výhody SPE patří jednoduchost, snadná obsluha, mnohem menší spotřeba organických rozpouštědel, možnost automatizace a miniaturizace metody. U miniaturizovaných technik došlo k výraznému snížení objemu organických rozpouštědel i vzorku a do této skupiny patří například mikroextrakce na pevné fázi (SPME), SPE na špičce pipety, SPE ve zkumavce nebo mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím injekční stříkačky (MEPS)<sup>89,90</sup>.

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a zařízení

Pro analýzu organických kyselin byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series (Agilent, Palo Alto, CA, USA) skládající se ze zásobníků mobilní fáze, duálního vysokotlakého čerpadla, odplyňovače mobilní fáze, autosampleru, termostatu kolony a detektoru diodového pole. Pro separace v módu reverzních fází byly testovány následující kolony: Luna Omega PS (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm), Kinetex EVO C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm), Luna Omega Polar C18 (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm), všechny od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA), dále ACE C18-PFP (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm) od firmy Avantor VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika). Pro HILIC separace byla využita kolona SeQuant ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, velikost částic 3,5 μm) od firmy Merck Milipore (Darmstadt, Německo).

Analyzované vzorky a standardy pro HPLC-DAD analýzu byly extrahovány pomocí vakuového zařízení Visiprep Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Pro SPE extrakci byly použity kolonky Discovery DSC-SAX 500 mg/3 ml (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Dále byl pro analýzu organických kyselin využit přístroj pro kapilární elektroforézu Capel-205 firmy Lumex (Praha, Česká republika) skládající se ze zdroje vysokého napětí, kapiláry (délka 53/60 cm, průměr 75 μm), elektrod ponořených do roztoku se základním elektrolytem, termostatu pro ohřev i chlazení, DAD a autosampleru.

K navažování standardních látek a vzorků kávových zrn byly využity analytické váhy od firmy Sartorius model A 200 S (Ústí nad Labem, Česká republika). Pro pipetování objemů v rozsahu jednotek až tisíců μl byly využity automatické pipety od firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Na promíchání analytů ve vialkách či Eppendorf mikrozkušavkách byl využit vortex IKA Yellowline TTS2 Vortex-Gemini BV (Staufen, Německo). Pražená i zelená kávová zrna byla namleta elektrickým mlýnkem Eta Magico (Praha, Česká republika). Pro ohřev vody, použité na přípravu vzorku, byl využit elektrický vařič Sencor SCP (Praha, Česká republika). Pro filtraci vzorků byly využity papírové skládané filtry a dodatečná centrifugace byla uskutečněna pomocí centrifugy Biofil od firmy Merci (Brno, Česká republika).



## 2.2 Použité chemikálie a rozpouštědla

Standardy stanovovaných organických kyselin byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Německo). K přípravě roztoků standardů byly použity následující kyseliny:

### Vybrané organické kyseliny

- citronová (99%)
- fumarová (99%)
- jablečná ( $\geq 99,5\%$ )
- jantarová ( $\geq 99,5\%$ )
- mléčná (85 %)
- mravenčí ( $\geq 98\%$ )
- octová ( $\geq 99,8\%$ )
- pyrohroznová ( $\geq 98\%$ )
- vinná (99%)

### Chlorgenové kyseliny

- chlorgenová (95%)
- neochlorgenová ( $\geq 98\%$ )
- kryptochlorgenová ( $\geq 98\%$ )

### Další použité chemikálie a rozpouštědla:

- dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát) (98-100,5%), Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- hydrogenfosforečnan disodný (dihydrát) ( $\geq 99,5\%$ ), Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- octan amonný (98%) Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- kyselina fosforečná 85% Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- methanol (gradient grade pro HPLC,  $\geq 99,9\%$ ), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- acetonitril (gradient grade pro HPLC,  $\geq 99,9\%$ ), Honeywell (Praha, Česká republika)
- kyselina sírová 96% p.a. , Penta (Chrudim, Česká republika)
- hydroxid sodný, Penta (Chrudim, Česká republika)

- hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ( $\geq 98\%$ ) Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- deionizovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice)

### 2.3 Analyzované vzorky

Bylo analyzováno celkem 10 druhů kávy arabika. Od každého druhu byla proměřena pražená i zelená kávová zrna. Káva byla získána z pardubické pražírny ZRNO44. Dále byl analyzován jeden vzorek pražené kávy robusta a jeden vzorek pražené bezkofeinové kávy. Tyto kávové vzorky byly zakoupeny z českých obchodů. Dohromady bylo pořízeno 22 vzorků kávy (tabulka 2), které byly po celou dobu od namletí uchovány v papírových obalech, suchu a temnu.

**Tabulka 2:** Seznam obdržených vzorků

<i>Označení (P=pražená káva; Z= zelená káva)</i>	<i>Název</i>	<i>Země původu</i>
<b>P1, Z1</b>	Barbosa	Brazílie
<b>P2, Z2</b>	Bombe	Ehiopie
<b>P3, Z3</b>	El Diviso	Kolumbie
<b>P4, Z4</b>	Gitwe	Rwanda
<b>P5, Z5</b>	Decaf	neuvedeno
<b>P6, Z6</b>	Vzorek č. 6	Peru
<b>P7, Z7</b>	Las Lajas	Kostarika
<b>P8, Z8</b>	Vzorek č. 8	Indonesia
<b>P9, Z9</b>	Hugo Gualaco	Kolumbie
<b>P10, Z10</b>	Luis José Valdés	Kolumbie
<b>P11</b>	Tchibo Dekaf (bez kofeinu)	Brazílie
<b>P12</b>	Marila Standard (robusta)	neuvedeno

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Úprava vzorků k analýze

Vzorky kávy pro analýzu byly připraveny podle normy tzv. *cuppingu* (degustace kávy)<sup>1</sup>. Na analytických vahách bylo do Erlenmayerovy baňky naváženo 9 g namleté kávy a zalito 150 ml vody ohřáté na  $94 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za občasného míchání se vzorky ponechaly zchladnout a poté byly zfiltrány přes papírový skládaný filtr. K analýze bylo odebráno 1,5 ml od každého vzorku do mikrozku mávek Eppendorf a tato množství byla centrifugována po dobu 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Následně byly vzorky naředěny a po celou dobu až do analýzy uchovávány v lednici.

Takto připravené vzorky byly pro analýzu HPLC-DAD dále upraveny metodou SPE pro jejich zakoncentrování a přečistění. Byl aplikován postup vycházející z práce E. Kukleva<sup>95</sup>. Anexové kolonky byly aktivovány 2 ml 100% MeOH a 2 ml redestilované vody. Byly aplikovány 2 ml vzorku (padesátkrát ředěného) a poté následovalo promytí 2 ml redestilované vody. Následně se kolonka nechala vysušit proudem vzduchu po dobu 5 minut. K eluci byl potřeba 1 ml 0,5M kyseliny sírové. Tento postup byl aplikován na standardy kyselin i vzorky kávy.

Vzorky pro analýzu vybraných organických kyselin metodou CZE-DAD a pro analýzu chlorgenových kyselin metodou HPLC-DAD nebyly před měřením upravovány metodou SPE a pouze byly po centrifugaci příslušně naředěny (vzorky pro analýzu organických kyselin metodou CZE-DAD naředěny pětkrát a vzorky pro analýzu chlorgenových kyselin metodou HPLC-DAD naředěny padesátkrát).

## 2.4.2 Příprava standardních a kalibračních roztoků

Organické kyseliny byly kvantifikovány na základě metody vnější kalibrace. Zásobní roztoky standardů byly připraveny navážením 100 mg jednotlivých standardů vybraných kyselin a rozpuštěním v 10 ml deionizované vody. Kalibrační řada vybraných organických kyselin pro analýzu HPLC-DAD byla připravena pro koncentrační rozsah 2,5; 5; 10; 15; 25; 50; 100; 200; 250; 500 mg/l. Dále byl připraven zásobní roztok kyseliny chlorgenové o koncentraci 10 mg/ml a zásobní roztoky kyselin neochlorgenové a kryptochlorgenové o přibližné koncentraci 1 mg/ml. Pro kvantifikaci chlorgenových kyselin, analyzovaných na HPLC-DAD, byla připravena kalibrační řada standardu kyseliny chlorgenové ve vodném prostředí na následujících koncentračních úrovních: 1; 5; 10; 15; 25; 50; 100; 150; 200 mg/l. Kalibrační řada organických kyselin pro CZE-DAD byla připravena ve vodném prostředí na koncentračních úrovních 10; 15; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 mg/l. Směs a jednotlivé standardy vybraných organických kyselin o koncentraci 50 mg/l, pro ověření využitelnosti metody HILIC, byly rozpuštěny v 80% acetonitrilu.

## 2.4.3 Stanovení organických kyselin ve vzorcích kávy metodou HPLC-DAD

Stanovení vybraných organických kyselin bylo uskutečněno optimalizovanou HPLC-DAD metodou (v módu reverzních fází) za podmínek uvedených v tabulce 3. Pro stanovení chlorgenových kyselin byla dodatečně optimalizována další HPLC-DAD metoda na reverzních fázích, jejíž podmínky jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 3:** Podmínky pro měření organických kyselin pomocí HPLC-DAD

<b>Kolona</b>	Luna Omega Polar C18 (150×3 mm, velikost částic 3 μm)
<b>Mobilní fáze A</b>	Pufř o pH 2 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
<b>Mobilní fáze B</b>	80% MeOH
<b>Profil izokratické analýzy</b>	0 % B – 6 minut, následný promývací krok 100 % B – 7,5 min
<b>Dávkovaný objem</b>	3 μL
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,5 ml/min
<b>Teplota kolony</b>	30 °C
<b>Detektor</b>	DAD
<b>Vlnová délka detekce</b>	210 nm

**Tabulka 4:** Podmínky pro měření chlorgenových kyselin pomocí HPLC-DAD

<b>Kolona</b>	ACE 3 C18-PFP (150×3 mm, velikost částic 3 μm)
<b>Mobilní fáze A</b>	Deionizovaná voda + 0,1 % kyselina octová
<b>Mobilní fáze B</b>	Acetonitril + 0,1 % kyselina octová
<b>Profil izokratické analýzy</b>	10 % B – 7,5 min, následný promývací krok 100 % B – 10 min
<b>Dávkovaný objem</b>	3 μL
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,7 ml/min
<b>Teplota kolony</b>	40 °C
<b>Detektor</b>	DAD
<b>Vlnová délka detekce</b>	325 nm

#### 2.4.4 Stanovení organických kyselin ve vzorcích kávy metodou CZE-DAD

Pro stanovení vybraných organických kyselin byla optimalizována metoda CZE-DAD. Podmínky této metody jsou shrnuty v tabulce 5.

**Tabulka 5:** Podmínky pro měření organických kyselin pomocí CZE-DAD

<b>Kapilára</b>	53/60 cm, 75μm
<b>Základní elektrolyt</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5mM CTAB, 5 % MeOH
<b>Dávkovaný objem</b>	5 μL
<b>Teplota kapiláry</b>	25 °C
<b>Detektor</b>	DAD
<b>Vlnová délka detekce</b>	200 nm
<b>Vkládané napětí</b>	-10 kV
<b>Proud během analýzy</b>	71 μA

### 2.4.5 Stanovení organických kyselin metodou HILIC

Byla testována využitelnost metody chromatografie hydrofilních interakcí pro separaci standardů vybraných organických kyselin. Optimální separace standardních látek bylo dosaženo za podmínek uvedených v tabulce 6.

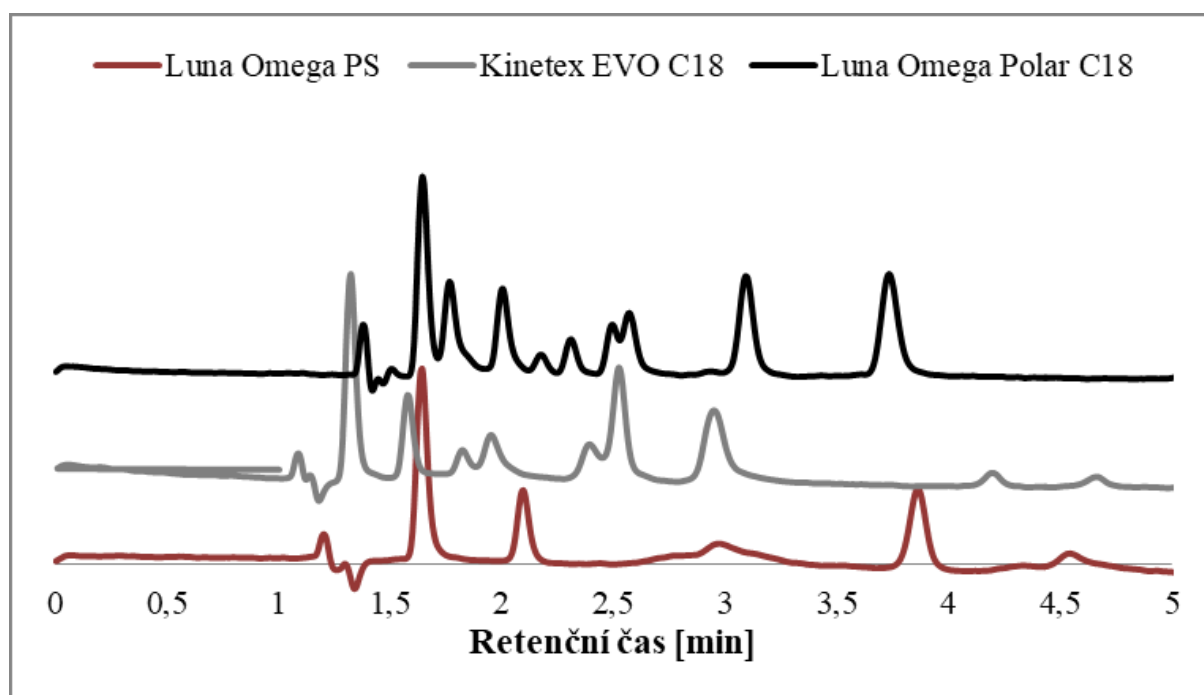
**Tabulka 6:** Podmínky pro měření organických kyselin pomocí HILIC

<b>Kolona</b>	SeQuant ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, velikost částic 3,5 μm)
<b>Mobilní fáze A</b>	Deionizovaná voda + 10mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze B</b>	Acetonitril
<b>Profil izokratické analýzy</b>	90 % B – 7 min
<b>Dávkovaný objem</b>	3 μL
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,5 ml/min
<b>Teplota kolony</b>	30 °C
<b>Detektor</b>	DAD
<b>Vlnová délka detekce</b>	210 nm

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Optimalizace HPLC-DAD metody pro vybrané organické kyseliny

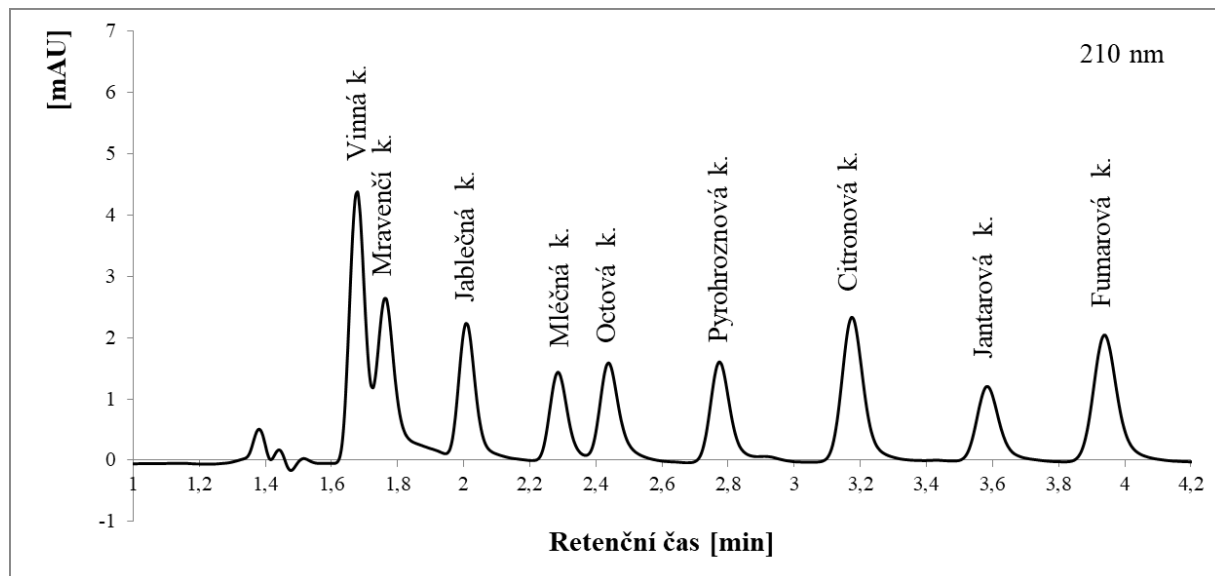
Na základě dostupných zdrojů<sup>26,69</sup> byla jako první metoda pro analýzu vybraných organických kyselin zvolena kapalinová chromatografie na reverzních fázích v kombinaci s DAD. Pro tyto účely byly vybrány tři chromatografické kolony: Luna Omega PS (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm), Kinetex EVO C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm) a Luna Omega Polar C18 (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm). Jako výchozí mobilní fáze byl zvolen fosfátový pufr (pH 2,2) připravený z 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 85% kyseliny fosforečné. Separace standardů probíhaly v režimu izokratické analýzy s 0 % mobilní fáze B. Porovnání separace organických kyselin na třech testovaných kolonách je prezentováno na obrázku 20.



**Obrázek 20:** Chromatogramy analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřených HPLC-DAD metodou na třech testovaných kolonách

Optimálních výsledků bylo dosaženo na koloně Luna Omega Polar C18. Na této koloně byl dále testován vliv pH mobilní fáze (2; 2,2 a 2,4) a teploty kolony (20; 30 a 40 °C). Při hodnotách pH 2,2 a 2,4 docházelo k dobrému rozdělení jednotlivých organických kyselin, vyjma dvojice kyselina vinná a kyselina mravenčí. Tato dvojice látek byla alespoň částečně rozdělena při použití mobilní fáze o pH 2. Vliv teploty na průběh separace se zdál

být málo významný, proto byla pro konečnou metodu (obrázek 21) zvolena střední hodnota, tedy 30 °C.



**Obrázek 21:** Chromatogram analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou

**Podmínky analýzy:** kolona Luna Omega Polar C18 (150×3 mm, velikost částic 3 μm); MF A: pufr o pH 2 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); MF B: 80% MeOH; nástřik 3 μL; průtok MF 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; DAD detekce při 210 nm; izokratická analýza 0 % B - 6 minut, následný promývací krok 100 % B – 7,5 min

Ke kvantifikaci vybraných organických kyselin ve vzorcích zelených i pražených kávových zrn byly připraveny kalibrační roztoky. Kalibrační řada jednotlivých standardů organických kyselin byla připravena v koncentračním rozsahu 2,5-500 mg/l a pro kyselinu fumarovou 0,01-2 mg/l. Graf kalibračních závislostí (z ploch píků) pro vybrané standardy organických kyselin je uveden v příloze 1. Na základě směrnice kalibrační křivky z výšek píků a šumu detektoru, byly vypočítány limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) pro jednotlivé kyseliny podle rovnic 3 a 4. Parametry kalibračních závislostí společně s limity detekce i kvantifikace jsou shrnuty v tabulce 7.



**Rovnice 3:** Vztah pro výpočet limitu detekce LOD

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

h = šum detektoru; m = směrnice kalibrační křivky (závislost výšky píku na koncentraci)

**Rovnice 4:** Vztah pro výpočet limitu kvantifikace LOQ

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

h = šum detektoru; m = směrnice kalibrační křivky (závislost výšky píku na koncentraci)

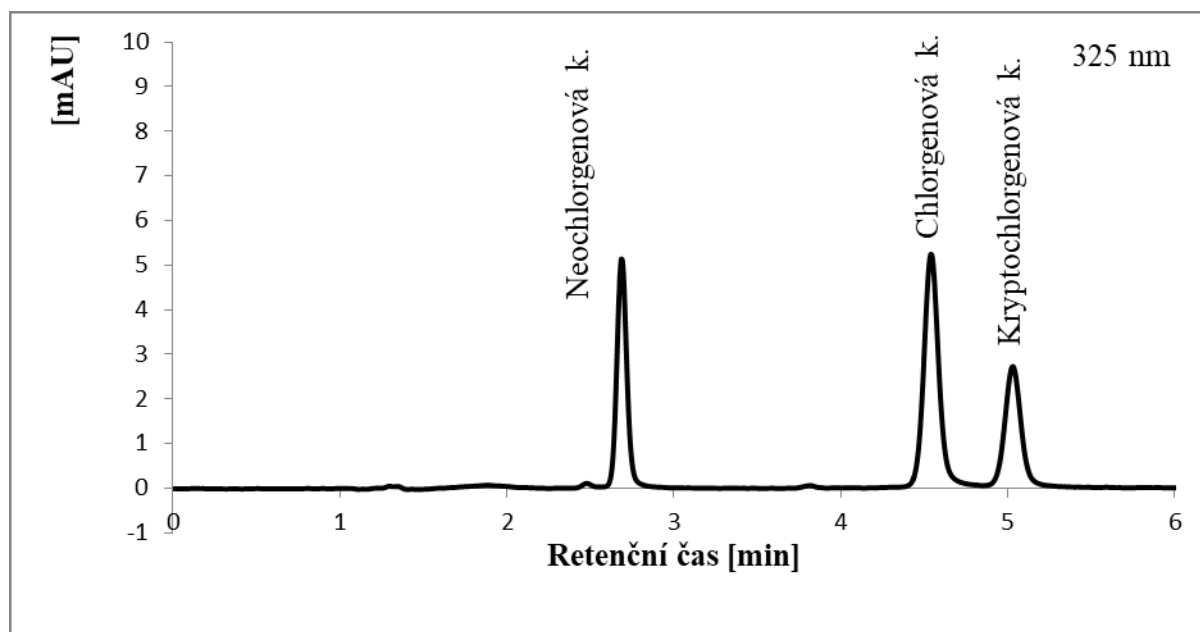
**Tabulka 7:** Parametry kalibračních závislostí a limity LOD, LOQ pro jednotlivé standardy organických kyselin analyzovaných HPLC-DAD metodou

<i>Kyselina</i>	<i>Rovnice regrese</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>LOD (mg/l)</i>	<i>LOQ (mg/l)</i>
<b>Vinná</b>	y = 0,2921x - 0,3349	0,9997	0,13	0,45
<b>Mravenčí</b>	y = 0,1809x - 0,2224	0,9996	0,23	0,77
<b>Jablečná</b>	y = 0,1544x - 0,2321	0,9997	0,27	0,90
<b>Mléčná</b>	y = 0,0936x - 0,0445	0,9997	0,49	1,65
<b>Octová</b>	y = 0,0868x + 0,0304	0,9996	0,48	1,60
<b>Pyrohroznová</b>	y = 0,1438x - 0,2024	0,9999	0,36	1,20
<b>Citronová</b>	y = 0,2567x - 0,3738	0,9997	0,21	0,69
<b>Jantarová</b>	y = 0,1256x - 0,1132	0,9998	0,45	1,49
<b>Fumarová</b>	y = 0,2111x - 0,1747	0,9998	0,30	0,98

### 3.2 Optimalizace HPLC-DAD metody pro chlorgenové kyseliny

Speciální skupinou kávových organických kyselin jsou chlorgenové kyseliny. Metoda kapalinové chromatografie v módu reverzních fází je již spolehlivě zavedenou technikou pro jejich analýzu v kávě<sup>26,27,70,93</sup>. Z tohoto důvodu byla pro chlorgenové kyseliny optimalizována pouze metoda HPLC-DAD a metodou HILIC ani CZE-DAD nebyly dále proměřovány. V kávových zrnech jsou přítomny zejména neochlorgenová (3-CQA), kryptochlorgenová (4-CQA) a chlorgenová kyselina (5-CQA). Analyzovány proto byly pouze tyto tři hlavní chlorgenové kyseliny.

Pro jejich analýzu byla využita kolona ACE 3 C18-PFP (150×3 mm, velikost částic 3 μm). Jako mobilní fáze A byla použita deionizovaná voda s 0,1 % kyseliny octové a mobilní fází B byl acetonitril s přídavkem 0,1 % kyseliny octové. Testovány byly izokratické analýzy 20 % B, 15 % B a následně 10 % B. Při použití 10 % B již docházelo k úplné separaci všech tří chlorgenových kyselin v přijatelném čase, proto byla tato úroveň zvolena jako optimální (obrázek 22).



**Obrázek 22:** Chromatogram analýzy směsi standardů chlorgenových kyselin o koncentraci 10 mg/l naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou

**Podmínky analýzy:** kolona ACE 3 C18-PFP (150×3 mm, velikost částic 3 μm); MF A deionizovaná voda + 0,1 % kyselina octová; MF B: acetonitril + 0,1 % kyselina octová; nástřik 3 μL; průtok MF 0,7 ml/min; teplota kolony 40 °C; DAD detekce 325 nm; izokratická eluce 10 % B – 7,5 min, následný promývací krok 100 % B – 10 min

Ke kvantifikaci chlorgenových kyselin ve vzorcích zelených i pražených kávových zrn byly připraveny kalibrační roztoky. Kalibrační řada pro chlorgenovou kyselinu byla připravena v koncentračním rozsahu 1-200 mg/l. Graf kalibračních závislostí (z ploch píků) pro kyselinu chlorgenovou je uveden v příloze 2. Pro výpočty limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), byla použita směrnice kalibrační křivky z výšky píků kyseliny chlorgenové a velikost šumu odezvy detektoru (tabulka 8) podle rovnic 3 a 4.

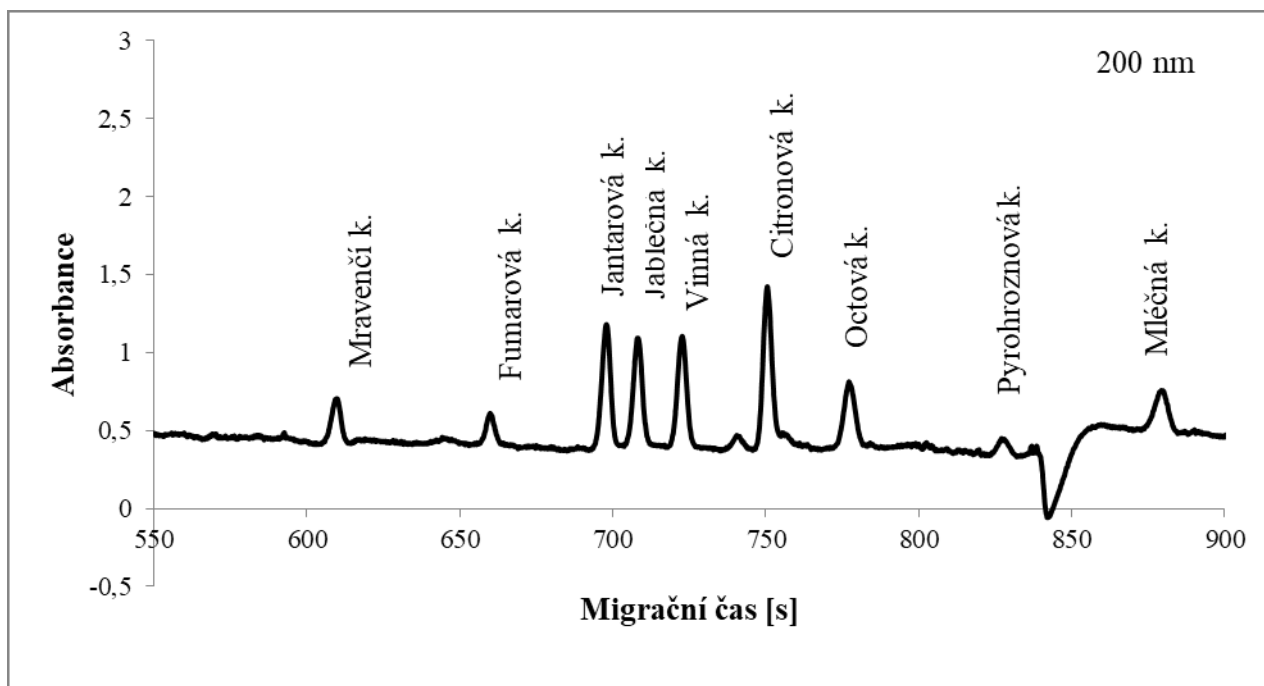
**Tabulka 8:** Parametry kalibračních závislostí a limity LOD, LOQ pro kyselinu chlorgenovou analyzovanou HPLC-DAD metodou

<i>Kyselina</i>	<i>Rovnice regrese</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>LOD (mg/l)</i>	<i>LOQ (mg/l)</i>
<b>Chlorgenová</b>	$y = 5,5203x + 7,8664$	0,9995	0,05	0,15

### 3.3 Optimalizace CZE-DAD metody pro vybrané organické kyseliny

Při optimalizaci metody pro stanovení vybraných organických kyselin se vycházelo z publikací, které se zabývaly analýzou organických kyselin metodou CZE<sup>77,78,79</sup>. Pro analýzu byla použita kapilára délky 53/60 cm a průměru 75  $\mu\text{m}$  na kterou bylo vkládáno napětí -10 kV při vlnové délce 200 nm a 25 °C. Jako výchozí elektrolyt byl připraven fosfátový pufr složený z 0,4M roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,4M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5mM CTAB a přidavku methanolu.

Testovanými parametry pro nalezení optimálního složení základního elektrolytu byly koncentrace (0,05; 0,1; 0,2M) a pH výchozího elektrolytu (6,1; 6,2; 6,25 a 6,3) dále koncentrace CTAB (0,4; 0,5; 0,6mM) a procentuální obsah methanolu (0; 5; 7 %). Optimální složení elektrolyt pro separaci vybraných organických kyselin byl 0,2M fosfátový pufr upravený pomocí  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  na pH 6,25 s přidavkem 0,5mM CTAB a 5 % methanolu. Výsledný záznam kalibrační směsi o koncentraci 100 mg/l, která byla proměřena konečnou metodou je znázorněn na obrázku 23.



**Obrázek 23:** Záznam analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 100 mg/l (0,4 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou CZE-DAD metodou

**Podmínky analýzy:** kapilára 53/60 cm a průměr 75 $\mu$ m, základní elektrolyt: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5mM CTAB, 5 % MeOH, nástřik 5  $\mu$ L, teplota kapiláry 25 °C, vlnová délka DAD detekce 200 nm, vkládané napětí -10 kV

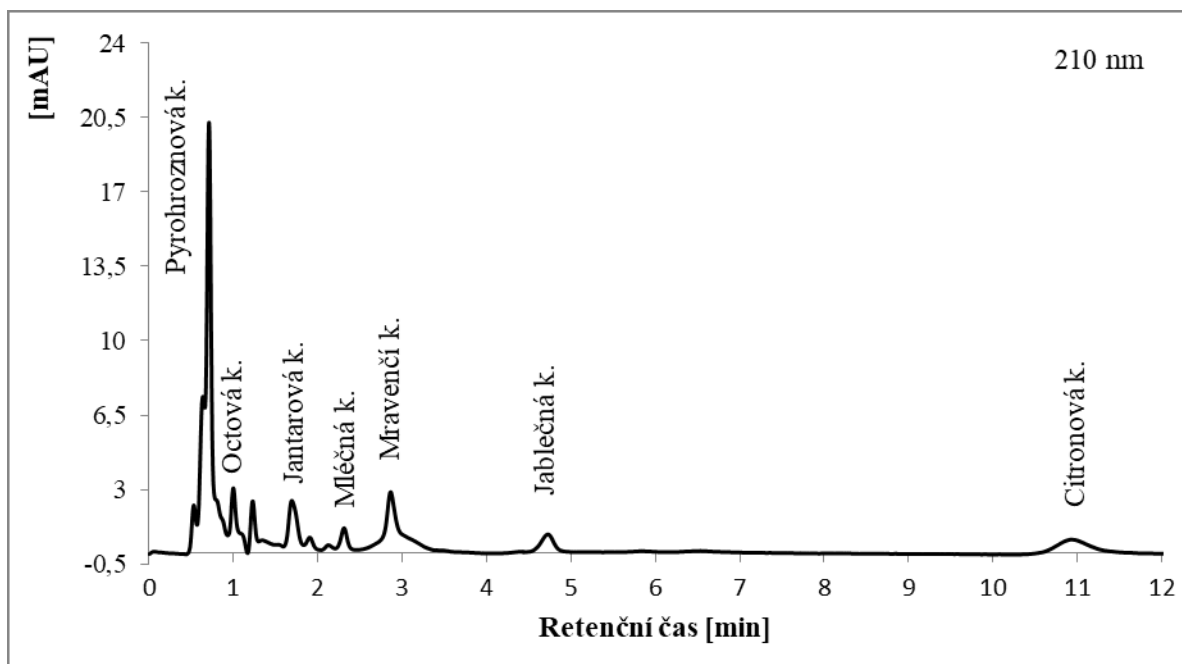
Pro kvantifikaci vybraných organických kyselin ve vzorcích zelených i pražených kávových zrn byly připraveny kalibrační roztoky. Kalibrační řada jednotlivých standardů organických kyselin byla připravena v koncentračním rozsahu 10-250 mg/l a pro kyselinu fumarovou 0,04-1 mg/l. Graf kalibračních závislostí (z ploch píků) pro vybrané standardy organických kyselin je uveden v příloze 3. Limity detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé standardy organických kyselin byly vypočteny na základě směrnice kalibrační křivky a šumu odezvy detektoru podle rovnic 3 a 4. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Parametry kalibračních závislostí a limity LOD, LOQ pro jednotlivé standardy organických kyselin analyzovaných CZE-DAD metodou

<i>Kyselina</i>	<i>Rovnice regrese</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>LOD (mg/l)</i>	<i>LOQ (mg/l)</i>
<b>Mravenčí</b>	$y = 0,1111x - 0,0369$	0,9973	6,43	21,44
<b>Fumarová</b>	$y = 0,0652x + 0,2372$	0,9922	10,79	35,96
<b>Jantarová</b>	$y = 0,2944x - 0,7147$	0,9991	2,36	7,85
<b>Jablečná</b>	$y = 0,2543x - 1,127$	0,9979	2,72	9,05
<b>Vinná</b>	$y = 0,2676x - 0,074$	0,9959	2,72	9,05
<b>Citronová</b>	$y = 0,3648x - 1,1606$	0,9983	1,82	6,08
<b>Octová</b>	$y = 0,195x - 0,4763$	0,9968	4,39	14,64
<b>Pyrohroznová</b>	$y = 0,0451x - 0,129$	0,9813	15,41	51,35
<b>Mléčná</b>	$y = 0,1643x - 1,2778$	0,9959	6,92	23,05

### 3.4 Optimalizace HILIC metody pro vybrané organické kyseliny

Při optimalizaci metody se vycházelo z publikací, které se zabývaly analýzou organických kyselin metodou HILIC<sup>96,97</sup>. Pro separaci vybraných organických kyselin byla využita kolona SeQuant ZIC-HILIC (150×2,1 mm, velikost částic 3,5 μm) v módu izokratických analýz (testovány byly úrovně 80; 90 a 95 % B). Byly testovány dvě mobilní fáze A: 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 10mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>. Mobilní fází B byl acetonitril bez aditiv. Mobilní fáze s octanem amonným se ukázala být mnohem méně vhodnou, neboť na záznamu byly patrné pouze píky kyseliny pyrohroznové a mléčné (ve směsi standardů). Při použití NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> jako aditiva do mobilní fáze bylo možné ve směsi standardů rozlišit 7 z 9 organických kyselin (obrázek 24).



**Obrázek 24:** Chromatogram analýzy směsi standardů organických kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený finální HILIC metodou

*Podmínky analýzy:* kolona SeQuant ZIC-HILIC (150 × 2,1 mm, velikost částic 3,5 μm); MF A: deionizovaná voda + 10 mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; MF B: acetonitril; nástřik 3 μL; průtok MF 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; DAD detekce při 210 nm; izokratická eluce 90 % B – 7 min

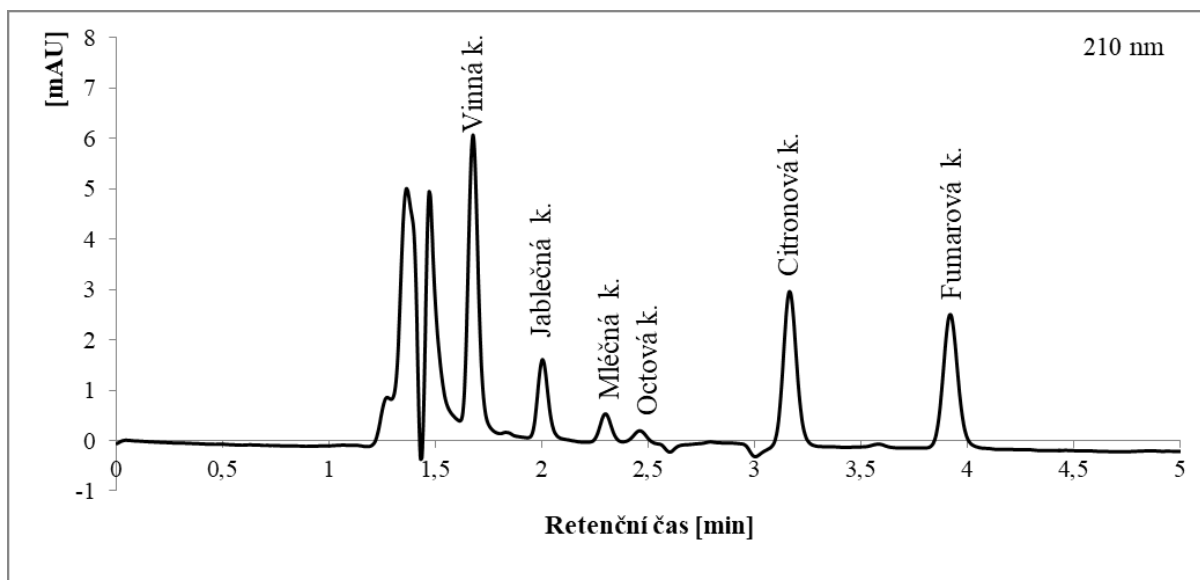
V porovnání s HPLC-RP a CZE se metoda HILIC ukázala být méně účinnou, a proto nebylo vynaloženo další úsilí pro zajištění optimálních podmínek separace touto metodou. Jako zásadní nedostatky této metody lze jmenovat chybějící píky kyseliny vinné a fumarové na záznamu. Dále nekompatibilitu vzorků získaných po SPE (vodné kyselé prostředí), jelikož pro získání uspokojivého tvaru píků bylo potřeba dávkovat vzorky v prostředí s vysokým obsahem acetonitrilu.

### 3.5 Volba podmínek úpravy vzorku

Vzorky pražené i zelené kávy byly k analýze metodami HPLC-DAD a CZE-DAD připraveny podle postupu popsaného v kapitole 2.4.1. Z důvodu velkého množství koelujících píků matrice v takto upravených vzorcích kávy bylo potřeba nejdříve vytvořit a optimalizovat metodu extrakce pro umožnění stanovení vybraných organických kyselin metodou HPLC-DAD. Tento problém nebyl pozorován u techniky CZE-DAD ani u HPLC-DAD analýz chlorgenových kyselin, proto zde reálné vzorky nebylo nutné upravovat metodou SPE.

### 3.5.1 Volba extrakční metody

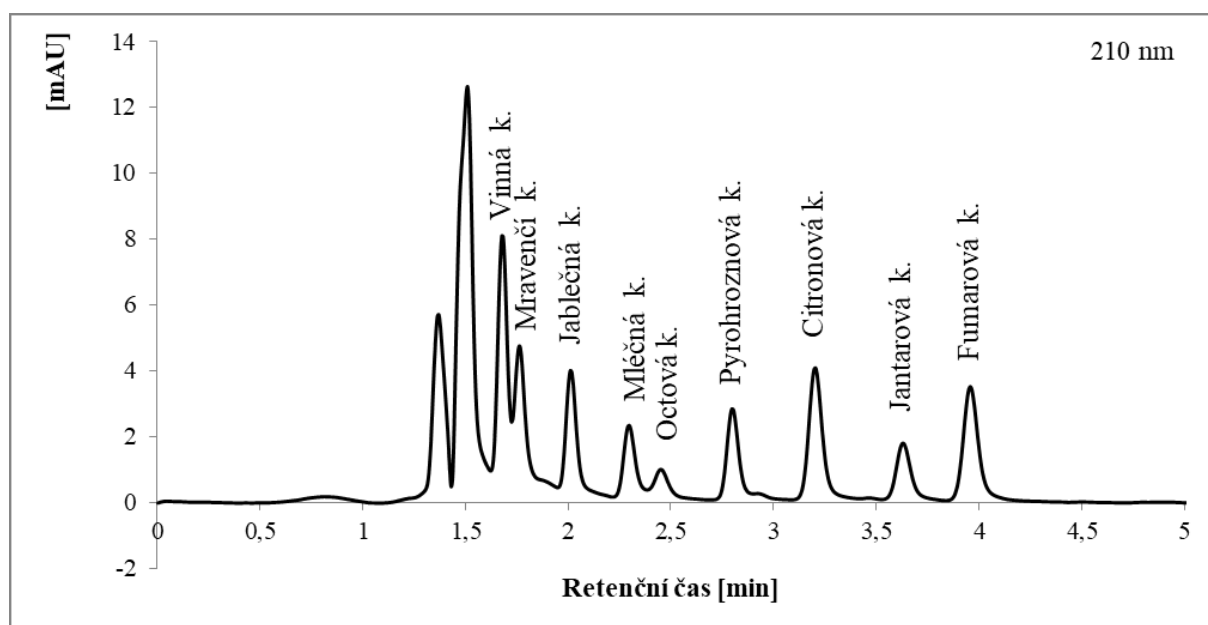
Pro analýzu vybraných organických kyselin metodou HPLC-DAD bylo nutno reálné vzorky upravit metodou SPE extrakce pro jejich přečištění a zakoncentrování. Byly testovány dva postupy SPE metody. První postup (extrakce A) vycházel z diplomové práce M. Kříže<sup>85</sup>, kdy anexové kolony byly v prvním kroku postupně aktivovány 10 ml 0,1M NaOH, 10 ml redestilované vody, 15 ml kyseliny sírové (pH 3,5) a 5 ml kyseliny sírové (pH 2). Následně bylo aplikováno 2,5 ml vzorku a 10 ml redestilované vody pro vymytí interferujících látek. Poté se kolonka nechala vysušit proudem vzduchu po dobu 5 minut. Eluce byla uskutečněna 0,5 ml 0,5M kyselinou sírovou. Výsledný záznam extrakce A směsi standardů vybraných organických kyselin, proměřených finální HPLC-DAD metodou, je znázorněn na obrázku 25.



**Obrázek 25:** Chromatogram směsi standardů vybraných organických kyselin po SPE postupu A o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou

**Podmínky analýzy:** kolona Luna Omega Polar C18 (150×3 mm, velikost částic 3 μm); MF A: pufr o pH 2 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); MF B: 80% MeOH; nástřik 3 μL; průtok MF 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; DAD detekce při 210 nm; izokratická analýza 0 % B-6 minut, následný promývací krok 100 % B – 7,5 min

Po proměření extraktu získaného SPE postupem A bylo možné identifikovat na chromatogramu pouze 6 z 9 organických kyselin. Z důvodu neuspokojivé extrakční účinnosti byla dále testována metoda SPE vycházející z bakalářské práce E. Kuklevy<sup>96</sup> (extrakce B). V prvním kroku extrakce B byly anexové kolonky aktivovány 2 ml MeOH a 2 ml redestilované vody. Poté byly aplikovány 2 ml vzorku a následovalo promytí 2 ml redestilované vody. Dále se kolonka nechala vysušit proudem vzduchu po dobu 5 minut a k eluci byl použit 1 ml 0,5M kyseliny sírové. Výsledný záznam extrakce B směsi standardů vybraných organických kyselin proměřených finální HPLC-DAD metodou, je znázorněn na obrázku 26. Extrakce B poskytla lepší výsledky, protože bylo možné na chromatogramu identifikovat všech 9 organických kyselin.



**Obrázek 26:** Chromatogram směsi standardů vybraných organických kyselin po SPE postupu B o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) naměřený optimalizovanou HPLC-DAD metodou

**Podmínky analýzy:** kolona Luna Omega Polar C18 (150×3 mm, velikost částic 3 μm); MF A: pufr o pH 2 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); MF B: 80% MeOH; nástřik 3 μL; průtok MF 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; DAD detekce při 210 nm; izokratická analýza 0 % B - 6 minut, následný promývací krok 100 % B – 7,5 min



### 3.5.2 Opakovatelnost a účinnost extrakce

Opakovatelnost metody extrakce byla zjišťována extrakcí směsi standardů kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) pomocí extrakčního postupu B. Extrakce byly připraveny ve třech opakováních, přičemž každý získaný extrakt byl HPLC-DAD metodou proměřen třikrát.

Z těchto celkem devíti analýz byl pro jednotlivé standardy kyselin vypočítán průměr a směrodatná odchylka plochy píků. Z těchto hodnot byla dále vypočtena residuální směrodatná odchylka (RSD) v %, vyjadřující míru rozptylu dat od průměrné hodnoty (tabulka 10). Pro většinu organických kyselin byla RSD menší než 4 %, což lze považovat za velmi uspokojivé. Výjimkou byla kyselina octová, jejíž RSD byla větší než 12 %, což mohlo být způsobeno nízkou extrakční účinností pro takto vysokou koncentraci této kyseliny.

**Tabulka 10:** Opakovatelnost extrakce B směsi standardů kyselin o koncentraci 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou) vyjádřená jako RSD plochy píků pro tři opakování

<i>Plocha píku</i>									
<i>Kyselina</i>	<i>Vinná</i>	<i>Mravenčí</i>	<i>Jablečná</i>	<i>Mléčná</i>	<i>Octová</i>	<i>Pyrohroznová</i>	<i>Citronová</i>	<i>Jantarová</i>	<i>Fumarová</i>
<b>Extrakce 1_01</b>	31,7	21,5	14,8	8,7	2,3	11,8	19,8	8,6	20
<b>Extrakce 1_02</b>	31,5	21,5	15,3	9,2	2,2	11,8	20,4	8,7	19,2
<b>Extrakce 1_03</b>	31,6	21,7	13,8	9,3	2,2	11,9	19,9	8,4	19,2
<b>Extrakce 2_01</b>	32	22,4	14,3	9,4	2,7	12	20,1	9,1	19,3
<b>Extrakce 2_02</b>	31,9	21,6	14	9,3	2,9	12	20,7	8,9	19,4
<b>Extrakce 2_03</b>	32,3	21,5	14,1	9,6	3,2	11,7	20,1	8,7	19,1
<b>Extrakce 3_01</b>	32,3	21,8	14,2	9,3	2,6	11,9	20,6	9	19,6
<b>Extrakce 3_02</b>	32,3	21,9	14	9,6	2,8	12,3	20,6	8,6	19,1
<b>Extrakce 3_03</b>	32,3	22	13,9	9,3	2,6	12,2	20,7	9,3	19,5
<b>Průměr</b>	31,99	21,77	14,27	9,30	2,61	11,96	20,32	8,81	19,38
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,33	0,30	0,48	0,26	0,34	0,19	0,35	0,28	0,29
<b>% RSD</b>	<b>1,03</b>	<b>1,38</b>	<b>3,40</b>	<b>2,84</b>	<b>12,91</b>	<b>1,63</b>	<b>1,74</b>	<b>3,23</b>	<b>1,50</b>

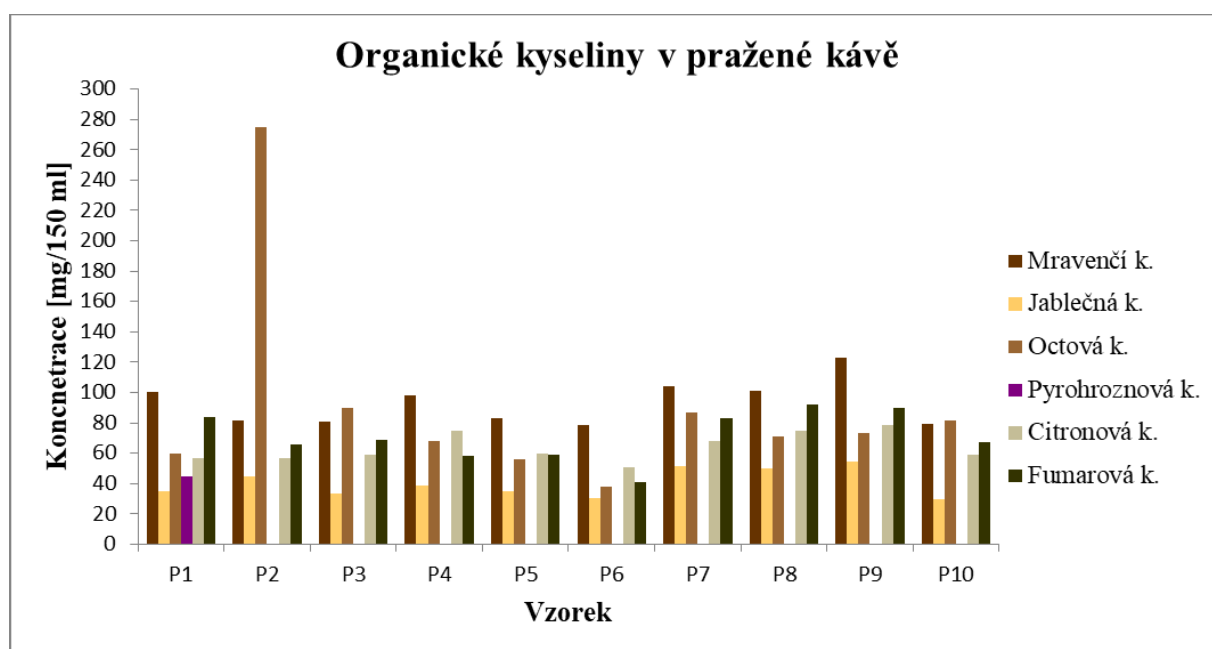
Účinnost extrakce byla testována na různých koncentračních úrovních (50, 25 a 10 mg/l). Jako optimální koncentrace byla vyhodnocena 10 mg/l (pro kyselinu fumarovou 0,04 mg/l), jelikož pro vyšší koncentrační úrovně bylo dosaženo nižší extrakční účinnosti, zejména v případě kyseliny octové. Z tohoto důvodu byla při extrakci vzorků snaha dosáhnout obdobné koncentrace těchto kyselin, což bylo zajištěno příslušným ředěním. Jednotlivé účinnosti extrakce byly vypočteny z průměrných hodnot polovičních ploch píků standardů kyselin (upravených extrakcí B) příslušných koncentrací a průměrných hodnot ploch píku stejné směsi standardů před extrakcí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11 jako procentuální extrakční účinnost.

**Tabulka 11:** Extrakční účinnost (%)  $\pm$ RSD směsí standardů organických kyselin na testovaných koncentračních úrovních: 10 mg/l (0,04 mg/l pro kyselinu fumarovou), 25 mg/l (0,1 mg/l pro kyselinu fumarovou) a 50 mg/l (0,2 mg/l pro kyselinu fumarovou)

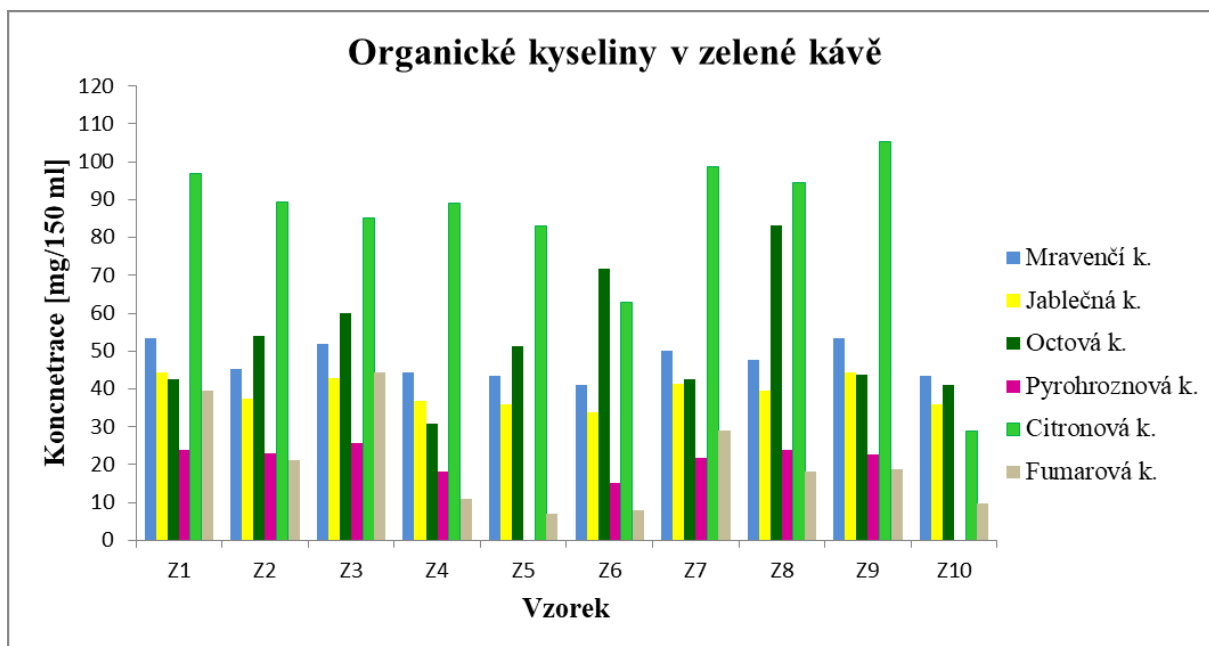
<i>Kyselina</i>	<i>Extrakční účinnost 10 mg/l [%]</i>	<i>Extrakční účinnost 25 mg/l [%]</i>	<i>Extrakční účinnost 50 mg/l [%]</i>
<b>Vinná</b>	100,54 $\pm$ 0,02	101,79 $\pm$ 0,02	103,44 $\pm$ 0,08
<b>Mravenčí</b>	83,64 $\pm$ 0,05	80,82 $\pm$ 0,02	90,47 $\pm$ 0,20
<b>Jablečná</b>	101,11 $\pm$ 0,02	100,41 $\pm$ 0,02	92,98 $\pm$ 0,06
<b>Mléčná</b>	100,00 $\pm$ 0,00	97,94 $\pm$ 0,06	72,94 $\pm$ 0,06
<b>Octová</b>	98,75 $\pm$ 0,02	86,50 $\pm$ 0,06	20,37 $\pm$ ,01
<b>Pyrohroznová</b>	91,67 $\pm$ 0,02	90,87 $\pm$ 0,05	79,69 $\pm$ 0,07
<b>Citronová</b>	104,69 $\pm$ 0,02	107,35 $\pm$ 0,05	89,82 $\pm$ 0,14
<b>Jantarová</b>	103,03 $\pm$ 0,02	97,28 $\pm$ 0,02	77,17 $\pm$ 0,08
<b>Fumarová</b>	99,19 $\pm$ 0,04	100,00 $\pm$ 0,02	88,38 $\pm$ 0,06

### 3.6 Výsledky stanovení vybraných organických kyselin metodou HPLC-DAD

Obdržené a upravené vzorky zelených i pražených kávových zrn byly, pro stanovení vybraných organických kyselin, extrahovány extrakčním postupem B (kapitola 2.4.1). Dále byla provedena HPLC-DAD analýza získaných extraktů a rovněž analýza kalibračních roztoků, jejichž příprava je uvedena v kapitole 2.4.2. Na základě metody vnější kalibrace byla vypočtena koncentrace vybraných organických kyselin a přepočtena na mg na 150 ml demineralizované vody (tabulka v příloze 4), přičemž bylo potřeba při výpočtech uvažovat dvojnásobné zakoncentrování pomocí SPE, padesátinásobné ředění vzorku před SPE a extrakční účinnost. Výsledky jsou zaznamenány v grafech na obrázcích 27 a 28.



**Obrázek 27:** Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích pražené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD



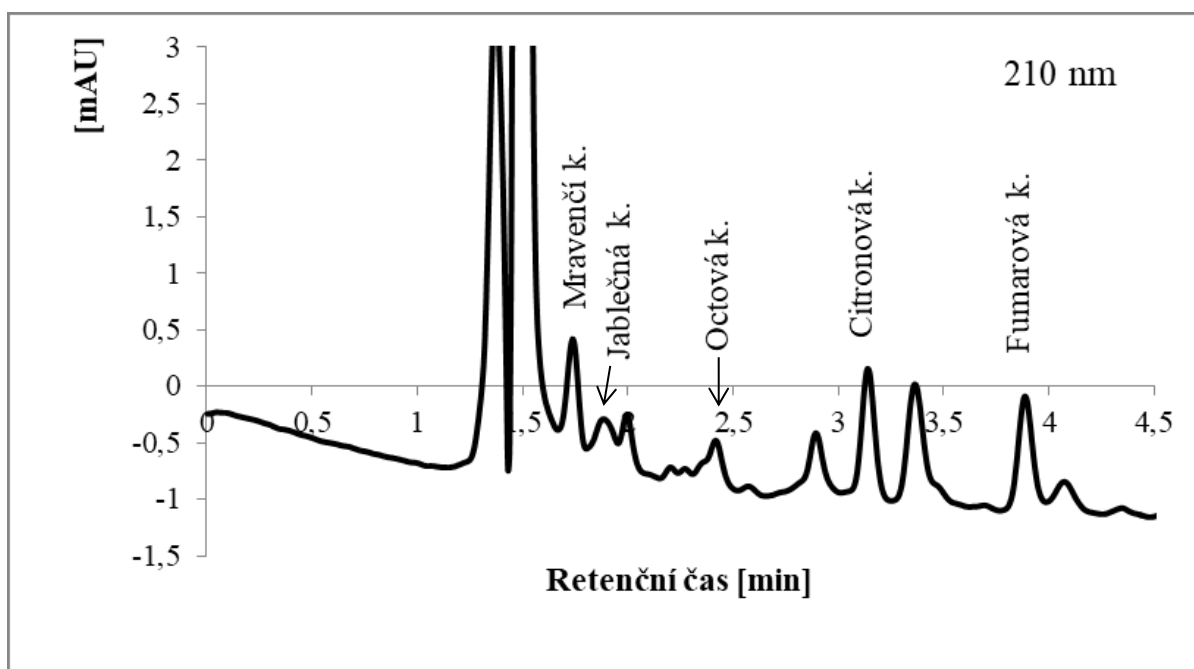
**Obrázek 28:** Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdrženích vzorcích zelené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD

Metodou HPLC-DAD se ve vzorcích kávových zrn podařilo identifikovat a kvantifikovat 5 až 6 organických kyselin. Kyselinu mléčnou se nepodařilo stanovit, neboť v reálných vzorcích znemožnily kvantifikaci rušivé píky. Jako hlavní kyseliny v pražených kávových zrnech byly nalezeny kyselina mravenčí, octová, citronová, fumarová a jablečná. Ve vzorku P1 (Barbosa Brasil) byla nalezena i v menším měřítku kyselina pyrohroznová, ale v ostatních pražených vzorcích stanovena nebyla. V zelených kávových zrnech byla nalezena kyselina mravenčí, jablečná, octová, citronová, fumarová a také kyselina pyrohroznová, která nebyla nalezena pouze u dvou vzorků.

Na základě těchto analýz lze tvrdit, že se obsah kyseliny pyrohroznové a citronové v průběhu pražení snižoval. Naopak obsah kyseliny mravenčí a fumarové se vlivem pražení výrazně zvýšil. Koncentrace kyseliny jablečné byla srovnatelná před i po pražení a změna koncentrace kyseliny octové byla různorodá v rámci jednotlivých vzorků.

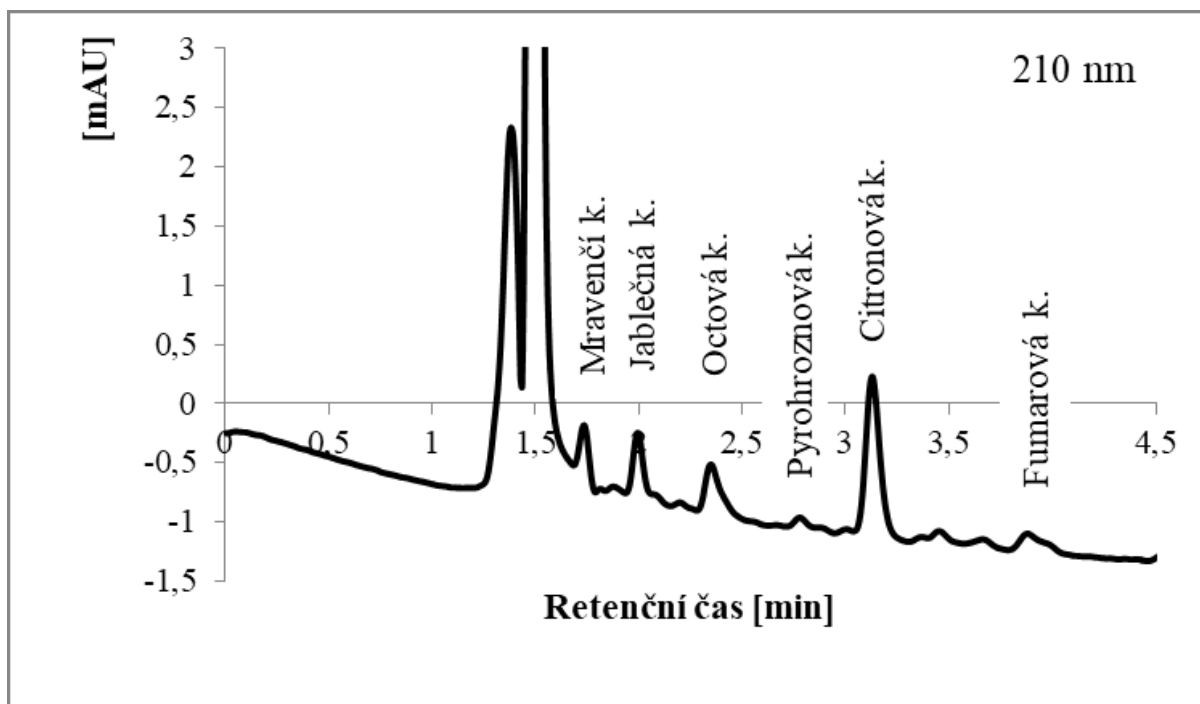
### 3.6.1 Záznam analýzy reálného vzorku metodou HPLC-DAD

Veškeré obdržené vzorky pražených i zelených kávových zrn byly proměřeny optimalizovanou metodou HPLC-DAD. Zde je uveden záznam analýzy stanovení vybraných organických kyselin ve vzorku P8 na obrázku 29 a Z8 na obrázku 30 (káвовá zrna z Indonésie).



**Obrázek 29:** Záznam analýzy pražených kávových zrn vzorku P8 analyzovaného optimalizovanou metodou HPLC-DAD

**Podmínky analýzy:** kolona Luna Omega Polar C18 (150×3 mm, velikost částic 3 μm); MF A: pufr o pH 2 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); MF B: 80% MeOH; nástřik 3 μL; průtok MF 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; DAD detekce při 210 nm; izokratická analýza 0 % B - 6 minut, následný promývací krok 100 % B – 7,5 min

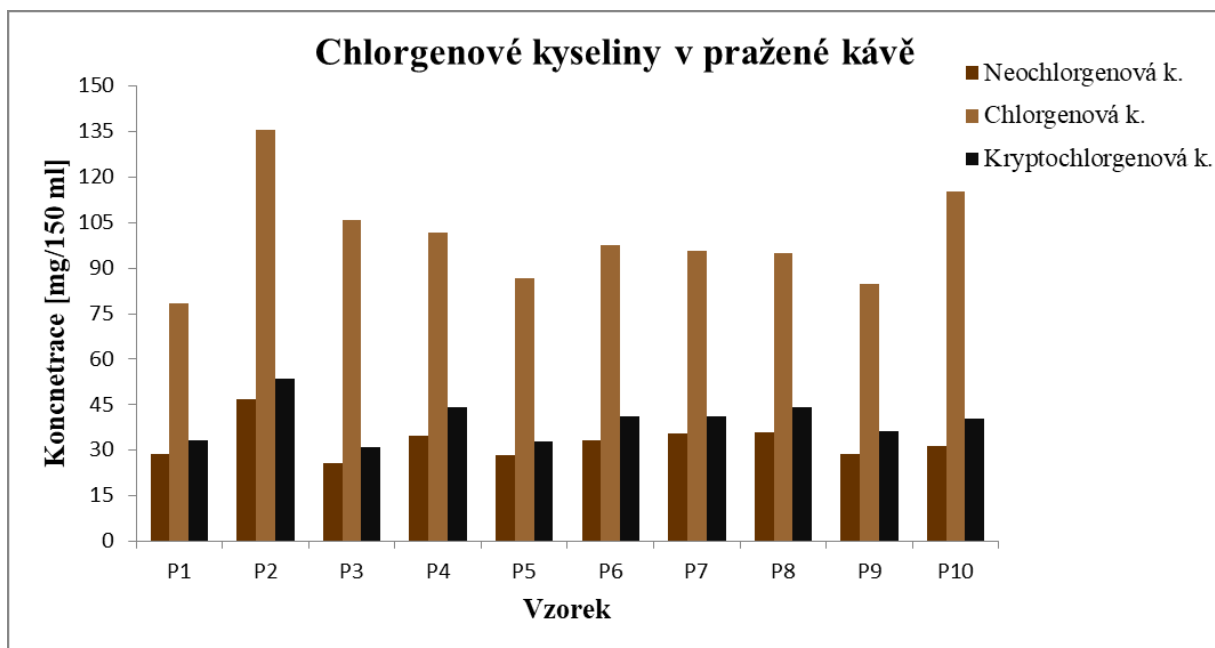


**Obrázek 30:** Záznam analýzy zelených kávových zrn vzorku Z8 analyzovaného optimalizovanou metodou HPLC-DAD

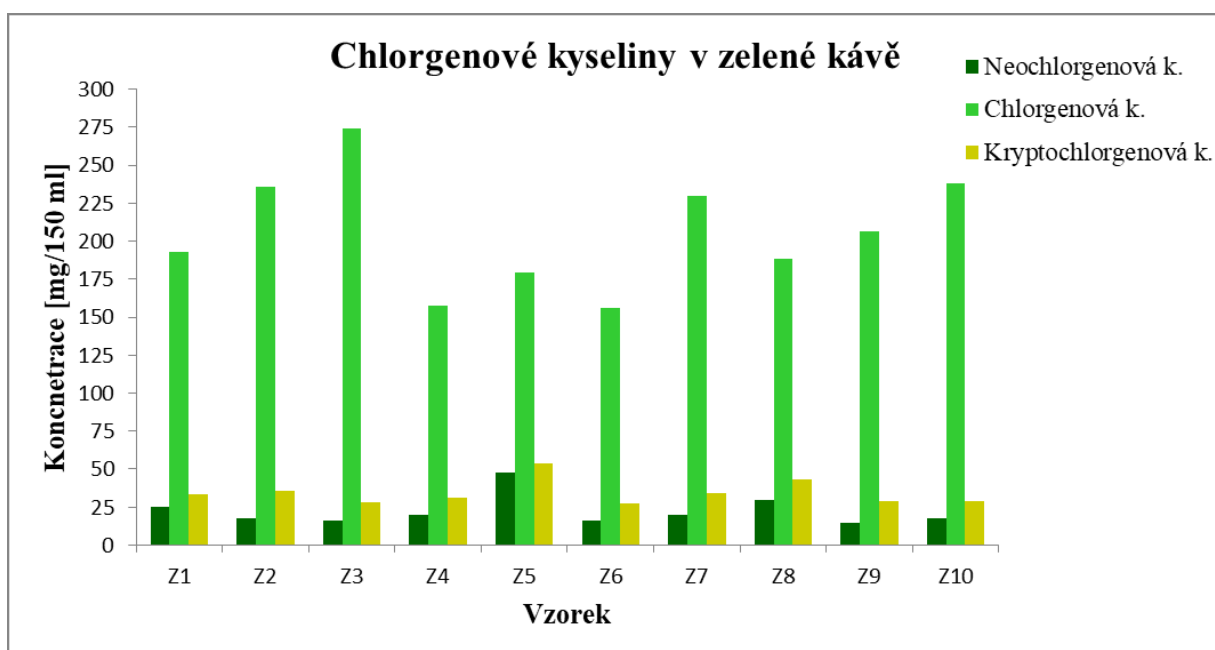
**Podmínky analýzy:** kolona Luna Omega Polar C18 (150×3 mm, velikost částic 3 μm); MF A: pufr o pH 2 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); MF B: 80% MeOH; nástřik 3 μL; průtok MF 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; DAD detekce při 210 nm; izokratická analýza 0 % B - 6 minut, následný promývací krok 100 % B – 7,5 min

### 3.7 Výsledky stanovení chlorgenových kyselin metodou HPLC-DAD

Veškeré obdržené a upravené vzorky zelené i pražené kávy nebylo třeba upravovat metodou SPE, protože stanovení nebránily žádné rušivé vlivy matrice. Vzorky i kalibrační roztoky, jejichž příprava i koncentrační rozsah je uveden v kapitole 2.4.2, byly analyzovány metodou HPLC-DAD. Na základě metody vnější kalibrace byla vypočtena koncentrace (tabulka v příloze 5) chlorgenových kyselin v mg na 150 ml demineralizované vody. Při výpočtech bylo uvažováno padesátinásobné ředění vzorků. Výsledky jsou zaznamenány na obrázcích 31 a 32.



**Obrázek 31:** Obsah chlorogenových kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích pražené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD



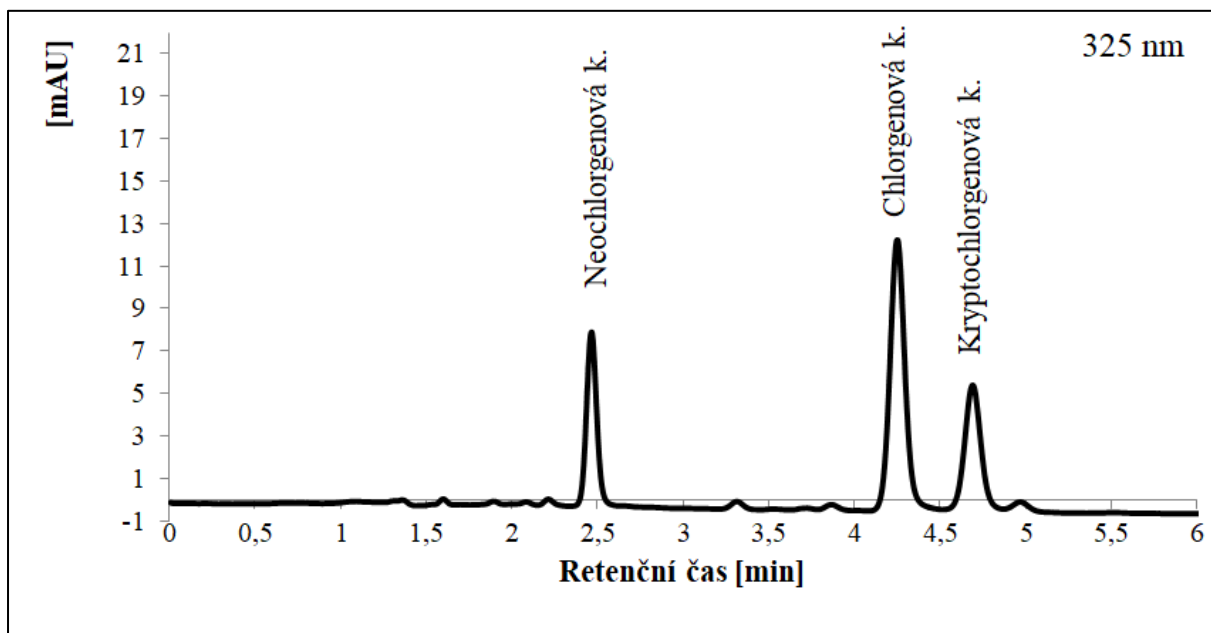
**Obrázek 32:** Obsah chlorogenových kyselin (mg/150 ml) v obdržných vzorcích zelené kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD

Z výsledků analýz vyplývá, že koncentrace kyseliny neochlorgenové a kryptochlorgenové je vyšší v pražených kávových zrnech než v těch zelených. Výjimkou je vzorek P5 (Dekaf), kde je koncentrace těchto dvou kyselin naopak nižší v pražené kávě než v té zelené. Největší koncentrace kyselin neochlorgenové i kryptochlorgenové v pražených zrnech byly nalezeny ve vzorku Bombe z Etiopie (P2) a ostatní vzorky se mezi sebou příliš nelišily obsahem těchto kyselin. Kyselina chlorgenová byla podle výsledků analýz zastoupena ve všech vzorcích ve větším množství než kyseliny neochlorgenová a kryptochlorgenová. Koncentrace kyseliny chlorgenové byla výrazně vyšší u zelených kávových zrn, než v pražených. Při pražení tedy dochází k degradaci této kyseliny za vzniku dalších sloučenin. Největší obsah kyseliny chlorgenové v zelených zrnech byl nalezen ve vzorku kolumbijské kávy El Diviso (Z3) a také ostatní zelené kávy z Kolumbie (Z9, Z10), společně s etiopskými zrny Bombe (Z2), se řadí mezi ty s vyšší koncentrací chlorgenové kyseliny. Naopak nejméně chlorgenové kyseliny byl zjištěn u zelených zrn kávy z Peru (Z6) a Rwandy (Z4), kde byl její obsah srovnatelný. Co se týká kávy pražené, největší koncentrace byla nalezena v kávě Bombe z Etiopie (P2) a v kolumbijské Luis Jose Valdes (P10), naopak nejméně v kávě Dekaf (P5).



### 3.7.1 Záznam analýzy reálného vzorku metodou HPLC-DAD

Veškeré obdržené vzorky pražených i zelených kávových zrn byly proměřeny optimalizovanou metodou HPLC-DAD. Zde je uveden záznam analýzy stanovení chlorgenových kyselin ve vzorku P8 (pražená kávová zrna z Indonésie).

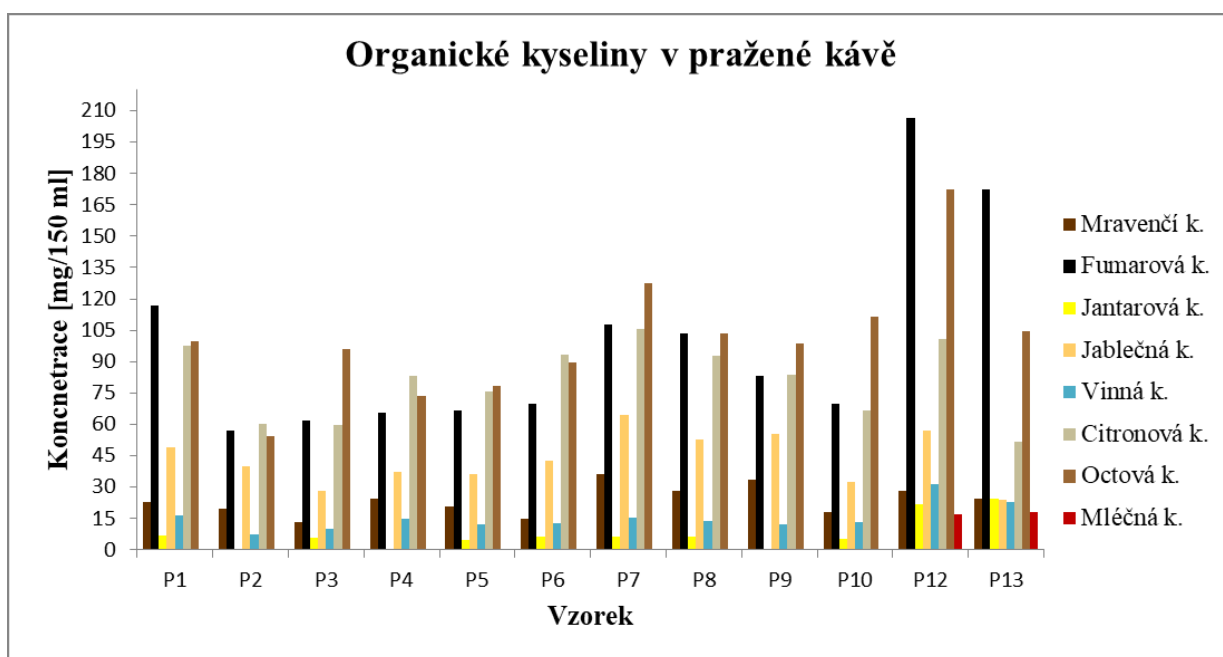


**Obrázek 33:** Záznam analýzy pražených kávových zrn vzorku P8 analyzovaného optimalizovanou metodou HPLC-DAD

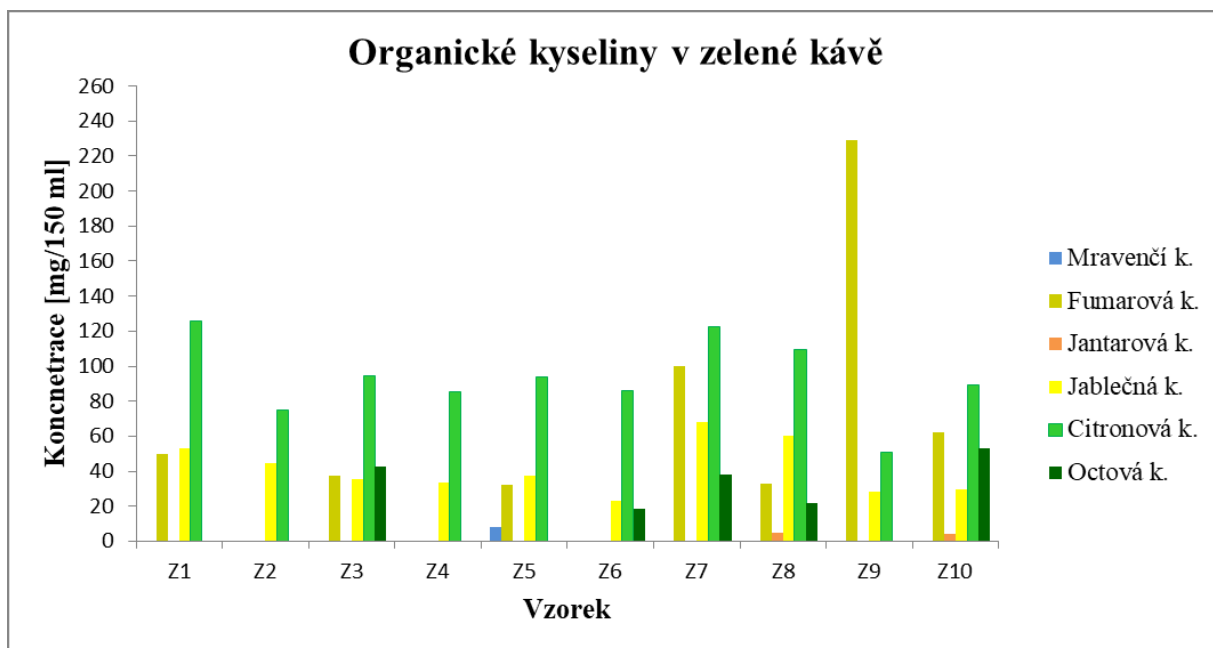
**Podmínky analýzy:** kolona ACE 3 C18-PFP (150×3 mm, velikost částic 3 μm); MF A deionizovaná voda + 0,1 % kyselina octová; MF B: acetonitril + 0,1 % kyselina octová; nástřik 3 μL; průtok MF 0,7 ml/min; teplota kolony 40 °C; DAD detekce 325 nm; izokratická eluce 10 % B – 7,5 min, následný promývací krok 100 % B – 10 min

### 3.8 Výsledky stanovení vybraných organických kyselin metodou CZE-DAD

Obdržené a upravené vzorky zelených i pražených kávových zrn byly analyzovány metodou CZE-DAD. Vzorky nebylo potřeba upravovat metodou SPE, neboť stanovení nebránily žádné interferující píky z matrice. Analyzovány byly rovněž kalibrační roztoky, jejichž příprava i koncentrační rozsah je shrnut v kapitole 2.4.2. Koncentrace vybraných organických kyselin byla vypočtena na základě metody vnější kalibrace a přepočtena na mg na 150 ml demineralizované vody (tabulka v příloze 6). Při výpočtech bylo uvažováno pětinašobné ředění vzorků. Výsledky jsou zaznamenány na obrázcích 34 a 35.



**Obrázek 34:** Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích pražené kávy analyzovaných metodou CZE-DAD



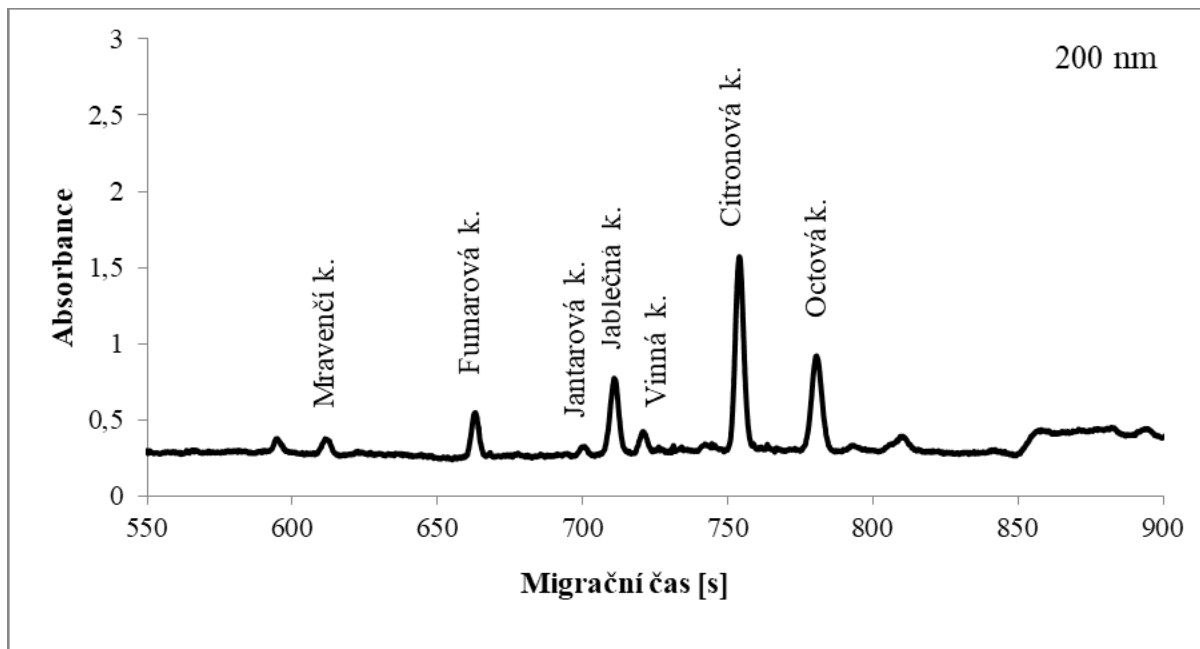
**Obrázek 35:** Obsah vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržení vzorcích zelené kávy analyzovaných metodou CZE-DAD

Pomocí metody CZE-DAD se podařilo stanovit 8 z 9 organických kyselin. Z výsledků měření vyplývá, že procesem pražení vznikají další kyseliny, a jejich množství je tedy v pražených zrnech větší. Mezi kyseliny s největší koncentrací v pražených kávových zrnech patří fumarová, jablečná, citronová a octová. Za nimi následují mravenčí a vinná kyselina. Obsah kyseliny jantarové je nižší a u vzorků P2, P4, a P9 je její obsah pod mezí detekce. Kyselinu mléčnou ani pyrohroznovou se nepodařilo ve vzorcích kávy arabika stanovit, nicméně v pražených zrnech kávy robusty (P12) i v bezkofeinové kávě (P11) byla zaznamenána nízká koncentrace mléčné kyseliny. V pražené kávě robusta (P12) byla stanovena zdatně vyšší koncentrace fumarové, jantarové i vinné kyseliny ve srovnání s kávou arabika. Naopak obsah kyseliny citronové a jablečné byl nižší. Obsah kyseliny mravenčí a octové byl na srovnatelné úrovni. V bezkofeinové kávě (P11) byl zaznamenán opět velký nárůst koncentrace fumarové, jantarové, vinné a dále i octové kyseliny. Kyseliny citronová, jablečná a mravenčí byly přítomny na podobných koncentračních hladinách jako u předchozích vzorků.

V zelené kávě jsou podle výsledků analýz obsaženy zejména kyseliny fumarová, jablečná a citronová. V některých druzích zelené kávy byla obsažena také octová kyselina a jantarová byla zaznamenána pouze v kávě z Indonésie (Z8) a v kolumbijské kávě Luis Jose Valdes (Z10). Mravenčí kyselina byla nalezena jen v zelených zrnech kávy Dekaf (Z5).

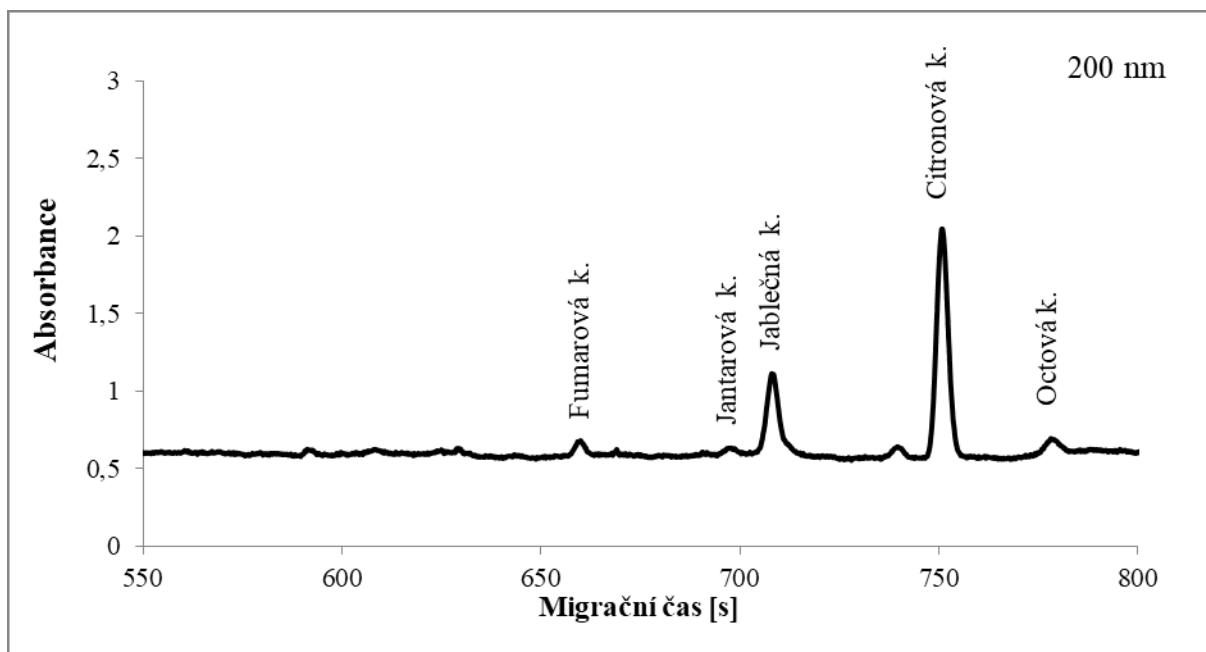
### 3.8.1 Záznam analýzy reálného vzorku metodou CZE-DAD

Optimalizovanou metodou CZE-DAD byly proměřeny veškeré vzorky pražených i zelených kávových zrn. Zde je uveden záznam analýzy vzorku P8 na obrázku 36 a Z8 na obrázku 37 (kávová zrna z Indonésie).



**Obrázek 36:** Záznam analýzy pražených kávových zrn vzorku P8 analyzovaného optimalizovanou metodou CZE-DAD

*Podmínky analýzy:* kapilára 53/60 cm a průměr 75 $\mu$ m, základní elektrolyt:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5mM CTAB, 5 % MeOH, nástřik 5  $\mu$ L, teplota kapiláry 25 °C, vlnová délka DAD detekce 200 nm, vkládané napětí -10 kV



**Obrázek 37:** Záznam analýzy zelených kávových zrn vzorku Z8 analyzovaného optimalizovanou metodou CZE-DAD

**Podmínky analýzy:** kapilára 53/60 cm a průměr 75 $\mu$ m, základní elektrolyt: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5mM CTAB, 5 % MeOH, nástřik 5  $\mu$ L, teplota kapiláry 25 °C, vlnová délka DAD detekce 200 nm, vkládané napětí -10 kV

### 3.9 Srovnání dosažených výsledků

Obsah organických kyselin vypočtený z výsledků měření získaných metodou CZE-DAD a HPLC-DAD se při porovnání obou metod liší. V případě metody HPLC-DAD mohlo být stanovení ovlivněno množstvím interferujících píků při analýze reálných vzorků. Dále mohly být hodnoty u metody HPLC-DAD ovlivněny množstvím kroků při úpravě vzorku (ředění, extrakce). Při stanovení metodou CZE-DAD nebylo nutné vzorky upravovat pomocí SPE metody, protože v reálných vzorcích nebyly přítomny interferující píky. Tato metoda má ale oproti metodě HPLC-DAD nižší citlivost, což se projevilo u vzorků zelené kávy, kde metodu CZE-DAD nebyly některé kyseliny detekovány. Z důvodu omezeného množství vzorků nebylo možno v termínu určeném pro vypracování diplomové práce vyzkoušet přípravu vzorků s větší navázkou.

V publikaci<sup>77</sup>, která se rovněž zabývala stanovením organických kyselin v kávě pomocí CZE, identifikovali 17 organických kyselin. Jako majoritní kyseliny byly identifikovány a kvantifikovány kyseliny mravenčí, jablečná, citronová, octová a chinová. Kyseliny

zastoupené v nižší koncentraci byly šťavelová, fumarová, jantarová, mléčné nebo glykolová. V porovnání s analýzou obdržných vzorků pro vypracování této diplomové práce bylo v kávových zrnech nalezeno větší množství kyseliny fumarové. Majoritními kyselinami byly nalezeny rovněž kyselina citronová, jablečná i octová.

Ve studii<sup>93</sup> zabývající se stanovením chlorgenových kyselin pomocí HPLC metody, byly stanovovány kyselina neochlorgenová, chlorgenová a kryptochlorgenová v pražené i zelené kávě. Podle dosažených výsledků bylo zjištěno, že kyselina chlorgenová je v kávových zrnech přítomna ve větší koncentraci oproti neochlorgenové a kryptochlorgenové kyselině. Vzorky nepražené kávy obsahovaly výrazně větší množství kyseliny chlorgenové než ty pražené. Tyto výsledky se shodují se závěry vyhodnocenými v této diplomové práci, kde byla v obdržných vzorcích kyselina chlorgenová nalezena ve vyšší koncentraci v zelených zrnech.

## 4. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala stanovením vybraných organických a chlorgenových kyselin ve vzorcích zelených i pražených kávových zrn pomocí HPLC a CZE technik. Vzorky kávy byly poskytnuty pardubickou pražírnou ZRNO44 a dva vzorky byly zakoupeny v obchodních řetězcích.

Nejprve byly optimalizovány podmínky pro separaci vybraných organických kyselin metodou HPLC-DAD a CZE-DAD. Testována byla rovněž technika HILIC, u které však nebyly detekovány kyselina vinná a fumarová ve směsi standardních látek a také vodné prostředí u přípravy vzorků nebylo pro tuto metodu vhodné. Pro analýzu vybraných organických kyselin metodou HPLC-DAD bylo nutno, z důvodu velkého množství interferujících píků matrice, reálné vzorky upravit pomocí SPE metody pro jejich přečištění. U metody CZE-DAD nebyly interferující piky zaznamenány a nebylo tedy nutné vzorky před analýzou upravovat optimalizovaným postupem SPE metody. Pro stanovení třech hlavních zástupců chlorgenových kyselin byla vybrána a optimalizována metoda HPLC-DAD. Ani u této metody nebylo nutné vzorky kávy upravovat metodou SPE.

Optimalizovanými metodami bylo analyzováno 22 vzorků kávy, 10 druhů zelených kávových zrn arabika a k nim odpovídajících 10 vzorků pražených kávových zrn. Dále byl dispozici 1 vzorek bezkofeinové kávy a 1 vzorek pražené kávy robusta. Ve vzorcích byly stanovovány kyseliny vinná, mravenčí, fumarová, citronová, octová, jablečná, pyrohroznová, mléčná, jantarová, neochlorgenová, chlorgenová a kryptochlorgenová.

Na základě analýz bylo vyhodnoceno, že majoritními kyselinami v zelené kávě jsou kyseliny fumarová, jablečná, citronová a v některých vzorcích také octová kyselina. Procesem pražení vznikají další kyseliny, a proto v pražených kávových zrnech byly identifikovány a kvantifikovány kyseliny fumarová, jablečná, citronová, octová, mravenčí, vinná a nižší obsah jantarové kyseliny. V bezkofeinové kávě a v kávě robusta byla zaznamenána také nižší koncentrace kyseliny mléčné.

Výhody metody CZE-DAD oproti HPLC-DAD jsou menší časová náročnost při úpravě vzorku i menší objem použitých rozpouštědel. Nevýhodou je nižší citlivost metody. Po dořešení navážky při přípravě vzorků zelené kávy u metody CZE-DAD by tato metoda mohla být využita pro analýzu organických kyselin v kávě v průběhu pražení a také by bylo

zajímavé, z hlediska zastoupení organických kyselin, proměřit větší množství vzorků bezkofeinové kávy a kávy robusta.

Pro analýzu chlorgenových kyselin v kávě je již spolehlivě zavedenou metodou kapalinová chromatografie v módu reverzních fází, proto byly proměřovány pouze pomocí metody HPLC-DAD. Koncentrace kyseliny neochlorgenové a kryptochlorgenové byly vyšší v pražených kávových zrnech než v zelených. Obsah chlorgenové kyseliny byl ale naopak výrazně vyšší v zelených kávových zrnech, to je způsobeno procesem pražení, při kterém se tato kyselina degraduje. Kyselina chlorgenová byla ve všech vzorcích zastoupena ve větším množství než kyseliny neochlorgenová a kryptochlorgenová



## 5. SEZNAM LITERATURY

- 1) VESELÁ, Petra Davies. Velká kniha o kávě. Praha: Nakladatelství Smart Press, 2021. ISBN: 978-80-88244-05-9.
- 2) WASSERMAN G. S., BRADBURY A., CRUZ T., PENSON S. Coffee. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2012, 7(5), 250-271 .
- 3) FEBRIANTO N. A., ZHU F. Coffee bean processing: Emerging methods and their effects on chemical, biological and sensory properties. *Food Chemistry*. 2023, 412, 1-20.
- 4) ERGIN E., TOKUSOGLU O., VURAL H. Coffee toxicology, processing of the coffee and liver diseases (is it a miracle of nature?). *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021, 45(4).
- 5) VIANI R., PETRACCO M. Coffee. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2007.
- 6) ETIENNE H. ALPIZAR E., LASHRMES P., MENÉNDEZ-YUFFÁ A., GUGLIELMO-CROQUER Z., SREENATH H. L. Coffee. *Compendium of Transgenic Crop Plants*. 2009, 57-84.
- 7) Uprazeno (2022). Dostupné z: <https://www.uprazeno.cz/pruvodce-svetem-kavy-A/> [citováno 2024-02-14]
- 8) BUFFO R. A., CARDELLI-FREIRE C. Coffee flavour: an overview. *Flavour and Fragrance Journal*. 2004, 19(2), 99-104.
- 9) FREITAS V. V., BORGES R. L. L., CASTRO A. D., SANTOS M. H., VIDIGAL M. C. T. R., FERNANDES S. A., STRINGHETA P. C. Impact of different roasting conditions on the chemical composition, antioxidant activities, and color of *Coffea canephora* and *Coffea arabica* L. samples. *Heliyon*. 2023, 9(9).
- 10) LU T., SUN Y., HUANG Y., CHEN X. Effects of roasting on the chemical compositions, color, aroma, microstructure, and the kinetics of changes in coffee pulp. *Journal of Food Science*. 2023, 88(4), 1430-1444.
- 11) YEAGER S. E., BATALI M. E., LIM L. X., LIANG J., HAN J., THOMPSON A. N., GUINARD J. X., RISTENPAR W. D. Roast level and brew temperature significantly affect the color of brewed coffee. *Journal of Food Science*. 2022, 87(4), 1837-1850.
- 12) PEREIRA, Lucas Louzada, MOREIRA, Taís Rizzo. Quality Determinants In Coffee Production. Springer Nature Switzerland AG, 2021. ISBN: 978-2-030-54437-9.

- 13) YILDIRIM S., GOK I., DEMIR E., TOKUSOGLU E. Use of electrochemical techniques for determining the effect of brewing techniques (espresso, Turkish and filter coffee) and roasting levels on total antioxidant capacity of coffee beverage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022, 46(7).
- 14) Coffee Dream. Dostupné z: [https://www.coffeedream.cz/STUPNE-PRAZENI-KAVY-a3\\_4.htm](https://www.coffeedream.cz/STUPNE-PRAZENI-KAVY-a3_4.htm) [citováno 2024-03-15]
- 15) Batch Coffee Dream. Dostupné z: <https://www.batchcoffee.co.uk/stories/different-coffee-roasts> [citováno 2024-03-15]
- 16) Kávomil. (2018) Dostupné z: <https://kavomil.cz/jak-je-to-se-stupni-prazeni-kavy/> [citováno 2024-03-15]
- 17) Dokonalá káva CZ. 2023. Dostupné z: <https://www.dokonalakava.cz/a/styly-prazeni> [citováno 2024-03-15]
- 18) DEROSI A., RICCI I., CAPORIZZI R., FIORE A., SEVERINI. How grinding level and brewing method (Espresso, American, Turkish) could affect the antioxidant activity and bioactive compounds in a coffee cup. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018, 98(8), 3198-3207.
- 19) Kávomil. 2015. Dostupné z: <https://kavomil.cz/domaci-priprava-kavy-5-alternativni-priprava-kavy/> [citováno 2024-03-15]
- 20) SANTANATOGLIA A., CESPI M., PERINELLI D. R., DIORETTI L., SAGRATINI G., VITTORI S., CAPRIOLI G. Impact of the human factor on the reproducibility of different coffee brewing methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2023, 124.
- 21) BROMER E., STRATMANN B., QUACK D. Environmental impacts of different methods of coffee preparation. *International Journal of Consumer Studies*. 2011, 35(2), 212-220.
- 22) Lázeňská káva. Dostupné z: <https://www.lazenskakava.cz/druhy-kavy/> [citováno 2024-03-16]
- 23) YEAGAR S. E., BATALI M. E., GUINARD J. X., RISTENPART W. D. Acids in coffee: A review of sensory measurements and meta-analysis of chemical composition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023, 63(8), 1010-1036.
- 24) RUNE B., GIACALONE D., STEEN I., DUELUND L., MUNCHOW M., PORSMOSE C. Acids in brewed coffees: Chemical composition and sensory threshold. *Current Research in Food Science*. 2023, 6.

- 25) LENTNER C., DEATHERAGE F. E. Organic acids in coffee in relation to the degree of roast. *Journal of Food Science*. 2006, 24(5), 453-607.
- 26) SANTANATOGLIA A., ANGELONI S., FIORIT M., FIORETTI L., RICCIUTELLI M., SAGRATINI G., VITTORI S., CAPRIOLI G. Development of new analytical methods for the quantification of organic acids, chlorogenic acids and caffeine in espresso coffee by using solid-phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). 2024, 125.
- 27) COLOMBAN S., GUERCIA E., NAVARINI L. Validation of a rapid ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of chlorogenic acids in roasted coffee. *Journal of Mass Spectrometry*. 2020, 55(11).
- 28) MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. *Food Chemistry*. 1999, 64, 547–554.
- 29) FRANCA, A. S., MENDONCA, J. C. F., & OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT- Food Science and Technology*. 2005, 38, 709–715.
- 30) MUSCHLER, R. G. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. *Agroforestry Systems*. 2001, 85, 131–139.
- 31) MARTINEZ, H. E. P., CLEMENTE, J. M., DE LACERDA, J. S., NEVES, Y. P., & PEDROSA, A. W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. *Revista Ceres*. 2014, 61, 838–848.
- 32) SIVETZ, M., & DESROSIER, N. W. Physical and chemical aspects of coffee. *Westpor: Coffee Techonology*. 2006, 527-575.
- 33) DE SIQUEIRA, H. H., & DE ABREU, C. M. P. Composição Físico-Química e Qualidade do Café Submetido a Dois Tipos de Torração e com Diferentes Formas de Processamento. *Ciência e Agrotecnologia*. 2006, 30(1), 112–117.
- 34) GROSSEN L. J., RODRIGUEZ N., GROSSEN K. Carboxylic Acids as Substrates in Homogeneous Catalysis. *Angewandte Chemie*. 2008, 47(17), 3100-3120.
- 35) VELÍŠEK, Jan. CHEMIE POTRAVIN 2. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. ISBN: 80-86659-01-1.
- 36) KUBITSCHKE J., LANGE H., STRUTZ H. Carboxylic Acids, Aliphatic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2014.

- 37) BAGBY M. O., JIHNSON R. W., DANIELS R. W., CONTRELL R. R., SAUER E. T., KEENAN M. J., KREVALIS M. A. Carboxylic Acids. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2003.
- 38) SEFKOW M. First Efficient Synthesis of Chlorogenic Acid. *European Journal of Organic Chemistry*. 2001, 6, 1137-1141.
- 39) RIVELLI D. P., FILHO C. A. H., ALMEIDA R. L., ROPKE C. D., SAWADA T. C. H., BARROS S. B. M. Chlorogenic Acid UVA-UVB Photostability. *Photochemistry and Photobiology*. 2010, 86(5), 1005-1007.
- 40) VADASSERY A. K., Chlorogenic acid-mediated chemical defence of plants against insect herbivores. *Plant biology*. 2019, 21(2), 185-189.
- 41) WERAKOON W. N. M. T. D. N., ANJALI N. V. P., JAYATHILAKA N., SENEVIRATNE K. N. Soybean oil and coconut oil enhance the absorption of chlorogenic acid in humans. *Journal of Food Biochemistry*. 2021, 45(8).
- 42) <https://botanic.cz/slovník-pojmu/organické-kyseliny>
- 43) LOPEZ-GARCIA R. Citric Acid. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2010.
- 44) VERHOFF F. H., BAUWELEERS H. Citric Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2014.
- 45) ROSENBERG M., MIKOVÁ H., KRIŠTOFÍKOVÁ L. Formation of L-malic acid by yeasts of the genus *Dipodascus*. *Letters in Applied Microbiology*. 1999, 29(4), 221-223.
- 46) CHANG J. S., CHANG L. B., TSAI M. L. Liquid-crystalline behaviour of chitosan in malic acid. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007, 105(5) 2670-2675.
- 47) KANG N. K., LEE J. W., ORT D. R., JIN Y. L-malic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*. 2022, 17(3).
- 48) KÖVILEIN A., KUBISCH CH., CAI L., OCHSENREITHER K. Malic acid production from renewables: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2020, 95(3), 513-526.
- 49) PERO E. W., LUND H., LEANDERSON T. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. *Phytotherapy Research*. 2009, 23(3), 335-346.
- 50) PINTA M. N., MONTOLIU I., AURA A. M., SEPPÄNEN-LAAKSO T., BARRON D., MOCO S. In vitro Gut Metabolism of [U-<sup>13</sup>C]-Quinic Acid, The Other Hydrolysis Product of Chlorogenic Acid. *Molecular Nutrition Food Research*. 2018, 62(22).

- 51) WAGNER F. S. Acetic Acid. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2014.
- 52) TAMMALI R., SENAYYA G., REDDY G. Fermentatiton of cellulose to acetic acid by *Clostridium lentocellum* SG6: induction of sporulation and effect of buffering agent on acetic acid production. 2003, 37 (4), 304-308.
- 53) BERRE C., SERP P., KALCK P., TORRENCE G. P. Acetic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2014.
- 54) DRURY D. J. Formic Acid. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2013.
- 55) HIETALA J., VUOR A., JOHNSON P., POLLARI I., REUTEMANN W. KIECZKA H. Formic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2016.
- 56) BULUSHEV D. A., ROSS J. R. H. Towards Sustainable Production of Formic Acid. *ChemSusChem*. 2018, 11(5), 821-836.
- 57) STARR J. N., WESTHOFF G. Lactic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2014.
- 58) KIM D. H., LEE M. K., HWANG Y., IM W. T., YUN Y. M., PARK C., KIM M. S. Microbial granulation for lactic acid. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016, 113(1), 101-111.
- 59) LU X., YAO Y., YANG Y., ZHANG Z., GU J., MOJOVIC L., KNEZEVIC-JUGOVIC Z., BAGANZ F., LYE G., SHI J., HAO J. Ethylene glycol and glycolic acid production by wild-type *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2021, 68(4), 744-755.
- 60) MARDYUKOV A., KEUL F., SCHREINER P. R. 1,1,2-Ethenetriol: The Enol of Glycolic Acid, a High-Energy Prebiotic Molecule. *Angewandte Chemie*. 2021, 133(28), 15441-15444.
- 61) HORIKOSHI T., MATSUMOTO M., USUKI A., IGARASHI S., HIKIMA R. UCHIWA H., HAYASHI S., BRYSK M. M., ICHIHASHI M., FUNASAKA Y. Effects of glycolic acid on desquamaion-regulating proteinases in human stratum corneum. *Experimental Dermatology*. 2005, 14(1), 34-40.
- 62) QIAO, Yang, WU, Min, DAI, Zhongxue, XIN, Fengxue, ZHOU, Jin. Comprehensive investigation of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*: a promising native succinic acid producer. *Biofuels Bioproducts&Biorefininf*. 2020, 14(5), 950-964.

- 63) FUMAGALLI, Carlo. Succinic Acid and Succinic Anhydride. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2013.
- 64) NAPORA-WIJATA, Kamila, STROHMEIER, Gernot A., WINKLER, Margit. Biocatalytic reduction of carboxylic acids. *Biotechnology Journal*. 2014, 9(6), 822-843.
- 65) KASSAIAN J. M. Tartaric Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000.
- 66) ALONSO E. R., LEÓN I., KOLESNIKOVÁ L., MATA S., ALONSO J. L. Unveiling Five Naked Structures of Tartaric Acid. *Angewandte Chemie*. 2021, 133(32), 1755-17554.
- 67) SWETHA, Poyye Dsouza Priya, PRASAD, Sudhakara K. A Non\_enzymatic Disposable Electrochemical Sensor for Pyruvic Acid. *Electroanalysis*. 2020, 32(10), 2237-2243.
- 68) JHAM G. N., FERNANDES S. A., GARCIA C. F. SILVA A. A. Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. *Phytochemical Analysis*. 2002, 13(2), 63-128.
- 69) RODRIGUES, Carla Isabel, MARTA, Liliana, MAIA, Rodrigo, MIRANDA, Marco, RIBEIRINHO, Miguel, MÁGUAS, Cristina. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, 20(5), 440-448.
- 70) CHOMA, Irena Maria, OLSZOWY, Malgorzata, STUDZINSKI, Marek, GNAT, Sebastian. Determination of chlorogenic acid, polyphenols and antioxidants in green coffee by thin-layer chromatography, effect-directed analysis and dot blot-comparison to HPLC and spectrophotometry methods. *Journal of Separation Science*. 2019, 42(8), 1542-1549.
- 71) SUARÉZ-LUQUE, Silvia, MATO, Inés, HUIDOBRO, José F., SIMAL-LOZANO, Jesús, SANCHO, Teresa. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2002, 955(2), 207-214.
- 72) GARCÍA, A. Alonso, GRANDE B. Cancho, GÁNDARA, J. Simal. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1054(1-2), 175-180.

- 73) KHAMITOVA, Gulzhan, ANGELONI, Simone, FIORETTI, Lauro, RICCIUTELLI, Massimo, SAGRATINI, Gianni, TORREGIANI, Elisabetta, VITTORI, Sauro, CAPRIOLI, Giovanni. The impact of different filter baskets, heights of perforated disc and amount of ground coffee on the extraction of organic acids and the main bioactive compounds in espresso coffee. *Food Research International*. 2020, 133.
- 74) HUGHES W. J., THORPE T. M. Determination of Organic Acids and Sucrose in Roasted Coffee by Capillary Gas Chromatography. *Journal of Food Science*. 2006, 52(4), 837-1119.
- 75) MORVAI, Magdolna, MOLNÁR-PERL, Ibolya, KNAUSZ, Dezsó. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of sugars and organic acids as trimethylsilyl derivatives in vegetables and strawberries. *Journal of Chromatography A*. 1991, 552, 337-344.
- 76) ADAMS, A. Mark, CHEN, Zu Liang, LANDMAN, Peter, COLMER, D. Timothy. Simultaneous Determination by Capillary Gas Chromatography of Organic Acids, Sugars, and Sugar Alcohols in Plant Tissue Extracts as Their Trimethylsilyl Derivatives. *Analytical Biochemistry*. 1999, 266(1), 77-84.
- 77) GALLI, Verónica, BARBAS, Coral. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1032(1-2), 299-304.
- 78) BÖKE, Nuran, SIRÉN, Heli, PETRIK, F. Leslie. Fungal biofermentation of pine bark producing organic acids and their quantification with capillary electrophoresis. *Industrial Crops and Products*. 2015, 67, 41-48.
- 79) BRUGNEROTTO, Patricia, BETTA, Fabiana, Della, GONZAGA, Luciano, Valdemiro, FETT, Roseane, COSTA, Ana, Carolina, Oliveira. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019, 82.
- 80) PONT, Laura, BARBOSA, José, BENAVENTE, Fernando. A rapid and simple method for the determination of organic acids in proteolytic enzymes by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *Microchemical Journal*. 2020, 158.
- 81) LUIS, Saavedra, CORAL, Barbas. Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines. *Electrophoresis*. 2003, 24(12-13), 2235-2243.
- 82) KENNEY, F. Beverly. Fermentation of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1991, 546, 423-430.

- 83) FUNG Y. S., LAU K. M. Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2003, 24(18), 3107-3296.
- 84) KLAMPFL CH. W. Determination of organic acids by CE and CEC methods. *ELECTROPHORESIS*. 2007, 28(19), 3345-3578.
- 85) KRÍŽ, Martin. Analýza organických kyselin v medovině. *Diplomová práce*. Pardubice, 2017. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- 86) NOLLET, L. M. L. Liquid Chromatography in Food Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation*. 2015.
- 87) DA COSTA, Marion, Pereira, CONTE-JUNIOR, Carlos, Adam. Chromatographic Methods for the Determination of Carbohydrates and Organic Acids in Foods of Animal Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2015, 14(5), 586-600.
- 88) CHINNICI, Fabio, SPINABELLI, Umberto, RIPONI, Claudio, AMATI, Aureliano. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005, 18(2-3), 121-130.
- 89) BEGEROW, Jutta, DUNEMANN, Lothar. Sample Preparation for Trace Analysis. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2014.
- 90) SAMADIFAR, Mahsa, YAMINI. Yadollah, KHATAEI, Mohammad Mahdi, SHIRANI, Mahboue. Automated and semi-automated packed sorbent solid phase (micro) extraction methods for extraction of organic and inorganic pollutants. *Journal of Chromatography A*. 2023, 1706.
- 91) HORÁK, Tomáš, ČULÍK, Jiří, JURKOVÁ, Marie, ČEJKA, Pavel, KELLNER, Vladimír. Využití SPE a SPME při analýze piva. *Kvasný průmysl*. 2006, 52(3), 78-82.
- 92) NOLAND, Patrick, Solid Phase Extraction. *Encyclopedia of Agrochemicals*. 2003.
- 93) KLIKAROVÁ, Jitka, ŘEHÁKOVÁ, Barbora, ČESLOVÁ, Lenka. Evaluation of regular and decaffeinated (un)roasted coffee beans using HPLC and multivariate statistical methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2022, 114.
- 94) ROGERS, W. J., MICHAUX, S., BASTIN, M., & BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science*. 1999, 149(2), 115–123.
- 95) KUKLEVA, Ekaterina. Stanovení organických kyselin v pivu metodou HPLC. *Bakalářská práce*. Praha, 2013. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

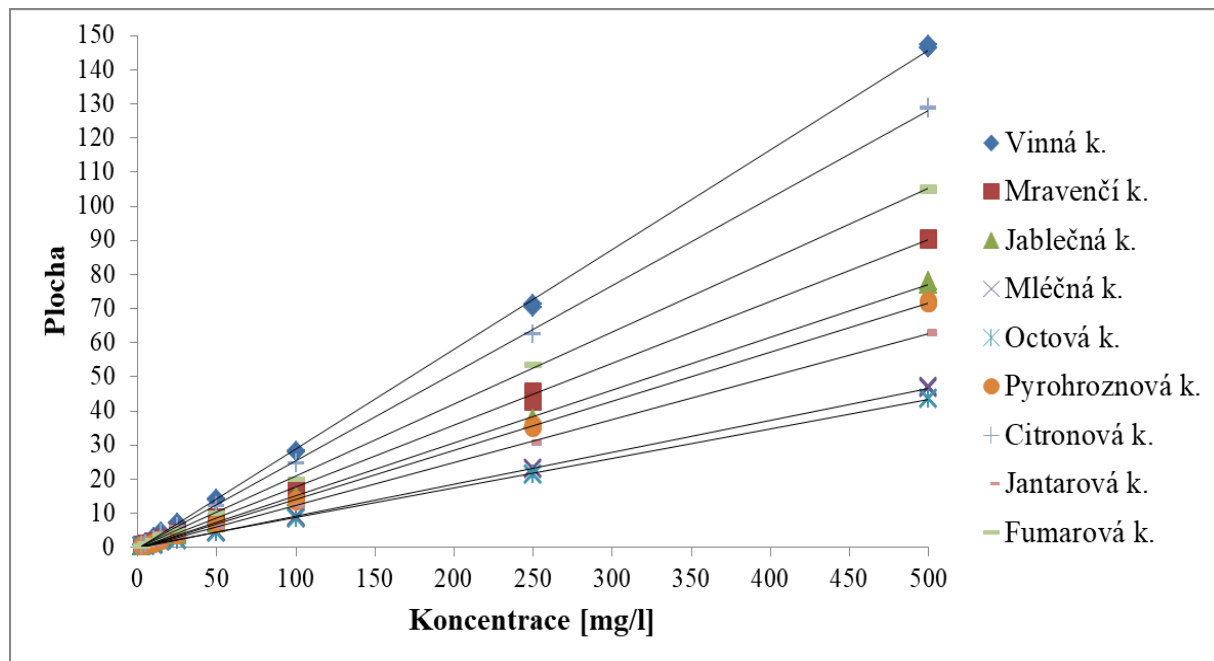


- 96) WANG, T., FENG, X., LIN, M., WANG, P., CAO, X., ZHANG, W. Established methods and comparison of 10 organic acids based on reversed phase chromatography and hydrophilic interaction chromatography. *CY-Ta Journal of Food*. 2022, 20(1), 206-217
- 97) HUANG, Y., TIAN, Y., ZHANG, Z., PENG, C. A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar. *Journal of Chromatography B*. 2012, 905, 37-42.

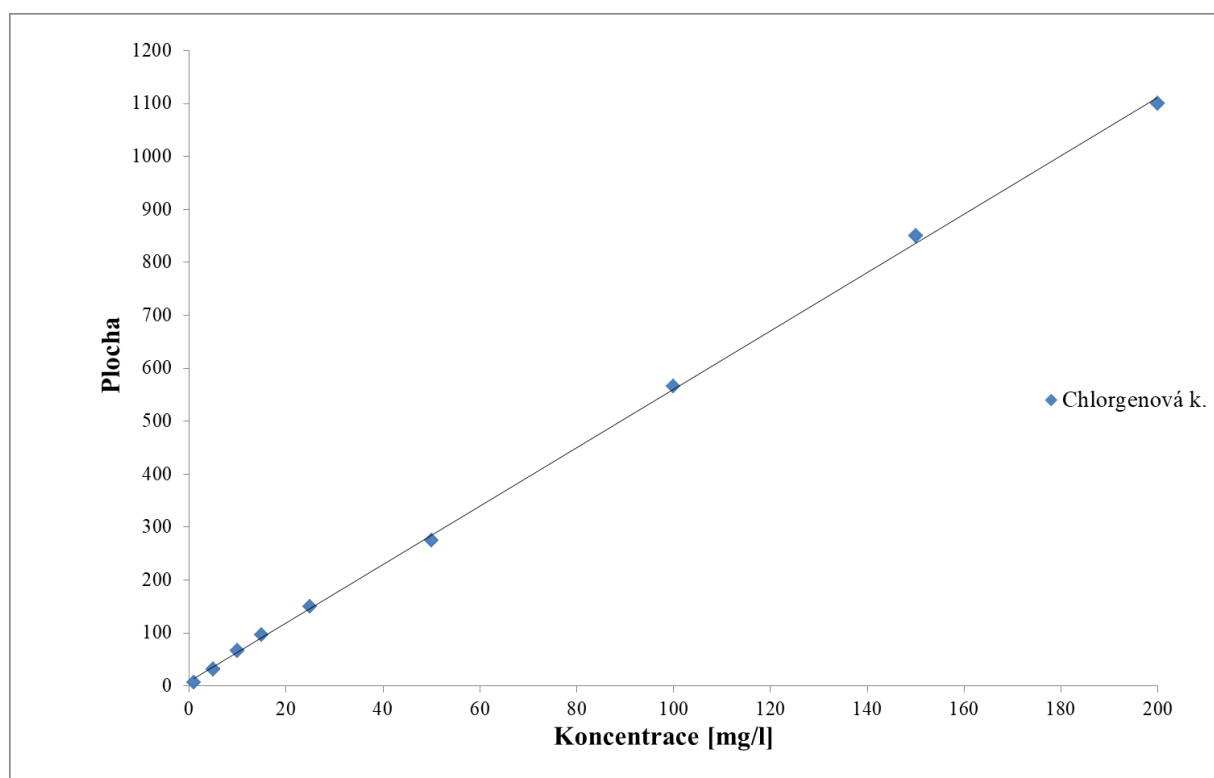
## 6. PŘÍLOHY

<b>Příloha 1:</b> Kalibrační křivka vybraných organických kyselin analyzovaných metodou HPLC-DAD .....	82
<b>Příloha 2:</b> Kalibrační křivka kyseliny chlorgenové analyzované metodou HPLC-DAD.....	82
<b>Příloha 3:</b> Kalibrační křivka vybraných organických kyselin analyzovaných metodou CZE-DAD .....	82
<b>Příloha 4:</b> Koncentrace $\pm$ RSD vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD .....	84
<b>Příloha 5:</b> Koncentrace $\pm$ RSD chlorgenových kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD.....	85
<b>Příloha 6:</b> Koncentrace vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích kávy analyzovaných metodou CZE-DAD .....	86

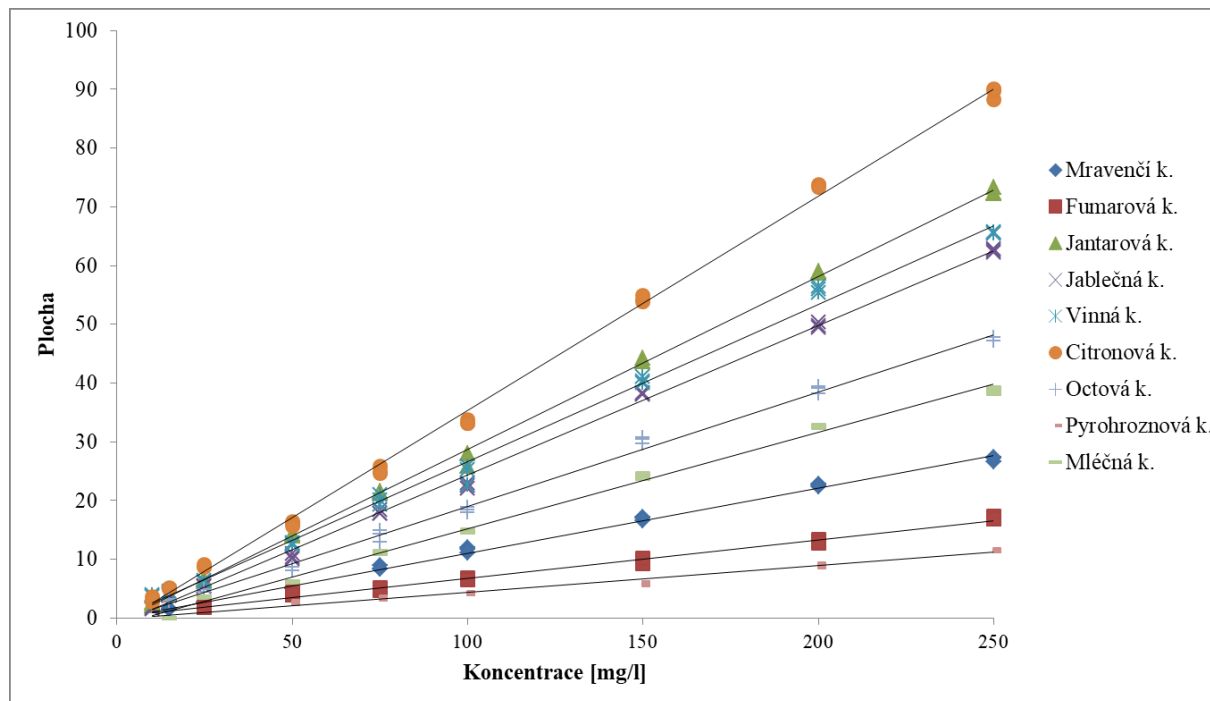
**Příloha 1:** Kalibrační křivka vybraných organických kyselin analyzovaných metodou HPLC-DAD



**Příloha 2:** Kalibrační křivka kyseliny chlorgenové analyzované metodou HPLC-DAD



**Příloha 3:** Kalibrační křivka vybraných organických kyselin analyzovaných metodou CZE-DAD



**Příloha 4:** Koncentrace  $\pm$  RSD vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD

<b>mg/150ml, Pražená kávová zrna</b>						
<b>Kyselina</b>	<b>Mravenčí k.</b>	<b>Jablečná k.</b>	<b>Octová k.</b>	<b>Pyrohroznová k.</b>	<b>Citronová k.</b>	<b>Fumarová k.</b>
<b>P1</b>	100,5 $\pm$ 1,2	35,2 $\pm$ 2,3	60,0 $\pm$ 3,8	44,6 $\pm$ 7,5	56,5 $\pm$ 0,5	83,5 $\pm$ 1,5
<b>P2</b>	81,5 $\pm$ 1,2	44,8 $\pm$ 1,1	275,0 $\pm$ 3,8	<LOD	56,8 $\pm$ 1,1	65,7 $\pm$ 1,5
<b>P3</b>	80,7 $\pm$ 1,2	33,6 $\pm$ 1,1	89,7 $\pm$ 8,3	<LOD	58,7 $\pm$ 1,3	68,6 $\pm$ 1,7
<b>P4</b>	98,1 $\pm$ 1,2	38,4 $\pm$ 2,3	68,1 $\pm$ 1,9	<LOD	75,0 $\pm$ 0,0	58,6 $\pm$ 0,0
<b>P5</b>	83,2 $\pm$ 1,2	35,2 $\pm$ 1,1	55,9 $\pm$ 1,9	<LOD	59,6 $\pm$ 1,1	59,1 $\pm$ 0,8
<b>P6</b>	78,2 $\pm$ 1,2	30,4 $\pm$ 1,1	38,2 $\pm$ 1,6	<LOD	50,8 $\pm$ 0,7	40,7 $\pm$ 0,0
<b>P7</b>	103,9 $\pm$ 1,2	51,2 $\pm$ 3,4	87,0 $\pm$ 3,3	<LOD	68,0 $\pm$ 0,0	82,9 $\pm$ 2,2
<b>P8</b>	101,4 $\pm$ 2,3	49,6 $\pm$ 3,0	70,8 $\pm$ 3,3	<LOD	75,0 $\pm$ 0,0	92,4 $\pm$ 1,5
<b>P9</b>	122,9 $\pm$ 2,3	54,4 $\pm$ 1,1	73,5 $\pm$ 1,9	<LOD	78,2 $\pm$ 0,7	90,0 $\pm$ 0,8
<b>P10</b>	79,1 $\pm$ 1,2	29,6 $\pm$ 0,0	81,6 $\pm$ 1,9	<LOD	59,2 $\pm$ 1,3	67,5 $\pm$ 1,5
<b>mg/150 ml, Zelená kávová zrna</b>						
<b>Kyselina</b>	<b>Mravenčí k.</b>	<b>Jablečná k.</b>	<b>Octová k.</b>	<b>Pyrohroznová k.</b>	<b>Citronová k.</b>	<b>Fumarová k.</b>
<b>Z1</b>	53,4 $\pm$ 1,2	44,2 $\pm$ 1,0	42,4 $\pm$ 0,0	23,8 $\pm$ 1,3	96,8 $\pm$ 1,3	39,6 $\pm$ 0,8
<b>Z2</b>	45,2 $\pm$ 3,5	37,4 $\pm$ 2,9	54,1 $\pm$ 2,1	23,1 $\pm$ 2,7	89,4 $\pm$ 0,7	21,2 $\pm$ 0,0
<b>Z3</b>	51,8 $\pm$ 2,3	42,8 $\pm$ 1,9	59,9 $\pm$ 3,6	25,7 $\pm$ 4,0	85,2 $\pm$ 1,7	44,3 $\pm$ 1,5
<b>Z4</b>	44,4 $\pm$ 1,2	36,7 $\pm$ 1,0	30,8 $\pm$ 5,5	18,1 $\pm$ 1,3	88,9 $\pm$ 0,0	11,1 $\pm$ 0,8
<b>Z5</b>	43,5 $\pm$ 1,2	36,0 $\pm$ 1,0	51,2 $\pm$ 0,0	<LOD	82,9 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 1,5
<b>Z6</b>	41,0 $\pm$ 1,2	34,0 $\pm$ 1,0	71,6 $\pm$ 5,5	15,2 $\pm$ 1,3	62,9 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 0,8
<b>Z7</b>	50,1 $\pm$ 0,0	41,5 $\pm$ 0,0	42,4 $\pm$ 3,6	21,9 $\pm$ 1,3	98,7 $\pm$ 0,0	28,9 $\pm$ 0,8
<b>Z8</b>	47,7 $\pm$ 0,0	39,4 $\pm$ 0,0	83,3 $\pm$ 4,1	23,8 $\pm$ 3,5	94,5 $\pm$ 0,0	18,2 $\pm$ 0,8
<b>Z9</b>	53,4 $\pm$ 1,2	44,2 $\pm$ 1,0	43,9 $\pm$ 5,5	22,8 $\pm$ 0,0	105,2 $\pm$ 0,7	18,8 $\pm$ 1,7
<b>Z10</b>	43,5 $\pm$ 1,2	36,0 $\pm$ 1,0	41,0 $\pm$ 2,1	<LOD	28,9 $\pm$ 0,0	9,9 $\pm$ 0,8

**Příloha 5:** Koncentrace  $\pm$  RSD chlorgenových kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích kávy analyzovaných metodou HPLC-DAD

mg/150 ml, Pražená kávová zrna				mg/150 ml, Zelená kávová zrna			
Kyselina	Neochlorgenová k	Chlorgenová k.	Kryptochlorgenová k.	Kyselina	Neochlorgenová k	Chlorgenová k.	Kryptochlorgenová k.
<b>P1</b>	28,7 $\pm$ 0,1	78,3 $\pm$ 0,2	33,1 $\pm$ 0,2	<b>Z1</b>	25,3 $\pm$ 0,1	193,0 $\pm$ 0,3	33,4 $\pm$ 0,1
<b>P2</b>	46,8 $\pm$ 0,0	135,6 $\pm$ 0,2	53,6 $\pm$ 0,2	<b>Z2</b>	17,7 $\pm$ 0,2	235,9 $\pm$ 0,7	35,7 $\pm$ 0,1
<b>P3</b>	25,7 $\pm$ 0,1	106,0 $\pm$ 0,3	31,0 $\pm$ 0,5	<b>Z3</b>	16,1 $\pm$ 0,0	274,3 $\pm$ 0,1	28,4 $\pm$ 0,3
<b>P4</b>	34,7 $\pm$ 0,1	101,7 $\pm$ 0,1	44,1 $\pm$ 0,0	<b>Z4</b>	19,8 $\pm$ 0,1	157,6 $\pm$ 0,7	30,8 $\pm$ 0,3
<b>P5</b>	28,5 $\pm$ 0,1	86,5 $\pm$ 0,1	32,8 $\pm$ 0,2	<b>Z5</b>	47,6 $\pm$ 0,2	179,0 $\pm$ 0,6	53,5 $\pm$ 0,1
<b>P6</b>	33,4 $\pm$ 0,1	97,5 $\pm$ 0,9	41,0 $\pm$ 2,3	<b>Z6</b>	15,8 $\pm$ 0,2	155,8 $\pm$ 0,1	27,1 $\pm$ 0,2
<b>P7</b>	35,5 $\pm$ 0,0	95,8 $\pm$ 0,1	41,0 $\pm$ 0,1	<b>Z7</b>	19,9 $\pm$ 0,1	229,4 $\pm$ 0,2	34,1 $\pm$ 0,4
<b>P8</b>	35,8 $\pm$ 0,1	95,0 $\pm$ 0,1	44,1 $\pm$ 0,1	<b>Z8</b>	29,4 $\pm$ 0,2	188,4 $\pm$ 0,3	43,3 $\pm$ 0,1
<b>P9</b>	28,6 $\pm$ 0,1	84,6 $\pm$ 0,3	36,3 $\pm$ 0,1	<b>Z9</b>	14,3 $\pm$ 0,1	206,7 $\pm$ 0,1	28,5 $\pm$ 0,3
<b>P10</b>	31,3 $\pm$ 0,1	115,1 $\pm$ 0,2	40,4 $\pm$ 0,1	<b>Z10</b>	17,3 $\pm$ 0,1	238,1 $\pm$ 0,5	28,7 $\pm$ 0,3

**Příloha 6:** Koncentrace vybraných organických kyselin (mg/150 ml) v obdržených vzorcích kávy analyzovaných metodou CZE-DAD

mg/150 ml, Pražená kávová zrna								
Kyselina	Mravenčí k.	Fumarová k.	Jantarová k.	Jablečná k.	Vinná k.	Citronová k.	Octová k.	Mléčná k.
P1	22,6±0,5	117,1±0,6	6,6±0,5	48,8±0,9	16,5±0,9	97,6±1,5	99,6±2,0	<LOD
P2	19,6±3,1	56,8±2,6	<LOD	40,1±1,7	7,5±0,7	60,3±1,2	54,3±1,7	<LOD
P3	13,3±1,6	61,8±5,1	6,0±0,7	28,4±1,5	10,2±2,1	59,7±1,2	95,9±1,7	<LOD
P4	24,4±2,1	65,4±1,3	<LOD	37,5±1,2	14,8±3,8	83,0±1,6	73,7±0,4	<LOD
P5	20,5±3,6	66,5±4,0	4,7±1,2	36,0±2,8	12,3±1,5	75,7±0,4	78,4±1,7	<LOD
P6	15,1±2,6	70,0±11,6	6,2±0,7	42,7±4,7	12,7±1,4	93,3±0,7	89,9±1,7	<LOD
P7	36,5±4,2	107,6±2,2	6,0±1,6	64,4±3,8	15,5±0,4	105,4±0,7	127,5±1,8	<LOD
P8	28,1±2,0	103,7±5,4	6,3±1,0	53,0±0,6	14,0±1,5	92,8±1,1	103,6±2,5	<LOD
P9	33,5±2,2	83,1±2,4	<LOD	55,7±0,1	12,1±2,0	83,9±0,2	98,5±0,4	<LOD
P10	17,9±0,3	70,0±2,6	5,3±0,4	32,6±0,4	13,1±0,1	66,8±0,2	111,5±2,7	<LOD
P11	27,9±3,3	206,7±4,7	21,8±1,5	56,8±1,4	31,5±0,4	100,7±1,1	172,2±5,8	16,8±1,7
P12	24,3±0,7	172,2±6,1	24,3±0,3	23,9±0,8	22,8±2,3	52,0±1,1	104,6±3,6	18,3±2,3
mg/150 ml, Zelená kávová zrna								
Kyselina	Mravenčí k.	Fumarová k.	Jantarová k.	Jablečná k.	Vinná k.	Citronová k.	Octová k.	
Z1	<LOD	50,0±2,1	<LOD	53,1±0,4	<LOD	125,6±1,5	<LOD	
Z2	<LOD	<LOD	<LOD	44,4±3,1	<LOD	75,0±0,3	<LOD	
Z3	<LOD	37,7±0,7	<LOD	35,2±2,6	<LOD	94,2±2,0	42,5±2,8	
Z4	<LOD	<LOD	<LOD	33,6±1,1	<LOD	85,4±1,6	<LOD	
Z5	8,1±0,7	32,4±2,5	<LOD	37,5±1,3	<LOD	93,6±1,6	<LOD	
Z6	<LOD	<LOD	<LOD	23,3±0,5	<LOD	85,8±4,2	18,6±3,2	
Z7	<LOD	100,1±5,4	<LOD	67,8±2,2	<LOD	122,6±0,9	38,1±2,0	
Z8	<LOD	33,0±4,0	4,6±0,3	60,0±0,7	<LOD	109,6±2,3	21,6±2,3	
Z9	<LOD	229,3±2,6	<LOD	28,5±0,8	<LOD	50,9±1,4	<LOD	
Z10	<LOD	62,5±2,9	4,1±1,0	29,9±0,3	<LOD	89,6±1,4	52,9±3,7	