

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

MOŽNOSTI STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK KÁVY

Martin Lobotka

Bakalářská práce

2014

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin Lobotka**
Osobní číslo: **C11157**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Možnosti stanovení jednotlivých složek kávy**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. V teoretické části popište výrobu kávy a její chemické složení. Zjistěte, jakým způsobem se vzorky kávy připravují na analýzu.
2. V druhé části popište, jakými metodami lze látky v kávě stanovit. Zaměřte se na separační metody.
3. Získané výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2014

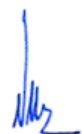
Termín odevzdání bakalářské práce:

18. července 2014



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2014

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 18.7. 2014

Martin Lobotka

Chtěl bych tímto poděkovat panu Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za konstruktivní kritiku, cenné rady a projevenou trpělivost. Dále můj dík patří i mé přítelkyni a rodině za velikou podporu během psaní této práce.

ANOTACE

Bakalářská práce shrnuje informace o technologickém výrobním postupu a chemickém složení kávy. Zaměřuje se na možnosti stanovení jednotlivých skupin látek pomocí metod analytické chemie. Pozornost je věnována hlavně separačním metodám.

KLÍČOVÁ SLOVA

káva, složení kávy, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie

TITTLE

Determination of the components of coffee

ANNOTATION

This bachelor thesis summarizes information about technology process and substance composition of coffee and focuses on possibility of determination groups of compounds using methods of analytical chemistry. More attention is dedicated to analytical separation.

KEYWORDS

coffee, composition of coffee, liquid chromatography, gas chromatography

Obsah

1. ÚVOD	10
2. KÁVA.....	11
2.1 Historie kávy	11
2.2 Botanické zařazení kávovníku	12
2.2.1 <i>Coffea arabica</i>	13
2.2.2 <i>Coffea canephora</i>	14
2.2.3 <i>Coffea liberica</i>	14
2.2.4 <i>Coffea stenophylla</i>	14
2. TECHNOLOGIE KÁVY.....	15
2.1 Sběr plodů	15
2.2 Získání semen	16
2.2.1 Suchá metoda	16
2.2.2 Mokrý metoda	16
2.3 Pražení.....	17
2.3.1 Chemické a biologické změny, probíhající během pražení zrn	20
2.4 Mletí pražených zrn	21
3. SLOŽENÍ KÁVY	22
3.1 Minerální látky v kávě	22
3.2 Organické látky v kávě	23
3.2.1 Aminokyseliny a proteiny	23
3.2.2 Alkaloidy	24
3.2.3 Sacharidy	26
3.2.4 Lipidy	28
3.2.5 Kyselina chlorogenová.....	31
3.2.6 Karbonylové sloučeniny.....	31
3.2.6.1 Aldehydy	31
3.2.6.2 Ketony	32
3.2.7. Ostatní sloučeniny	34
4. METODY VYUŽITELNÉ KE STANOVENÍ LÁTEK V KÁVĚ.....	36
4.1. Odměrná stanovení (Volumetrie)	36
4.1.1 Stanovení kyseliny chlorogenové jodometrickou titrací	36
4.2 Gravimetrie	36

4.2.1 Vázkové stanovení směsi theobrominu a kofeinu	37
4.3 Separční metody	37
4.3.1 Plynová chromatografie	39
4.3.1.1 Stanovení těkavých látek v pražené kávě s použitím FID a MS	41
4.3.1.2 Stanovení těkavých látek po předchozí mikroextrakci pevnou fází s použitím MS.....	42
4.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	42
4.3.2.1 Stanovení purinových alkaloidů	44
4.3.2.2 Stanovení triglyceridů	45
4.3.2.3 Stanovení tokoferolů.....	45
4.3.2.4 Stanovení fenolických látek.....	45
4.3.2.5. Stanovení sacharidů	46
4.3.2.6 Stanovení aminokyselin	46
4.3.2.7 Stanovení trigonellinu	47
4.3.2.8 Stanovení kyseliny nikotinové.....	47
4.3.3 Tenkovrstvá chromatografie	47
4.3.3.1 Stanovení purinových alkaloidů	48
4.3.4 Kapilární elektromigrační metody	48
4.3.4.1 Stanovení purinových alkaloidů pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie s detekcí v UV oblasti	48
4.3.4.2 Stanovení organických kyselin v kávě pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí	48
4.4 Elektroanalytické metody	49
4.4.1 Stanovení kofeinu pomocí voltametrie s uhlíkovými pastovými elektrodami	49
4.5 Optické metody	50
4.5.1 Spektrofotometrické stanovení kofeinu.....	51
4.5.2 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	51
4.5.3 Spektrofotometrické stanovení kahweolu	51
5. ZÁVĚR.....	52
6. SEZNAM LITERATURY	53

Seznam zkratek

CEC – elektrochromatografie (Capillary Electrochromatography)

CGE – kapilární gelová elektroforéza (Capillary Gel Electrophoresis)

CIEF – kapilární izoelektrická fokusace (Capillary Isoelectric Focusing)

CITP – kapilární izotachoforéza (Capillary Isotachophoresis)

CZE – kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)

ECD – detektor elektronového záchytu (Electron Capture Detector)

FID – plamenově ionizační detektor (Flame Ionisation Detector)

GC – plynová chromatografie (Gas Chromatography)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

LC – kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

MEKC – micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography)

MS – hmotnostní spektrometr/spektrometrie (Mass Spectrometry)

ppm – částic z miliónu, tj. jedna desetitisícina procenta (parts per milion)

SFC – superkritická fluidní chromatografie (Supercritical Fluid Chromatography)

UV – ultrafialové záření

1. Úvod

Káva je nápoj s dlouholetou tradicí, připravovaný z horké vody a různě upravovaných semen rostlin rodu *Coffea*. Kávou rozumíme i samotná zpracovaná semena. Z hlediska výživy je pro nízké nutriční hodnoty řazena mezi pochutiny. Káva je proto konzumována především pro povzbudivé účinky a sensorické vlastnosti, dále je zdrojem látek, prospěšných pro lidské zdraví, především antioxidantů. Vzhledem k velmi širokému zastoupení různých látek a složitých chemických pochodů, doprovázející technologický výrobní proces, je káva stále předmětem vědeckého výzkumu, ať už z farmakologického nebo právě z hlediska analytické chemie.

Cílem této práce je poukázání na možnosti stanovení, ať už nových látek, nebo látek již objevených, pomocí rozličných analytických metod, zejména metod separačních.

2. Káva

Káva patří společně s čajem mezi nejstarší nápoje vůbec. Díky tak dlouhé tradici má velmi širokou základnu konzumentů po celém světě. To dokládá i statistika, provedená k 1.1. 2014 v USA (viz Tab 1)¹.

Tabulka 1: Statistické údaje, týkající se konzumace kávy v USA, vztažené k 1.1 2014¹.

54 %	obyvatel nad 18 let pije kávu každý den
60 %	konzumentů pije kávu každé ráno
65 %	veškeré kávy se zkonsumuje během snídane
30 %	konzumentů preferuje černou kávu
400000000000 \$	utratí každý rok USA za import kávy
164,71 \$	utratí ročně každý konzument za kávu

Díky obrovské poptávce se káva stala strategickou subtropickou plodinou. Toto tvrzení dokládá i celková suma peněz, utracená za import kávy celosvětově, částka překračuje 100 miliard dolarů. Jedná se tedy o obchodní artikl s dlouhodobě silnou pozicí ve světě a nelze očekávat nějaké výraznější změny. Přestože se na trhu objevuje velké množství kávovinových nápojů, po nichž poměrně rychle roste poptávka, zůstává tradiční káva stále oblíbenější².

2.1 Historie kávy

Samotný kávovník je známý už několik tisíc let. Jako původní oblast výskytu lze označit území dnešní Etiopie ve východní Africe. Na této půdě divoce rostly kávovníky, proto byla jen otázka času, kdy je člověk objeví. Stalo se tomu někdy ve 13. až 14. století našeho letopočtu. Následovalo rozšíření kávy na Arabský poloostrov. Jako styčný bod sloužil dnešní Jemen, nacházející se na západní straně Arabského poloostrova. Káva tedy překonala jen asi 20 km nejjižnější části Rudého moře, které odděluje Arabský poloostrov a africký kontinent. Přesun na Arabský poloostrov byl klíčový, neboť tamější obyvatelé zcela převzali otěže pěstování kávy a odstartovali éru kávovníkových plantáží. Arabové ale distribuci kávy pečlivě kontrolovali, byl přísně zakázán vývoz zelené kávy. Okolo roku 1600 přivezli Holanďané kávu do Indie, do Evropy káva přicestovala společně s benátskými kupci v roce 1615. Severní Amerika čekala na kávový nápoj do roku 1668. V roce 1699 se káva objevuje také v Indonésii. Kolébkou pěstování byl ostrov Jáva, oblast Batavia. Kolumbii se dostalo kávového osvětlení někdy kolem roku 1723. V roce 1730 mořeplavci královského

námořnictva dovezli kávu na Jamajku. Postupem času zde vznikla vyhledávaná jakostní káva s charakteristickou chutí, přezdívaná „Blue Mountain“. Obrovská expanze pěstování kávy se odehrála v Brazílii. V roce 1830 zde byly založeny rozlehlé plantáže kávovníků s dosud nevídaným objemem produkce zrn^{3,4}.

V dnešní době si mezi producenty kávy udržela první příčku Brazílie. Ta si díky své poloze a podmínkám, vhodným k pěstování této plodiny, dlouhodobě udržuje prvenství v produkci kávových zrn. Mezi pěstované druhy patří hlavně Brazílská arabika, která zaujímá cca 24 % veškeré arabiky, vypěstované na celém světě. Robusta je v Brazílii pěstována méně, zaujímá cca 9 % z celkového množství ve světě. Dalšími významnými producenty jsou Vietnam a Kolumbie. Statistiky uvádějí, že tyto tři kávové velmoci vyprodukují zhruba polovinu veškeré kávy na Zemi. Mezi další, leč menší producenty, patří Indonésie, Etiopie, Indie a Mexiko. Celkem kávu pěstuje přibližně 60 zemí⁵.

2.2 Botanické zařazení kávovníku

Mezi kávovníky řadíme více než 40 zástupců z rodu *Coffea*. Hospodářsky významné jsou pouze druhy dva, *Coffea arabica* L. neboli kávovník arabský či „arabika“ a *Coffea canephora* var. *robusta*. Úplná taxonomická klasifikace kávovníku arabského je uvedena v Tab. 2⁶.

Tabulka 2: Taxonomické zařazení kávovníku arabského⁷.

Říše	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	Krytosemenné (<i>Angiospermae</i>)
Třída	Dvouděložné (<i>Dicotyledoneae</i>)
Podtřída	<i>Asteridae</i>
Řád	Hořcotvaré (<i>Gentianales</i>)
Čeleď	Mořenovité (<i>Rubiaceae</i>)
Druh	Kávovník arabský (<i>Coffea arabica</i>)

Kávovníky jsou obecně dřeviny. Jejich vzrůst se pohybuje od cca 1 m po 15 m vysoké stromy. Hloubka kořenového systému kolísá s druhem, zpravidla ale zasahuje do cca 1,5 m⁴.

2.2.1 *Coffea arabica*

Jedná se až o 3 m vysoký, stálezelený keř s párovým bočním větvením (viz Obr. 1). Listy jsou kopinaté, kožovité, přibližně 8 – 15 cm dlouhé, tvaru elipsy. Na vrchní straně jsou tmavě zelené, rub listu je ale výrazně světlejší. K větvím jsou připojeny krátkými řapíky. Květy jsou bílé s charakteristickou vůní, rostou v trsech. Rostlina kvete v závislosti na okolních podmínkách. Mezi ně patří hlavně vlhkost a teplota. Např. v nížinatých oblastech s dostatkem srážek je kávovník schopen kvést téměř po celý rok. Naopak je tomu např. v Kostarice, tam kávovníky kvetou zpravidla jednou, a to v období března. V celkové produkci kávy zaujímá arabika majoritní podíl, cca 75 – 80 %^{4,8}.



Obrázek 1: Rostlina *Coffea arabica*⁹.

Postupným šlechtěním a křížením kávovníku arabského bylo dosaženo velkého množství různých odrůd a hybridů (viz níže).

Coffea arabica var. *maragogipe*. Jedná se o hybrid *Coffea arabica*, který nese jméno Maragogipe, odvozené od okresu spolkového státu Bahia v Brazílii. Odrůda je typická výrazně většími plody, samotná semena jsou až o třetinu větší než je tomu u běžné arabiky (viz Obr. 2). Na celé rostlině se někdy může vyskytovat pouze několik bobulí^{4,8,10}.

Mezi další hybridy lze zařadit *Laurinu*, což je hybrid *C. arabica* a *C. mauritiana* a odrůdu *Mokka*, která je typická svým výrazným aroma. Žlutoplodá *Amarella*, *Bullata*, a červenolistá varianta *Purpurescens*, patří rovněž ke křížencům původní arabiky⁸.



Obrázek 2: Srovnání velikosti zrna klasické arabiky a hybridu maragogipe¹¹.

2.2.2 *Coffea canephora*

Poprvé byla objevena v Kongu, přibližně v roce 1898. Rostlina je celkově robustnější než *Coffea arabica*, má rovněž větší a tenčí listy na dlouhých větvích. Listy a větve tvoří charakteristický profil, připomínající deštník. Dobře se jí daří ve vyšších nadmořských výškách, kde bývá často pěstována. Po *Coffea arabica* je *canephora* druhým nejvíce pěstovaným zástupce rodu *Coffea*, zaujímá cca 30 % z celkové kávové produkce^{8,10}.

2.2.3 *Coffea liberica*

Libericu lze od ostatních zástupců rodu *Coffea* snadno rozlišit už na první pohled. Dosahuje totiž velmi vysokého vzrůstu, často až 15 m. Oproti *Coffea arabica* je tedy výrazně vyšší a celkově mohutnější. Má velmi tlusté listy, velké kulovité plody tmavě červené barvy, které po dozrání neopadávají, jako je tomu u kávovníku arabského. Tlusté listy pomáhají rostlině přežít na místech s vysokou insolancí⁸.

2.2.4 *Coffea stenophylla*

Tento druh je často porovnáván s arabským kávovníkem kvůli jeho sensorickým vlastnostem, které jsou na velmi dobré úrovni. Oproti ostatním druhům má znatelně menší listy. Plody tohoto kávovníku zrají velmi dlouhou dobu, dlouho rovněž trvá, než rostlina poprvé začne nést plody. Tento kávovník je typický pro oblast Sierra Leone⁸.

2. Technologie kávy

Technologický postup zpracování kávy lze rozdělit na několik etap:

- sběr plodů
- získání semen a jejich úprava
- pražení kávy
- mletí pražených zrn

2.1 Sběr plodů

Vyzrálé plody mají barvu zpravidla červenou, modrofialovou, ale někdy i žlutou či bílou. Vzhledem připomínají třešně. První úrodu dávají kávovníky po 3 až 4 letech od výsadby. Rostlina obvykle nese jednou za rok, neboť plody dozrávají 6 – 8 měsíců u arabiky a 9 – 11 měsíců u robusty. V některých oblastech kávovník může nést dvakrát do roka, jedná se o země, kde se střídá období sucha a deště v pravidelných intervalech (Keňa, Kolumbie). Doba sběru sklizně se liší s geografickým umístěním produkční země. Například v Etiopii a Střední Americe probíhá sběr zpravidla od září do prosince. Trochu jižněji, v oblasti Brazílie, probíhá sklizeň v dubnu až květnu, v rovníkových oblastech (Kolumbie), může proběhnout sběr v kteroukoli roční dobu^{4,8}.

Vlastní sběr často probíhá paradoxně tak, jako před stovkami let, tedy ručně. Pouze na větších plantážích se užívá strojového sběru. Prioritou je získat plody v optimální zralosti, neboť nedozrálé plody po utrnutí už nedozrají, přezrálé naopak mohou být zkažené. Sběr může být realizován jednorázově, to znamená, že je sklizena celá úroda, nebo může proběhnout výběrovým způsobem. Tím rozumíme sběr takových semen, která jsou optimálně dozrána. V určitém časovém intervalu je pak realizován další sběr, atd. Z jedné plantáže jsou tedy získány různě staré plody. Doba sklizně se pak promítne do označení jednotlivých várek, často se používají 4 označení⁴.

- old crop – starý sběr
- past crop – minulý sběr
- present crop – současný sběr
- new crop – nový sběr

2.2 Získání semen

V ideálním případě následuje krok získání semen bezprostředně po jejich sběru. Vyzrálé plody se nejprve čistí, zpravidla proplachováním vodou, tím jsou plody zbaveny zbytky zeminy a jiných nečistot. Pak následuje jeden z technologických postupů, a to tzv. suchý způsob nebo mokrá způsob. Tyto dva postupy diferencují 2 různé druhy kávy. Tzv. pranou a nepranou kávu. Praná káva se získává v oblastech s vyšší zásobou vody, kde je možno použít mokrou metodu. Některé země mají špatně dostupnou vodu a produkují suchým způsobem kávu nepranou^{4,5}.

2.2.1 Suchá metoda

Základní a nejjednodušší způsob získání semen. Plody jsou rozloženy na volnou plochu, betonový, cihlový či jiný povrch, a následně vystaveny přímému slunečnímu svitu. Voda a prudké poklesy teplot působí negativně na sušené bobule, zejména voda přispívá k nežádoucím fermentačním pochodům uvnitř plodů. Dále se bobule pravidelně přehrabávají, rovněž z důvodu potlačení fermentace. Plody se suší přibližně 4 týdny, po uplynutí této doby obsahuje plod přibližně 12 % vody. Vnější slupka zhnědne, semena se volně pohybují uvnitř plodu. Proces sušení je nutno velmi pečlivě sledovat, přílišné vysušení, nebo naopak nedostatečné odstranění vlhkosti vede k problémům, vzniklých v dalších částech technologického postupu⁴.

Ideálně vysušené plody putují do loupacích strojů, kde proběhne mechanické oddělení kávových zrn od zbytku plodu, může být také odstraněna stříbřitá blanka z povrchu semen. Nevýhodou této metody je fakt, že nelze oddělit uschlá, nahnilá či jinak znehodnocená semena. Další nevýhodou je vysoká časová náročnost. Mezi přednosti této metody patří její jednoduchost a nízké náklady na realizaci. Metoda se standardně používá pro kávu nižší jakosti jako tzv. nepraná přírodní káva, zejména v oblasti Brazílie, západní Afriky, Arábie^{4,10}.

2.2.2 Mokrý metoda

Plody jsou ihned po sběru shromážděny ve vodních nádržích, kde se zbavují nečistot. Zde dochází i k rozčlenění na zralé plody a plody nedozrálé či poškozené. Následuje strojní krok, plody jsou vylupovány na strojích, dochází k oddělení dužiny od pergamenového obalu se semeny. Stroje mohou plody rozmělnovat tlakem nebo pomocí válců s rotačními čepelemi. Vylupování by mělo proběhnout co nejdříve, nejpozději do 24 h, pro vysoce jakostní kávy se doporučuje maximální prodleva 12 h. Při vysoké časové prodlevě je pak odstranění dužiny o mnoho náročnější. Ve vyplavovacích kanálech dochází k třídění semen podle jejich hustoty,

zralá zrna jsou těžší než zrna nedozrálá, která je nutno oddělit. Další operací, která bezprostředně navazuje je fermentace. Tento děj probíhá obvykle v betonových nádržích, kam jsou semena dopravena proudem vody. Cílem fermentace je zbavit oplodí zbytků dužiny, která na něm tvoří slizový obal. Celý proces trvá 12 – 36 hodin a je nutné sledovat parametry jako teplotu okolí, množství ulpělé dužiny nebo koncentraci enzymů, podílejících se na fermentaci. Při nezvládnutí procesu může dojít k hnilobě semen, a tudíž ke znehodnocení celé várky. Správně provedená fermentace dává oplodí dokonale zbavená slizové vrstvy. Následuje finální promývání semen vodou, probíhá v tzv. pračkách. Pračky mají zpravidla horizontální, nebo vertikální válcovitou vanu, ve které je umístěno otáčivé vřeteno. V této fázi tedy máme semena, uzavřená tenkou pergamenovou slupkou, která jsou dokonale zbavená dužiny. Produktu v této výrobní fázi se někdy říká káva „pergamino“. Oplodí se semeny obsahuje přibližně 50 % vody, pro další úpravy je nutno tuto hodnotu snížit na cca 11 %. Sušení „pergamina“ probíhá na betonových plochách či sušících stolech, volně na vzduchu. Sušení trvá 12 – 15 dní a semena jsou průběžně přehazována, aby nedošlo k poškození oplodí silným slunečním svitem, a aby bylo zaručeno rovnoměrné sušení. Dále se využívá různých mechanických sušičů, kterých se používá hlavně na velkých plantážích a v uzavřených prostorech, převážně v oblastech s častějším výskytem náhlých dešťových srážek. Principem mechanických sušičů je distribuce sušícího vzduchu k jednotlivým semenům. Po vysušení mohou být semena skladována po delší čas, přibližně po dobu 1 roku. Takováto káva se nazývá kávou „pergamentovou“ neboť jsou zrna stále uzavřena v tenké stříbřité blance^{4,8,10}.

Dalším krokem ve výrobě kávy je vylupování samotných zrn z pergamenového obalu. Jedná se o čistě strojovou záležitost. Stroje zažily velký rozkvět v 19. století, vzniklo několik odlišných konstrukcí. Jedná se například o konstrukci od Belgičana Julese Smouta. Loupač využívá spirálovitého tělesa a rotorem. Oba prvky se točí v opačných směrech a odstraňují obalové vrstvy ze semen. Jiný typ loupáče využívá rotujícího disku v pevné skříni. Disk má po obvodu kolmo umístěné kolíky. Odstředivou silou jsou suroviny vháněny ke kolíkům, kde probíhá segregace zrn a obalových vrstev⁴.

2.3 Pražení

Asi nejdůležitějším krokem ve výrobě kávy je pražení. Jedná se o tepelný proces, jehož výsledkem je nám známé kávové aroma, tvorba tmavého pigmentu a jiné vlastnosti, spojené s praženou kávou. První pokusy o pražení kávy spočívaly v prostém pohození semen do ohně. Pražení, jako řízeného procesu, se začalo využívat okolo roku 1700 v západní Africe

a na Arabském poloostrově. Způsob pražení do jisté míry koresponduje s oblastními tradicemi a zvyklostmi. Podstatou pražení je záhřev semen na teplotu 160 – 220 °C. Zkušený „pražič“ volí z teplotních intervalů ten, který nejlépe vyhovuje danému druhu zelené kávy. V tomto ohledu je člověk zatím nepostradatelný, proto je pro výrobu, zejména jakostních káv, potřeba velkých zkušeností. V zásadě rozlišujeme tři stupně pražení, a to pražení světlé, střední a tmavé. Někdy se používají výrazy: nízké, střední, vysoké. Samozřejmě existuje mnoho dalších stupňů, které se odvíjí od oblastních zvyklostí. Tmavé pražení je charakteristické pro kávy v Brazílii, Vietnamu, Francii, Itálii. Střední Evropa je zvyklá na pražení do středního stupně, Skandinávské země zase preferují světlejší odstín^{4,10}.

Jiné označení jednotlivých stupňů pražení ukazuje Obr. 3. V regionu Severní Ameriky se setkáváme s pojmem „light“ (světlý), který je typický pro tuto oblast. Pražení do tmavšího stupně „city“ (město), je rovněž používáno v oblastech Severní Ameriky, stejně jako pražení „full city“ (plné město). Téměř před spáleným zrnem se nachází velmi tmavé francouzské pražení. Káva, připravená z takto upražené kávy má nízkou kyselost, ale výraznou hořkosladkou chuť⁴.



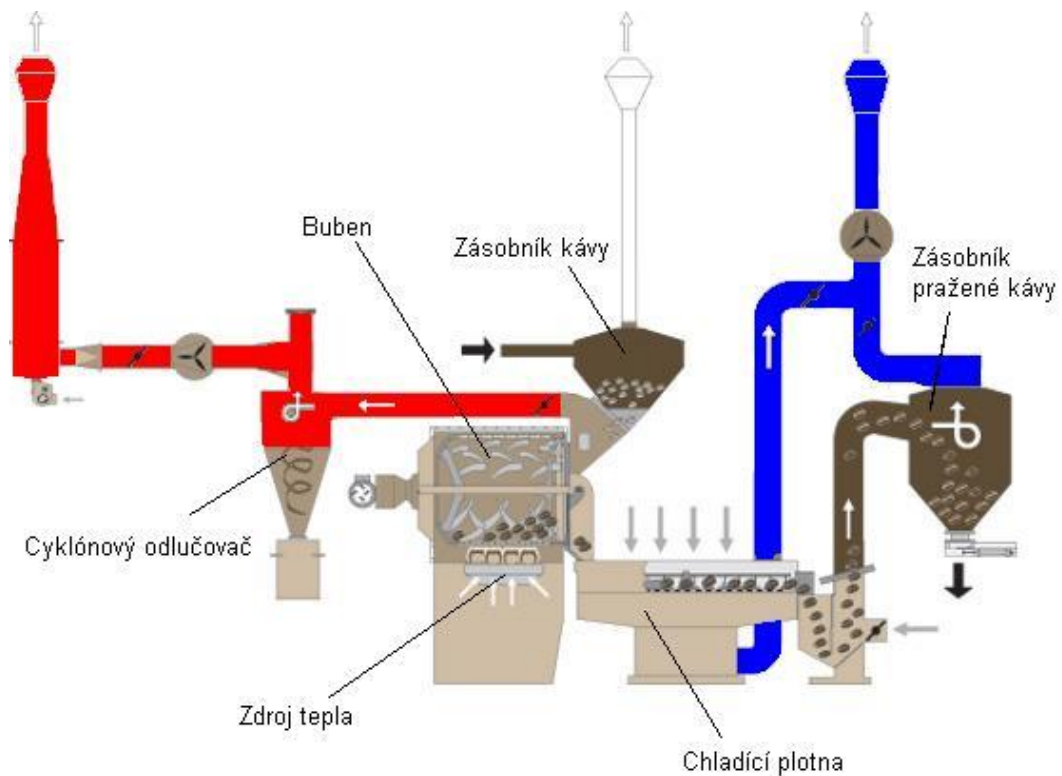
Obrázek 3: Stupně pražení kávových zrn¹².

Samotné pražení dnes probíhá v zařízeních, zvaných „roasters“ neboli pražicí stroje. Podoba přístrojů se v průběhu let podstatně změnila. Od nevzhledných kovových skříní (viz Obr. 4) až po moderní, elektronicky řízená zařízení. Základní součásti ovšem zůstaly stejné, v kovové skříní je uložen kovový buben s horizontálně umístěnou osou. Buben se poté naplní kávovými zrny a za pravidelného otáčení se zahřívá. Dříve se zahřívával nad otevřeným ohněm,

dnes se používají speciální plynové hořáky či topná tělesa, umístěná uvnitř bubny, popřípadě lze zrna pražit i horkým vzduchem⁴.



Obrázek 4: Pražicí stroj velmi jednoduché konstrukce, přibližně z let 1880 – 1900¹³.



Obrázek 5: Schéma moderního pražicího stroje¹⁴.

Moderní pražicí stroj (Obr. 5) je složen z pražicího bubny, který je vyhříván horkým vzduchem. V bubnu jsou umístěny lamely, které zajišťují rovnoměrný pohyb praženého zrna. Vedlejší produkty pražení jsou z bubny odváděny ventilačním okruhem (červeně) a přes cyklónový odlučovač putují do komína. Upražená káva je po ukončení pražení vysypána na

chladicí plotnu a ochlazována pomocí chladicího ventilačního okruhu (modře). Při této operaci jsou zrna nepřetržitě promíchávána. Po ochlazení je káva uskladněna v zásobníku a dále zpracována^{4,14}.

Chladicí část procesu již upražených zrn je rovněž důležitá. Zrna mají být po stanovené době pražení rychle ochlazena, neboť díky tepelné setrvačnosti probíhá pražení i mimo buben pražicího stroje. Chladicí prostory mají většinou podobu válcovité, shora otevřené nádoby (plotny), ve které je umístěno síto s míchadlem. Přes síto proudí chladicí vzduch. Někdy lze zrna rychle ochladit i vodou, tohoto postupu se ale používá v daleko menší míře. Správně upražené zrno by mělo mít vyrovnanou barvu v celém jeho objemu, mělo by mít matný, nebo slabě lesklý vzhled. Aroma čerstvě upražené kávy je poměrně „drsné“, postupem času se ale zjemní⁴.

2.3.1 Chemické a biologické změny, probíhající během pražení zrn

Při takové tepelné operaci, jako je pražení, lze předpokládat velké množství chemických a biologických pochodů. Zrno během pražení ztrácí hmotnost díky odparu vody a jiných těkavých látek. Na druhou stranu nabývá na objemu, a to až o 40 %. Při vysokých teplotách rovněž zrno puká. Předpokládá se, že během pražení vzniká okolo 700 těkavých látek, které se podílejí na chuti a vůni kávy. Jedná se o různé kyseliny, fenolické látky, heterocyklické sloučeniny, karbonylové sloučeniny, uhlovodíky, aj. Dále je třeba zmínit pyrolytické reakce, kdy dochází k rozkladu tuků a sacharidů a reakce, při nichž se škrob rozkládá na jednoduché sacharidy, které mohou dále karamelizovat. Zároveň dochází ke změně pH, které nejprve klesá z hodnoty cca 6 do kyselější oblasti okolo 5. Později ale opět narůstá⁴.

Zvláštní skupinou významných reakcí jsou reakce Maillardovy nebo také reakce neenzymového hnědnutí. Jako reaktanty zde vystupují aminokyseliny, volné či uvolněné z peptidů, a redukující cukry. Vznikají hnědé dusíkaté heterocyklické sloučeniny, melanoidy, jejichž struktura závisí na výchozím cukru, aminokyselině a na podmínkách reakce jako jsou: pH, teplota, doba reakce. Druhým typem reakcí aminokyselin jsou Streckerovy reakce, nebo také Streckerovo odbourávání aminokyselin. Během těchto pochodů dochází za přítomnosti kyslíku k dekarboxylaci a deaminaci α aminokyselin¹⁵.

2.4 Mletí pražených zrn

Samotná extrakce (vyluhování) celých zrn je značně neúčinná. Proto je pro přípravu nápoje nutno zrna rozemlít na prášek. Hrubost umleté kávy je důležitá pro správnou přípravu různých druhů káv. Například hrubě pomletá káva je vhodná jen pro kávu tureckou, kdy je extrakce málo intenzivní, ale dlouhotrvající. Pro přípravu kávy espresso je nutné kávu jemně namlít, neboť extrakce probíhá jen krátkodobě, cca 20 – 25 s⁴.

V dávných dobách se k mletí kávy používaly hmoždíře, kde bylo zrno rozdrveno nedokonale a vznikla poměrně hrubá káva. Později se s úspěchem užívalo metody mlýnských kamenů, sloužící původně k mletí obilí. Postupem času vznikaly stále výkonnější a specializovanější zařízení. Dnes se průmyslově užívá mlýnků s elektrickým pohonem a regulací hrubosti mletí. Mlýnky zpravidla využívají dvou pohyblivých elementů, zdrsňené kotouče, nebo válce, mezi kterými se kávová zrna drtí. Tyto přístroje jsou preferovány ve velkovýrobě kávy. Samotné mletí je většinou realizováno ve dvou stupních. Nejprve jsou zrna rozdrvena a vzniklý hrubozrnný produkt je dále drcen na požadovanou hrubost. Jelikož při jemnějším mletí dochází k intenzivnímu tření strojových částí a kávových zrn, vzniká díky tomu velké množství odpadního tepla. Při dlouhodobém mletí může proto dojít k tepelnému poškození kávy. Z tohoto důvodu bývají mlecí válce chlazeny vodou. Jiné přístroje jsou vybaveny rotujícími čepelími. Avšak mlýnky této konstrukce nedosahují takových kvalit, jako je tomu u předešlé konstrukce⁴.

Mletá káva je náchylná na skladovací podmínky, jelikož na vzduchu ztrácí těkavé látky, a tudíž i své aroma. Kávu je proto třeba co nejrychleji zabalit do obalů s inertní atmosférou, nebo užít vakuového balení. Takto ošetřená káva poté putuje ke spotřebitelům⁴.

3. Složení kávy

Přesné složení, ať už zelené kávy, nebo kávy pražené, nelze vyjádřit s uspokojivou přesností. Látkové složení je závislé na botanickém druhu kávovníku, stáří kávových zrn, na podmínkách pěstování a technologickém procesu. Proto je třeba brát hodnoty uvedené níže, jako čistě orientační. V Tab. 3 jsou uvedeny hodnoty, v hmotnostních procentech, některých významných látek, obsažených v kávových zrnech.

Tabulka 3: Látkové složení zelené kávy v hm. %⁴.

Přítomná látka	C. arabica	C. canephora	Sloučeniny
Rozpustné sacharidy	55 – 65	40 – 55	glukóza, galaktóza, arabinóza, sacharóza
Ner rozpustné sacharidy	35	35	celulóza, manan
Kyseliny a fenoly	8 – 11	9 – 17	
Těkavé kyseliny	0,1	0,1	kys. propionová, máselná, valerová, octová
Chlorogenové kyseliny	6,7 – 9,3	7,1 – 12,1	
Lipidy	15 – 18	8 – 12	kafestol, kahweol
Vosky	0,2 – 0,3	0,1 – 0,3	
Oleje	7,7 – 17,8	7,7 – 17,8	estery kyseliny palmitové a linolové
Dusíkaté sloučeniny	11 – 15	11 – 15	
Volné aminokyseliny	0,2 – 0,8	0,2 – 0,8	kys. glutamová, asparagová
Bílkoviny	8,5 – 12	8,5 – 12	
Kofein	0,8 – 1,4	1,4 – 4	
Trigonellin	0,6 – 1,2	0,3 – 0,9	
Minerální látky	3 – 5,4	3 – 5,4	

Jak už bylo řečeno, v kávě je přítomno daleko větší množství různých látek, mnoho z nich ještě nebylo identifikováno nebo popsáno.

3.1 Minerální látky v kávě

Káva je na obsah minerálních látek poměrně bohatá, např. draslík, hořčík, vápník, železo, fosfor, mangan, nikl, měď, jsou významněji zastoupeny. Níže uvedená tabulka (Tab. 4) obsahuje orientační hodnoty zastoupení minerálních prvků v zelené kávě. Obsah obzvláště přechodných kovů (Fe, Ni, Cu) bývá často ovlivněn vnějšími podmínkami, zejména složením půd a jejich znečištěním¹⁵.

Tabulka 4: Obsah některých minerálních prvků v zelené kávě¹⁶.

Prvek	m [mg/1 kg kávy]
K	16000
Ca	1000
Mg	1800
Fe	90
P	1500
Ni	20
Cu	15

Analýza hotového kávového nápoje, v porovnání se samotnou vodou, z níž je káva připravena, ukazuje významný nárůst koncentrací vápníku (cca 3x), hořčíku (cca 8x) a draslíku (až 800x). Kávu lze tedy brát pouze jako určitý zdroj právě těchto tří minerálů¹⁷.

3.2 Organické látky v kávě

3.2.1 Aminokyseliny a proteiny

V zelené kávě je pouze cca 1 % volných aminokyselin. Volné aminokyseliny jsou pravděpodobně prekurzory chuťových a aromatických látek, vznikajících během pražení. Dále mají tuto vlastnost i proteiny a peptidy obecně. Většina aminokyselin je vázána v proteinech. Samotná identifikace konkrétních proteinů je zdlouhavá a náročná. Stanovení probíhá na principu analýzy obsahu dusíku s korekcí na kofein a trigonellin. Změřené hodnoty se pohybovaly okolo 10 % obsahu bílkovin u káv druhu robusta a arabika¹⁵.

Pro stanovení aminokyselin je nutné provést hydrolyzu proteinů. Tu lze realizovat dvěma způsoby: kyselou či alkalickou hydrolyzu, popřípadě lze bílkoviny rozštěpit enzymaticky. Volné aminokyseliny je možno separovat a pro stanovení použít vhodnou metodu. Zjištěno bylo, že majoritní zastoupení v kávových proteinech má kyselina glutamová (13 – 19 %), kyselina asparagová (8 – 11 %) a leucin (6 – 9 %). Porovnáván byl také obsah aminokyselin v různě starých zrnech, zjištěno bylo, že mladší zrna jsou chudší na aminokyseliny než zrna starší. Nedožralá zrna obsahují také větší množství pipekolové kyseliny a prolinu, popřípadě hydroxyprolinu, všechny tři tyto látky nejsou typické pro zrna zralá¹⁵.

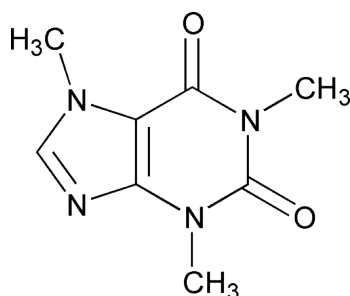
3.2.2 Alkaloidy

Velmi významné dusíkaté látky, obsažené v kávě, jsou tři methylové deriváty xanthinu. Důležité jsou proto, že mají značný vliv na sensorické vlastnosti kávy a zároveň jsou zodpovědné za její fyziologické účinky^{4,15}.

Kofein (1, 3, 7 – trimethylxanthin)

Kofein je bezesporu nejznámější dusíkatou sloučeninou, obsaženou v kávě. Jedná se o rostlinný alkaloid, přesněji xanthinový derivát, substituovaný třemi methylovými skupinami (viz Obr. 6). Obsažen je, kromě kávy, také v čaji, kakaových bobech a semenech kolovíku. Celkem lze kofein nalézt v přibližně 60 různých rostlinách. Synteticky připravený se jeví jako bílý prášek, nebo jako bílé, lesklé krystaly hořké chuti. V přítomnosti vody tvoří monohydrát. Samotná látka je rozpustná ve vodě, chloroformu a alkoholech¹⁸.

Farmakologické projevy kofeinu byly dlouhodobě zkoumány, popsány byly především analeptické (povzbudivé) a diuretické (močopudné) účinky. Káva byla proto od nepaměti brána jako povzbuzující nápoj¹⁹.



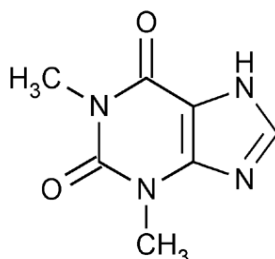
Obrázek 6: Chemická struktura kofeinu.

Theofylin (1, 3 – dimethylxanthin)

Theofylin je, stejně jako kofein, rostlinným alkaloidem a derivátem xanthinu (viz Obr. 7). Základní skelet je ale substituován pouze dvěma methylovými skupinami. Látka bílé barvy, hořce chutnající, je rovněž rozpustná ve vodě, velmi dobře rozpustná v horké vodě, alkalických hydroxidech, zředěných kyselinách a v amoniaku²⁰.

Vzhledem k podobné struktuře lze očekávat i obdobné farmakologické účinky. Stejně jako kofein je theofylin významným stimulantem nervové soustavy (analeptikum). Diuretický účinek je ještě výraznější než v případě kofeinu (pro srovnání viz tabulka č. 5). Stejně tak

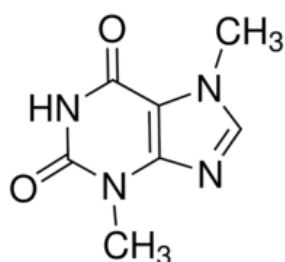
intenzivněji stimuluje srdeční činnost a výrazně způsobuje tzv. bronchodilataci a vazodilataci. Díky těmto účinkům je theofylin používán v lékařství při léčbě astmatu, při kterém dochází k zužování dýchacích cest¹⁹.



Obrázek 7: Chemická struktura theofylinu.

Theobromin (3,7 – dimethylxanthin)

Dalším derivátem je theobromin (Obr. 8). Tato látka je dobře rozpustná v horké vodě, alkalických hydroxidech, koncentrovaných kyselinách. Na rozdíl od theofylinu je hůře rozpustná v amoniaku a špatně rozpustná ve studené vodě a alkoholech. Vzhledem je prakticky k nerozeznání od zbylých alkaloidů, má podobu bílých, jehlicovitých krystalů nebo bílého prášku hořké chuti. Zastoupena je převážně v kakaových bobech, méně poté v kávě. Farmakologické účinky jsou obdobné jako u kofeinu a theofylinu (viz Tab. 5)¹⁹.

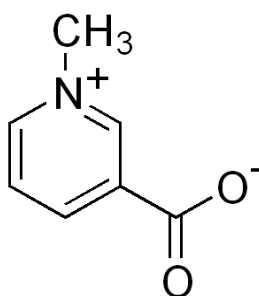


Obrázek 8: Chemická struktura theobrominu.

Tabulka 5: Porovnání farmakologických účinků 3 kávových alkaloidů¹⁹.

Účinek	Kofein	Theofylin	Theobromin
Stimulace CNS	+++	+++	–
Stimulace srdeční aktivity	+	+++	++
Vaso – a bronchodilatace	+	+++	++
Stimulace kosterní svaloviny	+++	++	+
Diuretický účinek	+	+++	++

Trigonellin (betain N – methylnikotinové kyseliny)



Obrázek 9: Chemická struktura trigonellinu.

Trigonellin (Obr. 9) je rostlinný alkaloid, který byl poprvé izolován v roce 1909 z *Coffea arabica*, o rok později byla stejná sloučenina objevena v druhu *Coffea liberica*. Jedná se o derivát kyseliny nikotinové, látky známé rovněž jako niacin. Obsah této látky v zelené kávě se pohybuje okolo 0,6 – 1 %. Sloučenina je výrazně termolabilní, během pražení se její obsah velmi rychle snižuje. Udává se, že po cca 15 min pražení při teplotě 230 °C, se obsah trigonellinu sníží až o 75 %. Jako ostatní alkaloidy je i trigonellin hořké chuti. Podrobnější analýza pražícího procesu, ukázala, že je tato sloučenina rovněž i prekurzorem pro různé třídy těkavých látek^{15,21}.

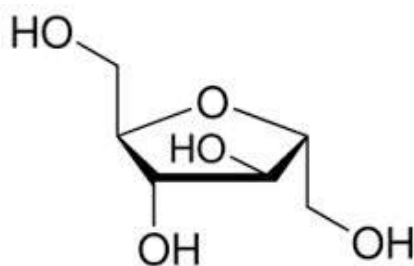
3.2.3 Sacharidy

Sacharidy jsou hojně zastoupenou skupinou látek v zelené kávě. Během pražení tvoří aromatické a barevné produkty, díky karamelizaci a Maillardovým reakcím s aminokyselinami. Obsah všech sacharidů se pohybuje okolo 50 % sušiny zelené kávy. V tomto množství najdeme různé monosacharidy, oligosacharidy, ať už redukující, nebo neredukující. Většinové zastoupení má ale skupina polysacharidů, jejíž množství převyšuje ostatní cukerné složky. Mannan, škrob, celulóza a pektiny jsou hlavními složkami polysacharidové frakce, mezi další, méně zastoupené sloučeniny, patří arabinogalaktan a galaktomannan. Funkce polysacharidů je většinou stavební, celulóza spolu s hemicelulózou,

tvoří buněčné stěny buněk. Je tvořena lineárním řetězcem β glukóz, které jsou navzájem spojeny glykosidickou vazbou v poloze 1 a 4^{4, 15, 22}.

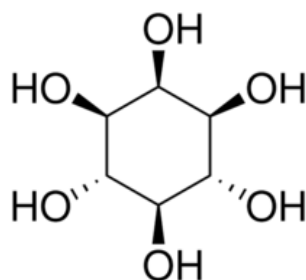
Monosacharidy, respektive nízkomolekulární sacharidy jsou v kávě zastoupeny méně. Ve vodě jsou rozpustné, stejně tak v ethanolu. Majoritní zastoupení má sacharóza, které je ve větší míře zastoupená v kávách arabika. Robusty obsahují menší množství tohoto cukru. Další analýzy, prováděné v 70. letech, ukázaly možnosti stanovení monosacharidů v zelené a pražené kávě pomocí tenkovrstvé a sloupcové chromatografie. Výsledky udávaly zastoupení glukózy (0,18 %), fruktózy (0,02 %). Zajímavostí je, že díky parciální hydrolyze sacharózy, byl v dekofeinované kávě stanoven vyšší obsah glukózy (0,21%) a zejména fruktózy (0,2 %). Určitý stupeň hydrolyzy lze pozorovat i u ostatních sacharidů, mohou za to hydrolytické enzymy, obsažené v kávovém zrně. Pozdější měření objevila v pražené kávě i jiné sacharidy, a to arabinózu a v menším množství i galaktózu, manózu, ribózu, raffinózu a xylózu, jejich obsah je ale jen velmi malý. Pozorováním změn obsahu glukózy během skladování kávy bylo zjištěno, že se stářím zrna roste množství glukózy v nich obsažené, na proces prakticky nemají vliv skladovací podmínky. Tento údaj proto může být jakýmsi ukazatelem stáří zrna^{15,22}.

V 90. letech byl v kávě identifikován mannitol (Obr. 10), což je cukerný alkohol, obsažený hlavně v hnědých řasách a houbách, v potravinářství se používá jako sladidlo, v lékařství se používá jako diuretikum²³.



Obrázek 10: Chemická struktura mannitolu.

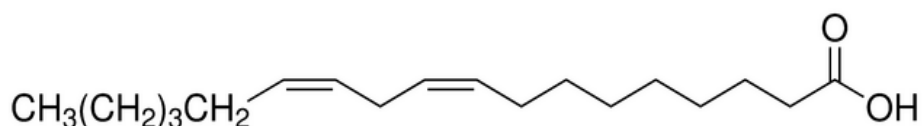
Stanovený obsah v zelené kávě se pohybuje okolo 0,05 %, v pražené kávě 1,6 – 2 %. Do stejné skupiny látek, jako mannitol, patří i inositol (Obr. 11), jehož zastoupení odpovídá max 1%. Inositol je cyklický cukerný alkohol, který se v přírodě vyskytuje např. v sóji, ovoci, játrech. Někdy bývá řazen i do skupiny vitamínů B. V lidském těle tvoří komplexní sloučeninu s fosfátem, v takovéto formě je součástí buněčných membrán^{15,22}.



Obrázek 11: Chemická struktura inositolu.

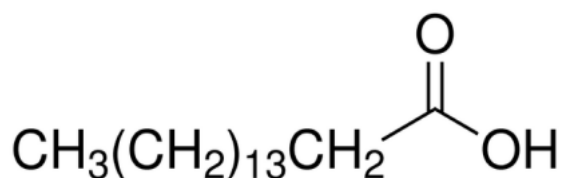
3.2.4 Lipidy

Lipidy jsou poměrně hojně zastoupenou skupinou látek. Nejedná se pouze o tuky, oleje, vosky, jako je tomu zvykem u jiných potravin. Mezi látky lipidické povahy řadíme i terpeny, diterpeny, diterpenové glykosidy, aj. Nejvíce zastoupenou skupinou lipidů jsou oleje. Olej je přítomen v každém rostlinném semeni. Při stanovení obsahu olejů je důležitým krokem jejich extrakce vhodným organickým rozpouštědlem, např. etherem, petroletherem, hexanem. Měření, provedená v 60. letech ukázala, že je nejvíce obsaženou mastnou kyselinou v oleji kyselina linolenová (Obr. 12). Tato osmnáctuhlíková kyselina patří mezi nenasycené mastné kyseliny. Obsahuje dvě dvojné vazby, a to mezi uhlíky 9 a 12^{15,22}.



Obrázek 12: Chemická struktura kyseliny linolenové.

Další, významněji zastoupenou mastnou kyselinou, je kyselina palmitová (hexadekanová, Obr. 13). Tvoří přibližně 30 % z celkového obsahu mastných kyselin v oleji. Tato kyselina je nasycená, obsahuje šestnáct uhlíků, velmi často se z jiných zdrojů používá k výrobě mýdel^{15,23}.

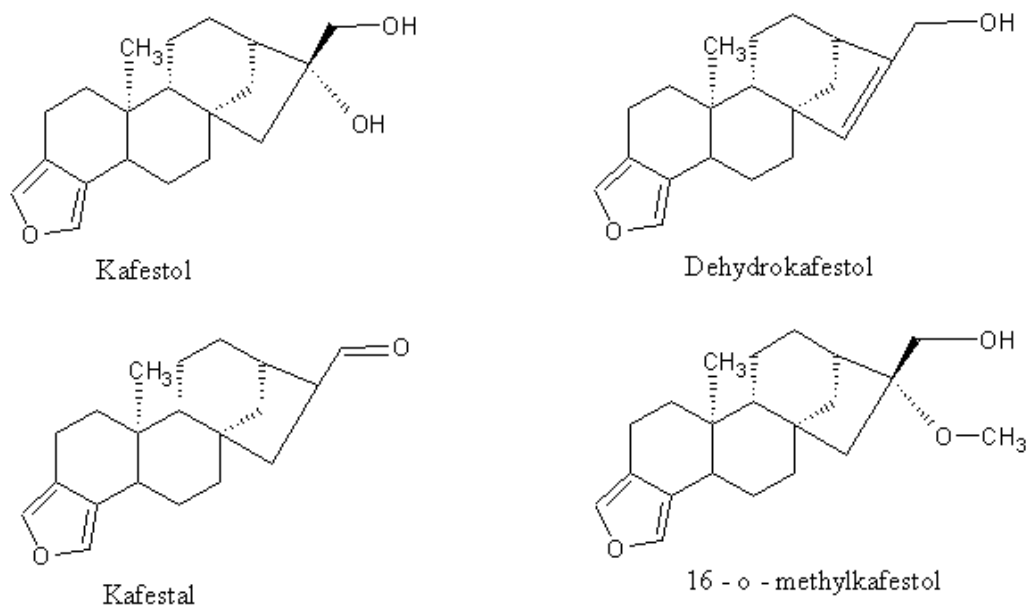


Obrázek 13: Chemická struktura kyseliny palmitové.

Stanovení, provedená v 70. letech na více než čtyřech desítkách káv, potvrdily předchozí výsledky s mírnými nuancemi, které však korespondují s povahou vzorků. Předmětem studia byly i látky voskovité povahy. Bylo zjištěno, že je vosk tvořen z 45 % nenasycenými mastnými kyselinami s délkou řetězce 18 – 24 uhlíků. Cca 20 % tvoří kyselina linolenová, zbytek je složen z různých sterolů, fosfolipidů, tokoferolů, aj. Během pražení dochází k oxidativní degradaci lipidů. Vznikají lehčí produkty jako aldehydy a ketony. Figurují též v Maillardových reakcích¹⁵.

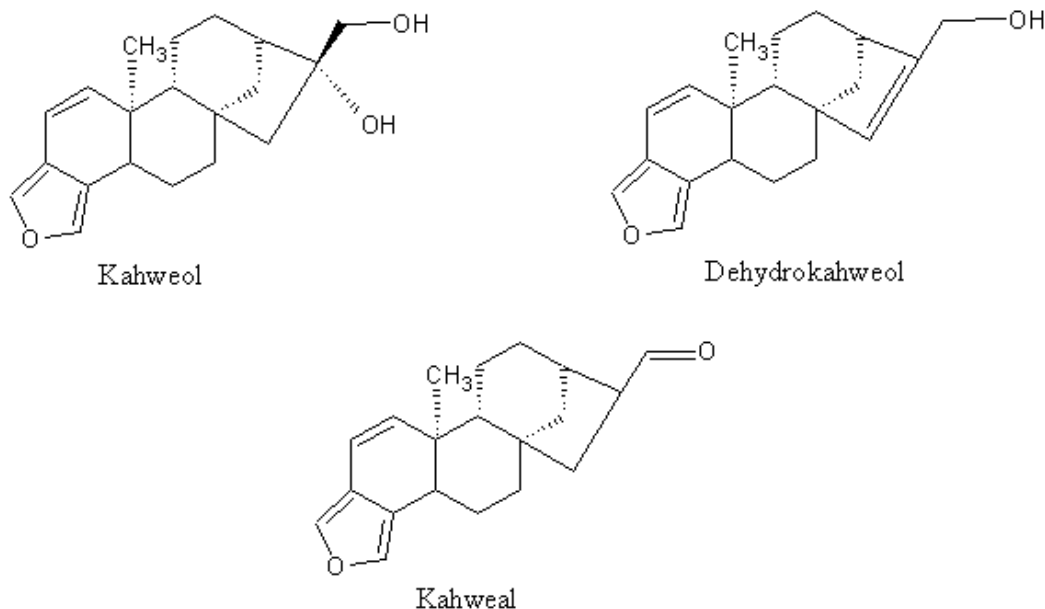
Důležitými látkami lipidické povahy jsou diterpenové alkoholy, zkráceně diterpeny. Většinou jsou to látky cyklické, se zabudovaným furanovým cyklem, vyskytují se ve formě esterů mastných kyselin, popřípadě se mohou spojit s cukernou složkou a vytvořit tak glykosid. V přírodě je najdeme jako složku chlorofylu, tzv. fytol, nebo jako vitamíny, např. retinol či tokoferoly, nebo také jako rostlinné hormony – giberelliny. V kávě jsou významněji zastoupeny 2 zástupci diterpenů, kafestol, kahweol a jejich dehydrované formy, dehydrokafestol a dehydrokahweol, popřípadě lze zaznamenat i jiné deriváty. U kafestolu a kahweolu se stále zkoumají fyziologické účinky na organismus člověka. Z celé škály lipidů, zastupují diterpeny přibližně 20 %^{15,22}.

Kafestol je nejhojněji zastoupeným terpenoidem v kávě. Vyskytuje se převážně ve formě esterů s nasycenými mastnými kyselinami, zejména s kyselinou palmitovou, nenasycenou kyselinou linolenovou nebo s kyselinami stearovou a olejovou, které jsou avšak zastoupeny méně. U kafestolu bylo prokázáno, že zvyšuje hladinu cholesterolu v krvi, neboť potlačuje tvorbu žlučových kyselin v jaterních buňkách. Z tohoto důvodu nebyla doporučována nadměrná konzumace kávy u osob, trpících vyšší hladinou cholesterolu, nebo u jinak rizikových skupin lidí. Na druhou stranu se kafestol zachytává na kávovém filtru, pro jeho odstranění stačí tedy pouze pít filtrovanou kávu. Jiné výzkumy poukázaly na malou tepelnou stabilitu a náchylnost ke vzdušné oxidaci či světelnému záření. Po objevu kafestolu, byly posléze popsány i některé jeho objevené deriváty (viz Obr. 14), mezi ně patří dehydrokafestol, kafestal a 16-o-methylkafestol. Zatímco kafestal je v podstatě oxidovaný kafestol, k oxidaci dochází na jedné hydroxylové funkční skupině, 16-o-methykafestol je derivát, který byl pozorován zatím jen v kávách typu robusta, je tepelně stabilnější^{15,20}.



Obrázek 14: Chemická struktura kafeolu a jeho derivátů.

Kahweol (Obr. 15) je méně zastoupeným diterpenovým alkoholem, strukturně je velmi podobný s kafeolem, z tohoto důvodu má také podobné vlastnosti. Kahweol je náchylnější ke světlu a k samovolné oxidaci při které vznikají jeho deriváty. Rovněž při pražení degraduje ve větší míře. Farmakologické účinky jsou obdobné jako v předchozím případě^{4,20}.

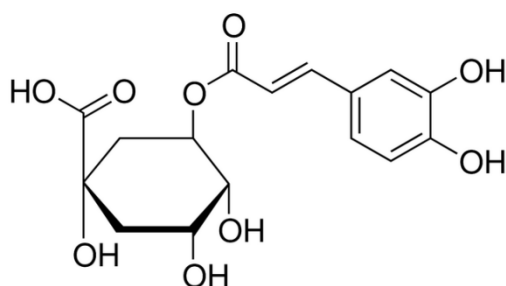


Obrázek 15: Chemická struktura kahweolu a jeho derivátů.

Mezi lipidické sloučeniny, obsažené v kávě, patří i steroly. Podle některých výzkumů, jsou steroly, ať už volné, nebo esterifikované, obsaženy v kávových lipidech přibližně z 2,2 % a z 3,2 % jako estery s mastnými kyselinami.

3.2.5 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová (Obr. 16) a jejich soli byly objeveny přibližně v polovině 19. století u druhu *Coffea liberica*, kde byl celkový obsah této kyseliny stanoven přibližně na 6 – 8 %. Je to cyklická látka, složitější struktury, odvozená od chinové kyseliny. Je bezbarvá, v kávě ji často najdeme ve formě draselných solí. Chlorogenová kyselina je tedy esterem kyseliny chinové, která je rovněž jejím prekurzorem v biosyntetické dráze. Dále bylo objeveno, že hydrolýzou kyseliny chlorogenové vznikají dvě jednodušší kyseliny a to kyselina kávová a již zmíněná kyselina chinová. Volnou kyselinu i její soli najdeme ve větším množství pouze v zelené kávě, neboť při procesu pražení degraduje díky oxidačním a polymeračním reakcím za vzniku vnitřních esterů – laktonů^{15,20,24}.



Obrázek 16: Kyselina chlorogenová.

3.2.6 Karbonylové sloučeniny

3.2.6.1 Aldehydy

Aldehydy vznikají rozkladem aminokyselin a následnou reakcí se sacharidy. Typickým představitelem je acetaldehyd. Poprvé byl izolován v roce 1926. Záhy byly samozřejmě sledovány jeho osudy během výroby kávy. Výzkumy vedly ke zjištění, že se stupněm pražení roste koncentrace acetaldehydu v zrnech. Zjištěná koncentrace se pohybovala od 27 do 124 ppm. K analýze těkavých látek, aldehydů nevyjímaje, významně přispěl rozvoj plynové chromatografie¹⁵.

Mimo acetaldehydu byl v kávě objeven dimethylsulfid a isobutylaldehyd. Tyto látky se nacházejí v kávě pouze v malých koncentracích a vzhledem k jejich těkavosti jsou během pražení prakticky odstraněny. Díky tomu se konzumací kávy nemohou dostat do lidského organismu ve větších koncentracích, které by mohli způsobit zdravotní potíže, neboť se jedná o látky zdraví škodlivé. Vzhledem k tvorbě acetaldehydu během fermentace by mohl být jeho obsah jistým ukazatelem kvality zrn^{15,20}.

Plynovou chromatografií byl rozpoznán i formaldehyd. Formaldehyd patří mezi jedovaté látky, a proto se jeho obsah pohybuje ve velmi malých hodnotách. Původ této sloučeniny byl přisouzen degradaci určitých aminokyselin. Od roku 1950 do roku 2000 bylo nalezeno velké množství méně významných aldehydů, podílejících se převážně na aromatických vlastnostech kávy. (viz Tab. 6)¹⁵.

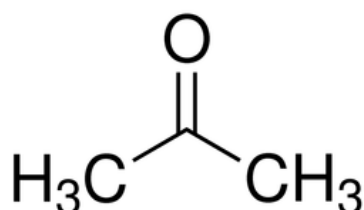
Tabulka 6: Přehled některých aldehydů, objevených během 20. století¹⁵.

Aldehyd
propanal
butanal
pentanal
hexanal
heptanal
oktanal
nonanal
dekanal
2-methylpropanal
2-methylbutanal
3-methylbutanal
2-methylpentanal
2,4-dimethylpentanal
benzaldehyd
2-propenal
z-4-heptanal
2-methylpent-2-enal
fenylacetaldehyd
2-fenylbut-2-enal

3.2.6.2 Ketony

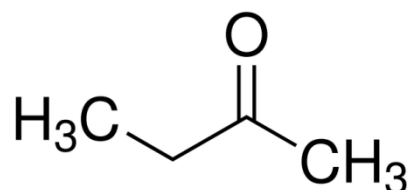
V kávovém aroma bylo nalezeno velké množství různých ketonů. Podle určitých studií se ketony z cca 22 % podílejí na konečném aroma kávy. Původ těchto karbonylových sloučenin byl také zkoumán, bylo zjištěno, že cyklické ketony vznikají ze sacharidů během pražení. Tento poznatek byl podpořen experimentálně, kdy byla zahřívána glukóza. Bylo objeveno cca 12 alifatických a cyklických ketonů. Od roku 1950 po rok 2000 bylo identifikováno bezmála 90 sloučenin, majících povahu ketonů. Některé jsou zachyceny v Tab. 7, nejvýznamnější zástupci jsou podrobněji popsány níže¹⁵.

Aceton (Obr. 17) byl poprvé identifikován už v roce 1880. Stejně jako u aldehydů roste obsah acetonu během pražení, neboť vzniká degradací jiných sloučenin. Porovnávány byly obsahy acetonu v zelené kávě, kávě pražené a kávě jako nápoji. Nejvyšší koncentrace, 40 – 100 ppm, byly naměřeny v upražené kávě, 0,6 – 5,0 ppm bylo stanoveno v kávě zelené a cca 1,95 ppm připadlo na kávový nápoj¹⁵.



Obrázek 17: Chemická struktura acetonu.

Druhým, významnějším zástupcem je butan-2-on (Obr. 18). Jedná se rovněž o nosič aromatických vlastností kávy. Jeho obsah byl stanoven na 0,2 – 1,3 ppm v zelené a 15 – 25 ppm v pražené kávě. Vzhledem k těkavosti se jeho obsah s časem snižuje, stejně jako je tomu v případě acetonu. Butan-2-on vzniká tepelnou degradací glukózy¹⁵.



Obrázek 18: Chemická struktura butan-2-onu.

Přehled dalších ketonů, izolovaných z kávy, je uveden v Tab. 7.

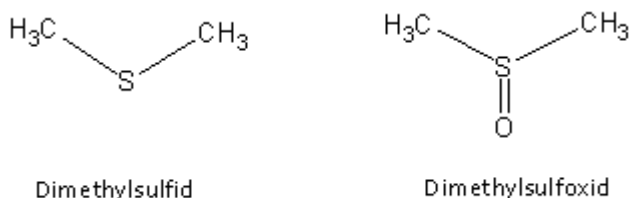
Tabulka 7: Přehled některých ketonů, objevených během 20. století¹⁵.

Keton
pentan-2-on
heptan-2-on
oktan-2-on
pentadekan-2-on
pentan-3-on
3-methylbutan-2-on
3-methylpentan-2-on
1-hydroxypropan-2-on
3-hydroxybutan-2-on
butan-2,3-dion
pentan-2,3-dion

3.2.7. Ostatní sloučeniny

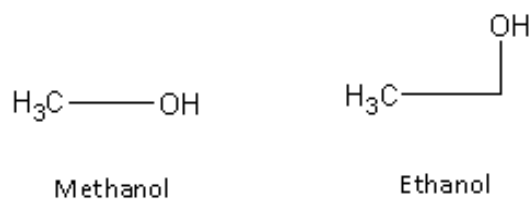
Mezi ostatní sloučeniny lze zařadit především alkoholy, fenoly, estery, uhlovodíky a jiné látky¹⁵.

Zvláštní látkou je dimethylsulfid (Obr. 19). Tato látka je zodpovědná za kyselost kávového nápoje. Někteří znalci proto hodnotí vyšší obsahy této látky pozitivně, neboť takováto káva má ve výsledku lepší chuťové vlastnosti. Dimethylsulfid má antioxidační vlastnosti, může proto reagovat s peroxidy a peroxokyselinami, popřípadě může být oxidován kyslíkem na dimethylsulfoxid, poté může oxidace pokračovat až na odpovídající kyselinu. Vyšší koncentrace dimethylsulfidu se projevují intenzitou namodralého zabarvení kávových bobů¹⁵.



Obrázek 19: Chemická struktura dimethylsulfidu a dimethylsulfoxidu.

Ethanol i methanol (Obr. 20) jsou v malé míře obsaženy v každém kávovém zrně. Původ těchto alkoholů lze hledat ve fermentačním procesu. Během pražení tyto látky tvoří ethyl a methyl estery sensoricky aktivních látek¹⁵.



Obrázek 20: Chemická struktura methanolu a ethanolu.

V kávě je samozřejmě přítomno větší množství alkoholů. Některé další zástupce lze nalézt spolu s několika uhlovodíky v Tab. 8.

Tabulka 8: Přehled některých uhlovodíků a alkoholů, izolovaných z kávy během 20. století¹⁵.

Uhlovodíky
benzen
toluen
ethylbenzen
kumen
o-xylen
m-xylen
penta-1,3-dien
Alkoholy
propan-1-ol
butan-1-ol
pentan-1-ol
hexan-1-ol
2-methylpropan-1-ol
2-methylbutan-1-ol
3-methylbutan-1-ol
propan-2-ol
3-methylbut-2-en-1-ol
okt-1-en-3-ol

4. Metody využitelné ke stanovení látek v kávě

Z celé škály různých analytických metod lze výhodně ke kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení sloučenin v kávě využít následujících metod:

- odměrná stanovení
- gravimetrie
- separační metody
- optické metody
- elektrochemické metody

4.1. Odměrná stanovení (Volumetrie)

V dnešní době se volumetrická analýza sloučenin v kávě prakticky téměř nepoužívá. Oproti moderním instrumentálním metodám jsou tato stanovení časově daleko náročnější, rovněž je větší spotřeba vzorku a chemikálií. Před rozmachem instrumentálních metod vědcům ale nic jiného nezbývalo. Byly vypracovány postupy k titračnímu stanovení např. kofeinu, chlorogenové kyseliny, celkové kyselosti nápoje, aj.

4.1.1 Stanovení kyseliny chlorogenové jodometrickou titrací

Metoda využívala oxidační vlastnosti jódu, který reaguje se kyselinou chlorogenovou v nadbytku, zbylý jód se titruje thiosíranem sodným na indikátor škrobový maz. Spotřeba roztoku thiosíranu je korigována na slepý pokus, připravený pouze z vody. Pro co nejpřesnější výsledky je během reakce s jódem nutné udržovat konstantní teplotu reakční směsi a konstantní pH. Průměr obsahu chlorogenové kyseliny v 6 vzorcích zelené kávy se pohyboval okolo 7,43 %, průměr ze 4 vzorků pražené kávy činil 5,81 %²⁵.

4.2 Gravimetrie

Gravimetrie neboli vážková analýza dříve sloužila ke stanovení alkaloidů v kávě. Při této metodě analyt převádíme na tzv. vážitelnou formu. Z poměrů hmotností analytu a vzorku zjistíme procentuální zastoupení sledované látky. Obecně v gravimetrii musí být vážitelná forma látky dobře definovatelná, tzn., musí být přesně známo složení oné formy. V případě kávy je vážitelnou formou čistý alkaloid, získaný pomocí separačních operací. Tyto typy stanovení mají spíše víc nevýhod než výhod. Nevýhodami je značná časová náročnost, vysoké nároky na přesnost provedení, nižší citlivost a obtížnější stanovení všech alkaloidů vedle sebe.

Výhodou může být nižší pořizovací náklady na vybavení a chemikálie, při použití v průmyslovém měřítku by to byl ale opak²⁶.

4.2.1 Vázkové stanovení směsi theobrominu a kofeinu

Oba alkaloidy se ze vzorku vyloučí oxidem hořečnatým. Poté jsou z matrice extrahovány chloroformem. Po oddestilování chloroformu se gravimetricky stanoví obsah obou alkaloidů. Pro stanovení pouze kofeinu je nutno chloroformový odparek extrahovat podruhé, tentokrát chloridem uhličitým. Po odstranění extrakčního činidla se gravimetricky stanoví pouze kofein²⁷.

4.3 Separční metody

Analytické separační metody jsou širokou skupinou instrumentálních analytických metod. Díky širokému uplatnění, možnosti stanovovat komplexnější vzorky a mnoha dalším výhodám jsou separační metody v analytické chemii bezesporu nenahraditelné.

Analytické separace lze rozdělit podle principu. Metody jako extrakce, kapalinová, plynová chromatografie, využívají fázových rovnováh. Stanovovaná látka se pohybuje nejčastěji mezi dvěma fázemi, v případě extrakce je to např. mezi fází pevnou a kapalnou, nebo mezi dvěma kapalinami, kapalinou a plynem, atd. V extrakci se uplatňují rozpouštěcí rovnováhy, tzn. stanovovaná látka je v jedné fázi extrakčního činidla více rozpustná než ve fázi druhé. Popřípadě se uplatňují procesy adsorpce, chemisorpce či iontové výměny. Druhou skupinou separací jsou separace v silovém poli (elektrické). V tomto případě se stanovovaná látka pohybuje pouze ve fázi jediné, jako příklad můžeme uvést elektromigrační metody²⁸.

Chromatografie

Chromatografie byla objevena koncem 19. století. Jedná se o metodu mladší než je extrakce. Využívá dvou fází, tzv. mobilní a stacionární fáze. Mezi tímto fázovým systémem se v přítomnosti analytu opakovaně ustaluje rovnováha, ať už sorpční, iontově výměnná nebo jiná. Mobilní fáze s analytem prochází prostředím stacionární fáze a dochází k ustanovování rovnováh. Analyt je zachycován ve stacionární fázi, tudíž je jeho pohyb oproti ostatním složkám zpomalen. Tímto „zachytáváním“ sledované látky v koloně se počáteční směs diferencuje podle složení, respektive interakce se stacionární fází^{28,29}

Podle skupenství použité mobilní fáze dělíme chromatografické metody na:

- metody kapalinové chromatografie (Liquid Chromatography, LC)
- metody plynové chromatografie (Gas Chromatography, GC)
- metody superkritické fluidní chromatografie (Supercritical fluid chromatography, SFC)

Dále lze metody diferencovat podle uspořádání:

- plošná (papírová, tenkovrstvá chromatografie)
- sloupcová (kolonová – kapalinová, plynová)

V neposlední řadě lze ještě chromatografické metody dělit podle separačního mechanismu:

- adsorptivní (kapalinová/plynová adsorpční chromatografie)
- rozdělovací (kapalinová/plynová rozdělovací chromatografie)
- iontově výměnná (iontově výměnná chromatografie)
- založené na síťovém efektu (plynová chromatografie na molekulových sítích, gelová permeační chromatografie)
- založené na specifické interakci (afinitní chromatografie)

Kapilární elektromigrační metody

Princip metody je postaven na pohybu látek v elektrickém poli. K separaci dochází v tenkých kapilárách, vyrobených z teflonu, popřípadě z křemenného skla. Na kapiláru je vloženo vysoké napětí, často v řádech kV. Uvnitř kapiláry probíhají dva děje, elektroosmotický tok a migrace. Elektroosmotický tok je tok kapaliny kapilárou pod elektrickým napětím. Migrace je pohyb elektricky nabitých částic k opačně nabitým elektrodě. Výhodou elektromigračních metod je vysoká účinnost separace, malá spotřeba vzorku a rychlost provedení. Nevýhodou je především nižší citlivost²⁸.

Jelikož existuje mnoho různých elektromigračních metod, je třeba uvést základní rozdělení:

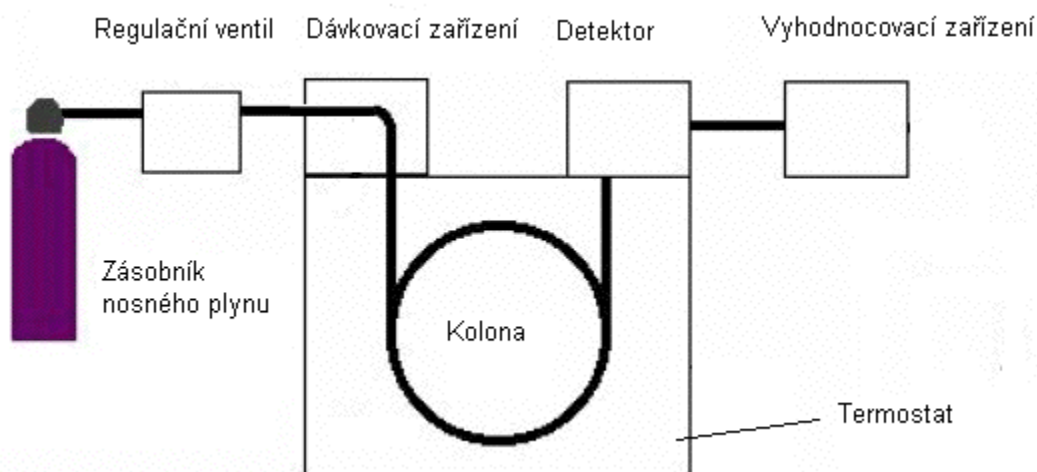
- kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)
- kapilární gelová elektroforéza (Capillary Gel Electrophoresis, CGE)
- micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MEKC)

- elektrochromatografie v naplněných kapilárách (Capillary Electrochromatography, CEC)
- kapilární izoelektrická fokusace (Capillary Isoelectric Focusing, CIEF)
- kapilární izotachofóréza (Capillary Isotachopheresis, CITP)

Uvedené metody se liší v oblasti použití, instrumentací, účinností separace a jiných parametrech²⁸.

4.3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se začala v analýze kávy používat v polovině dvacátého století. Tato metoda je výhodná při studiu těkavých látek, popřípadě plynů. V praxi se používá k analýze kávového aroma a ke sledování procesu pražení. Rozkvět plynové chromatografie dokládá i počet nově objevených sloučenin. Během 20 let, od roku 1965 až 1985, bylo v pražené kávě objeveno přibližně 600 nových látek a to s velkým přispěním právě plynové chromatografie. V praxi lze výhodně použít GC pouze na dostatečně těkavé látky, nedostatečně těkavé látky je nutno upravit, aby mohla analýza správně proběhnout, tato operace ale skýtá mnohá úskalí a někdy bývá poměrně náročná na provedení. Oproti jiným metodám je právě tato podmínka nemalou nevýhodou. Základní schéma instrumentace pro GC je uvedeno na Obr. 21^{15,29}.



Obrázek 21: Schéma instrumentace plynové chromatografie³⁰.

Příprava vzorku pro plynovou chromatografii

Vzorek musí být dostatečně těkavý, aby zpětně nekondenzoval a nezanášel kolonu a dávkovací zařízení. Pokud látka není dostatečně těkavá, je ji nutno převést na těkavější formu tzv. derivatizací. A to nejčastěji na těkavější estery nebo na silylderiváty. Silylace je postup, kdy je ve sloučenině kyselý vodík nahrazen silyl – skupinou a vzniká alkylsilyl. Kyselý vodík se nalézá např. u OH, COOH skupin. Derivatizace také často může ovlivnit odezvu detektoru, čehož se např. využívá u detektoru elektronového záchytu. Kromě silylace a esterifikace se pro derivatizační reakce používají i alkylace s acylací. Dále je ze vzorku často nutné odstranit vodu, popřípadě jiné příměsi pomocí různých extrakčních operací^{29,31}.

Detektory, používané v plynové chromatografii

Obecně detektory zaznamenávají určitou veličinu (absorbanci, elektrický proud, tepelnou vodivost, aj.) v závislosti na eluci látek z chromatografické kolony. Jinými slovy je odezva detektoru závislá na koncentraci analytu v eluátu. Důležitým parametrem každého detektoru je jeho citlivost na stanovovanou látku. Čím je tato hodnota vyšší, tím nižší jsou detekční limity stanovení oné sloučeniny, což je žádoucí a tuto skutečnost dobře popisuje poměr signálu a šumu použitého detektoru. Dále se sleduje lineární oblast detektoru. Tento parametr udává takovou koncentraci analytu, při které použitý detektor poskytuje lineární odezvu na danou látku. Pro přesná stanovení je nutno pracovat právě v této oblasti^{28,29,31}.

Pro plynovou chromatografii se používají následující detektory, z nichž první tři budou rozebrány podrobněji:

- plamenově ionizační detektor (FID – flame ionization detector)
- teplotně – vodivostní detektor (TCD – thermal conductivity detector)
- detektor elektronového záchytu (ECD – electron capture detector)
- hmotnostní spektrometr (MS – mass spectrometer)

Plamenově ionizační detektor (FID): V současnosti asi nejpoužívanější detektor v plynové chromatografii. Je tomu tak díky jeho vysoké univerzálnosti a relativní jednoduchosti. Dalšími jeho přednostmi jsou nízké odezvy na vodu a oxid uhličitý, poměrně široká lineární oblast a solidní citlivost. Detektor je složen z vodíkového hořáku a elektrod, umístěných okolo něj. Na elektrody je vloženo napětí v řádech stovek voltů. Na hořák je rovněž napojen výstup z chromatografické kolony. Detektor využívá rozkladu separovaných látek v plameni za vzniku fragmentů iontové povahy, které výrazně mění velikost protékajícího proudu mezi

elektrodami. Chromatogramem pak může mít podobu závislosti času na velikosti protékajícího proudu, a má povahu píků. Nevýhodou FID je nutnost dodávky paliva pro vodíkový hořák^{29,31}.

Tepelně vodivostní detektor (TCD): Tento typ detektoru využívá žhaveného vlákna, které je umístěno v termostatu. Kontinuálně je měřen odpor vlákna, který závisí na jeho teplotě a tepelné vodivosti okolního prostředí. Do okolí je přiveden výstup ze separační kolony. Látky, procházející okolím žhavené spirály změny tepelnou vodivost okolí spirály. To se projeví změnou odporu a teploty vlákna. Změny jsou úměrné koncentraci analytu. Výhodou tohoto detektoru je jeho univerzálnost, nevýhodou je jeho nižší citlivost²⁹.

Detektor elektronového záhytu (ECD): Principem tohoto detektoru je ionizace nosného plynu spolu s analytem pomocí vysokorychlostních elektronů, emitovaných β zářičem. Tyto elektrony způsobují ionizaci a následnou emisi sekundárních elektronů o nižší energii z nosného plynu. V prostoru ionizace jsou umístěny elektrody. Emise elektronů způsobuje vzestup hodnoty protékajícího proudu mezi nimi. V případě, že nosný plyn obsahuje i stanovovanou látku, dochází absorpci elektronů právě na těchto látkách, navenek je pozorováno snížení hodnoty protékajícího proudu mezi elektrodami. Detektor je velmi citlivý na halogeny a nitroskupiny, málo citlivý na uhlovodíky, alkoholy a aminy. Nevýhodou je užší lineární rozsah ve srovnání s ostatními detektory²⁹.

4.3.1.1 Stanovení těkavých látek v pražené kávě s použitím FID a MS

Analyzována byla zrna z rostliny *Coffea Arabica*, *Coffea canephora* var. *robusta* a nakonec směs rozpustné kávy. Zkoumány byly zrna v syrovém a praženém stavu. Použity byly dvě srovnávací metody: plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC/MS) a plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem a pomocnou kolonou, sloužící k senzorické analýze (GCO, Gas Chromatography-Olfactometry). Pracovní postup se sestával z vyloužení vzorku zrnkové kávy horkou vodou, směs byla poté přefiltrována. Vzorek rozpustné kávy byl ve vodě pouze rozpuštěn. Filtrát či pevná káva byly umístěny do skleněných nádobek a uzavřeny víčkem se septem. Obě nádobky byly umístěny na vodní lázeň, cca 70 °C teplou. Poté byly plynotěsnou injekční stříkačkou dávkovány do kolony páry, odebrané nad vzorkem přes septum. K separaci byla použita kapilární kolona RTX-5 s náplní SE-54 od firmy Amchro, pro srovnávací metodu s hmotnostním spektrometrem byla použita kapilární kolona DB-5 firmy J & W Scientific³².

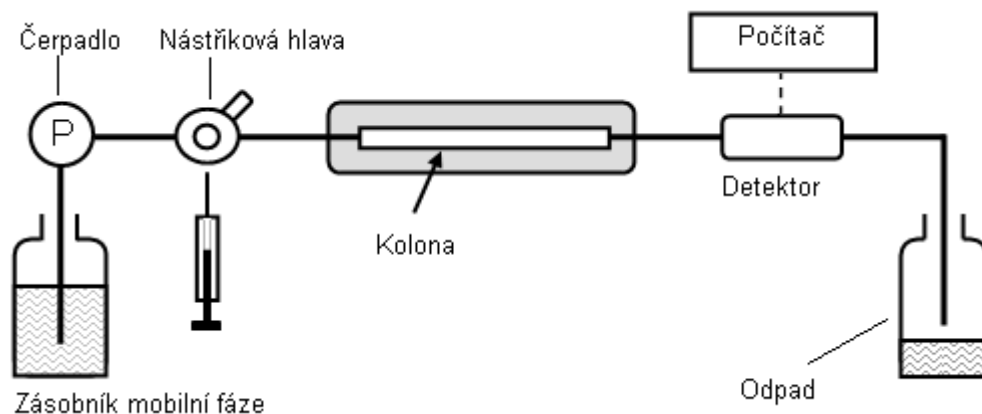
Dvěma nezávislými metodami bylo identifikováno 21 vzorků těkavých látek, patřící vesměs do skupin uhlovodíků, aldehydů, ketonů, fenolů, esterů, thiolů a sulfidů³².

4.3.1.2 Stanovení těkavých látek po předchozí mikroextrakci pevnou fází s použitím MS

Extrakci lze využít k lepšímu rozdělení původní matrice vzorku, tím pádem lze ve vzorku selektivně stanovit různé typy analytů. K extrakci lze například využít sorbentů na bázi polyakrylátu nebo již zmíněné iontové kapaliny. Použitý sorbent ovlivňuje selektivitu separace. Jako detektor může být použit hmotnostní spektrometr. Vzorek kávy byl umístěn do nádoby se septem a vhodným sorbentem. Vše proběhlo při pokojové teplotě, cca 21 °C. Po provedení extrakce byly páry dávkovány do chromatografické kolony HP 5-ms od firmy Agilent. Stanoveno bylo celkem 49 sloučenin. Jednalo se převážně o heterocyklické sloučeniny, alkoholy, aldehydy a kyseliny³³.

4.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Jedná se o kapalinovou chromatografii s vyšší účinností separace. Dosahuje toho jednak stacionární fází, ale i způsobem nástřiku vzorku a jinými prvky. Náplň má podobu velmi malých částic, které skýtají pro mobilní fázi vysoký hydrodynamický odpor. Proto je pro čerpání mobilní fáze nutno použít čerpadlo, schopné vyvinout na výstupu vysoké tlaky v řádech jednotek, běžně ale i desítek MPa. Mobilní fáze v kapalinové chromatografii hraje rovněž důležitou roli a nebývá inertní k procesům, probíhajícím v separačních kolonách. Sleduje se zejména její polarita, selektivita a odezva, kterou poskytuje na detektoru. Z tohoto vyplývá, že volba mobilní fáze podstatně závisí na povaze stanovované látky a na použité instrumentaci. Vzhledem k polaritě dvou styčných fází, mobilní a stacionární, dělíme tyto metody na chromatografii s normálními fázemi (NP, normal phase) a chromatografii s obrácenými fázemi (RP, reversed phase). V prvním případě je stacionární fáze polární a mobilní fáze je nepolárního charakteru. Druhý typ chromatografie využívá opačné vlastnosti použitých fází a je v dnešní době více užíván. Základní schéma instrumentace HPLC je uvedeno na Obr. 22^{29,31}.



Obrázek 22: Základní schéma instrumentace HPLC³⁴.

Používané detektory v HPLC

Používané detektory pro plynovou a kapalinovou chromatografii se podstatně liší. V HPLC jsou detektory uzpůsobeny k práci v kapalném prostředí. Prakticky je to realizováno tak, že jsou čidla umístěna v průtočné měřící cele. Ostatní požadavky a parametry jsou shodné s detektory, používaných v jiných oblastech analytické chemie²⁹.

Pro HPLC se nejčastěji používají následující detektory:

- fotometrický detektor
- fluorimetrický detektor
- hmotnostní detektor

Fotometrický detektor: Ve fotometrii sledujeme závislost absorbance na vlnové délce použitého záření. Záření, emitované např. halogenovou, rtuťovou či deuteriovou výbojkou, prochází průtočnou kyvetou, která je napojena na výstup ze separační kolony. Kyveta je nejčastěji zhotovena z křemenného skla. Množství procházejícího záření je detekováno např. fotonásobičem. Pro organické látky je často používán detektor, pracující v UV oblasti. Většina organických látek totiž absorbuje v ultrafialové oblasti elektromagnetického záření. Výhodou tohoto detektoru je široký lineární rozsah, vysoká citlivost a široká oblast použitelnosti. Moderní spektrofotometry navíc umožňují simultánní měření více vlnových délek. Toho se docílí použitím speciálního zdroje záření, jakým je tzv. diodové pole²⁹.

Fluorimetrický detektor: Některé látky vykazují fluorescenci. Je to jev, kdy látka po ozáření emituje sekundární záření o kratší vlnové délce, než je tomu u budícího záření. Na rozdíl od fosforescence trvá emise záření jen zlomek sekundy. Zdrojem záření může být xenonová

výbojka nebo laser. Emitované záření je detekováno fotonásobičem. Systém je velmi citlivý pro látky s vysokou fluorescenční schopností²⁹.

Úprava vzorku pro HPLC

Často je nutno zbavit vzorek interferujících příměsí, zejména u složitějších typů vzorků jako je např. káva nebo krev. Odstranění probíhá nejčastěji extrakcí, destilací, centrifugací, dialýzou, atd. Samozřejmostí je zbavení vzorku rozptýlených částí (suspenze) pomocí filtrace. Stejně jako u plynové chromatografie se i v HPLC vzorek často derivatizuje. Hlavními důvody jsou: optimalizace odezvy detektoru a zvýšení jeho citlivosti. Vzorek se může derivatizovat ještě před vstupem do kolony, tehdy hovoříme o tzv. pre – column derivatizaci, nebo až po výstupu z kolony, tzv. post – column derivatizace. Příkladem derivatizace pre – column může být esterifikace karboxylových kyselin. Pro post – column derivatizaci můžeme uvést reakci ninhydrinu s aminokyselinami³¹.

4.3.2.1 Stanovení purinových alkaloidů

Při stanovení kofeinu, theobrominu, theofilinu lze použít HPLC s amperometrickým detektorem. Tento typ detektoru při daném stanovení nepatří k nejběžnějším, přesto je však jeho citlivost dostačující a teoreticky bylo možno při vhodně zvoleném potenciálu bezpečně stanovit všechny 3 látky vedle sebe. Analyty je nutno extrahovat ze vzorku v koloně pevnou fází³⁵.

Rozemletý vzorek byl extrahován horkou vodou, přefiltrován, vhodně zředěn a poté dávkován do kolony C18 s izokratickou elucí mobilní fází (methanol/ fosfátový pufr pH 3,5; 1:9). Optimální hodnota potenciálu pro stanovení všech 3 alkaloidů byla stanovena na 1,4 V. V testovaném vzorku se ukázal obsah theofylinu jako nedetekovatelný. Naměřené hodnoty pro kofein byly v rozmezí 2,9 – 2,3 %, pro theobromin 0,008 – 0,009 %. Uvedeným výsledkům odpovídal i detekční limit. Pro kofein a theobromin byl cca 2,5 ng a pro theofylin 1 ng. S amperometrickým detektorem bylo dosaženo 2 – 5 krát vyšší citlivosti než je tomu u UV detektoru³⁵.

Ke stanovení lze také použít hmotnostního spektrometru. Vzorek kávy byl extrahován horkou vodou, přefiltrován přes papírový filtr a dávkován do kolony C18, mobilní fází byl 0,3 % roztok kyseliny mravenčí a methanolu. Obsah kofeinu byl stanoven v 8 vzorcích káv typu robusta a arabika, pohyboval se od 900 – 1700 mg/100 g sušiny³⁶.

Vzhledem k výrazné absorpenci purinových alkaloidů v UV oblasti lze výhodně užit fotometrického detektoru, pracujícího právě v této oblasti vlnových délek. Kofein byl extrahován pevnou fází z matrice po předchozím vyloužení vzorku horkou vodou. Směs byla přefiltrována a dávkována do kolony C18. Mobilní fází byla směs fosfátového pufru, triethylaminu a acetonitrilu, použita byla izokratická eluce. Obsah kofeinu byl v intervalu 190 – 450 mg/l pro kávu typu arabika a 310 – 760 mg/l u káv robusta. Dekofeinovaná káva obsahovala jen 8 mg/l. Analyzováno bylo na 20 různých vzorců³⁷.

4.3.2.2 Stanovení triglyceridů

Pomocí HPLC je možno dobře stanovit látky lipidické povahy po předchozí extrakci z kávových zrn vhodným organickým rozpouštědlem. Tím může být například hexan, kterým byl extrahován kávový olej, jenž byl následně rozpuštěn v acetonu, přefiltrován a separován na koloně C18. Použitá mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitril/aceton (50:50, v/v). Celkem bylo analyzováno na 32 vzorců zelené a pražené kávy. Na 10 různých triglyceridů bylo identifikováno, jejich obsah se pohyboval od cca 1 %, až do 28 % u zelené kávy a od 1 do 32 % u pražené kávy. Triglyceridy byly složeny z následujících mastných kyselin: linolová, linolenová, olejová, palmitová a stearová. Nejvíce zastoupená byla kyselina linolová a palmitová³⁶.

4.3.2.3 Stanovení tokoferolů

Pro stanovení je klíčové, že jsou tyto látky rozpustné v tucích. Postup extrakce těchto sloučenin je proto totožná jako je tomu v případě triglyceridů. Jako extrakční činidlo byl použit hexan. Vyextrahovaný olej byl rozpuštěn rovněž v hexanu a dávkován do HPLC kolony se silikátovým sorbentem. Mobilní fází byl hexan ve směsi s propan-2-olem (99:1, v/v). Celkem ve 32 vzorcích byla identifikována trojice tokoferolů: tokoferol α , β a γ . Nejvíce byl zastoupen tokoferol β , 10 – 88 $\mu\text{g}/1\text{g}$ sušiny v zelené kávě a 16 – 161 $\mu\text{g}/1\text{g}$ sušiny u kávy pražené. Nejméně zastoupený byl tokoferol γ 1 – 5 $\mu\text{g}/1\text{g}$ sušiny pro zelenou kávu, po upražení byl pozorován více než desetinásobný nárůst koncentrace této látky³⁶.

4.3.2.4 Stanovení fenolických látek

Volné fenolické kyseliny a jejich deriváty lze stanovit pomocí fotometrického detektoru s diodovým polem. Vzorek zrnkové kávy byl vyloužen horkou vodou, přefiltrován a dávkován do HPLC kolony C18, termostatované na teplotu 35 °C. Detektor pracoval při vlnových délkách 254, 270, 280 a 329 nm. Stanoveny byly 4 fenolické látky:

3-caffeoylchinová kyselina (400 mg/1kg), 4-caffeoylchinová kyselina (530 mg/1kg),

5-caffeoylchinová kyselina (560 mg/1kg) a kyselina kávová (1,3 mg/1kg)³⁸.

4.3.2.5. Stanovení sacharidů

Pro stanovení sacharidů se běžně užívá kapalinové chromatografie ve spojení s refraktometrickým detektorem. V kávě se ale sacharidy nacházejí v malém množství, na které citlivost refraktometrického detektoru nestačí. Ke stanovení sacharózy byly úspěšně zkoušeny spektrofotometrické metody po enzymatickém rozštěpení cukru, někdy ovšem ani citlivost tohoto stanovení nestačila. Za účelem dosažení nižších detekčních limitů byl testován hmotnostní spektrometr³⁹.

Sacharózu lze v kávě stanovit po její předchozí extrakci horkou vodou. Sacharid přejde do roztoku. Kávová směs byla poté přefiltrována. Filtrát byl vyčereňován zásaditým octanem olovnatým a znovu přefiltrován. Na separaci byla použita chromatografická kolona C18, mobilní fází byla směs 0,3 % kyseliny mravenčí a methanolu. V zelené kávě byl stanoven obsah sacharózy na 6,4 – 8,4 g/100 g kávy. Po upražení se obsah snížil na cca 16 – 184 g/100 g. Celkem byl obsah sacharózy stanoven u 13 vzorků kávy³⁹.

Stanovení sacharidů lze realizovat i s amperometrickou detekcí a pracovní elektrodou zhotovenou ze zlata. Rozemletý vzorek byl extrahován vodou, získaný extrakt byl odplyněn a centrifugován. Po odstředění byl supernatant přefiltrován a dávkován do kolony CarboPac PA-20, termostatované na 31 °C. Mobilní fází byla voda. V kávu arabika byla stanovena galaktóza v koncentraci 0,1 – 0,6 mg/g a sacharóza v koncentraci 63 – 90 mg/g. V kávu robusta byly stanoveny 4 sacharidy: galaktóza (0,1 – 0,6 mg/g), sacharóza (36 – 56 mg/g), glukóza (0,3 – 1,6 mg/g) a manóza (0,3 mg/g)⁴⁰.

4.3.2.6 Stanovení aminokyselin

Metodou vnitřního standardu a po derivatizaci aminokyselin lze aplikovat HPLC k analýze aminokyselino obsahu v zelené kávě. K úspěšnému stanovení aminokyselin je nejprve nutno vzorek rozmělnit a extrahovat např. kyselinou chlorovodíkovou. Vzniklá suspenze byla následně přefiltrována. K čistému extraktu byl přidán vnitřní standard v podobě α -aminobutanové kyseliny. Po zahřátí byly vzorky dávkovány do chromatografické kolony AccQ Tag od firmy Waters, termostatované na 39 °C. Mobilní fáze se sestávaly ze tří různých směsí následujících rozpouštědel: acetonitril, octan sodný, triethylamin a voda. Excitační vlnová délka byla 250 nm, emisní 395 nm. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou byl alanin (800 – 1200 $\mu\text{g/g}$), následován asparaginem (500 – 700 $\mu\text{g/g}$). Vyšší obsah byl zaznamenán i u fenylalaninu (300 – 500 $\mu\text{g/g}$), glutaminu (250 – 375 $\mu\text{g/g}$), serinu (375 $\mu\text{g/g}$). Dále byly

identifikovány: glycin, asparagová kyselina, arginin, threonin, prolin, valin, methionin, lysin, leucin, isoleucin, histidin a tyrosin. Kávy typu robusta se ukázaly jako bohatší zdroj aminokyselin⁴⁰.

4.3.2.7 Stanovení trigonellinu

Trigonellin je rostlinným alkaloidem, jeho stanovení nám může podat obraz reakčním pochodů této látky během pražení. Tuto látku je možno stanovit pomocí fotometrického detektoru s diodovým polem, po předchozí separaci na C18 koloně. Rozmělněný vzorek kávy byla extrahována horkou vodou. Káva byla poté přefiltrována a dávkována do proudu mobilní fáze, složené z fosfátového pufru (pH 4) a methanolu. Analyzována byla káva typu arabika a robusta. Pro arabiku byl stanoven obsah trigonellinu na 5,25 – 6,28 g/1kg sušiny, u robusty bylo naměřeno 3,08 – 5,54 g/1kg sušiny⁴¹.

4.3.2.8 Stanovení kyseliny nikotinové

Kyselinu nikotinovou lze dobře stanovit po předchozí separaci na C18 koloně s použitím fotometrického detektoru s diodovým polem. Vzorek kávy byl extrahován horkou vodou, přefiltrován a dávkován do chromatografické kolony. Mobilní fází byl fosfátový pufr (pH 4) ve směsi s methanolem. Vzorky byly kávy typu robusta a arabika. Obsah této kyseliny byl u obou typů káv srovnatelný, pohyboval se v intervalu od 77 – 136 mg/1kg sušiny⁴¹.

Ke stanovení lze použít jako detektor i hmotnostní spektrometr. Práškový vzorek byl extrahován horkou vodou a přefiltrován. Vzniklý roztok byl vyčeřen zásaditým octanem olovnatým, opět přefiltrován a dávkován do C18 kolony. Mobilní fází byla 0,3 % kyselina mravenčí a methanol. Celkem bylo zkoumáno 13 vzorků, z toho 8 vzorků pražených káv, 3 vzorky káv zelených a 2 vzorky kávy instantní. U syrové kávy nebyla kyselina nikotinová detekována, u pražených káv se její obsah pohyboval v rozmezí 9,6 – 30,4 mg/100g sušiny³⁹.

4.3.3 Tenkovrstvá chromatografie

Jedná se o jednu z nejjednodušších aplikací chromatografie. Většinou je realizována v podobě tenké destičky, tvořené z hliníku nebo skla, na které je nanesena slabá vrstva sorbentu. Nejčastěji používané sorbenty jsou: oxid hlinitý, práškový silikagel a jeho modifikace, mikrokrytalická celulóza, popřípadě škrob. Spodní hrana destičky se ponoří do vhodného rozpouštědla, které je zároveň mobilní fází. Nad úrovní hladiny se udělá tzv. startovní čára, na kterou se posléze nanese vzorek. Na startovní čáru lze aplikovat několik vzorků, v závislosti na velikosti destičky. Mobilní fáze vzlíná destičkou vzhůru a unáší s sebou vzorek, který se separuje v závislosti na sorpčních vlastnostech analyzovaných látek.

Chromatografie je ukončena, když mobilní fáze dosáhne horního okraje destičky. Takovému uspořádání říkáme vzestupné vyvíjení, kdy rozpouštědlo vzlíná destičkou. Druhý typ uspořádání je vyvíjení sestupné²⁹.

Tenkovrstvá chromatografie je velmi jednoduchá a finančně nenáročná. Nevýhodou je nízká účinnost separace²⁹.

4.3.3.1 Stanovení purinových alkaloidů

Tento typ chromatografie je celkem dobře použitelný pro stanovení kofeinu, theobrominu a theofylinu.

Nejdříve se alkaloidy uvolní z roztoku povařením s kyselinou sírovou. Po filtraci se extrahují chloroformem. Extrakt je poté dávkován na destičku se silikagelovým sorbentem. Jako mobilní fázi lze použít směs octanu ethylatého, methanolu a kyseliny octové. (80:10:10). Alkaloidy lze detekovat denzitometricky při vlnové délce 272 nm²⁷.

4.3.4 Kapilární elektromigrační metody

4.3.4.1 Stanovení purinových alkaloidů pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie s detekcí v UV oblasti

Micelární elektrokinetickou chromatografii lze dobře využít ke stanovení purinových alkaloidů v kávě.

Vzorek kávy byl extrahován horkou vodou a přefiltrován a dávkován do kapiláry. Jako elektrolyt byla použita směs acetonitrilu, fosfátového pufru (pH 9) a dodecylsulfátu sodného. Na kapiláru bylo vloženo napětí 25 kV. Látky byly detekovány v UV oblasti při 210 nm. Separace byla provedena při 25 °C. Obsah alkaloidů byl měřen ve 3 různých vzorcích kávy. Koncentrace kofeinu se pohybovala od 0,1 – 1,9 g/100g. Theobromin ani theofylin se stanovit nepodařilo. Detekční limity pro tyto látky byly větší než koncentrace těchto látek ve vzorcích⁴².

4.3.4.2 Stanovení organických kyselin v kávě pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí

Elektroforéza je použitelná pro stanovení různých karboxylových kyselin, detekci lze uskutečnit např. pomocí spektrofotometru, pracujícího v UV oblasti.

Vzorek kávy byl rozmělněn a extrahován vodou. Po extrakci byla vzniklá suspenze centrifugována a přefiltrována. Filtráty byly dávkovány do elektrolytu, tvořeného směsí 0,5 M

kyseliny fosforečné, hydroxidu draselného a činidla pro potlačení elektroosmotického toku. Na skleněnou kapiláru byl vložen potenciál -10 kV. Separace proběhla při pH 6,25 a teplotě 25 °C. Detektor pracoval na vlnové délce 200 nm. Celkem v 5 vzorcích různých káv bylo stanoveno celkem 17 organických kyselin, např. kyselina šťavelová, mravenčí, fumarová, maleinová, citrónová, jablečná, octová, glykolová a mléčná⁴³.

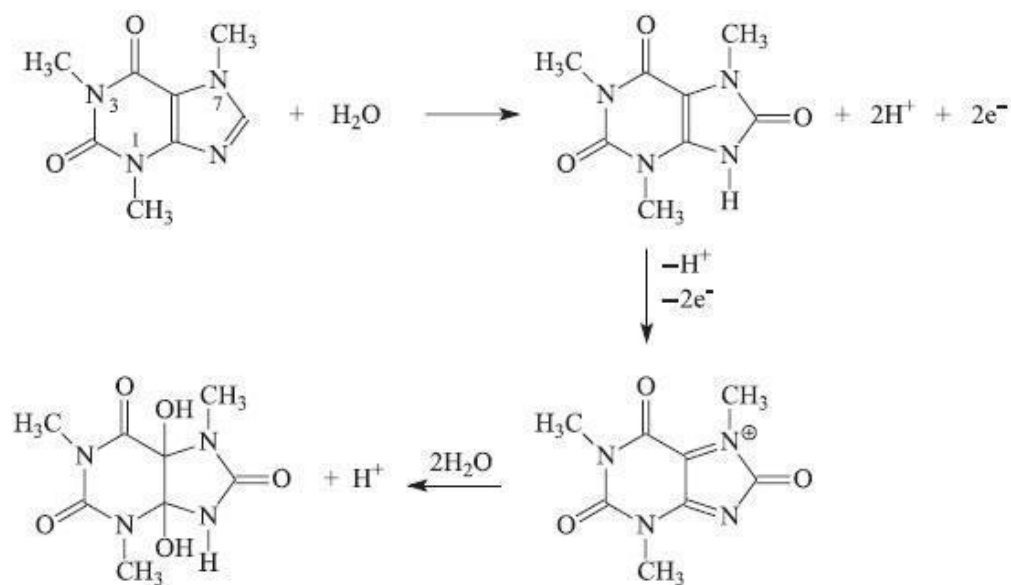
4.4 Elektroanalytické metody

Široká rodina těchto analytických metod využívá elektrochemických poznatků ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení určitých látek ve vzorcích. Pracuje s elektrickými veličinami jako elektrický potenciál, proud, náboj, rovněž využívá ryze chemické principy. Klasickými zástupci této větve analytické chemie je např. voltametrie, potenciometrie, coulometrie, amperometrie a elektrogravimetrie. Všechny tyto uvedené metody využívají redoxních reakcí pro stanovení příslušné látky a někdy se označují jako tzv. elektrochemické metody. Jiné elektroanalytické metody pracují s intenzivními veličinami jako elektrická vodivost, permitivita a označujeme je metodami elektrometrickými^{29,44}.

Nesporná výhoda elektroanalytických metod je jejich vysoká citlivost, spojená s nízkými detekčními limity stanovovaných látek. Dalšími výhodami jsou: vysoká selektivita, široká lineární oblast stanovení a v neposlední řadě i poměrně nízké finanční nároky na instrumentaci⁴⁴.

4.4.1 Stanovení kofeinu pomocí voltametrie s uhlíkovými pastovými elektrodami

Kofein lze oxidovat při potenciálu okolo $1,45$ V. Elektrochemická oxidace je znázorněna na Obr. 23. Hodnota potenciálu je poměrně vysoká, což se může projevit rušivými proudy, vznikajícími oxidací kyslíku, rozpuštěného v analyzovaném roztoku. Proto je nejprve nutno analyzovaný roztok zbavit kyslíku, probubláváním inertním plynem, např. dusíkem. Výhoda pastových uhlíkových elektrod, modifikovaných 1,4 – benzochinonem, spočívá v tvorbě dobře patrného, reverzibilního píku okolo potenciálu $0,2$ V. Tento pík vzniká díky redoxním vlastnostem použitého modifikátoru v užitém pufru. Nemodifikovaná elektroda naproti tomu nevykazuje při srovnatelných podmínkách měření žádnou proudovou odezvu. V režimu square – wave voltametrie se objevuje při shodném potenciálu a podmínkách měření totožný pík 1,4 – benzochinonu. Po přidání kofeinu dochází ke snížení amplitudy původního chinonového píku a to v závislosti na koncentraci přidané analyzované látky. Vztah mezi proudovou odezvou a koncentrací kofeinu lze označit jako lineární. Metodou kalibrační křivky lze pak jednoduše stanovit obsah kofeinu ve vzorku⁴⁵.



Obrázek 23: Princip elektrochemické oxidace kofeinu⁴⁶.

Vzorek kávy byl rozmělněn, získaný prášek byl extrahován horkou vodou. Vzniklá suspenze byla přefiltrována a uvolněné látky byly extrahovány do dichlormethanu. Extrakt byl rozpuštěn v horkém pracovním elektrolytu (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , H_3PO_4 pufr) a následně bylo provedeno měření⁴⁵.

Uvedená metoda stanovení je poměrně levnou záležitostí, další předností je její rychlost, jedno měření je otázkou pouze několika málo minut. Navíc je metoda s použitím modifikovaných pastových elektrod velmi citlivá, prakticky srovnatelná s HPLC. Detekční limit se pohyboval okolo $0,3 \mu\text{mol/l}$. Při stanovení kofeinu bylo naměřeno $3,73 \pm 0,02 \text{ mmol/l}$ a $4,28 \pm 0,00 \text{ mmol/l}$ pro dva různé vzorky kávy⁴⁵.

4.5 Optické metody

Mezi dobře využitelné optické metody v kávové analýze patří především spektrofotometrie. Principem této metody je měření absorbance analytu v závislosti na vlnové délce elektromagnetického záření. Absorbované vlnové délky jsou pro každou látku charakteristické a odvíjí se od jejich struktury energetických hladin. Lze tedy konstatovat, že jsou absorbované vlnové délky údajem kvalitativním, kdežto velikost absorbance údajem kvantitativním. Pro popis vztahu mezi absorbancí a koncentrací analytu používáme Lambert – Beerova zákona (Rovnice 1), kde A značí absorbanci, ϵ molární absorpční koeficient v $\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ a c je látková koncentrace v $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ²⁹.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot L \quad (1)$$

4.5.1 Spektrofotometrické stanovení kofeinu

Kofein lze po extrakci vhodným rozpouštědlem stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 276 nm. Jelikož je káva dost komplexní vzorek, je nutno odstranit rušící složky pomocí kolonové chromatografie, jako náplň lze užít např. celit. Výsledky jsou pak vyhodnoceny metodou kalibrační křivky²⁷.

4.5.2 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek

Totální obsah fenolických látek lze stanovit reakcí s činidlem podle Folin – Ciocalteua. Vhodně zředěný vzorek reaguje s činidlem, poté se změří absorbance při 765 nm. Standardem pro sestavení kalibrační křivky je kyselina gallová. Celkový obsah fenolických látek v kávě se pohybuje v rozmezí 41 – 140 mg/g⁴⁷.

4.5.3 Spektrofotometrické stanovení kahweolu

Obsah kahweolu lze spektrofotometricky stanovit po předchozí extrakci z lipidové frakce zelené i pražené kávy. Extrakčním činidlem může být hexan či ether. Extrahovaný kahweol poté reaguje s HCl nebo KI na barevný produkt, který je proměřen v UV/VIS oblasti. Pro reakci s KI bylo provedeno měření při 620 nm. Naměřené hodnoty se pohybovaly od 395 do 418 mg kahweolu na 100 g vzorku⁴⁸.

5. Závěr

Práce shrnuje obecné informace o kávě, její výrobě, chemickém složení a možnostem stanovení různých sloučenin. Vzhledem k velkému počtu zastoupených látek jsou i metody stanovení poměrně pestré.

Mezi analytickými metodami má ve stanovení kávových složek výsadní postavení vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Pomocí HPLC lze stanovit široké spektrum látek, např. sacharidy, kofein, theofylin, theobromin, nikotinovou kyselinu, triglyceridy, tokoferoly, aj. Všechny tyto látky lze stanovit přímo, tzn. bez derivatizace. Naopak stanovit např. aminokyseliny pomocí HPLC bez převodu na deriváty nelze.

Jinou separační metodou, použitelnou k analýze kávy, je elektroforéza. Vhodná je především k přímému stanovení alkaloidů a organických kyselin.

V analýze těkavých aromatických látek má své místo plynová chromatografie. GC lze využít pro stanovení aldehydů, ketonů, alkoholů, těkavých kyselin, různých esterů a uhlovodíků. Látky lze stanovit přímo nebo po extrakci, která vylepšuje parametry stanovení.

Poměrně užitečnou skupinou stanovení jsou optické metody, zejména spektrofotometrie. Vzhledem ke značné absorbanci purinových alkaloidů, lze optické metody upotřebit při stanovení kofeinu a jiných alkaloidů.

Elektrochemické metody lze použít v menším měřítku, neboť jsou velmi specifické. Stanovovaná látka musí vykazovat oxidačně/redoxní vlastnosti. Uplatnění elektrochemických metod je zejména při stanovení kofeinu a jiných alkaloidů.

Odměrná stanovení, popřípadě gravimetrie se dnes v analytické praxi moc nepoužívá. Jsou to vesměs metody složité, časově náročné a neekonomické.

6. Seznam literatury

1. Statistic Brain; *Coffee drinking statistics*.
Dostupné z: <http://www.statisticbrain.com/coffee-drinking-statistics/>.
2. Business Insider; *11 Incredible facts about the global coffee industry*.
Dostupné z: <http://www.businessinsider.com/facts-about-the-coffee-industry-2011-11?op=1#ixzz30xkBYjeo>.
3. International Coffee Organization; *Coffee Story*.
Dostupné z: http://www.ico.org/coffee_story.asp?section=About_Coffee.
4. Augustín J.; *Povídání o kávě*; Fontána, 2003.
5. Scholer M.; ASI group; 2006.
Dostupné z: http://www.worldmapper.org/posters/worldmapper_1037_coffee_production_ver5.pdf.
6. Motarjemi Y., Lelieveld H.; *Food Safety Management – A Practical Guide for the Food Industry*; Academic Press, 2014.
7. Casabrazilcoffees; *Brief History of Coffee Classification*; 2014.
Dostupné z: <http://www.casabrazilcoffees.com/learn/taxonomy/>.
8. Ukers H. W.; *All About Coffee*; The tea and coffee trade journal company; 1922.
9. Turbosquid; www.turbosquid.com.
Dostupné z: <http://www.turbosquid.com/3d-models/coffee-coffea-arabica-3d-model/545358>.
10. Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M., a kol.; *Technologie potravin – Přehled tradičních potravinářských výrob*; KEY Publishing s.r.o., 2012.
11. Food GPS; *Beach Bum Caffee: Keeping Coffee Local in Hawaii*; Lurie J.
Dostupné z: <http://www.foodgps.com/beach-bum-cafe-honolulu/>.
12. Merry Oaks Coffee Roasters; www.merryoakscoffee.com.
Dostupné z: <http://www.merryoakscoffee.com/roasts.php>.

13. Home Coffee Roasting Supplies; www.sweetmarias.com.
Dostupné z: <https://www.sweetmarias.com/Roasters-SweetMarias.php>.
14. Probat Burns; www.probatburns.com.
Dostupné z: <http://www.probatburns.com/commercial-coffee-equipment/commercial-coffee-roasters/p-series-roasters.php>.
15. Flament I.; *Coffee Flavor Chemistry*; John Wiley & Sons; England; 2002.
16. Morgano M. A., Pauluci L. F., Mantovani D. M. B., Mory E. E. M.; *Determinacao De Mineralis Em Café Cru*; Ciênc Technologies Aliment, 2002; 22.
17. Gillies M. E.; Birkbeck J. A.; *Tea and coffee as sources of some minerals in the New Zealand diet*; The American Society for Clinical Nutrition, 1983; 38, 936 – 942.
18. Food Chemical Codex (7, edice); The United States Pharmacopeial Convention, 2010; 129.
19. Kleeman A.; Jürgen E.; Kutscher B.; Reichert D.; *Pharmaceutical Substances – Syntheses Patents and Applications of the Most Relevant AIPs* (5. edice); Thieme Medical Publishers Inc., 2009.
20. Steglich W.; Fugmann B.; Lang – Fugmann S.; *RÖMPP Encyclopedia Natural Products*; Thieme Medical Publishers Inc., 2000.
21. Paquin P.; *Functional and Speciality Beverage Technology*; Woodhead Publishing, 2009.
22. Clifford M. N.; Willson K. C.; *Coffee – Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*; The Avi Publishing Company, 1985.
23. Daintith J.; *Dictionary of Chemistry* (6. edice); Oxford University Press, 2008.
24. Bennat C., Engelhardt U. H., Kiehne A., Wirries F. M., Maier H. G.; *HPLC Analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee*; *Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und Forschung*, 1994; 199, 17 – 21.
25. Moores R. G., McDermott D. L., Wood T. R.; *Determination of chlorogenic acid in coffee*; *Analytical Chemistry*, 1948; 20, 620 – 624.
26. Bartoš M, Šránková J, Staněk V.; *Analytická chemie*; Univerzita Pardubice, 2011.

27. Davídek J. a kol.; *Laboratorní příručka analýzy potravin*; SNTL, 1981.
28. Štulík K. a kol.; *Analytické separační metody*; Karolinum, 2004.
29. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.; *Základní analytická chemie*, Karolinum, 2010.
30. Boomer; www.boomer.org.
Dostupné z: <http://www.boomer.org/c/p3/c03/c0306.html>.
31. Braithwaite A., Smith F. J.; *Chromatographic methods*; Chapman and Hall, 1985.
32. Semmelroch P., Werner G.; *Analysis of Roasted coffee powders and brews by gas chromatography – olfactometry of headspace samples*; LWT – Food Science and Technology, 1995; 28, 310 – 313.
33. López – Darias J., Anderson J. L., Pino V., Afonso A. M.; *Developing qualitative extraction profiles of coffee aromas utilizing polymeric ionic liquid sorbent coatings in headspace solid–phase microextraction gas chromatography – mass spectrometry*; Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011; 401, 2965 – 2976.
34. Hitachi – High Tech; www.hitachi-hitec.com.
Dostupné z: http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_3.html.
35. Meyer A., Ngiuwonsanga T., Günter H.; *Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection*; Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1996; 356, 284 – 287.
36. González A. G., Pablos F., Martín M. J., León – Camacho M., Valdenegro M. S.; *HPLC Analysis of Tocopherols and Triglycerides in Coffee and Their Use as Authentication Parameters*; Food Chemistry, 2001; 73, 93 – 101.
37. Rodrigues C. I., Marta L., Maia R., Miranda M., Ribeirinho M., Máguas CH.; *Application of solid–phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC*; Journal of Food Composition and Analysis, 2007; 20, 440 – 448.
38. Mattila P., Kumpulainen J.; *Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant – Foods by HPLC with Diode – Array Detection*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002; 50, 3660 – 3667.

39. Perrone D., Donangelo C. M., Farah A; *Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography – mass spectrometry*; Food Chemistry, 2008; 110, 1030 – 1035.
40. Derler K., Murkovic M.; *Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee*; Journal of biochemical and biophysical methods; Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2006; 69, 25 – 32.
41. Casal S., Oliveira M. B. P. P., Alves M. R., Ferreira M. A.; *Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000; 48, 3420 – 3424.
42. Injac R., Srdjenovic B., Prijatelj M., Boskovic M., Karljikovic – Rajic K., Strukelj B.; *Determination of Caffeine and Associated Compounds in Food, Beverages, Natural Products, Pharmaceuticals, and Cosmetics by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*; Journal of Chromatographic Science, 2008; 46, 137 – 143.
43. Galli V., Barbas C.; *Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee*; Journal of Chromatography A; 2004; 1032, 299 – 304.
44. Wang J.; *Analytical Electrochemistry*; VCH Publishers, 1994.
45. Aklilu M., Tessema M., Redi – Abshiro M.; *Indirect voltammetric determination of caffeine content in coffee using 1,4-benzoquinone modified carbon paste electrode*; Talanta, 2008; 76, 742 – 746.
46. Hansen B. H., Dryhurst G.; *Voltammetric oxidation of some biologically important xanthenes at the pyrolytic graphite electrode*; Journal of Electroanalytical Chemistry, 1971; 30, 417 – 426.
47. Pérez – Hernández L. M., Chávez – Quiroz K., Medina – Juárez L. Á., Meza N. G.; *Phenolic Characterization, Melanoidins, and Antioxidant Activity of Some Commercial Coffees from Coffea arabica and Coffea canephora*; Journal of the Mexican Chemical Society, 2012; 56, 430 – 435.
48. Dias R. C. E., Alves S. T., Benassi M. T.; *Spectrophotometric method for quantification of kahweol in coffee*; Journal of Food Composition and Analysis, 2013; 31, 137 – 143.