

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Analýza heterocyklických aromatických aminů  
v kávě metodou plynové chromatografie**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:

Bc. Richard Adámek

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2018

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 18.4. 2018

.....

Podpis

## **Poděkování**

Rád bych chtěl poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné vedení celé mé práce, za trpělivost, cenné rady a veškerý čas, který mi po celou dobu věnoval.

Dále bych chtěl poděkovat mé rodině, která mě podporovala během celého studia.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory Interní grantové agentury UP (projekty číslo IGA\_PrF\_2017\_020 a IGA\_PrF\_2018\_027).

# Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Richard Adámek

Název práce: Analýza heterocyklických aromatických aminů v kávě metodou plynové chromatografie

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2018

Anotace:

Tato práce je zaměřena na analýzu heterocyklických aromatických aminů v kávě metodou plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. V předložené práci je podrobně popsán celý postup přípravy reálných vzorků včetně jejich přečištění. Navržená metoda využívá akcelerovanou extrakci acetonem a následnou extrakci kapalina-kapalina a derivatizaci jako nástroje přečištění. Pro stanovení koncentrace aminů (harman, norharman) ve vzorcích kávy byly použity 3 kvantifikační metody. Obsah aminů byl stanoven v zrnech kávy i v připravených nápojích. Koncentrace norharmanu byla vždy vyšší než harmanu a v připravených nápojích byla koncentrace těchto aminů minimální.

Klíčová slova: heterocyklické aromatické aminy, SPE, L-L extrakce, káva, plynová chromatografie

Počet stran: 58

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

# Bibliographical identification

Author's first name and surname: Richard Adámek

Title: Analysis of heterocyclic aromatic amines in coffee by gas chromatography

Type of thesis: master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of submission: 2018

Anotation:

This work is focused on analysis of heterocyclic aromatic amines in coffee by gas chromatography with mass spectrometry. The present work describes in detail the process of preparation of real samples including their purification. The proposed method uses pressurized solvent extraction followed by extract purification with liquid-liquid extraction and derivatization. Three quantification methods were used to determine the concentration of amines (harman, norharman) in coffee samples. Amine content was determined in coffee beans even in prepared beverages. The concentration of norharman was always higher than the harman, and in the prepared beverages the concentration of these amines was minimal.

Keywords: heterocyclic aromatic amines, SPE, L-L extraction, coffee, gas chromatography

Number of pages: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

# Seznam použitých zkratek

AHNSA	kyselina 4-amino-3-hydroxynaftalensulfonová
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
DCM	dichlormethan
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
FT	Fourierova transformace
HAA	heterocyklické aromatické aminy
HMDS	hexamethyldisilazan
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotností spektrometrie
např.	například
NIRS	blízká infračervená spektroskopie
Obr.	obrázek
PSE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
SPE	extrakce na pevné fázi
SWASV	square wave anodická stripping voltametrie
Tab.	tabulka
tzv.	takzvaný, takzvaně
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod a cíle</b> .....	9
<b>2.</b>	<b>Teoretická část</b> .....	10
<b>2.1</b>	<b>Historie kávy</b> .....	10
<b>2.2</b>	<b>Kávovník</b> .....	10
2.2.1	<i>Coffea arabica</i> .....	12
2.2.2	<i>Coffea canephora</i> .....	13
<b>2.3</b>	<b>Technologie zpracování kávy a její úprava</b> .....	14
2.3.1	Suchý postup .....	15
2.3.2	Mokvý postup .....	15
2.3.3	Polo-promývaný postup .....	16
2.3.4	Loupání .....	16
2.3.5	Leštění .....	17
2.3.6	Třídění .....	17
2.3.7	Export .....	17
2.3.8	Pražení .....	17
2.3.9	Chlazení pražených zrn .....	19
2.3.10	Mletí pražených zrn .....	19
<b>2.4</b>	<b>Hodnocení kvality a degustace kávy</b> .....	20
<b>2.5</b>	<b>Způsoby přípravy kávy</b> .....	23
2.5.1	Příprava pomocí džezvy .....	23
2.5.2	Filtrační metoda .....	24
2.5.3	Příprava pomocí kony .....	24
2.5.4	Metoda s francouzským lisem (french press) .....	24
2.5.5	Český turek .....	24
2.5.6	Příprava pomocí perkolátoru .....	25
2.5.7	Metoda studené vody .....	25
2.5.8	Metoda obrácené konvice .....	25
2.5.9	Metoda otevřené konvice .....	25
2.5.10	Metoda espresso .....	25
<b>2.6</b>	<b>Další modifikace kávy</b> .....	26
2.6.1	Instantní káva .....	26
2.6.2	Káva bez kofeinu .....	27
<b>2.7</b>	<b>Chemie kávy</b> .....	28

2.7.1	Purinové heterocykly (kofein, teofylin, teobromin) .....	31
2.7.2	Furany .....	32
2.7.3	Thiofeny .....	32
2.7.4	Pyrroly .....	32
2.7.5	Oxazoly .....	33
2.7.6	Thiazoly .....	33
2.7.7	Pyridiny .....	34
2.7.8	Pyraziny .....	34
2.7.9	Heterocyklické aminy .....	35
<b>2.8</b>	<b>Vybrané analytické metody a jejich aplikace .....</b>	<b>36</b>
2.8.1	Separační metody .....	36
2.8.2	Optické metody .....	37
2.8.3	Elektroanalytické metody .....	38
<b>3</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Přístrojová technika a chemikálie .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Vzorky kávy .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Příprava vzorků kávy .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Způsoby přečištění .....</b>	<b>41</b>
3.4.1	Přečištění metodou SPE .....	41
3.4.2	Přečištění L-L extrakcí .....	41
<b>3.5</b>	<b>Derivatizace .....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Příprava vzorku a jeho přečištění .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Derivatizace .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Stanovení koncentrace HAA v kávových extraktech .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Stanovení koncentrace HAA v připravených nápojích .....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>55</b>



# 1 Úvod a cíle

Slovo káva pochází z arabského slova „qahwah“, které bylo původně používáno pro označení vína, a znamená sílu a vzrušení<sup>[1]</sup>. Káva je společně s čajem jedním z nejvíce konzumovaných nápojů na světě. Mezi nejznámější druhy patří *Coffea arabica* a *Coffea canephora*, běžně známé jako *arabica* a *robusta*. V dnešní době je mezi konzumenty nejosvědčenější *arabica*, kvůli její výraznější vůni a chuti. Avšak vůně a chuť nejsou jedinými parametry, neboť *arabica* je známá i svou lepší kvalitou, která se odráží na její ceně. Obě kávy se liší tvarem svých zrn, zatímco *arabica* má zrna zelená a oválná, tak *robusta* má zrna hnědá a kulatá<sup>[2-8]</sup>.

Vzhledem k vysoké poptávce tohoto produktu je její výroba velmi rozšířená a to přináší vznik velkého množství vedlejších produktů, které mohou být toxické a představují vedle přímého ohrožení zdraví konzumenta/spotřebitele také vážné riziko pro životní prostředí.<sup>[9]</sup>

Mezi základní látky, které káva obsahuje, patří jednoznačně kofein. Kofein je derivát xantinu, který stimuluje centrální nervový systém. Další základní látkou je trigonelin, což je derivát pyridinu, který během pražení nepřímo přispívá ke vzniku vonných produktů, mezi které patří např. furany, pyraziny nebo pyrroly. Během pražení dochází k jeho demethylaci, která vede ke vzniku kyseliny nikotinové, což je ve vodě rozpustný vitamín B3. Trigonelin je navíc známý svou antiinvazivní aktivitou vůči rakovinným buňkám<sup>[10]</sup> a má schopnost regenerovat dendrity a axony nervových buněk. Třetí hojně obsaženou látkou kávy je disacharid sacharóza<sup>[11-15]</sup>.

Cílem této práce je najít vhodnou metodu pro stanovení heterocyklických aromatických aminů (dále jen HAA) v kávě, které vznikají při pražení kávových zrn. HAA jsou závažný problém nejen pro životní prostředí, ale i pro naše zdraví, neboť patří mezi mutagenní látky, a proto je potřeba sledovat jejich koncentraci. Pro jejich stanovení je třeba nejprve najít vhodný postup přečištění kávové matrice a následně najít vhodnou kvantifikační metodu.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Historie kávy

Káva je konzumována již přes 1000 let a v dnešní době je to jeden z nejkonzumovanějších nápojů světa. Za šíření kávy byla zodpovědná Arábie. I přestože kořeny kávové kultury začínají v Arábii a Etiopii, tak ve skutečnosti káva pochází z východní Afriky, konkrétně z okolí Velkých jezer. Zde můžeme i v současné době nalézt množství divoce rostoucích keřů kávovníku<sup>[16]</sup>. Nejstarší rukopisy o kultuře kávy pochází z roku 575 z Jemenu, ale poprvé byly kávové boby praženy v Persii v 16. století. V roce 1615 se začala káva objevovat i v Evropě díky tehdejším cestovatelům. Zejména pak Němci, Francouzi a Italové začali hledat způsob, jak kávové plantáže rozvíjet. Jako prvním se to ale podařilo Holanďanům, kteří získali kávová zrna a začali je pěstovat v botanických zahradách v Amsterdamu a následně z nich připravovali nápoj, který známe dnes. Postupem času dostali Francouzi od Holanďanů již zmíněná kávová zrna a jejich kultivace se rozšířila po evropských koloniích. Evropský trh najednou rostl a jeho cílem bylo rozšíření kávových plantáží do Afriky, ze které se dostaly např. až na Kubu nebo do Guiney. Přes Guineu se káva dostala až do severní Brazílie, odkud bylo tajemství Arabů rozšířeno po celém světě<sup>[17-21]</sup>.

### 2.2 Kávovník

Kávovník je zelená dřevina, jejíž výška se pohybuje mezi 1,5–15 metry, avšak na plantážích jsou keře upravovány tak, aby měly 3 metry. Důvodem je snazší sklizeň. Na světě existuje několik desítek druhů kávovníku, ale nejznámější jsou *Coffea arabica* (*arabica*) a *Coffea canephora* (*robusta*). *Arabica* je jemnější, bohatší na chuť a na rozdíl od *robusty* obsahuje méně kofeinu. První plody kávovník poskytne po 5 letech od vysazení (Obr. 1). Plody, které jsou již zralé, mají podobu třešní, jsou tedy kulaté a červené. Na kávovníku se nachází jak zralé plody, tak i zralé květy. Zralé plody se sklízí buďto „ručně“ do košů, což je výhodnější, neboť zkušený sběratel sbírá pouze plody zralé a nepoškozené, nebo se setřesou do plachet, které jsou rozloženy pod stromy. Druhý způsob není tak výhodný z hlediska kvality, protože se následně musí zralé plody oddělit od nezralých, ale výsledek

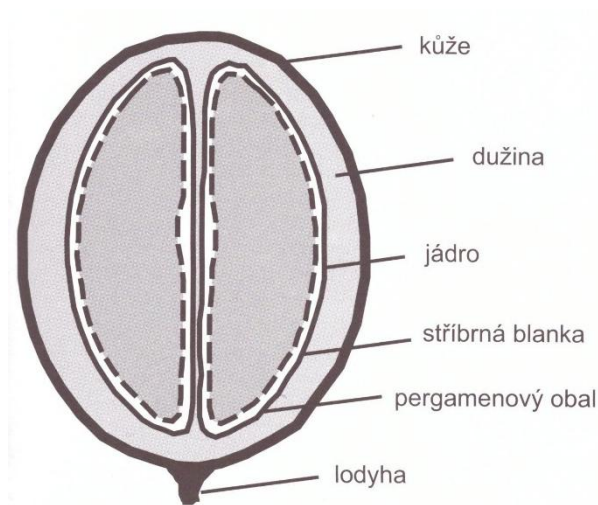
není vždycky stoprocentní. Když je sklizeň u konce, tak se plody dále zpracují v továrnách<sup>[22]</sup>.



Obr. 1: Kávovník<sup>[23]</sup>

Kávovníky jsou početnou skupinou nižších tropických rostlin. Strom rodu *Coffea* druhu *arabica* má paralelní párové boční větvení, ale spodní větve se sklánějí směrem dolů. Zároveň je to i samoopylující rostlina. *Coffea canephora* má vějířovité uspořádání větví. Typicky se u něj pozoruje pravidelné střídání vstřícných větví. Na rozdíl od *Coffea arabica* není samoopylovací rostlinou. Kávovníky jsou často napadány listovou rzí (*Hemileia vastatrix*) nebo kávovým broukem (*Stephanoderes coffeae*), který atakuje přímo plody. Listy jsou rozmanité, mají stále zelenou barvu s nádechem žluté nebo i fialové, tvary mají oválné a vždy mají voskovitý povrch. Vrchní i spodní část listu je vždy špičatá, což je základní charakteristický znak pro všechny druhy kávovníku. List zároveň slouží i jako ochrana rostliny, v noci před mrazem a přes den před silným slunečním zářením. Listy kávovníku dosahují délky až 15 cm a obsah kofeinu je v nich největší<sup>[23]</sup>. Květy mají bílou barvu a hvězdicovitý tvar, kvetou po trsech, které obsahují až 15 květů. Květy kvetou jen několik dní, nejčastěji po dešti, a mají silnou vůni. Po opylení květů se objeví malé zelené bobule, které když dozrávají, tak postupně mění svou barvu ze zelené na červenou. Doba zrání je okolo 14 měsíců. V poslední fázi zrání mají hnědou barvu. Každá bobulka obsahuje zpravidla dvě kávová zrna, ale někdy může být obsaženo i jen jedno nebo naopak více. Kávovníková bobule se skládá z několika vrstev (Obr. 2). Vnější vrstva (exokarp) je hrubá a odolná vůči poškození. Pod ní se nachází gelová vrstva (mezokarp), která obsahuje

nasládlou dužinu. Další vrstvou je slupka, nebo-li pergamenový obal (endokarp), na který hned navazuje část nazývaná stříbrná blanka, která se po pražení samovolně oddělí.



Obr. 2: Průřez kávovníkovou bobulí<sup>[24]</sup>

Pěstování kávovníků závisí hlavně na kvalitě půdy (pH půdy, mineralizaci, živinách a na množství dusíkatých hnojiv), na nadmořské výšce plantáží (vliv slunečního záření, umělé zavlažování) a na technologii zpracování kávových zrn, což je považováno za nejdůležitější faktor v oblasti jakosti. V případě, že je půda mírně alkalická, tak má kávovník zpomalený růst. Pokud je půda silně kyselá nebo alkalická, tak rostlina odumírá. Optimální teplota pro pěstování arabiky je 17-24 °C, u *robusty* je teplota v rozmezí od 24-30 °C. V případě, že teplota klesne pod bod mrazu, tak oba zmíněné druhy odumírají. Optimální vlhkost pro pěstování kávovníků by měla mít zhruba 90 %<sup>[25]</sup>.

### 2.2.1 *Coffea arabica*

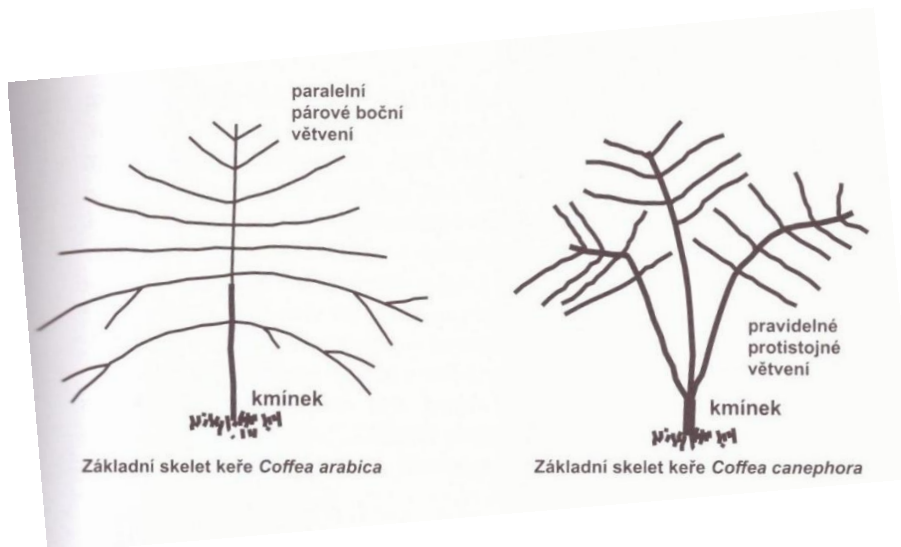
Je řazena mezi nejkvalitnější kávy. *Arabica* je náročnější na pěstování a první úrodu má i po 6 letech. Co se týče velikosti, tak dorůstá až do výšky 5 metrů a je odolná na změny počasí. Oproti *robustě* obsahuje méně kofeinu. V této práci budou zmíněny jen základní typy:

- *Arabica Typica* – základní druh pocházející z Etiopie. Tento typ kávovníku rostl již v Jemenu na prvních plantážích. Je to velmi kvalitní druh konického tvaru dorůstající do výšky až 4 metrů.

- *Arabica Bourbon* – tento druh má malé plody rostoucí těsně u sebe. *Arabica Bourbon* není tolik odolná vůči změnám počasí, neboť při dešti nebo silnějším větru odpadají zralé plody samy. Stejně jako u typu *Arabica Typica* je i v tomto případě kvalita velmi dobrá.
- *Arabica Caturra* – tento typ je mutací druhu *Arabica Bourbon*. Její produkce je velmi vysoká a zároveň i kvalitní. Je náročná na péči a hnojení.
- *Arabica Mundo Nuovo* – tento druh je považován za přírodní hybrid mezi *Typicou* a *Bourbonem*. Tato odrůda je velmi silná a odolná. Má velmi vysokou produkci, ale zraje později než ostatní druhy.
- *Arabica Maragogype* – tato odrůda je také mutací *Typicy*. Má nízkou produkci a dosahuje velkých rozměrů. Zrna této odrůdy jsou velmi velká a jsou považována za největší kávová zrna na světě.
- *Arabica Pacamara* – uměle vyšlechtěná odrůda z odrůd typu *Maragogype* a *Pacas*. Má výrazné aroma s kořenitými tóny.
- *Arabica Geisha* – v poslední době patří mezi nejžádanější. Dorůstá do velkých výšek a její chuť je nasládlá s tóny lesního ovoce.

### 2.2.2 *Coffea canephora*

Patří mezi levnější a méně kvalitní kávy. Dorůstá do výšky až 13 metrů. Pro svůj růst potřebuje teplé a stabilní klima s teplotou 24 °C až 29 °C. Oproti *arabice* je méně náročný na pěstování. První sklizeň se dostaví obvykle po 3 letech. Je odolnější a plody zrají rychleji. Obsahuje více kofeinu, a proto má výrazně hořkou chuť. Od druhu *arabica* se liší i tvarem zrn. *Arabica* má zrna plochá a protáhlá se zakřivenou rýhou uprostřed zrna, zatímco *robusta* má zrna vypouklejší s rovnou rýhou<sup>[23]</sup>.



Obr. 3: Větvení kávovníku *Coffea arabica* a *Coffea robusta*<sup>[24]</sup>

Kávovníky jsou produktivní po dobu 30 až 40 let a jejich životnost je přes 100 let. Na průmyslových plantážích jsou nahrazovány zhruba po 30 letech. Kořeny zasahují až do 1,5 metrové hloubky. Ročně se na jedné rostlině kávovníku urodí až jeden kilogram zrn. Dužina obsahuje velké množství sacharidů, které se po zkvašení používají i na výrobu likéru. Stříbrná blanka se po odstranění využívá jako přísada do kosmetických přípravků. Rozmnožování kávovníků se provádí dvěma způsoby, a to buď vyséváním nebo řízkováním, kterému je v průmyslu dávana přednost. Na jeden hektar se využije až 1500 sazenic. Kvůli udržování úrodnosti a efektivnějšímu používání pesticidů se kávovníky musí pravidelně po sedmi letech stříhat. Jak již bylo zmíněno výše, tak po dozrání přichází na řadu sběr a preferuje se sběr ruční (picking). Stejně jako u sběru hroznů se někdy provádí pozdní sběr. Tento způsob se využívá, když se chce docílit změny chuti. Bobule se na kávovníku nechávají až do úplného dozrání. Výsledný kávový produkt připravený z těchto zrn má příjemně nasládlou chuť<sup>[24]</sup>.

### 2.3 Technologie zpracování kávy a její úprava

Bezprostředně po dozrání přichází na řadu sběr. V oblastech okolo rovníku se sklizeň provádí po celý rok, zatímco na sever od rovníku sklizeň probíhá od září do prosince a na jih od rovníku od dubna do května. V nižších nadmořských výškách zrají plody mnohem rychleji, proto sklizeň začíná právě v těchto místech. Samotná sklizeň trvá okolo 8 týdnů<sup>[23]</sup>.

Sběr se provádí několika způsoby:

Prvním z nich je tzv. „pásové“ trháni bobulí, při kterém se všechny plody posbírají jedním přechodem přes plantáž.

Druhou metodou je tzv. „výběrové“ obírání. U druhého způsobu se plantáž přechází několikrát v intervalech mezi osmi až deseti dny a sbírají se pouze červené bobule, tedy jen zralé plody<sup>[22]</sup>.

Dalším způsobem je sběr strojový. U tohoto typu sběru se používá kombajn, který ale může být použit pouze na rovných plochách. Stroj strhává všechny plody včetně listů. Tento způsob sběru je mnohem rychlejší, ale za to velmi drastický vůči kávovníkům<sup>[23]</sup>.

Z důvodu sběru pouze zralých plodů se upřednostňuje ruční sběr. Ihned po sběru následuje technologické zpracování, při kterém se z plodů získávají zelená zrnka. Používají se tři postupy, a to je suchý, mokrý nebo polo-promývaný postup. Všechny zmíněné postupy mají vliv na výslednou kvalitu konečného produktu.

### **2.3.1 Suchý postup**

Nejjednodušší postup používaný pro zpracování zrn podřadnější jakosti. V prvním kroku se posbírané bobule zbaví nečistot a zeminy, rozloží se na betonový nebo cihlový povrch a nechají se volně sušit na slunci. Je jen potřeba bobule přehrabávat v pravidelných intervalech, aby nedocházelo k jejich fermentaci. Zhruba po měsíci jsou již bobule suché a jejich vnější slupka dostane hnědou barvu, stane se křehkou a chřestí v ní zrnka. Suchá metoda zpracování kávových zrn je ekonomicky méně náročná, avšak celý postup trvá mnohem déle.

### **2.3.2 Mokrý postup**

Tato metoda dokonaleji oddělí zralé plody od plodů nezralých či poškozených, tím se tedy zachová kvalita zrn. Rozdíl oproti metodě suché je v tom, že při mokré metodě se dužina odstraní od zrna hned, zatímco u suché metody se bobule nechávají ještě nějaký čas dosušit. V prvním kroku se plody plaví ve velkých nádobách, ve kterých dochází k odstranění listů, větviček a suchých nezralých plodů. Proudem vody jsou přeneseny do „vylupovacích“ strojů, kde je následně odstraněna i dužnina. Z důvodu zachování kvality

zrn se proces vylupování musí provádět nejpozději do 24 hodin od jejich sběru. Vyplavovací kanály slouží k oddělení lehčích, nevyzrálých zrn od těžších, zralých zrn.

Dalším krokem je fermentace, při které se oddělí kluzký slizovitý povrch od oplodí. Fermentace probíhá 12-36 hodin. Pro fermentaci se využívá *Lactobacillus acidophilus*. Během fermentace vzniká kyselina mléčná<sup>[24]</sup>. Po ukončení fermentace se oplodí, které obklopuje zrno, zbaví veškeré slizkosti a na dotek je tvrdé jako „kámen“. Celý fermentační proces musí být pečlivě kontrolován, aby nedocházelo ke hnití zrn.

V dalším technologickém stupni dochází k sušení zrn, která mají stále obal oplodí. Obaly obsahují asi 50 % vlhkosti a společně se zrnem se nazývají „pergamino“. Pro sušení se využívají mechanické sušiče nebo se jen rozloží na betonovou podlahu. Nejvyužívanějším sušícím činitelem je sluneční záření. Kvůli udržení rovnoměrnosti sušení se musí zrna pravidelně obracet a celý proces trvá zhruba 12-15 dní. Důležité je hlídat, aby nedocházelo k praskání oplodí vlivem vysoké teploty, v tomto případě se musí zrna chránit vhodným zastíněním. Tímto krokem zpracování zrn končí a zrna jsou nazývána jako „pergamenová“. Taková zrna jsou již uchována do okamžiku expedice.

### **2.3.3 Polo-promývaný postup**

Při tomto postupu putují některá zrna do vodních lázní, kde dochází k rozdělení na zrna zralá a nezralá. Zralé plody putují do loupačů. Poté následuje sušení na slunci. Zrna musí být pravidelně obracena, aby nedocházelo k jejich plesnivění. Takto zpracovávaná zrna obsahují na povrchu cukry, které časem fermentují a tím dodávají kávě jemnou a sladkou chuť, proto se jim někdy říká medová zrna. Výhodné na tomto způsobu je, že se nespoteřebuje tak velké množství vody jako u mokrého způsobu<sup>[23]</sup>.

### **2.3.4 Loupání**

Před exportem se kávová zrna ošetří loupáním, což znamená, že se odstraní pergamenová slupka – oplodí. Pro odstraňování pergamenové slupky se v praxi používají speciální loupače. Existují dva základní typy – třecí a nárazový.



### **2.3.5 Leštění**

Po oloupání zůstává na zrnech stříbrná blanka, která se odstraňuje leštěním. Jako v případě loupačů existují i při tomto postupu speciální leštiče, které pracují na principu tření a tím odírají povrch zrn.

### **2.3.6 Třídění**

Zrna se třídí prvně podle velikosti a až následně podle jejich hustoty. Třídění probíhá proséváním na sítích. Problémem však je, že se do konečného produktu dostanou i zrna sice stejné velikosti, ale odlišné hmotnosti, proto se tam mohou vyskytnout i zrna poškozená.

Oddělení těchto poškozených zrn probíhá za pomoci vzduchu. Tato metoda se nazývá jako pneumatická. Je to ruční metoda, při které se oddělují těžká a lehká zrna pomocí vzduchové dýzy.

Dalším stupněm třídění je přebírání. Tímto krokem se odstraňují zapáchající či zkažená zrna. Většina přebíracích postupů je vizuální a ruční záležitostí. Další metoda využívá elektronického třídění zrn dle barvy. Toto barevné třídění se používá v případě třídění zrn robusty. I přes tyto technologické vymoženosti je nejlepším „nástrojem“ lidské oko.

### **2.3.7 Export**

Při transportu jsou kávová zrna zabalena do hrubovláknitých jutových pytlů. Transport musí být uskutečněn tak, aby kávová zrna nebyla vystavována vlhkosti, při které může docházet k napadení zrn mikroskopickými houbami produkujícími aflatoxiny nebo hnilobnými bakteriemi.

### **2.3.8 Pražení**

Samotná zelená kávovníková zrna jsou nepoživatelná, proto musí být upravena pražením. Pražení je považováno za nejkritičtější část celého technologického postupu. Teplota pražení se liší dle druhu kávy, ale nejčastěji používané teploty se pohybují okolo 300 °C<sup>[22]</sup>. Během procesu pražení jsou zrna otáčena v otáčejícím se bubnu. Praží se za pomoci horkého vzduchu, přičemž teplota neustále stoupá. Pražení trvá zhruba 15 minut.

Po 9 minutách nastává first crack (první prasknutí) a 6 minut poté nastává second crack (druhé prasknutí). Pokud se praží dále, jsou přepražená, což má za následek velmi hořkou chuť a ztrátu vůně. V případě, že je žádoucí, aby výsledná káva měla jemnou chuť, tak se pražení zastaví již po prvním prasknutí<sup>[23]</sup>. V momentě, kdy zrna ztmavnou, tak začíná vystupovat kávová vůně. Během pražení zrna ztrácejí 20 % své původní váhy a jejich povrch je na pohled lesklý. V některých zemích, např. v Etiopii, se při konci pražení přidává koření, mezi které patří zázvor, skořice a hřebíčky. Pro kávu podávanou s mlékem jsou nejlepší zrna světle pražená, zatímco tmavá zrna jsou vhodná pro černou kávu. Velmi tmavá zrna se používají pro silně hořké espresso<sup>[1]</sup>.

V průběhu pražení dochází k řadě chemických reakcí. Škroby se mění na jednoduché sacharidy, které začínají trochu karamelizovat. Dále dochází ke vzniku některých kyselin. Buňkový skelet zrna začne tát a dojde k „pukání“ zrn. Jakmile začne docházet ke změně barvy ze zelené na hnědou, tak to znamená, že se začaly tvořit hnědé antioxidační látky, kterým se říká melanoidy. Kromě rozkladu škrobu dochází zároveň i k degradaci proteinů na menší peptidy. Kromě výše zmíněných látek dochází i ke vzniku různých fenolových látek. V tomto stupni začne docházet k úniku olejů na povrch. Při prudkém pražení dochází k tzv. „pocení zrna“, při kterém se tuk dostává na povrch zrna a značně ovlivňuje výslednou jakost finálního produktu. Během pražení musí být zrna neustále míchána, aby nedocházelo k jejich připálení, což by mohlo způsobit vznícení zrn.

Kávovníková zrna se praží do různého stupně (Obr. 4). Kávu lze pražit i v domácích podmínkách a to za využití trouby, mikrovlnné trouby či speciální pánve.



Obr. 4: Pražená kávová zrna<sup>[1]</sup>

### 2.3.9 Chlazení pražených zrn

Bezprostředně po upražení kávy do požadovaného odstínu musí být zrna zchlazena na chladicích sítích, kterými prochází proud chlazeného vzduchu.

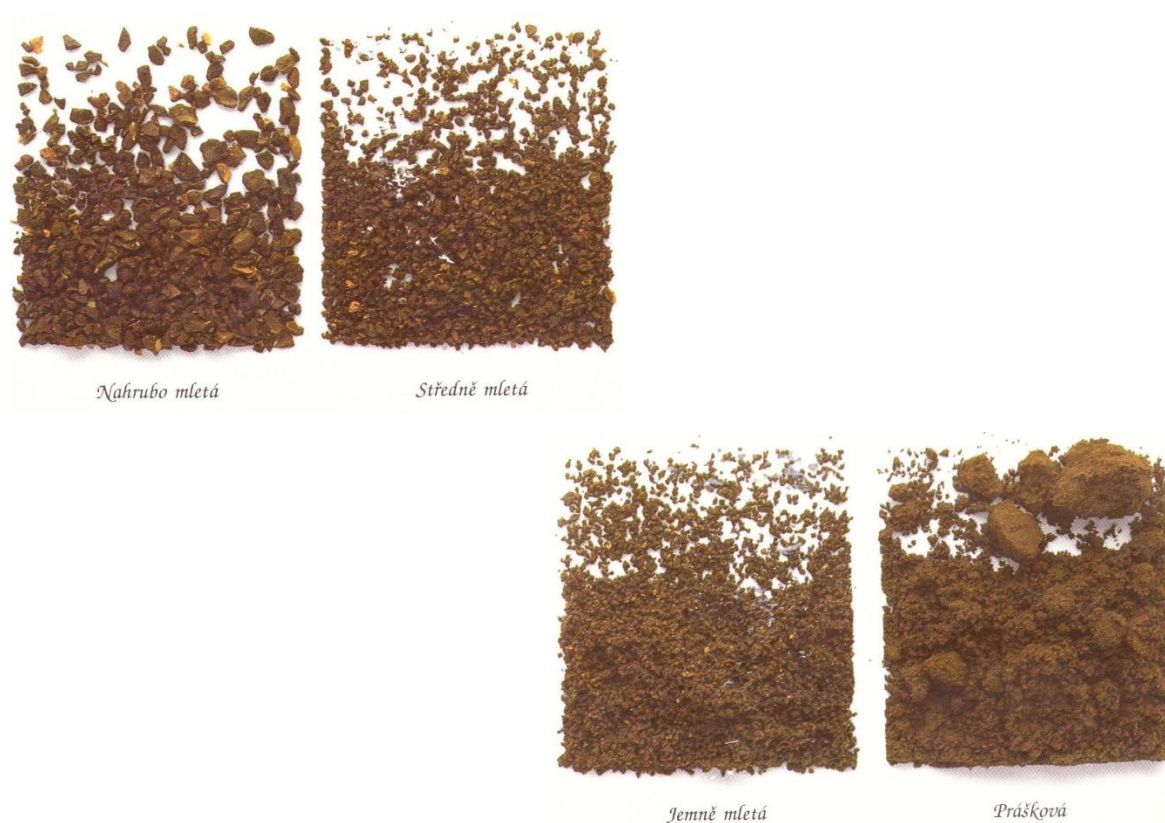
### 2.3.10 Mletí pražených zrn

Nejlepší je, když se zrna namelou těsně před přípravou kávy, protože po pomletí z nich vyprchávají aromatické látky a silice. Dříve byl k mletí používán hmoždíř, ale ten neměl kvalitní výsledky, a proto se dnes na domácí mletí používají ruční mlýnky na kliku nebo mlýnky elektrické s plynulou regulací otáček. U elektrických mlýnků, které nemají plynulou regulaci otáček, hrozí přepálení zrn a jejich následné znehodnocení.

Pro překapávání je vhodná káva mletá nahrubo, pro vakuový způsob středně mletá a jemně mletá káva se používá pro přípravu v papírových filtrech. Nejjemnější mletí (práškové) se používá pro přípravu kávy v džezvě (speciální konvička). V průmyslu se pro

mletí používají velkokapacitní mlýny s mlecími válci chlazenými vodou, aby nedošlo k přepálení kávy. Pomletá káva by měla být chráněna před vlhkem, světlem a vzduchem, proto je balena do vakuových obalů naplněných inertním plynem. Důvodem je zachování všech důležitých vonných a chuťových látek<sup>[22]</sup>.

Mletí je rozděleno do čtyř stupňů – hrubé, střední, jemné a práškové (Obr. 5). Hrubé mletí trvá 7 až 10 sekund, střední 10 až 13 sekund, jemné 15 až 20 sekund a práškové 20 až 25 sekund<sup>[25]</sup>. Jemně mletá káva má konzistenci připomínající polohrubou mouku a takto namletá káva se využívá pro přípravu espressa. Středně mletá káva má konzistenci hrubé mouky a takto namletá káva se používá pro přípravu v moka konvičce. Hrubě mletá káva připomíná krupici a využívá se pro přípravu filtrované kávy<sup>[24]</sup>.



Obr. 5: Druhy mletých káv<sup>[1]</sup>

## 2.4 Hodnocení kvality a degustace kávy

Káva prochází desítkami degustací. Toto ochutnávání je považováno za takový rituální obřad. Káva k degustaci by měla být nahrubo umletá. Nejdříve se k umleté kávě přičichne. Posuzuje se síla vůně a vše, co se v kávě cítí. Pro určení vůně jsou vzorky zality horkou vodou o teplotě 94 °C. Používá se kvalitní filtrovaná voda, neboť i voda ovlivňuje

výslednou chuť kávy. Po zhodnocení vůně se odstraní kávová pěna a hodnotí se chuť. Čich i chuť jsou velmi důležitými smysly při degustaci, které spolu velmi úzce souvisí a vzájemně se doplňují. Čichem se hodnotí kvalita plynné látky, zatímco chutí se hodnotí látky rozpuštěné ve slinách. Káva se srká z hlubokých speciálních „cuppingových“ lžiček. Plná lžička kávy se vloží do úst a jazykem „poválí“. Stejný postup se provede se všemi vzorky a u každého si dělá poznámky a bodově každý vzorek ohodnotí kvalifikovaný degustátor. Pro bodování se používají speciální stupnice (Tab. I). Každý degustátor musí mít své vybavení, mezi které patří váha, mlýnek, miniaturní pražírna, nádoba na použitou kávu, lžičky a přístroj na měření vlhkosti<sup>[24]</sup>.

Tab. I: Terminologie používaná při sensorickém hodnocení kávy<sup>[24]</sup>

<b>typ</b>	<i>arabica, robusta, arabica praná, apod.</i>
<b>vzhled a barva</b>	zelených a pražených zrn
<b>kyselost</b>	nevýrazná, slabá, silná, příliš povrchní
<b>věk</b>	staré nebo čerstvé zrn
<b>chyby</b>	příliš kyselá chuť, travnatá, zatuchlá
<b>chuť v šálku</b>	přepražená, slabě spálená, stará
<b>celkové hodnocení chuti</b>	neutrální, kořeněná, ovocná, trpká, dřevnatá, čokoládová, apod.
<b>vůně</b>	slabá, silná, popelová, spálená, chemická, tabáková, gumová
<b>chuťová plnost</b>	mírná, značná
<b>pocit v ústech</b>	vyvážený, svírající, trpký, plný

Před ochutnáním se posuzují kritéria, jako jsou velikost, barva, vlastnosti zrn po upražení a mikrobiologické požadavky.

Hodnocení velikosti je zásadní v případě, že se prodává celé zrn, nikoliv pomleté. Pro posouzení velikosti se používá sada sít.

Při posuzování barvy se degustátoři soustředí na barvu surových zrn kávovníku. Běžná barva těchto zrn je zelená, která někdy přechází přes žlutou až do hněda. Delším skladováním barva bledne.

Při kontrole vlastností zrn po upražení se hodnotí přítomnost chemických látek. Největší pozornost se upíná na obsah polycyklických aromatických uhlovodíků, které vznikají při pražení zrn.

Z hlediska mikrobiologických požadavků se kontroluje přítomnost patogenních mikroorganismů, hub a toxinů. Důraz se klade na přítomnost ochratoxinu A. V zrnech nesmí být nalezeni živí ani mrtví škůdci a počet mikroskopických hub nesmí překročit 100 na 1 g<sup>[25]</sup>.

Když se posuzuje kvalita kávy v šálku, tak jsou na degustátora kladeny vysoké odborné požadavky. Musí mít odborné zkušenosti z praxe. Degustátoři pro celkové posouzení vlastností šálku používají již zavedené termíny (Tab. II)<sup>[24]</sup>.

Tab. II: Termíny používané při hodnocení kvality připravené kávy v šálku<sup>[24]</sup>

<b>fine cup</b>	jemný šálek
<b>good cup</b>	dobrý šálek
<b>good to fine cup</b>	dobrý až jemný šálek
<b>fine and good cup</b>	jemný a dobrý šálek
<b>very good cup</b>	velmi dobrý šálek
<b>very fine and good cup</b>	velmi jemný a dobrý šálek
<b>fair cup</b>	ucházející šálek
<b>poor cup</b>	slabý šálek
<b>bad cup</b>	nedobrý šálek
<b>full body</b>	plný, velmi výrazný
<b>without body</b>	prázdný, bez charakteru

Mezi první posuzovanou vlastnost patří aroma, protože vůně je první vjem, který se pociťuje při servírování ještě před samotným ochutnáním.

Dále následuje zhodnocení chutě. Mezi hlavní chutě, které se posuzují, patří chuť sladká, slaná, hořká a kyselá. Určí se, zda je chuť příjemná nebo nepříjemná. Sladké a kyselé tóny se řadí mezi pozitivní, naopak jako negativní se považuje trpkost.

Dále se hodnotí kyselost (acidita), která postupně při chladnutí mění svou intenzitu, proto se vzorek ochutnává vícekrát. Tímto pojmem se nemyslí octová chuť, nýbrž pocit suchosti, který káva vytváří pod jazykem. Kyselost se u káv projevuje ostrou, pikantní a

mohutnou kvalitou, kterou tvoří přírodní kyseliny společně s cukry. Bez kyselosti je káva planá.

V neposlední řadě se hodnotí „tělo“, jestli je plné, hutné, těžké, bohaté nebo slabé, jemné. Pod tímto pojmem se skrývá chuťový pocit. Hodnotí se viskozita, síla, hmotnost a olejnatost<sup>[24]</sup>. *Robusty* mají silné a nezaměnitelné tělo.

Jako poslední se určí dochuť (chuť, která zůstane v puse). Doba jejího působení je různá, někdy trvá chvíli a někdy se zase velmi dlouho drží. Může být jemná a příjemná nebo naopak hrubá a hořká. Před samotnou degustací se nesmí nic jíst, maximálně suchý chléb nebo suchary, aby nedošlo ke zkreslení chuti<sup>[23]</sup>.

## 2.5 Způsoby přípravy kávy

Příprava kávy je založena na jejím vyluhování v krátkém čase po spaření vařící vodou. Delší luhování kvalitu kávy nezlepší. Důležitým parametrem je teplota vody. Voda o teplotě varu zvyšuje hořkost kávy a stejný účinek má i dlouhé spařování. V obou zmíněných případech se výrazně zhoršuje chuť i vůně kávy.

Pro přípravu lahodné kávy se používají dvě metody<sup>[1]</sup>:

První z nich je dekokce, což je vodní extrakce kávových zrn do té doby, až jsou všechny chuťové a vonné látky vyextrahovány.

V druhém případě je to infuze, která je založena na vodní extrakci kávových zrn za použití teplot, které jsou však nižší než je teplota varu směsi<sup>[25]</sup>.

Existuje několik postupů, jak kávu připravit. V této práci budou zmíněny ty nejčastěji používané.

### 2.5.1 Příprava pomocí džezvy

Tato příprava kávy patří mezi nejstarší. Džezva je měděná nádobka s širokým dnem a úzkým hrdlem. V dnešní době se už vyrábí i z jiného materiálu než je měď, např. z hliníku nebo nerezové oceli.

S džezvou se pracuje následovně:

Do nádoby se nasype příslušné množství mleté kávy, která se dolije studenou vodou. V této fázi se přidává i cukr, je-li žádoucí. Až se začne směs vařit, tak se džezva odstaví a čeká se na pokles pěny. Poté se opět přivede k varu a celý postup se opakuje nejméně 3×. Káva se rozlívá do šálků v okamžiku, kdy káva klesne na dno. Některé národnosti, jako jsou např. Turci nebo Arabové, přidávají kromě cukru i různé druhy koření.

### **2.5.2 Filtrační metoda**

Takhle připravená káva se nazývá překapávaná a připravuje se ve speciální nádobě. V horní části nádoby se nachází papírový filtr, na kterém je mletá káva. Horká voda prochází skrze ni a káva tedy odkapává do dolní části nádoby.

### **2.5.3 Příprava pomocí kony**

Výhodou této přípravy je, že si můžeme sami určit sílu výsledného nápoje. Výsledná síla závisí na počtu proběhnutých procesů. Do spodní nádoby se nalije studená voda a na tuto nádobu se vloží další nádoba, která obsahuje mletou kávu na filtru nebo na síťce. Celá tato soustava se vloží na tepelný zdroj. Při zahřívání vody vzniká ve spodní nádobě přetlak, který způsobí vytlačení vody do nádoby horní. Odstavením soustavy z tepelného zdroje, tedy změnou teploty, se tlak začne vyrovnávat a káva překapává do spodní nádoby. Proces se opakuje dle žádané intenzity výsledného nápoje. Tato metoda se někdy nazývá také jako metoda vakuová.

### **2.5.4 Metoda s francouzským lisem (french press)**

Do skleněné nádoby se na dno nasype mletá káva, která se zalije téměř vařící vodou, zamíchá a uzavře víkem, které se skládá z pístového filtru. Po vyluhování (asi 4 minuty) se stlačením pístu káva oddělí na dno nádoby a káva se může přelévat do šálků.

### **2.5.5 Český turek**

Nejznámější způsob přípravy je tzv. český turek. V tomto případě se do šálků nasype mletá káva, která se zalije vroucí vodou, ale na rozdíl od předešlých metod se v tomto případě



káva od nápoje neoddělí, tedy po celou dobu konzumace se luhuje, čímž postupně ztrácí svou kvalitu i chuť<sup>[22]</sup>.

### **2.5.6 Příprava pomocí perkolátoru**

Káva připravovaná tímto postupem má hořkou chuť, neboť se po celou dobu přípravy vaří.

### **2.5.7 Metoda studené vody**

Tato metoda se používá pro přípravu studených kávových nápojů. Pomletá káva se smíchá se studenou vodou a nechá se extrahovat zhruba 12 hodin. Poté se směs přefiltruje a sediment se odstraní. Extrakt se uchovává v lednici nebo se může nechat zmrazit na přípravu kávových kostek ledu. Takto připravená káva má velké aroma, a proto se při přípravě nápoje dále kombinuje s normálně připravenou kávou v poměru 1:4.

### **2.5.8 Metoda obrácené konvice**

Přístroj se skládá ze dvou překapávajících konvic, které jsou ale obrácené. Na jejich rozhraní je filtr nebo síťka s mletou kávou. Ve spodní konvici je umístěna voda, která když dosáhne bodu varu, tak se konvice obrátí a horká voda začne překapávat přes filtr nebo síťku do konvice druhé.

### **2.5.9 Metoda otevřené konvice**

Tato metoda patří mezi nejzákladnější. Mletá káva se umístí na dno konvice a zalije horkou vodou. Směs se promíchá a nechá se chvíli extrahovat. Poté je extrakt přefiltrován a připravený nápoj se může ihned podávat.

### **2.5.10 Metoda espresso**

Pro přípravu espresso se používají tmavě upražená zrna. Výsledný nápoj je intenzivní a velmi aromatický. Příprava espresso je založena na protlačení vody skrze namletá pražená kávová zrna. Dle odborníků patří příprava espresso mezi nejtěžší způsoby přípravy<sup>[25]</sup>.

## 2.6 Další modifikace kávy

### 2.6.1 Instantní káva

První prášková instantní káva byla uvedena na trh roku 1938 firmou Nestlé pod značkou Nescafé. Tento produkt byl velmi oblíbený za 2. světové války, kdy byly největšími konzumenty armády<sup>[23]</sup>. Vůně ani chuť instantní kávy se nedá srovnávat s pravou kávou. Instantní káva se většinou vyrábí z *robusty*, která není tolik kvalitní<sup>[22]</sup>. Na výrobu 1 kg instantní kávy je potřeba 2,2 kg zelených kávových zrn a výsledný produkt obsahuje velmi málo tukových látek, proto její konzumace nezpůsobuje zvýšení cholesterolu v krvi<sup>[25]</sup>.

Instantní káva se připravuje dvěma způsoby:

#### 2.6.1.1 Sušené rozprašování

Připravený velmi silný kávový koncentrát, který je zchlazen na teplotu 4 °C, se horkým vzduchem vhání do vysoké věže. Voda je kvůli horkému vzduchu částečně odpařena a na dno dopadají usušená zrníčka. Výrobek má lepší rozpustnost, avšak horší aroma. Nejčastěji používaný způsob.

#### 2.6.1.2 Sušení mražením

Tento způsob je založen na lyofilizaci. Připravený silný kávový koncentrát je zmražen na teploty -40 °C a vzniklý led se odstraňuje sublimací. Náročnější způsob výroby, avšak káva má výraznější aroma než káva vyrobená předchozím postupem<sup>[22]</sup>.

Obě metody jsou založeny na fyzikálním, nikoliv na chemickém procesu<sup>[23]</sup>.

V případě, že chceme, aby výsledná káva byla v podobě granulí, tak se dále provádí postup zvaný aglomerace. Aglomerace je technologický postup používaný při výrobě nejen kávy, ale i čaje. Shlukování se provádí ve speciálních přístrojích – „aglomerátorech“. Jako výchozí surovina slouží vysušený práškový extrakt, který je v aglomerátoru strháván párou, kvůli které se shlukují a následně opět suší. Výsledný produkt má výraznější aroma.

Na trhu existují i tzv. nepravé (falšované) instantní kávy. Pod tímto označením se rozumí ne příliš „čistá“ instantní káva. K pravému kávovému extraktu se přimíchá podíl

kávovin (pražené obilniny, cikorka). Takto vyrobené kávy musí mít na obale vyznačeno, že se nejedná o 100% kávový výrobek, nýbrž o směs kávového a kávovinového extraktu<sup>[25]</sup>.

Co se týče její přípravy, tak je rychlá a velmi snadná. Kávová lžička se jen zalije horkou vodou. Pro přípravu instantní kávy by se neměla používat vařící voda, neboť hrozí přepálení kávy. Dle odborníků je ideální teplota vody pro přípravu instantní kávy do 83 °C<sup>[23]</sup>.

## **2.6.2 Káva bez kofeinu**

Další variantou kávy, která je vhodná i pro lidi s vysokým krevním tlakem, je káva bez kofeinu<sup>[22]</sup>. V dnešní době existují dva druhy bezkofeinové kávy. U jednoho typu byl kofein odstraněn až na úplné minimum (0,1 % kofeinu v zeleném zrnku) a u druhého typu, kde jsou tzv. zrna chudá na kofein, nepřesahuje kofein hranici 0,2 % v zeleném zrnku. To tedy znamená, že v jednom šálku takto připravené kávy se nachází 1–5 mg kofeinu. Kofein tedy není nikdy zcela vyloučen a z tohoto důvodu by lidé, kteří jsou extrémně citliví na kofein, neměli konzumovat ani tuto kávu.

Technologie, které se využívají na odstranění kofeinu, jsou následující:

### **2.6.2.1 Nepřímá metoda**

Tato metoda je založena na odstraňování kofeinu s využitím organických rozpouštědel, jako je např. chloroform nebo ethylacetát. Nejprve jsou zrna napařována, čímž zvětší svůj objem a jsou propustnější pro použité rozpouštědlo. Nabobtnaná zrna se namáčí do rozpouštědla a tím se kofein luhuje ven. Tento postup se opakuje vícekrát. Poté je rozpouštědlo odděleno a zrna znovu napařována a vysušena kvůli odstranění zbytkového rozpouštědla. Nejčastěji používaným rozpouštědlem byl dichlormethan, neboť ze všech užívaných rozpouštědel na sebe nejméně vázal ostatní aromatické látky obsažené v kávovníkovém zrnku, avšak jeho používání bylo od roku 1995 v Evropě zakázáno kvůli poškozování ozonové vrstvy.

### **2.6.2.2 Švýcarská metoda**

Jako extrakční činidlo pro kofein je používána pouze voda a uhlíkové filtrační zařízení. Zrna jsou namáčena do vody a kofein je do ní vyluhován. Nevýhodou je, že společně s kofeinem jsou vyluhovány i další vonné látky. Tato kofeinová voda se přefiltruje přes

speciální filtry obsahující aktivní uhlí, které kofein z vody odstraní. Filtrát se odpaří za vzniku koncentráту, kterým se vysušená zrna pokropí za účelem zpětného získání vonných látek bez kofeinu.

### 2.6.2.3 Metoda superkritické extrakce

Proces, při kterém se jako extrakční činidlo používá tekutina v superkritickém stavu. Jako jeden z plynů používaných při této metodě je oxid uhličitý. Prvním krokem je napařování zrn vodní parou při teplotě 70 °C a za zvýšeného tlaku. Kofein se naváže na kapalně médium a je odstraněn vlivem absorpce s recirkulací plynu. Výhodou této metody je, že je odstraněn pouze kofein a vonné látky zůstávají v kávovníkovém zrně. Nevýhodou této metody je její energetická a technologická náročnost. Vyextrahovaný kofein je dále použit v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu<sup>[24]</sup>.

## 2.7 Chemie kávy

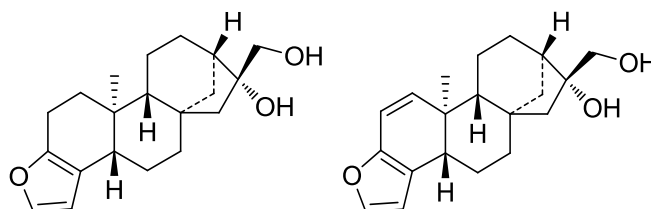
Dle odborníků obsahují zelená kávová zrna několik set chemických látek, z nichž většina nebyla podrobně prozkoumána. Mezi nejznámější tři látky obsažené v kávě patří kofein, teobromin a teofylin. Všechny tři zmíněné látky patří mezi alkaloidy a mají nahořklou chuť<sup>[22]</sup>.

Připravený šálek kávy obsahuje řadu organických i anorganických látek (Tab. III). Kromě zmíněných tří dominantních látek (kofein, teofylin a teobromin) je v přírodním rostlinném materiálu obsaženo i množství tříslovin a pentozanů. Ve stopovém množství je zde obsažen i niacin<sup>[24]</sup>.

Tab. III: Obsahové látky v zelených zrnech kávovníku (obsah v hmotnostních %)<sup>[24]</sup>

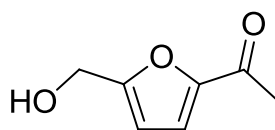
<b>Přítomná látka</b>	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>	<b>Sloučeniny</b>
<b>rozpustné sacharidy</b>	9,0 až 12,5	6,0 až 11,5	glukóza, arabinóza, galaktóza, sacharóza
<b>nerozpustné sacharidy</b>	46,0 až 53,0	34,0 až 44,0	polymery manózy, galaktózy a arabinózy, celulóza, hemiceluloza
<b>kyseliny a fenoly</b>	8,8 až 12,4	8,4 až 14,4	
<b>těkavé kyseliny</b>	0,1	0,1	kyselina octová, propionová, máselná, valerová
<b>netěkavé kyseliny</b>	2,0 až 2,9	1,2 až 2,2	kyselina citrónová, malonová, chinová, kávová
<b>chlorogenové kyseliny</b>	6,7 až 9,4	7,1 až 12,0	
<b>lipidové sloučeniny</b>	15,0 až 18,0	8,0 až 12,0	kafestol, kahweol
<b>vosky</b>	0,2 až 0,3	0,2 až 0,3	
<b>oleje</b>	7,6 až 17,8	7,6 až 17,8	převážně estery kyseliny palmitové a linolové
<b>dusíkaté sloučeniny</b>	11,0 až 15,0	11,0 až 15,0	
<b>volné aminokyseliny</b>	0,2 až 0,8	0,1 až 0,8	kyselina glutamová a asparagová, asparagin
<b>bílkoviny</b>	8,5 až 12,0	8,4 až 12,0	
<b>kofein</b>	0,8 až 1,4	1,3 až 4,0	
<b>trigonelin</b>	0,6 až 1,2	0,3 až 0,9	
<b>minerální látky</b>	3,0 až 5,4	3,0 až 5,4	draslík, vápník, fosfor, železo, hořčík

Kávový olej obsahuje řadu tuků, mezi které patří převážně triglyceridy kyseliny linoleové a palmitové. Dále obsahují diterpeny kafestol a kahweol (Obr. 6), které mají za následek zvyšování hladiny cholesterolu v krvi. Jejich koncentrace ve výsledném nápoji závisí na způsobu přípravy. Je-li příprava založena na filtraci přes např. papírový filtr, tak je obsah těchto látek minimální<sup>[26]</sup>.



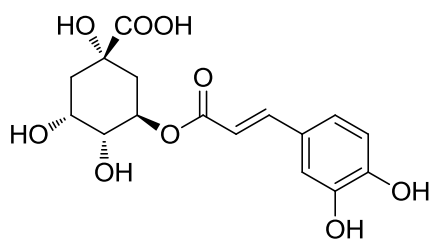
Obr. 6: Struktura kafestolu (vlevo) a kahweolu (vpravo)<sup>[26]</sup>

Cukry a aminokyseliny jsou důležitými prekurzory tzv. Maillardovy reakce, při které dochází ke změně barvy a tvorbě aroma. Během Maillardovy reakce v kávě dochází ke vzniku 5-hydroxymethylfurfuralu (Obr. 7), ale může docházet i ke vzniku akrylamidu, který má karcinogenní účinky. Maillardova reakce je zodpovědná i za vznik těkavých látek, které jsou zodpovědné za vůni<sup>[27]</sup>. Největším prekurzorem právě zmíněného akrylamidu je sacharóza, která je dominantním cukrem v zelených zrnech *arabiky*, kde je koncentrace 90 mg/g, zatímco v zelených zrnech *robusty* je koncentrace výrazně nižší a to 45 mg/g. Alanin je aminokyselina s nejvyšší koncentrací 1200 µg/g, následně asparagin 680 µg/g v *robustě*, zatímco v *arabice* je koncentrace alaninu 800 µg/g a asparaginu 360 µg/g. Z toho vyplývá, že nejvíce aminokyselin je obsaženo v *robustě* a nejvíce sacharidů v *arabice*<sup>[28]</sup>.



Obr. 7: Struktura 5-hydroxymethylfurfuralu<sup>[27]</sup>

Další látkou je kyselina chlorogenová (Obr. 8) a její laktony. Považuje se za silný antioxidant. Stejně jako kofein stimuluje vnímání a zvyšuje reaktivitu organismu. Kofein se v trávicím traktu vstřebává sliznicí a naváže se na kyselinu chlorogenovou za vzniku soli, a proto je kyselina chlorogenová považována za transportní prvek, který zodpovídá za rychlost průniku kofeinu do krevního oběhu<sup>[25]</sup>.

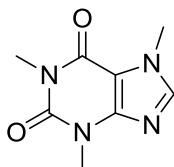


Obr. 8: Struktura kyseliny chlorogenové<sup>[25]</sup>

Následně budou v této práci zmíněny nejběžnější heterocyklické sloučeniny, které se vyskytují v kávě.

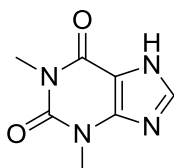
### 2.7.1 Purinové heterocykly (kofein, teofylin, teobromin)

Kofein (Obr. 9) je purinový alkaloid. Z hlediska organické chemie patří mezi dusíkaté látky, které mají obvykle zásaditý charakter. Patří mezi deriváty xantinu (1,3,7-trimethylxantin). Nachází se především v semenech, ale je obsažen i v listech, květech a větvičkách kávovníku. Čistá forma kofeinu je bílý prášek. Patří do skupiny „tolerovaných návykových látek“, mezi které patří i ethanol nebo nikotin. Denní dávka kofeinu, která se považuje za optimální pro dospělého člověka, je zhruba 400 mg<sup>[24]</sup>. Kofein a teofylin mají stimulační účinky na živý organismus. Stimulační mechanismus je založen na vazbě mezi kofeinem nebo teofylinem a příslušným receptorem. Navázání kofeinu nebo teofylinu zabrání navázání adenosinu na receptor, což je přírodní uspávací prostředek.



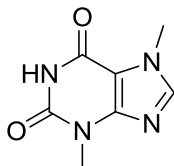
Obr. 9: Struktura kofeinu<sup>[24]</sup>

Teofylin (Obr. 10) je obsažen především v listech čajovníku. Využívá se ve farmacii v některých léčivých přípravcích jako diuretikum<sup>[24]</sup>.



Obr. 10: Struktura teofylinu<sup>[24]</sup>

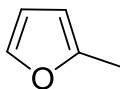
Teobromin (Obr. 11) nemá stimulační účinky, ale patří také mezi diuretika, tedy odvodňuje organismus. Teobromin a jeho účinky jsou důvodem, proč se v kavárnách ke kávě podává sklenice vody. Kromě zmíněných látek kávová zrna obsahují i řadu látek, které ovlivňují trávení<sup>[22]</sup>. Teobromin je především součástí kakaových bobů<sup>[24]</sup>.



Obr. 11: Struktura teobrominu<sup>[24]</sup>

### 2.7.2 Furany

Patří mezi organické heterocyklické sloučeniny, které se v přírodě vyskytují jako produkty Maillardovy reakce. V kávě vznikají převážně ze sacharózy během pražení (pyrolýzy)<sup>[29]</sup>. Právě furany jsou v kávě zodpovědné za příjemné aroma. Jako hlavní se považuje 2-methylfuran (Obr. 12)<sup>[30]</sup>.



Obr. 12: Struktura 2-methylfuranu<sup>[30]</sup>

### 2.7.3 Thiofeny

Organické heterocyklické sloučeniny, které mají ve svém cyklu atom síry (Obr. 13). V kávě byly nalezeny jako produkty pražení. Bylo jich nalezeno celkem 14<sup>[31]</sup>.



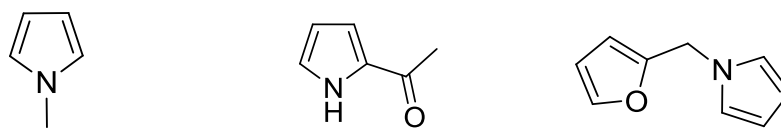
Obr. 13: Struktura thiofenu<sup>[31]</sup>

### 2.7.4 Pyrroly

Organické heterocyklické sloučeniny obsahující ve své struktuře atom dusíku. V potravinách vznikají tepelnou úpravou. V kávě hrají důležitou roli ve vůni. Konkrétně v kávě byly nalezeny 1-methylpyrrol a 2-acetylpyrrol (Obr. 14)<sup>[29]</sup>. Rozdíl mezi *arabica* a



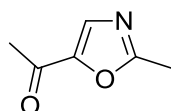
*robustou* je dán i výskytem jednotlivých pyrrolů, např. v *arabice* převládá obsah *N*-furfurylpyrrolů (Obr. 14)<sup>[32]</sup>.



Obr. 14: Struktura 1-methylpyrrolu (vlevo), 2-acetylpyrrolu (uprostřed)<sup>[30]</sup> a *N*-furfurylpyrrolu (vpravo)<sup>[32]</sup>

### 2.7.5 Oxazoly

Organické heterocyklické sloučeniny obsahující ve své struktuře atom kyslíku a dusíku. Jejich výskyt v kávě není tak četný, ale v kávovém aromatu můžeme nalézt např. 5-acetyl-2-methyloxazol (Obr. 15)<sup>[33]</sup>.



Obr. 15: Struktura 5-acetyl-2-methyloxazolu<sup>[33]</sup>

### 2.7.6 Thiazoly

Organické heterocyklické sloučeniny obsahující ve své struktuře atom dusíku a síry. Stejně jako ostatní skupiny heterocyklických sloučenin, tak i thiazoly mají svou roli v kávovém aromatu. První thiazoly, které byly v kávě charakterizovány, jsou 2-propionyl-4-methylthiazol a 2-acetyl-4-methylthiazol (Obr. 16)<sup>[34]</sup>. Postupem času bylo objeveno dalších 23 thiazolů<sup>[35]</sup>.

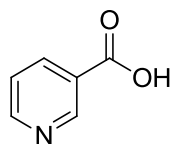


Obr. 16: Struktura 2-propionyl-4-methylthiazolu (vlevo) a 2-acetyl-4-methylthiazolu (vpravo)<sup>[34]</sup>

### 2.7.7 Pyridiny

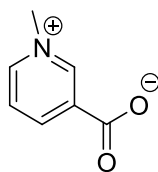
Organické heterocyklické sloučeniny obsahující ve své struktuře atom dusíku. Stejně jako furany vznikají z cukrů a aminokyselin Maillardovou reakcí během pražení kávy. V kávovém aromatu bylo nalezeno celkem 15 pyridinů<sup>[36]</sup>. Nejznámějšími pyridiny jsou niacin a trigonelin.

Nedostatek niacinu (Obr. 17) způsobuje průjemy, anémické stavy, ale i demenci. Nadbytek se projevuje zčervenáním a svěděním kůže. Jeho obsah je v pražených zrnech asi 25× vyšší než v zelených zrnech. Zatímco koncentrace kofeinu během pražení zůstává, tak obsah niacinu během pražení rapidně narůstá, a proto se řadí mezi další pyrolytické produkty kávy<sup>[24]</sup>.



Obr. 17: Struktura niacinu<sup>[24]</sup>

Další látkou obsaženou v kávě je trigonelin (betain kyseliny *N*-methyl-nikotinové) (Obr. 18). Vzniká při pražení zrn při teplotách 230 °C. Trigonelin je prekurzorem vitamínu B3. Používá se při migrénách a má antiseptické, hypoglykemické, hypocholesterolemické a antikarcinogenní účinky<sup>[24]</sup>.



Obr. 18: Struktura trigonelinu<sup>[24]</sup>

### 2.7.8 Pyraziny

Organické heterocyklické sloučeniny obsahující ve své struktuře dva atomy dusíku. Pyraziny objevené v kávovém aroma jsou samotný pyrazin, 2,5-dimethyl-1-pyrazin a 2,6-dimethylpyrazin (Obr. 19)<sup>[37]</sup>.



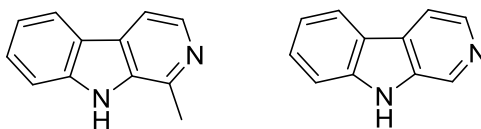
Obr. 19: Struktura 2,5-dimethyl-1-pyrazinu (vlevo) a 2,6-dimehylpyrazinu (vpravo)<sup>[37]</sup>

## 2.7.9 Heterocyklické aminy

Většina heterocyklických aromatických aminů patří mezi silné mutagenní sloučeniny. Lidé jsou jim pravidelně vystaveni prostřednictvím stravy a okolního prostředí<sup>[38]</sup>. HAA vznikají tepelnou úpravou (pyrolýzou) v potravinách bohatých na bílkoviny v koncentracích ng/g, ale jsou přítomny i v okolním prostředí např. ve vzduchu, v dešťové a říční vodě nebo v cigaretovém kouři. Doposud bylo izolováno více než 20 HAA z několika vzorků potravin včetně cigaretového kouře<sup>[39]</sup>.

Hlavní cesta metabolické aktivace většiny HAA začíná hydroxylací exocyklické aminoskupiny, při čemž tento krok je katalyzován převážně cytochromem P4501A2. Dále následuje acetylace nebo sulfatace za vzniku přímých reaktivních mutagenů, které mění DNA a genom<sup>[40]</sup>.

Mezi HAA, které se vyskytují v kávě, patří  $\beta$ -karboliny harman a norharman (Obr. 20)<sup>[41]</sup>. Obě tyto látky patří mezi fluorescenční sloučeniny<sup>[42]</sup> a jsou klasifikovány jako alkaloidy kvůli jejich přirozenému výskytu v rostlinné říši<sup>[43]</sup>, kde vznikají reakcí tryptofanu s pyruvátem nebo acetátem<sup>[44]</sup>. Harman i norharman byly také navíc detekovány u savců, kde je za endogenní prekurzor považován tryptamin<sup>[45]</sup>. Dále bylo zjištěno, že harman i norharman patří mezi účinné inhibitory monoaminoxidázy<sup>[46]</sup>.



Obr. 20: Struktura harmanu (vlevo) a norharmanu(vpravo)<sup>[41]</sup>

## 2.8 Vybrané analytické metody a jejich aplikace

V této kapitole budou zmíněny některé analytické metody, které byly doposud nejvíce využívány ke stanovení různých látek obsažených v kávě. V každé podkapitole budou uvedeny i příklady jejich využití včetně příkladů použití ke stanovení heterocyklických aromatických aminů (HAA).

### 2.8.1 Separační metody

Jednou z hlavních metod je plynová chromatografie, která byla použita k analýze odorantů přítomných v kávě. Semmelroch a Grosch stanovovali vysoce těkavé vonné látky metodou headspace v kávu typu *arabica* a *robusta*. Zjistili, že klíčovými vonnými látkami pro oba typy zmíněných káv byly 2,3-butandion, 2,3-pentandion, 3-methyl-2-butenthiol, methional, 2-furfurylthiol a 3-merkapt-3-methylbutylformiát<sup>[42]</sup>.

K analýze heterocyklických aromatických aminů byla použita metoda plynové chromatografie s detektorem elektronového záhytu. Po zpracování vzorku byly aminy derivatizovány *N*-methyl-*N*-(*tert.*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamidem. Deriváty byly charakterizovány pomocí hmotnostních spekter, kde se sledovala ztráta *tert.*-butyldimethylsilylové skupiny. Tento jednoduchý, rychlý a přesný postup je vhodný pro rutinní analýzu a využívá se pro analýzu některých běžných potravin<sup>[43]</sup>.

Dalším způsobem používaným při analýze HAA je kombinace metod SPE a HPLC s UV nebo fluorescenčním detektorem. SPE zahrnovala základní extrakci na křemelině (Extrelut) s následným přečištěním na gelu s propylsulfonovou kyselinou. Efektivita extrakce se pohybovala od 45 % do 90 %. Po přečištění následovalo stanovení metodou HPLC<sup>[44]</sup>.

Další metody používané pro identifikaci a analýzu HAA jsou HPLC/MS a RP-HPLC s fluorescenční detekcí. Byly testovány vzorky vařené a surové kávy. Bylo zjištěno, že koncentrace norharmanu v surových zrnech byla výrazně vyšší. Oba  $\beta$ -karboliny se začaly objevovat až při uvaření kávy. Studie došla k závěru, že pití uvařené kávy je hlavním zdrojem těchto bioaktivních  $\beta$ -karbalinových alkaloidů<sup>[45]</sup>.

Nejpoužívanější elektromigrační technikou používanou při analýze kávy je MEKC. Tato metoda byla např. použita při stanovení fenolických kyselin. Bylo rozpoznáno 5

hlavních fenolických kyselin v kávě, včetně kyseliny kávové a ferulové. Metoda byla testována jak na zelených zrnech, tak i na zrnech pražených<sup>[46]</sup>.

## 2.8.2 Optické metody

První metoda, která zde bude zmíněna, je infračervená spektrometrie, která byla využita k analýze kofeinu, teobrominu a teofylinu v pražených zrnech *arabiky* a *robusty*. Jako referenční metoda pro kalibraci systému NIRS byla použita metoda LC-UV. Bylo analyzováno 83 kávových extraktů, na kterých bylo vyhodnoceno, že metoda NIRS je velmi dobrá alternativa za LC-UV ve firmách produkujících kávu, neboť nabízí rychlou analýzu během několika sekund<sup>[47]</sup>.

Další hojně používanou metodou je Ramanova spektroskopie. El-Abassy aplikoval mikro Ramanovu spektrometrii s excitací ve viditelné oblasti na analýzu kyseliny chlorogenové u káv typu *arabica* a *robusta*. Jako nejvýznamnější rozmezí pro analýzu kyseliny chlorogenové v kávě se ukázal interval od 1000-1750  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[48]</sup>.

Jako jiný příklad využití Ramanovy spektroskopie je analýza kahweolu v kávových bobech. Pomocí FT Ramanovy spektroskopie s excitací 1064 nm bylo možné pozorovat charakteristické Ramanovy pásy v zelených zrnech. Měření bylo prováděno na několika typech kávy. Relativní zastoupení kahweolu v kávových zrnech bylo možno kvantitativně stanovit analýzou jednotlivých složek spektra, ze kterých se získal kahweolový index ( $\sigma_{ka}$ ), který byl úměrný relativnímu obsahu kahweolu v zrnech<sup>[49]</sup>.

Dalším příkladem optické metody je UV/VIS spektrofotometrie. Tato metoda byla použita pro získání molárního absorpčního koeficientu a přechodného dipólového momentu čistého kofeinu ve vodě a v dichlormethanu při 272 a 274,7 nm. Po této charakterizaci kofeinu ve vodě a v dichlormethanu byly dále vyvinuty rychlé a jednoduché metody, které umožňují kvantifikovat obsah kofeinu v kávových zrnech<sup>[50]</sup>.

Metodou pro současné stanovení harmanu a norharmanu se stala fluorimetrie. Stanovení harmanu a norharmanu se vyhodnocovalo pomocí sekundární derivace fluorimetrického spektra. Vzhledem k jejich podobné struktuře je obtížné je současně stanovit ve směsi pomocí konvenční fluorimetrie. Metoda byla použita pro současné stanovení obou sloučenin ve vzorcích kávy s uspokojivými výsledky<sup>[51]</sup>.

### 2.8.3 Elektroanalytické metody

Jako jedna z elektroanalytických metod, použitých při analýze kofeinu, byla SWASV. Pro sledování kofeinu byla použita jednoduchá grafitová elektroda. Byly zjištěny optimální experimentální podmínky pro analýzu kofeinu<sup>[52]</sup>.

Dalším příkladem, pro měření kofeinu v kávě, je modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku. V tomto případě byla kyselina 4-amino-3-hydroxynaftalensulfonová (AHNSA) elektropolymerizována na skleněné uhlíkové elektrodě. Vzniklý film vykazoval elektrokatalytickou aktivitu k oxidaci kofeinu. Modifikovaná elektroda měla vysokou citlivost, selektivitu a stabilitu při stanovení kofeinu v kávě. Analýza kofeinu nebyla ovlivněna matricovými složkami vzorku ani strukturně podobnými sloučeninami<sup>[53]</sup>.

Jiným příkladem je použití uhlíkové pastové elektrody modifikované 1,4-benzochinonem. Tato metoda je jednoduchá a vysoce citlivá pro stanovení kofeinu. Metoda je založena na potlačení proudu 1,4-benzochinonu po přidání kofeinu. Byla použita technika square-wave a cyklická voltametrie. Tato metoda byla úspěšně aplikována na stanovení kofeinu v kávě<sup>[54]</sup>.

Posledním příkladem v této podkapitole je stanovení derivátů kyseliny chlorogenové pomocí DPV. Tato studie potvrdila, že elektrochemické vlastnosti jsou silně závislé na jejich chemické struktuře. Měření DPV ukázalo, že elektrochemická oxidace některých derivátů byla reverzibilní. Bylo prokázáno, že DPV je velmi citlivou a selektivní metodou pro stanovení celkového obsahu kyseliny chlorogenové a jejích derivátů v kávě<sup>[55]</sup>.

# 3 Experimentální část

## 3.1 Přístrojová technika a chemikálie

Pro analýzu všech vzorků byl použit plynový chromatograf značky Agilent Technologies 7890A GC System a Agilent Technologies 5975C inert XL EI/CI MSD with Triple-Axis Detector (Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium 5.5 (rychlost průtoku 0,9 ml/min). Dále byla použita křemenná kapilární kolona HP-5MS (parametry 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA).

Dále byly použity následující techniky:

- analytické váhy AB204 (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)
- centrifuga 5702 (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- termostat blokový SBH130 + blok hliníkový SBH (Stuart, Staffordshire, UK)
- třepačka Reax Top (Heidolph, Schwabach, Německo)
- ultrazvuková lázeň 10LM (Kraintek Czech s.r.o, Hradec Králové, ČR)
- elektrický mlýnek na kávu SilverCrest SKME 150 C2 (Kompernass Handels GMBH, Bochum, Německo)
- běžné laboratorní sklo, plastové pomůcky a automatické pipety

Seznam chemikálií, které byly použity:

- dusík (99,99 %, Messer, Bad Soden, Německo)
- helium 5.5 (čistota 99,9995 %, SIAD, Bergamo, Itálie)
- harman (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- horharman (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- hexamethyldisilazan (HMDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- pyridin (PENTA, Chrudim, ČR)
- nikotin (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- chinin (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- 2-aminobifenyl (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- trichlorfenylhydrazin (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

- chinuklidinol (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- brucin (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- fenantrolin (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- 2,2-bipyridyl (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- hexan (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- dichlormethan (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- chloroform (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- tetrachlorethylen (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- diethylether (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- *tert*-butylmethylether (Acros Organics, Geel, Belgie)
- ethylacetát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- methylišobutylketon (Loba Feinchemie GMBH, Fischamend, Rakousko)
- aceton (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- acetonitril (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- toluen (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- hydroxid draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

### 3.2 Vzorky kávy

Všechny analyzované vzorky kávy byly zakoupeny v běžných obchodech a pražírnicích. V následující tabulce jsou všechny vzorky kávy blíže charakterizovány (Tab. IV).

Tab. IV: Testované vzorky

Číslo vzorku	Výrobce	Typ kávy
1	Henri Olomouc	mletá
2	Uganda Bwindi Coffee	zrnková
3	Manu cafe karamel	zrnková
4	Cafe Sati Peru	zrnková
5	Tchibo Barista Caffé Crema	zrnková
6	Tchibo Privat Kaffee African blue	mletá
7	Melangerie Colombia	zrnková



### **3.3 Příprava vzorků kávy**

V případě zrnkové kávy bylo potřeba ji nejprve umlít v kávovém mlýnku. Následně byla tato káva (4 g) navážena do extrakční patrony a extrahována do acetonu při teplotě 150 °C a tlaku 150 bar metodou PSE. Pracovalo se ve dvou cyklech po 10 minutách a výsledný kávový extrakt měl objem 20 ml. Takto připravený vzorek bylo nutno před samotnou analýzou dále přečistit.

### **3.4 Způsoby přečištění**

#### **3.4.1 Přečištění metodou SPE**

Prvním způsobem přečištění je extrakce na pevné fázi.

Nejprve byla provedena kondicionace SPE kolonky směsí acetonu (2 ml) a 1M HCl (0,4 ml) a následně byl nadávkován kávový extrakt (2 ml), který byl předem okyselený 1M HCl (0,4 ml). Nadávkovaný vzorek byl poté promýván stejnou směsí acetonu (2 ml) a 1M HCl (0,4 ml). Prošlý roztok byl jímán do čisté kádinky, kde byl alkalizován směsí 5M KOH (1 ml) ve vodě (4 ml). Následně byla provedena kondicionace druhé SPE kolonky směsí 5M KOH (1 ml) ve vodě (4 ml) a acetonu (2 ml). Po promytí následovalo nanesení výše uvedeného alkalizovaného vzorku a opětovné promytí směsí 5M KOH (1 ml), vody (4 ml) a acetonu (2 ml). Kolonka byla poté vysušena a vzorek byl eluován čistým acetonem (3 ml). Výsledný eluát byl odpařen a podroben derivatizaci.

#### **3.4.2 Přečištění L-L extrakcí**

Druhým způsobem přečištění je extrakce kapalina-kapalina s použitím vhodných rozpouštědel.

Nejprve bylo odebráno potřebné množství kávového extraktu (2 ml), ke kterému byla přidána voda (2 ml). Tato směs byla okyselena 1M HCl (0,4 ml). Dále následovalo odstranění přebytečných nepolárních matricových komponent extrakcí do DCM (2 ml). Po extrakci byla organická fáze odstraněna a vodná fáze byla alkalizována 5M KOH (1 ml) ve vodě (4 ml). Poté byla provedena opakovaná extrakce (alespoň 2×) požadovaných HAA (harman, norharman) opět do DCM (1 ml). Po protřepání na Vortexu a následné centrifugaci

byla organická fáze odebrána a odpařena v kovovém bloku s pomocí proudu dusíku. Získaný odparek byl posléze derivatizován.

### **3.5 Derivatizace**

Získaný odparek po předchozím přečištění byl derivatizován HMDS (0,2 ml) v pyridinu (0,2 ml) při 50 °C v kovovém bloku po dobu 30 minut. Po ochlazení byla směs doplněna hexanem (0,1 ml). Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí plynové chromatografie.

## 4 Výsledky a diskuze

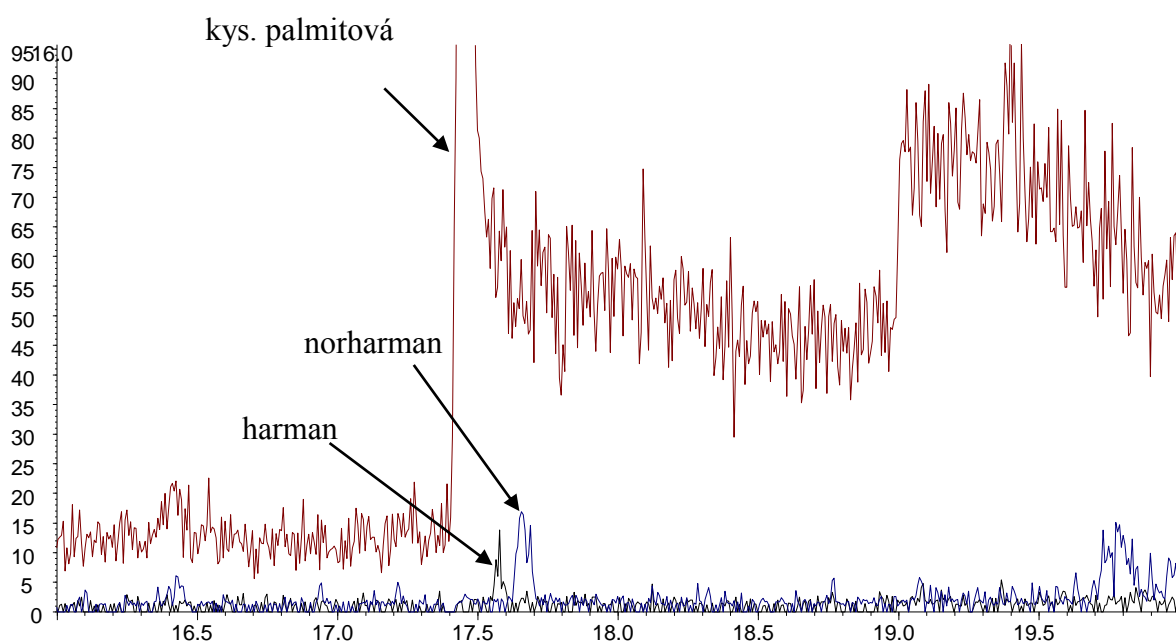
### 4.1 Příprava vzorku a jeho přečištění

Při přečištění se vycházelo z acidobazických vlastností HAA, neboť jsou to slabé báze ( $pK_a = 6,8$ )<sup>[56]</sup>, které jsou v kyselém prostředí protonizované. Z tohoto důvodu u SPE přecházely HAA po okyselení kávového extraktu do iontových forem, zatímco kyselé složky matrice zůstaly neutrální a byly spolu s nepolárními složkami matrice zachyceny na SPE kolonce (C18). Prošlý roztok, který obsahoval HAA, byl následně alkalizován, čímž došlo zpět k přechodu HAA z iontových forem do forem neutrálních a mohly být tedy poté zachyceny na další kolonce, zatímco polární komponenty matrice kolonkou prošly. Dále je důležité zmínit ředění vodou, čímž došlo ke snížení eluční síly.

Úvahou bylo využít tohoto chemického chování v jiném extrakčním systému, kde by mohlo být alternativou nepolární SPE kolonky rozpouštědlo, neboť přece jenom SPE extrakce patří k náročnějším postupům jak z hlediska ekonomického, tak i praktického. Dalším negativním parametrem SPE extrakce je její nižší robustnost oproti jiným prekoncentračním metodám. Z těchto zmíněných důvodů bylo vhodné použít nějakou méně náročnou a nákladnou metodu přečištění a jako vhodná se ukázala být základní extrakční technika kapalina-kapalina.

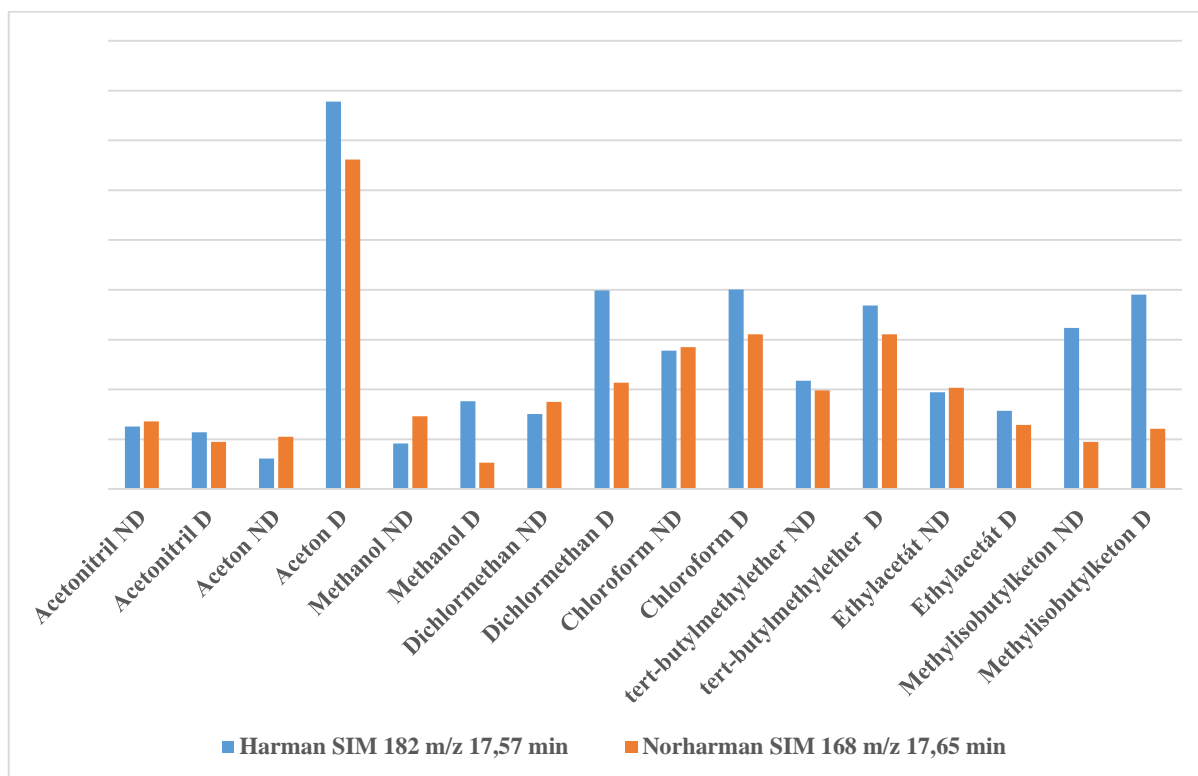
Nejprve bylo nutné tuto techniku vhodným způsobem optimalizovat. Při analýze čistého kávového extraktu byla zjištěna přítomnost značného množství kyseliny palmitové, které bylo nutno odstranit (Obr. 21). Kyselina palmitová za daných podmínek koeluuje s harmanem a norharmanem a její nadbytek nepříznivě ovlivňuje ionizaci v iontovém zdroji a citlivou detekci. Navržený extrakční postup dovoluje efektivní oddělení kyselých složek od bazických analytů. Pro úplné potlačení vlivu zbytku kyseliny palmitové, který nebyl oddělen extrakcí, byla navržena jednoduchá derivatizace dovolující převedení kyseliny palmitové na derivát s jiným retenčním časem.

Obr. 21: Chromatogram surového kávového extraktu



Prvním úkolem bylo zjistit, jaké rozpouštědlo je nejvhodnější pro extrakci surových zrn kávy s nejvyšší účinností. Kávová zrna byla extrahována metodou PSE při teplotě 150 °C a tlaku 150 bar. Při tomto experimentu byla použita následující rozpouštědla – acetonitril, aceton, methanol, dichlormethan, chloroform, *tert*-butylmethylether, ethylacetát a methylisobutylketon. Součástí experimentu bylo zároveň vyzkoušet nederivatizované i derivatizované vzorky. Na základě výsledků z analýzy (Graf 1) se jako rozpouštědlo s největší extrakční účinností kávových zrn prokázal aceton s následnou derivatizací, neboť dávala lepší výsledky.

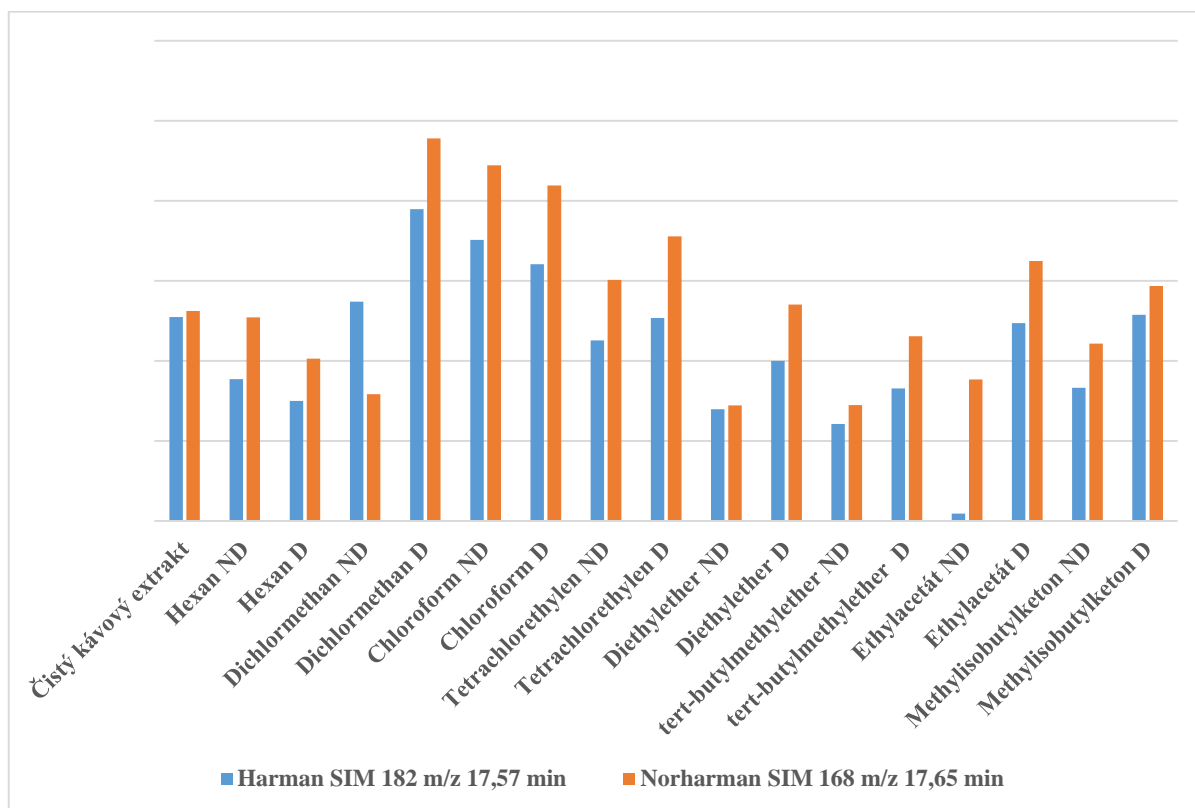
Graf 1: Extrakce kávových zrn ve vybraných rozpouštědlech (ND = nederivatizovaný, D = derivatizovaný)



Vzhledem k tomu, že se v navazujícím přečištění extraktů využívá dvoustupňové extrakce, tak bylo třeba věnovat se každému extrakčnímu kroku zvlášť.

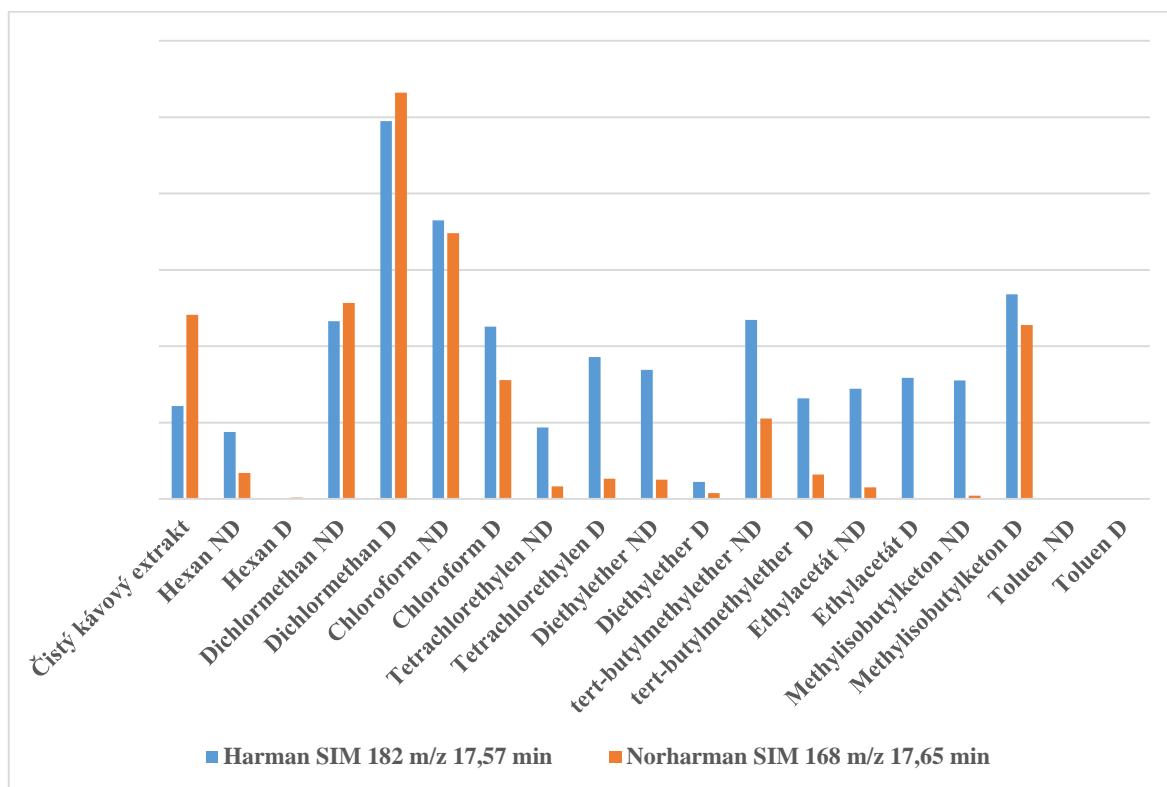
Pro optimalizaci prvního extrakčního kroku byl použit kávový extrakt (2 ml) se standardním roztokem harmanu (0,04 ml) a norharmanu (0,04 ml) s použitím následujících rozpouštědel - hexan, dichlormethan, chloroform, tetrachlorethylen, diethylether, *tert*-butylmethylether, ethylacetát a methylisobutylketon (MIBK). Při druhém extrakčním kroku byl v tomto případě použit vždy methylisobutylketon. Výsledky této analýzy ukázaly, že nejvhodnějším rozpouštědlem pro první extrakční krok, ve kterém jsou odstraněny balastní matricové komponenty neutrální a kyselé povahy (včetně nadbytečné kyseliny palmitové) a zároveň jsou ztráty analytů (harmanu a norharmanu) minimální, je DCM s použitím následné derivatizace vzorku (Graf 2).

Graf 2: Rozpouštědla použitá v prvním extrakčním kroku (ND = nederivatizovaný, D = derivatizovaný)



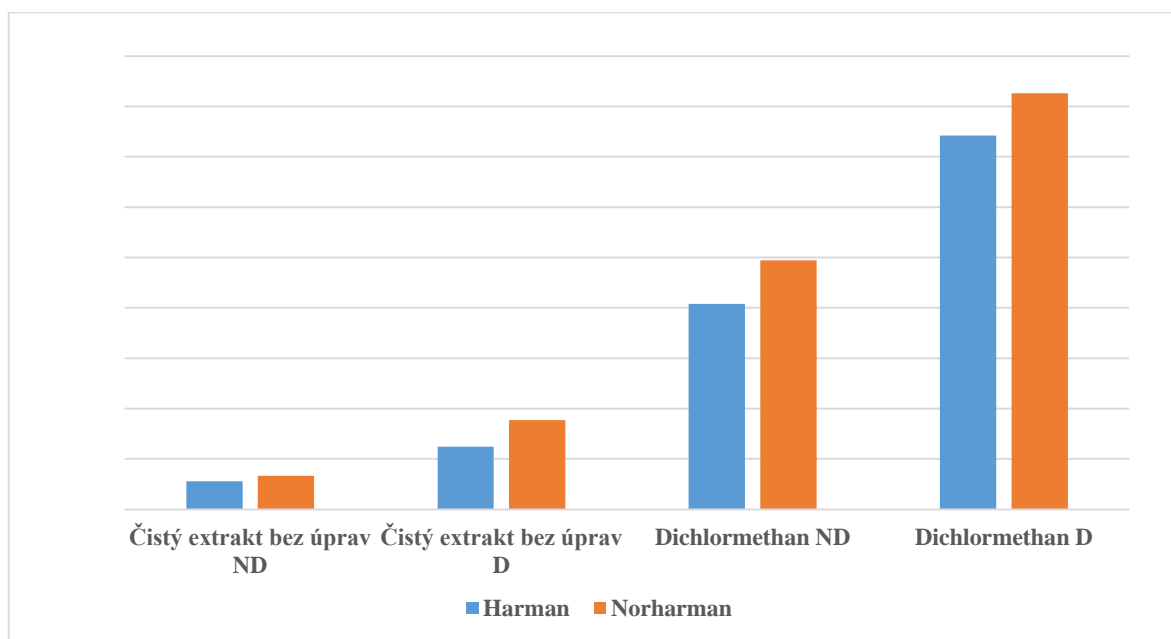
Dále bylo žádoucí sledovat vliv vybraných rozpouštědel na druhou fázi extrakce. Pro její optimalizaci byla použita následující rozpouštědla – hexan, dichlormethan, chloroform, tetrachlorethylen, diethylether, *tert*-butylmethyleher, ethylacetát, methylisobutylketon a toluen. V tomto případě opět vyšlo jako nejúčinnější rozpouštědlo DCM a znovu se potvrdilo, že derivatizace vzorku je nutným krokem k potlačení vlivu kyseliny palmitové (Graf 3). V druhém kroku extrakce bylo zároveň zjištěno, že je žádoucí provést opakovanou extrakci (alespoň 2×) kvůli větší účinnosti extrakce analytů do organické fáze. Při využití dvou extrakčních kroků je tak dosaženo celkové výtěžnosti (návrtnosti) extrakce přes 90 %.

Graf 3: Rozpouštědla použitá v druhém extrakčním kroku (ND = nederivatizovaný, D = derivatizovaný)

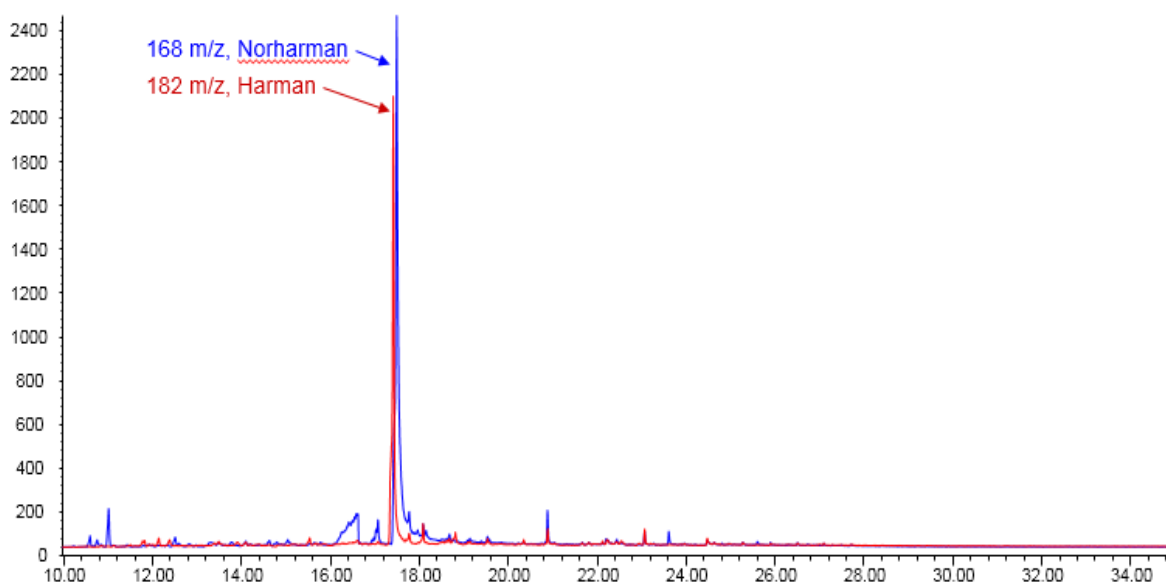


Pro kontrolu a zároveň potvrzení celého postupu přečištění byla dvoustupňová extrakce zopakována s již vybraným rozpouštědlem – DCM (Graf 4, Obr. 22). Výsledky dokládají, že pro potlačení nežádoucího vlivu kyseliny palmitové a dalších matricových komponent je nutné provádět jak extrakční odstranění nadbytku kyseliny palmitové, tak konečné dočištění s využitím derivatizace reziduí kyseliny palmitové. Žádný z dílčích čistících kroků není sám o sobě dostačující pro účinné potlačení vlivu matrice. Je na místě zdůraznit, že derivatizace v tomto případě nevede k chemické přeměně cílových analytů, ale má význam pro chemickou přeměnu hlavní koelující nečistoty (kyseliny palmitové) a potlačení jejího vlivu v důsledku změny retenčního chování.

Graf 4: Kontrola celého postupu přečištění (ND = nederivatizovaný, D = derivatizovaný)



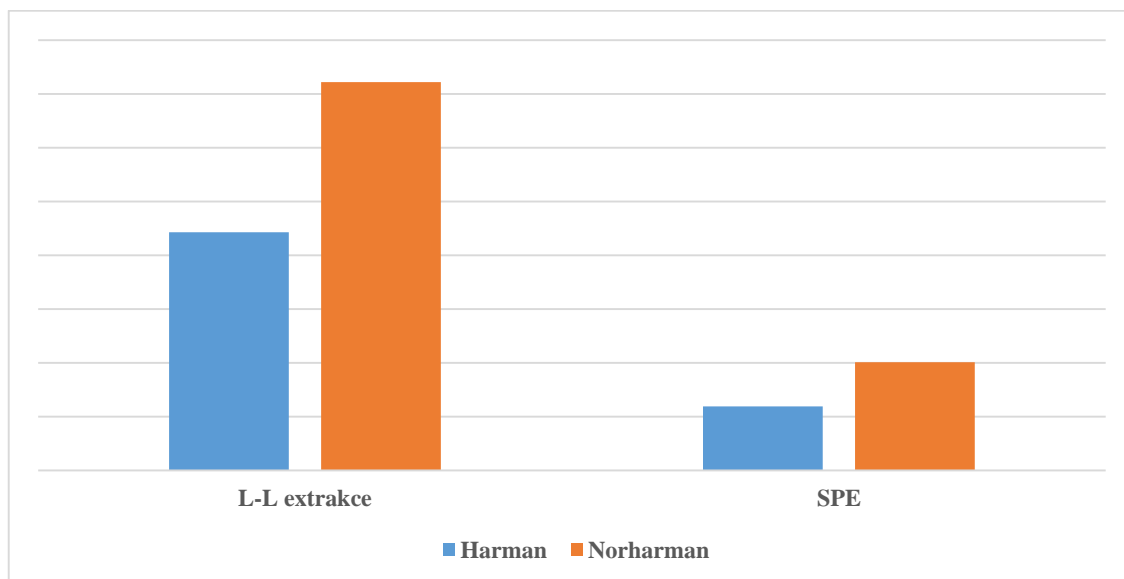
Obr. 22: Chromatogram po přečištění





Při zopakování experimentu a porovnání metody L-L extrakce s metodou SPE bylo závěrem zjištěno, že účinnost L-L extrakce byla v tomto případě výrazně vyšší (Graf 5).

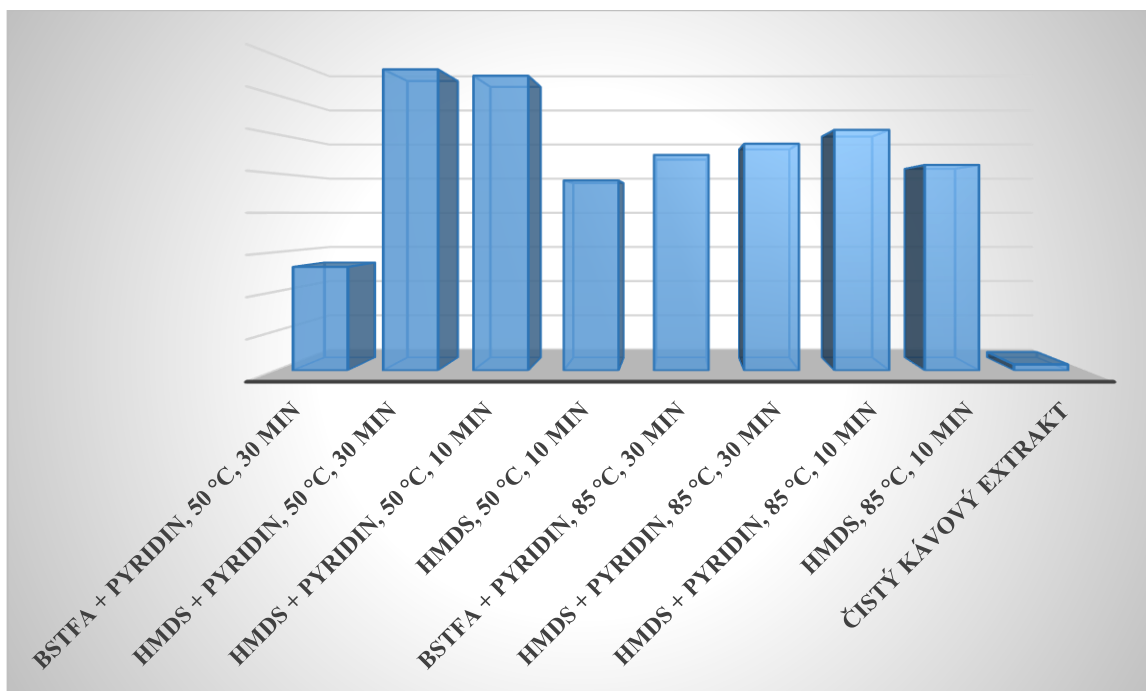
Graf 5: Porovnání účinnosti L-L extrakce s metodou SPE



## 4.2 Derivatizace

Po optimalizaci jednotlivých extrakčních kroků byla věnována pozornost nejvhodnějším podmínkám derivatizace. Na testování různých derivatizačních podmínek byl použit kávový extrakt (1 ml) se standardním roztokem harmanu (0,04 ml) a norharmanu (0,04 ml). Z takto připravené směsi bylo nadávkováno do devíti vialek 0,1 ml vzorku. Jeden vzorek byl ponechán bez úpravy a zbývajících osm vzorků bylo odpařeno v kovovém bloku. Poté byla provedena derivatizace s různými činidly (HMDS a BSTFA) a za různých podmínek (teplota, čas). Objem jednotlivých činidel a pyridinu byl vždy 0,2 ml. Po reakci byly derivatizované vzorky i původní neupravený vzorek doplněny hexanem na objem 0,5 ml. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie. Po analýze bylo zjištěno, že nejvhodnějším derivatizačním postupem je použití HMDS v pyridinu při 50 °C po dobu 30 minut (Graf 6).

Graf 6: Derivatizační podmínky



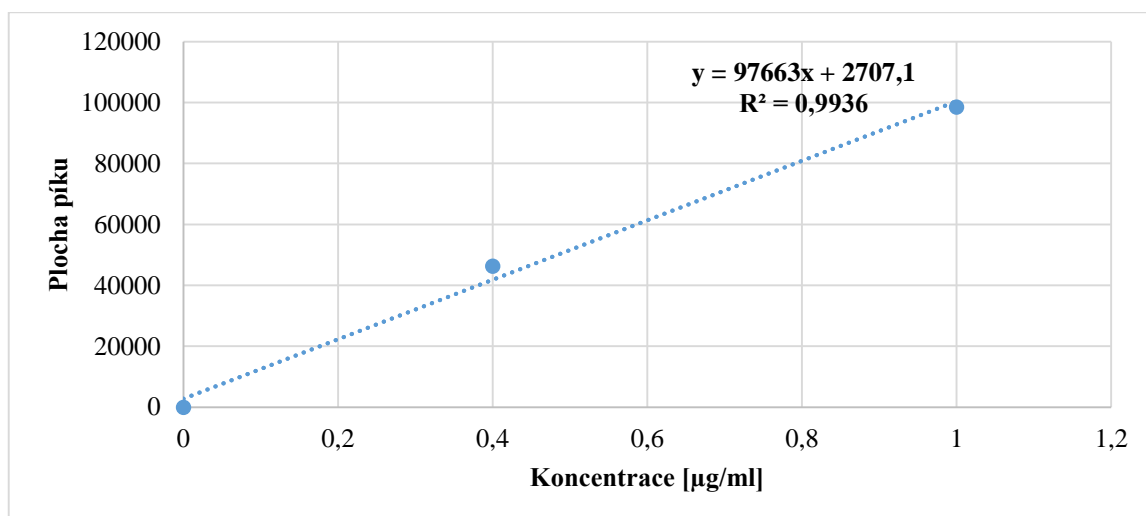
V porovnání s čistým kávovým extraktem nám tento graf zároveň opět potvrzuje, že přečištění a následná derivatizace jsou nezbytnými kroky k dosažení lepších výsledků.

### 4.3 Stanovení koncentrace HAA v kávových extraktech

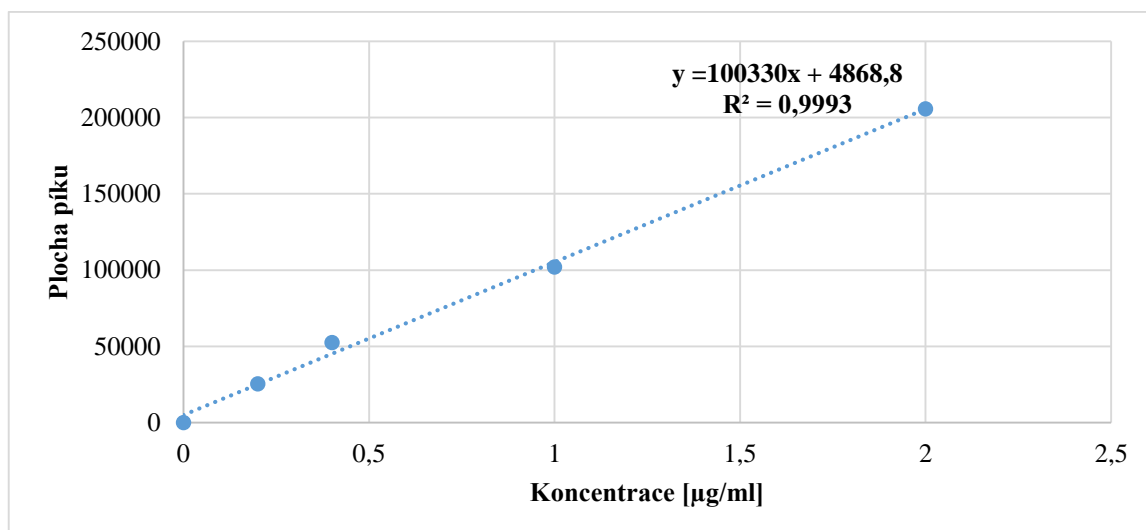
Pro stanovení koncentrace HAA v kávových extraktech byly pro srovnání použity tři následující kvantifikační metody – metoda kalibrační přímky, metoda standardního přídatku a metoda vnitřního standardu.

Při stanovení obsahu HAA v extraktech metodou kalibrační přímky se vycházelo z regresních rovnic, které byly vygenerovány z kalibračních přímek standardů harmanu (Graf 7) a norharmanu (Graf 8).

Graf 7: Kalibrační přímka harmanu



Graf 8: Kalibrační přímka norharmanu



Při stanovení metodou standardního přidavku byl pokaždé jako přídavek do všech vzorků přidán 1 µl standardů harmanu i norharmanu. Tato metoda dávala výsledky téměř shodné s výsledky z metody kalibrační přímky (Tab. V).

Jako poslední metoda byla použita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standardy byly testovány následující látky – nikotin, chinin, 2-aminobifenyl, trichlorfenylhydrazin, chinuklidinol, brucin, fenantrolin a 2,2-bipyridyl. Vnitřní standard byl přidán do surového acetonového extraktu bezprostředně po akcelorované extrakci (PSE). Jako vhodný vnitřní standard pro konečnou kvantifikaci byl zvolen chinin, jelikož vykazoval podobné analytické chování jako analyty.

Výsledky z jednotlivých měření jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. V):

<b>Koncentrace harmanu [<math>\mu\text{g/g}</math> kávy]</b>			
<b>Číslo vzorku</b>	<i>Metoda kalibrační přímky</i>	<i>Metoda standardního přídavku</i>	<i>Metoda vnitřního standardu</i>
<b>1</b>	4,397	4,242	4,384
<b>2</b>	3,731	3,75	3,416
<b>3</b>	2,186	2,131	2,132
<b>4</b>	5,049	5,157	4,938
<b>5</b>	4,669	4,804	4,839
<b>6</b>	3,061	2,972	3,071
<b>7</b>	2,588	2,575	2,160
<b>Koncentrace norharmanu [<math>\mu\text{g/g}</math> kávy]</b>			
<b>Číslo vzorku</b>	<i>Metoda kalibrační přímky</i>	<i>Metoda standardního přídavku</i>	<i>Metoda vnitřního standardu</i>
<b>1</b>	7,953	7,924	8,138
<b>2</b>	8,862	8,731	8,256
<b>3</b>	4,997	5,004	4,937
<b>4</b>	8,283	8,687	7,891
<b>5</b>	9,873	9,851	9,299
<b>6</b>	7,540	7,459	7,675
<b>7</b>	5,614	5,503	4,766

#### **4.4 Stanovení koncentrace HAA v připravených nápojích**

Kromě stanovení koncentrace HAA v kávových extraktech bylo dále žádoucí provést stanovení koncentrace HAA přímo v připravených nápojích a tento obsah porovnat s obsahem HAA přítomným v surovém extraktu.

Ze všech vzorků byly připraveny nápoje (4 g kávy zalité 20 ml horké vody), které se dále zpracovaly stejným postupem jako kávové extrakty. Jako kvantifikační metoda byla

v tomto případě použita již osvědčená metoda kalibrační přímky, která dávala velmi dobré výsledky při stanovení obsahu HAA v extraktech.

Výsledky z jednotlivých měření nápojů jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. VI):

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Koncentrace harmanu [μg/ml nápoje]</b>	<b>Množství harmanu extrahovaného z kávy do nápoje [%]</b>
<b>1</b>	0,055	6,249
<b>2</b>	0,041	5,560
<b>3</b>	0,026	5,989
<b>4</b>	0,057	5,679
<b>5</b>	0,061	6,565
<b>6</b>	0,032	5,147
<b>7</b>	0,027	5,255
<b>Číslo vzorku</b>	<b>Koncentrace norharmanu [μg/ml nápoje]</b>	<b>Množství norharmanu extrahovaného z kávy do nápoje [%]</b>
<b>1</b>	0,099	6,212
<b>2</b>	0,102	5,727
<b>3</b>	0,058	5,756
<b>4</b>	0,077	4,674
<b>5</b>	0,104	5,243
<b>6</b>	0,087	5,782
<b>7</b>	0,070	6,261

## 5 Závěr

Tato práce je založena na stanovení heterocyklických aromatických aminů (HAA) v kávě metodou plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Bylo analyzováno 7 vzorků, které jsou dostupné v běžných obchodech a pražírkách. V běžné praxi se HAA stanovují převážně metodou HPLC a předložená práce poukazuje na možnost jejich stanovení i metodou plynové chromatografie po vhodném postupu přečištění kávové matrice.

Po optimalizaci všech extrakčních kroků následovalo stanovení HAA v kávových extraktech jednotlivých vzorků. HAA, které se v kávě vyskytují, jsou harman a norharman. Oba zmíněné aminy byly ve vzorcích kávy přítomny v koncentraci v řádu jednotek  $\mu\text{g/g}$ . Koncentrace norharmanu byla vždy zhruba 2× vyšší než harmanu.

Po analýze extraktů bylo dále žádoucí stanovit koncentraci HAA přímo v připravených nápojích a následně srovnat jejich obsah s obsahem v kávovém extraktu. V tomto případě se obsah HAA v připravených nápojích pohyboval v desetinách až setinách  $\mu\text{g/ml}$ . Koncentrace norharmanu byla i v tomto případě zhruba 2× vyšší než harmanu. Dále lze na základě výsledků konstatovat, že koncentrace HAA v připravených nápojích je mnohonásobně nižší než v kávových extraktech. Vzhledem k tomu, že nápoje jsou připravovány z vody, tak možným důvodem těchto nízkých koncentrací může být nízká rozpustnost HAA ve vodě.

Závěrem této práce lze konstatovat, že byla navržena vhodná metoda pro extrakci harmanu a norharmanu ze vzorků kávy. Byl navržen postup pro efektivní přečištění extraktů s využitím disociační rovnováhy analytů (pKa, změna pH a změna eluční síly). Návržnost extrakčního postupu byla ověřena opakovanými extrakcemi a celková výtěžnost extrakce se pohybovala okolo 90 %. Dále zde byla využita derivatizace, působením běžných analytických činidel, jako nástroj pro účinné potlačení vlivu matricových komponent a nakonec byl nalezen i vhodný vnitřní standard pro kvantifikaci.

## 6 Literatura

1. J. Normanová, Káva: Známé i neobvyklé kávy a dezerty jimi ochucené, Champagne Avantgarde, Bratislava 1992.
2. A.W. Smith, R.J. Clarke, R. Macrae, Coffee, Volume 1: Chemistry, Elsevier, London 1985.
3. C.P. Bicchi, M.P. Ombretta, G. Pellegrino, A.C. Vanni, Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction-gas chromatography and principal component analysis, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4680–4686.
4. R. Briandet, E.K. Kemsley, R.H. Wilson, Discrimination of arabica and robusta in instant coffee by fourier transform infrared spectroscopy and chemometries, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 170–174.
5. M.J. Martin, F. Pablos, A.G. González, Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees, *Anal. Chim. Acta* 320 (1996) 191–197.
6. M.J. Martin, F. Pablos, A.G. González, Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content, *Food Chem.* 66 (1998) 365–370.
7. M.J. Martin, F. Pablos, A.G. González, Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition, *Talanta* 46 (1998) 1259–1264.
8. M. Suchánek, H. Filipova, K. Volka et al., Qualitative analysis of green coffee by infrared spektrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 327–332.
9. S.I. Mussatto, E.M. Machado, S. Martins, J.A. Teixeira, Production, composition, and application of coffee and its industrial residues, *Food Bioproc. Tech.* 4 (2011) 661.
10. L.C. Trugo, Analysis of coffee products. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, Amsterdam 2003, 1498–1506.
11. A. Farah, T. de Paulis, D.P. Moreira et al., Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 374–381.
12. A. Farah, T. de Paulis, D.P. Moreira et al., Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee, *Food Chem.* 98 (2006) 373–380.

13. C.L. Ky, J. Louarn, S. Dussert et al., Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions, *Food Chem.* 75 (2001) 223–230.
14. N. Hirakawa, R. Okauchi, Y. Miura et al., Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 653–658.
15. S. Casal, M.B. Oliveira, M.A. Ferreira, Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 21 (1998) 3187–3195.
16. V. Petriková, J. Patočka, Káva očima toxikologa, *Vojenské zdravotnické listy*, 2006 3-4.
17. C. Neves, A história do café, Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café (1974) 52.
18. A.D.E. Taunay, Historia do café no Brasil. Volume terceiro: no Brasil imperial (Tomo I) (1939) 1822-1872.
19. H.D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Coffee, tea, cocoa, *Food Chem.* (2009) 938-970.
20. H. Etienne, Protocol for somatic embryogenesis in woody plants (2005) 167-179.
21. Comité Français du Café, Café a la découverte du café, Adequation Publicite, Paris 1997.
22. M. Pössl, Káva jako životní styl, Grada, Praha 2010.
23. P. Veselá, Kniha o kávě: průvodce světem kávy s recepty na její přípravu, Smart Press, Praha 2010.
24. J. Augustín, U kávy o kávě a kávovinách, Jota, Brno 2016.
25. J. Augustín, Povídání o kávě: kávovníkové zrna (*Coffea arabica*), káva a kávoviny jako významné potravinářské pochutiny, Fontána, Olomouc 2003.
26. I. Krejčí, O kávě a čaji, aneb, víme proč je pijeme?, Grada Publishing, Praha, 2000.
27. H.D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Coffee, Tea, Cocoa, Vatican Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2009.
28. M. Murkovic, K. Derler, Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee, *J. Biochem. Bioph. Methods*, 69 (2006) 25-32.
29. M.A. Gianturco, A. S. Giammarino, P. Friedel, V. Flanagan, The volatile constituents of coffee. IV. Furanic and pyrrolic compopunds, *Tetrahedron* 20 (1964) 2951-61.



30. C. Merritt Jr, M.L. Bazinet, J.H. Sullivan, D.H. Robertson, Coffee aroma, mass spectrometric determination of volatile components from ground coffee, *J. Agric. Food. Chem.*, 11 (1963) 152-155.
31. O.G. Vitzthum, P. Werkhoff, Steam volatile aroma constituents of roasted coffee: neutral fraction, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 160 (1976) 277-291.
32. R. Tressl, K.G. Grunewald, H. Kamperschroer, R. Silwar, Formation of pyrroles and aroma contributing sulfur components in malt and roasted coffee, *Prog Food Nutr Sci* (1981).
33. J. Stoffelsma, J. Pypker, Some new constituents of roasted coffee, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 87 (1968) 241-242.
34. M. Stoll, M. Winter, F. Gautschi, I. Flament, B. Willhalm, Recherches sur les arômes 13e communication [1] Sur l'arôme de café. I, *Helv. Chim. Acta*, 50 (1976) 628-694.
35. O.G. Vitzthum, P. Werkhoff, Oxazoles and thiazoles in coffee aroma, *J. Food Sci.*, 39 (1974) 1210-1215.
36. F. Ledl, T. Severin, Thermische zersetzung von cystein und xylose in tributyrin, *Chem Mikrobiol Technol Lebensm*, 2 (1973) 155-160.
37. T. Reichstein, Beitrag zur qualitativen organisch-chemischen Analyse I. 3,5-Dinitrobenzoylchlorid als Reagens auf Alkohole etc., *Helv. Chim. Acta*, 9 (1926) 799-803.
38. J.H. Weisburger, Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future, *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, 480 (2001) 23-35.
39. H. Kataoka, Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their applications in environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, 774 (1997) 121-142.
40. H. Ohgaki, S. Takayama, T. Sugimura, Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 259 (1991) 399-410.
41. T. Herraiz, Identification and occurrence of the bioactive  $\alpha$ -carboline norharman and harman in coffee brews, *Food Addit. Contam.* 19 (2002) 748-754.
42. P. Semmelroch, W. Grosch, Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples, *LWT-Food Sci Technol*, 28 (1995) 310-313.
43. S. Casal, Analysis of heterocyclic aromatic amines in foods by gas chromatography-mass spectrometry as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Chromatogr. A* (2004) 105-114.
44. G. A. Gross, A. Grüter, Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *J. Chromatogr. A* (1992) 271-278.

45. T. Herraiz, Identification and occurrence of the bioactive  $\beta$ -carbolines norharman and harman in coffee brews, *Food Addit Contam* (2002) 748-754.
46. É.M. Risso, R.G. Péres, J. Amaya-Farfan, Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography, *Food Chem.*, 105 (2007) 1578-1582.
47. C.W. Huck, W. Guggenbichler, G.K. Bonn, Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 538 (2005) 195-203.
48. R.M. El-Abassy, P. Donfack, A. Materny, Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis, *Food Chem.*, 126 (2011) 1443-1448.
49. A. Keidel, D. von Stetten, C. Rodrigues, C. Máguas, P. Hildebrandt, Discrimination of green Arabica and Robusta coffee beans by Raman spectroscopy, *J. Agric. Food. Chem.*, 58 (2010) 11187-11192.
50. A. Belay, K. Ture, M. Redi, A. Asfaw, Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer, *Food Chem.*, 108 (2008) 310-315.
51. S. M. Wabaidur, Second derivative synchronous fluorimetric method for simultaneous determination of harman and norharman in coffee samples, *Spectrochim. Acta A* 110 (2013) 179-184.
52. S.Y. Ly, Y.S. Jung, M.H. Kim, I. kwon Han, W.W. Jung, H.S. Kim, Determination of caffeine using a simple graphite pencil electrode with square-wave anodic stripping voltammetry, *Mikrochim. Acta*, 146 (2004) 207-213.
53. M. Amare, S. Admassie, Polymer modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of caffeine in coffee, *Talanta*, 93 (2012) 122-128.
54. M. Aklilu, M. Tessema, M. Redi-Abshiro, Indirect voltammetric determination of caffeine content in coffee using 1, 4-benzoquinone modified carbon paste electrode, *Talanta*, 76 (2008) 742-746.
55. I. Tomac, M. Šeruga, Electrochemical properties of chlorogenic acids and determination of their content in coffee using differential pulse voltammetry, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 11 (2016) 2854-2876.
56. M.S. Alaejos, A.M. Afonso, Factors, That Affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10 (2011) 52–108.