UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

ANALÝZA SLOŽEK ESPRESSA PŘIPRAVENÉHO Z RŮZNĚ PRAŽENÝCH KÁVOVÝCH ZRN ODRŮDY *COFFEA ARABICA L.*

RIGORÓZNÍ PRÁCE

2015 Mgr. Lukáš Kučera

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

ANALÝZA SLOŽEK ESPRESSA PŘIPRAVENÉHO Z RŮZNĚ PRAŽENÝCH KÁVOVÝCH ZRN ODRŮDY *COFFEA ARABICA L.*

Rigorózní práce

Studijní program: Analytická chemie

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Autor: Mgr. Lukáš Kučera

Olomouc 2015

Místopřísežně prohlašuji, že jsem rigorózní práci na téma: „Analýza složek espressa připraveného z různě pražených kávových zrn odrůdy *Coffea arabica* L.“ vypracoval samostatně pod odborným dohledem vedoucího rigorózní práce a uvedl jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Olomouci dne. ..... Podpis .....

Na tomto místě bych rád poděkoval mému vedoucímu doc. RNDr. Petrovi Bednářovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracování mé rigorózní práce. Dále bych rád poděkoval pánům ing. Ivovi Ptáčníkovi, Mgr. Romanovi Papouškovi a Ondřejovi Válkovi za pomoc při přípravě vzorků kávy.

Souhrn

V současné době je káva velmi intenzivně studována z důvodu jejího pozitivního vlivu na lidský organismus. Mnoho studií poukazuje na antioxidační aktivitu kávy díky přítomnosti chlorogenové kyseliny a produktům Maillardovy reakce, které vznikají v průběhu pražícího procesu. Káva také obsahuje deriváty xanthinu – kofein, theobromin a theophylin, díky nimž má tento nápoj stimulační efekt. Cílem této práce je srovnání chemického složení kávy typu espresso připravené ze čtyř různých pražících stádií kávových zrn (lehce, středně, tmavě pražené a přepražené) pomocí kombinace ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem (UPLC/MS^2; hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem a hybridním analyzátorem typu kvadrupól – detektor doby letu) ve spojení s pokročilým zpracováním dat. Šest nalezených látek (signálů v MS spektru) bylo na základě porovnání obsahů v jednotlivých vzorcích a PCA analýzy navrženo na specifické markery jednotlivých stádií pražení. Markery s hodnotou m/z rodičovských iontů 773,3184 a 660,3337 nám umožňují jednoznačně odlišit espresso připravené z lehce a středně pražených zrn od zbylých dvou stádií pražení. Tmavě praženou a přepraženou kávu můžeme zcela odlišit od lehce a středně pražené kávy na základě přítomnosti markerů m/z = 319,1897, 388,1887, 552,2884 a 651,3359. Látky s hodnotami m/z 773,3184; 660,3337 a 319,1897 odpovídají derivátům aktraktylosidů. Ve fragmentačních spektrech látek s hodnotou m/z rodičovských iontů 388,1887, 552,2884, 651,3559 byly pozorovány procesy odpovídající odštěpování aminokyselin. Tyto látky jsou zřejmě produkty tepelného rozkladu proteinů obsažených v kávových zrnech a/nebo produktů Maillardovy reakce – melanoidinů.

Všechny vzorky espressa byly zároveň evaluovány pomocí organoleptické analýzy skupinou 15 lidí (laických posuzovatelů), která hodnotila kyselost, vůni, tělo, příchuť a celkových dojem vzorků kávy.

Summary

Recently, coffee has been very intensively studied mainly for its positive effects on the human body. Many studies show a high antioxidant activity of coffee, which is attributed to chlorogenic acid and products of Maillard reactions that arise during roasting process. Coffee has also a stimulative effect caused by the presence of xanthine derivatives such as caffeine, thebromine and theophylline. The aim of this study is a comparison of chemical composition of espresso coffee samples prepared using coffee beans roasted to different extent (at four different roasting stages - light, medium, dark and over-roasted) by means of ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometer (UPLC/MS^2; a mass spectrometer equipped with electrospray and quadrupole – time of flight hybrid analyser) in combination with advanced data processing. Six specific compounds were, based on comparison of their content in particular samples and principal component analysis, suggested to be characteristic markers of every single roasting stage. Among markers, compounds providing signals at m/z = 773.3184 a 660.3337 allow complete differentiation of light and medium roasted samples from others. Dark and over-roasted coffee samples can be distinguished on the basis of the presence of markers at m/z = 319.1897; 388.1887; 552.2884 and 651.3359 from light and medium roasted coffee beans. Markers m/z 773.3184, 660.3337 belong to group of atractyloside derivatives. In fragmentation spectra of parent mass m/z 388.1887, 552.2884 and 651.3559 the neutral losses of amino acids were found. Those signals were ascribed to products of thermal conversion of coffee proteins and/or melanoidinds. All samples of espresso coffee were also analyzed by organoleptic analysis. Group of 15 people (non-professional evaluation committee) evaluated acidity, aroma, body, flavour and total impression.

Obsah

1 Úvod 7
2 Teoretická část 8
2.1 Káva 8
2.1.1 Historie kávovníku a kávy, morfologické zařazení 8
2.1.2 Pražící proces 11
2.1.3 Způsoby přípravy kávy 11
2.2 Látky obsažené v pražených kávových zrnech Coffea arabica L. 12
2.2.1 Těkavé látky v kávě 12
2.2.2 Látky skupiny kyseliny chlorogenové a laktony kyseliny chlorogenové 14
2.2.3 Purinové alkaloidy 16
2.2.4 Deriváty atraktylosidů 17
3 Praktická část 19
3.1 Chemikálie 19
3.2 Přístroje a vybavení 19
3.2.1 Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr 19
3.2.2 Ostatní laboratorní vybavení 19
3.3 Příprava mobilní fáze a optimalizace retence 20
3.4 Příprava vzorků 20
3.4.1 Pražení kávových zrn 20
3.4.2 Příprava vzorků kávy pro LC/MS analýzu 21
3.4.3 Příprava vzorků pro organoleptickou analýzu 21
3.5 Statistické vyhodnocení dat 22
4 Výsledky a diskuze 23
4.1 UHPLC-MS analýza espressa 23
4.2 Organoleptická analýza kávy 42
5 Závěr 43
Literatura 45
Seznam použitých zkratek 48
Příloha 1 49
Příloha 2 50

1 Úvod

V minulosti byla káva požívána především kvůli jejím stimulačním efektům na lidský organismus, které jsou dány přítomností derivátů methylxanthinu – kofein, theobromin a theofylin. Další parametry jako je chuť a aroma kávy byly v dávné historii méně podstatné. S rozvojem obchodu a nových technologií je ovšem situace jiná a aroma a chuť hrají důležitou roli při prodeji této komodity [1-2]. V současnosti je káva jeden z nejpopulárnějších nápojů na světě a pro více než 25 miliónů farmářů v 50 státech je tato komodita nedílnou součástí jejich obživy [1, 3]. Složení kávy je dlouhodobě věnována velká pozornost. Řada studií se například zabývá hydroxyskořicovými kyselinami a jejich estery s kyselinu chinovou [4]. Tyto látky jsou hlavními antioxidanty v kávě mající pozitivní vliv na lidské tělo a mohou dokonce chránit organismus před Alzheimerovou nemocí [5] a vznikem rakoviny díky blokování DNA methyltransferázy [6].

V průběhu pražícího procesu dochází k termálním rozkladům řady látek přítomných v zelených kávových zrnech a vzniku látek nových. Významná část těchto látek vzniká tzv. Maillardovou reakcí, což je reakce aminokyseliny s karbonylovou skupinou cukru [7]. Tyto změny se výrazně odrážejí na chuťovém profilu připravené kávy, a proto se na trhu můžeme setkat s kávovými zrny v různých stádiích pražení. Obecně můžeme říci, že méně pražená kávová zrna si ponechávají více ovocnou a kyselou chuť a se vzrůstajícím čase pražení se tato chuť začne měnit na hořkou, vlivem narůstající koncentrace produktů pyrolýzy. Názory na nejvhodnější stupeň pyrolýzy se v řadách konzumentů výrazně liší. Důležitá je tedy organoleptická analýza provedená dostatečným počtem hodnotitelů. Při tomto posuzování se využívá všech smyslů [8]:

- zrak – kvalita pěny, barva a konzistence
- hmat – hodnocení těla kávy (pocit v ústech) a vlastnosti spojené s hustotou a viskozitou
- chuť – kyselost a hořkost
- čich – hodnocení těkavých aromatických látek

Hlavním cílem této práce je analýza látek v espressu připraveného z různě pražených kávových zrn *Coffea arabica L.* pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí kombinovaná se statistickým vyhodnocením analýzou hlavních komponent a nalezení vhodných chemických markerů charakterizujících jednotlivá pražicí stadia.

2 Teoretická část

2.1 Káva

2.1.1 Historie kávovníku a kávy, morfologické zařazení

První zmínky o kávovníku pocházejí několik století před naším letopočtem z Etiopie. O objevení kávovníků hovoří legenda o pasáčku ovcí, který pozoroval, jak jedna ovce z jeho stáda snědla několik podivných červených plodů (kávovníkové třešně). Sám pasáček po vzoru ovce poté tyto červené plody ochutnal a pozoroval na sobě povzbuzující účinky. Později se plody dostaly i do místního kláštera, kde z nich mniši vařili odvary. Na možnost pražit kávová zrna se přišlo náhodou, když došlo k požáru v blízkosti kávovníku a několik plodů lehce ohořelo. Vůně ohořelých plodů byla pro obyvatele příjemná, a proto začali později úmyslně dávat kávové boby do blízkosti ohně. Postupně se kávovníky dostaly do Arábie (kolem 15. století), kde si je místní obyvatelstvo přísně střežilo. Povoleno bylo vyvážet pouze očištěná kávová zrna, aby nebylo možné tuto rostlinu vysadit v jiných oblastech. Teprve koncem 16. století se první kávovníky dostaly do Evropy, ze které byly postupem času rozváženy do kolonií evropských států – Holandska (Srí Lanka, Java, Sumatra), Francie (Střední a Jižní Amerika) a Anglie (Indie) [9].

Kávovníky (*Coffea*) patří mezi dvouděložné rostliny z čeledi mořenovitých. Kávovníky jsou keře a nízké stromy s různobarevnými plody – červené, žluté, oranžové, modré nebo černé. Kávovníky můžeme botanicky dále rozdělit na více než 100 různých druhů, z nichž ovšem pouze tři mají zemědělský význam [11]:

- kávovník arabský (*Coffea arabica*)
- kávovník statný (*Coffea canephora* syn. *Coffea robusta*)
- kávovník liberijský (*Coffea liberica*)

Kávovník arabský

Kávovníky druhu arabika patří mezi nejvíce pěstované kávovníky a tvoří zhruba 75% světové produkce kávy. Obvykle se pěstují ve vyšších nadmořských výškách (600-2000 metrů nad mořem), kde je výrazně proměnlivé podnebí a teplota kolísá mezi 15-24 °C. Tento kávovník je náročnější na pěstování a první úroda se získá až po šesti letech. Chuťově se kávy typu arabika vyznačují výrazně kyselou chutí, která se odvíjí od způsobu pěstování, sklízení a pražení. Základní odrůdou je Arabika

Typica, ze které byly vyšlechtěny další odrůdy – Arabika Bourbon, Arabika Caturraje, Arabika Mundo Nuovoje, Arabika Maragogype, Arabika Pacamara a Arabika Geisba [11-13].

Kávovník statný

Kávovník statný, občas nazývaný kávovník robusta, není tak náročný na pěstování jako výše uvedený kávovník arabský. Ideální podmínky jsou 200-600 metrů nad mořem se stabilnějším klimatem (24-29 °C). První sklizeň u tohoto druhu kávovníku můžeme očekávat již po 2-3 letech. Káva připravená z čisté robusty je výrazně hořká a proto se nehodí k samotné konzumaci a je obvykle smíchávána s kávovými zrny kávovníku arabského v určitých poměrech. Do instantní kávy se přidává pro vytvoření husté pěny tzv. crema a také pro zvýšení obsahu kofeinu, který má oproti arabice dvojnásobný [11-13].

Kávovník liberijský

Kávovník liberijský se v porovnání s předchozími odrůdami pěstuje v zanedbatelném množství (Malajsie, západní Afrika) z důvodů výrazné nahořklé chuti. Jedná se až o 18 metrů vysokou dřeviny s velkými kulatými plody. V malém množství se používá podobně jako robusta pouze do směsí s arabikou [11-13].

Rozdíl mezi jednotlivými druhy je poznat již při srovnání zrn (Obr. 1) [13]. Kávové zrnko arabiky je ploché a protáhlé většinou se zakřivenou rýhou uprostřed. Zrnko kávy robusta je vypouklého a zaobleného tvaru s podélnou rýhou uprostřed. Kávová zrna posledního druhu kávovníku liberijského jsou výrazně větší se špičatým koncem a podélnou rýhou uprostřed.

Obr. 1: Srovnání morfologie kávových zrn kávovníku arabského, statného a liberijského

Kromě rozdílů v morfologii se jednotlivé druhy liší v chemickém složení. V Tab. 1 je uvedeno chemické složení zelených kávových zrn kávovníku arabského a kávovníku statného. Cukerné složky jsou převážně tvořeny celulózou a polysacharidy obsahující manózu, galaktózu a arabinózu. Řada

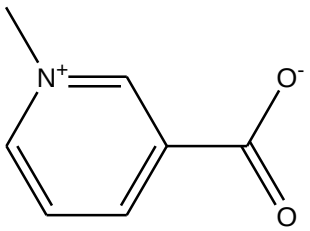
mono- a disacharidů se v kávových zrnech vyskytuje i ve volné formě. Z lipidů stojí za zmínku kyselina linoleová a palmitová, které jsou zde ve vysokých koncentracích. Kyseliny mravenčí, octová, mléčná, vinná a pyrohroznová jsou převládající alifatické kyseliny v zelené kávě [14].

Podobně jako u jiných rostlin jsou v kávě významně zastoupeny i minerální látky, zejména sulfáty a fosfáty kovů alkalických zemin, převážně vápnaté a hořečnaté. Zajímavou látkou je trigonelin (N-methylnikotinová kyselina, Obr.2). Tato látka se v průběhu pražení rozkládá. Na základě sledování poměru koncentrace trigonelinu a kofeinu, který je teplotně stálý, můžeme určit stupeň pražení kávových zrn [14]. Podrobnější popis chemického složení pražených kávových zrn je uveden v kapitole 2.2.

Tab. 1: Chemické složení zelených kávových zrn Kávovníku arabského a Kávovníku statného (g/100g) [14]

Látka	Kávovník arabský	Kávovník statný
Polysacharidy	46,9	54,4
Sacharóza	8,0	4,0
Redukující cukry	0,1	0,4
Ostatní cukry	1,0	2,0
Lipidy	16,2	10,0
Proteiny	9,8	9,5
Aminokyseliny	0,5	0,8
Alifatické kyseliny	1,1	1,2
Chinové kyseliny	0,4	0,4
Chlorogenové kyseliny	6,5	10,0
Kofein	1,2	2,2
Trigonellin	1,0	0,7
Minerální látky	4,2	4,4
Těkavé látky	stopy	stopy
Voda	8-12	8-12

Obr.2: Struktura trigonelinu



Trigonelin

2.1.2 Pražící proces

Usušená zelená kávová zrna jsou nevhodná pro přípravu nápoje, z důvodu jejich tvrdosti, nevýraznému aroma a chuti a proto jsou zrna upravována pražením. Kávová zrna v průběhu pražení mění svou barvu ze zelené na hnědou, což je způsobenou tvorbou hnědých pigmentů, tzv. melanoidů (melanoidinů).

Pražící proces je možné rozdělit na dvě fáze. V první fázi (endotermní fáze) jsou zelená zrna pomalu sušena, dokud nedosáhnou žluté barvy a vůně nezačne připomínat vůni popcornu. V následující fázi, též nazývané „first crack“, dochází při teplotě cca 205°C ke zvětšení objemu kávových zrnu v důsledku uvolňování plynů (vodní pára, CO, CO_2) a barva se mění na světle hnědou. Následně se teplota zvýší na 220°C, při níž dojde ke změně barvy kávových zrn ze světle hnědé na středně hnědou, s úbytkem na hmotnosti o cca 13%. V této fázi již dochází k výrazné pyrolýze látek obsažených v zrnech za současného uvolňování většího množství oxidu uhličitého. Při pražení kávových zrn do vyšších stádií – středně a tmavě (medium a dark roast) dochází k opakování celého pražícího cyklu a tato fáze se nazývá „second crack“. Tato fáze probíhá nejčastěji při teplotě 225-230°C a je doprovázena výrazným uvolňováním olejů. Délka jednotlivých fází je proměnlivá v závislosti na v závislosti na druhu kávových zrna a vkusu pražiče [12, 15-19].

2.1.3 Způsoby přípravy kávy

V každé zemi můžeme nalézt odlišnosti ve způsobu přípravy kávy a v některých je tento proces dokonce úzce spjat s náboženstvím. Příkladem může být Etiopský kávový obřad. V našich zeměpisných šířkách se můžeme setkat se sedmi základními typy přípravy kávy. Prvním z nich je příprava tzv. Turecké kávy. Jedná se o spaření mleté kávy horkou vodou a po celou dobu konzumace je kávová sedlina v kontaktu s vodou, do které se mohou dále extrahovat další látky ovlivňující chuťový projev nápoje. Doba vhodná pro extrakci látek s pozitivními vlastnostmi na lidský organismus byla stanovena na cca 3,5 minuty. Tato délka extrakce se využívá při přípravě filtrované kávy označované jako drip a při přípravě pomocí kafetieru (french-press). Při přípravě filtrované kávy je rozhodujícím faktorem hrubost namletí kávových zrn. Oproti tomu u french-pressu je káva louhována po dobu 3,5 minut a po uplynutí této doby je káva stlačena ke dnu a roztok kávy oddělen. U dalších metod přípravy kávy je již zahrnut i další parametr – tlak. Nejnižší potřebný tlak na přípravu kávy je zapotřebí u aeropressu - přístroje který byl vynalezen v roce 2005. Princip metody spočívá v přetlačování vody pomocí vzduchového pístu přes kávu na filtračním papíru. S vyšším tlakem

pracují metody – Moka press a vacuum pot. Princip obou metod je založen na zahřívání vody k bodu varu a vytvoření přetlaku, díky kterému dojde k vytlačení vody přes kávu do horní (odběrné) nádoby. S nejvyšším tlakem pracuje kávovary, kde je voda přetlačována přes kávu tlakem 15 barů. Poslední pomůcka pro přípravu kávy – džezva, která z hlediska procesu přípravy leží mezi českou tureckou kávou a french-pressem. V prvním kroku je v nádobě karamelizován cukr a poté přidána voda a ta přivedena k bodu varu. Následně je přidána mletá káva. Takto připravený roztok je třikrát přiveden k varu a při každém odstavení je odstraněna vytvořená pěna. Trojnásobným spařením kávy dojde k jejímu klesnutí na dno nádoby a káva je poté dekantována do šálků ke konzumaci [20].

2.2 Látky obsažené v pražených kávových zrnech Coffea arabica L.

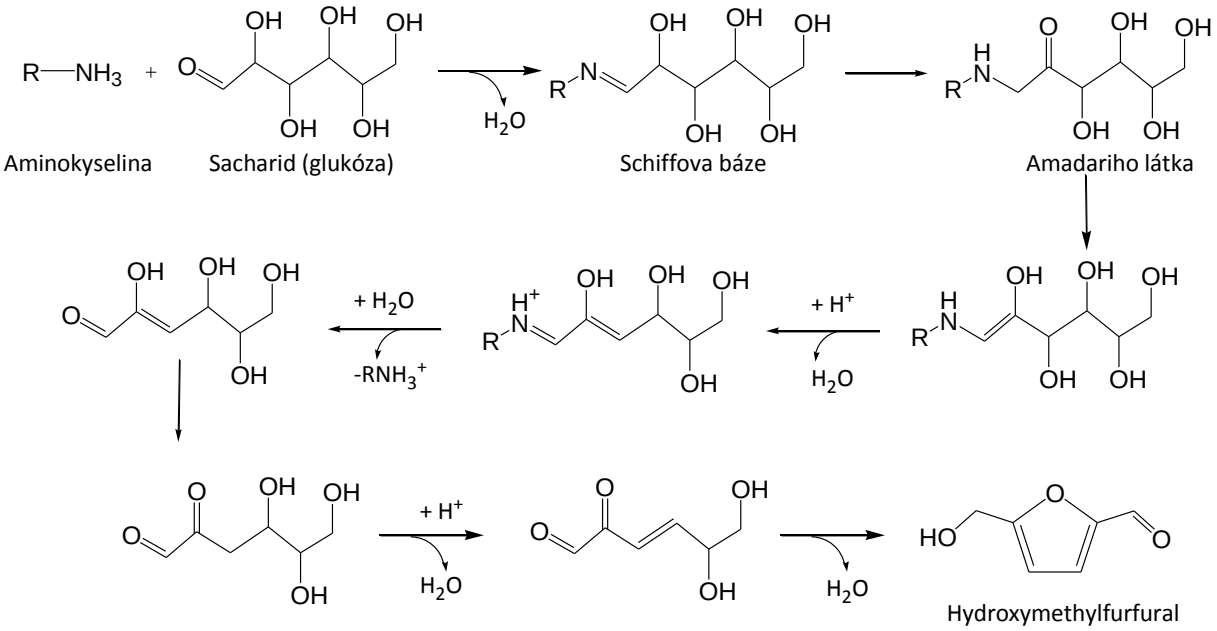
2.2.1 Těkavé látky v kávě

V roce 1970 Russwurm popsal význam sacharidů, proteinů, peptidů, volný aminokyselin, polyaminů, lipidů, fenolických kyselin, trigonellinu a různých těkavých látek přítomných v zelených zrnech pro chuť a vůni kávy. Například kyseliny chlorogenové a kofein jsou odpovědné za hořkost, sacharóza za barvu, vůni [21].

Důležitou skupinou látek jsou produkty Maillardovy reakce. Při tomto procesu reagují volné aminokyseliny s redukujícími cukry (např. glukóza, fruktóza) za vzniku Schiffových bází. Následně dochází ke konverzi na aminoketony a aminoaldehydy pomocí Amadori-Heynesova přesmyku. Vzniklé aminoketony a aminoaldehydy mohou dále reagovat různými cestami za tvorby široké škály látek [22]. Pro přiblížení tohoto složitého sledu reakcí je na Obr. 3 ukázán vznik hydroxymethylfurfuralu Maillardovou reakcí v průběhu pražení.

V literatuře se rovněž uvádí, že Maillardova reakce je hlavním procesem tvorby těkavých látek v pražené kávě [23]. Doposud bylo v pražené kávě identifikováno více než 800 těkavých látek, z nichž zhruba 40 je zodpovědná za charakteristickou vůni kávy [9]. Některé z těchto látek jsou uvedeny v Tab. 2. [24]

Obr. 3: Schéma vzniku hydroxymethylfurfuralu Maillardovou reakcí v kyselém prostředí



Tab. 2: Těkavé látky v pražené kávě

Sladká, karamelová vůně	**Sirovodíková vůně**
Methylpropanal	2-Furfurylthiol
2-Methylbutanal	2-Methyl-3-furanthiol
3-Methylbutanal	Methional
2,3-Butandion	3-Merkapto-3-methylbutyl-formiát
2,3-Pentandion	3-Methyl-2-butene-1-thiol
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HD3F)	Methanethiol
5-Ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2H)-furanon (EHM3F)	Dimethyltrisulfid
Vanilín	

Zemitá vůně	**Kouřová vůně**
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	Guajakol
2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin	4-Ethylguajakol
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	4-Vinylguajakol
2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin	
3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin	

Ovocná vůně	**Kořeněná vůně**
Acetaldehyd	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-3(5H)-furanone(HD2F)
Propanal	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon(EHM2F)
(E)-β-Damascenon	

2.2.2 Látky skupiny kyseliny chlorogenové a laktony kyseliny chlorogenové

Chlorogenové kyseliny (CGA) jsou hlavními aromatickými kyselinami obsaženými v kávě. Jedná se o estery (depsidy) kyseliny chinové s trans-skořicovými kyselinami (kyselina kávová, ferulová a p-kumarová). Nejběžnější látkou skupiny chlorogenových kyselin je 3-O-kaffeoyl-chinová kyselina (3-CQA). Díky tomu, že tyto látky se v přírodě vyskytují ve třech polohových izomerech (3-O estery, 4-O-estery a 5-O-estery), můžeme v zelených a pražených kávových bobech nalézt více než 30 strukturně různých esterů skořicových kyselin. Celkové množství CGA kyselin v kávových bobech se pohybuje v rozmezí 6-12% [21, 26].

Tyto látky můžeme rozdělit na 3 velké skupiny:

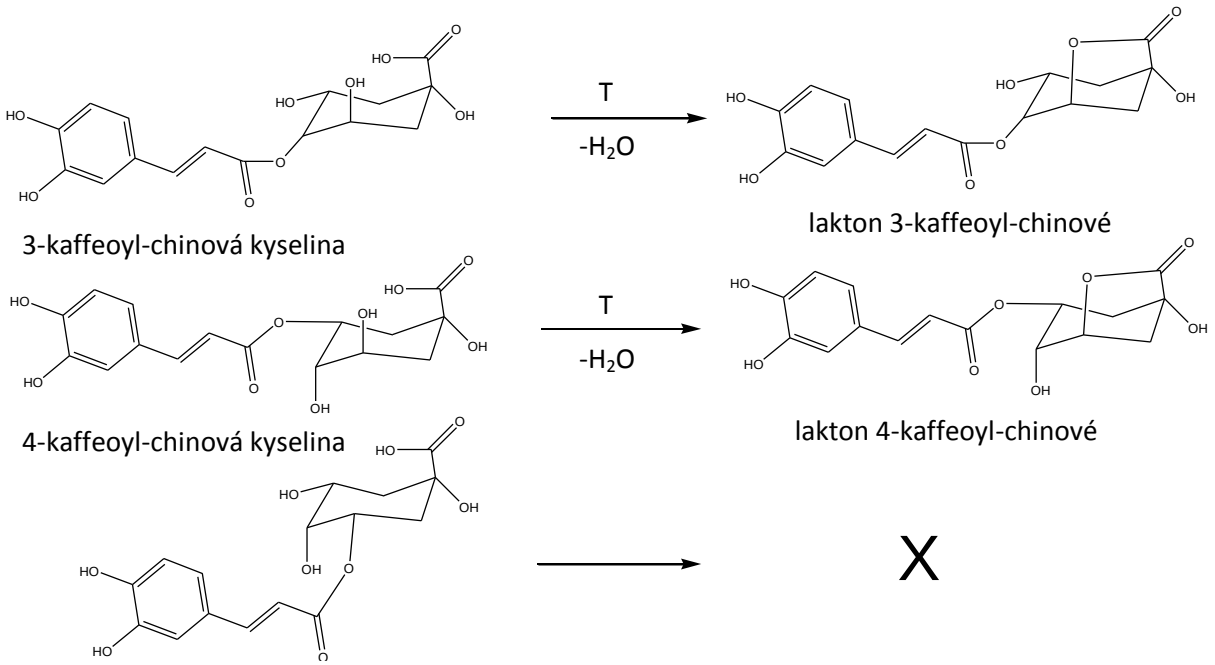
- mono estery kyseliny kávové, ferulové a p-kumarové:
    - kafeoyl-chinové kyseliny (CQA)
    - feruloyl-chinové kyseliny (FQA)
    - p-kumaroyl-chinové kyseliny (pCoQA)
- di estery stejných trans-skořicových kyselin
    - dikafeoyl-chinové kyseliny (diCQA)
    - diferuloyl-chinové kyseliny (diFQA)
    - di-p-kumaroyl-chinové kyseliny (di-pCoQA)
- di estery různých trans-skořicových kyseliny
    - kafeoyl-feruloyl-chinové kyseliny (CFQA)
    - p-kumaroyl-kafeoyl-chiové kyseliny (pCoCQA)

U většiny těchto látek byl potvrzen pozitivní vliv na lidský organismus díky jejich antioxidační aktivitě [27-28], schopnosti zvýšit využitelnost glukózy játry a tím snížit riziko vzniku cukrovky [29-31], inhibici HIV-1 integrázy, díky čemuž dochází ke zpomalení či dokonce zastavení integrace geneticky upravené DNA do DNA hostitelské buňky [32-34], antispazmodickému (protikřečovému) účinku [35] a inhibici mutagenních a karcinogenních látek [36].

V průběhu pražení dochází k rozkladu chlorogenových kyselin (30-70%) za vzniku odpovídajících 3-O- a 4-O-laktonů. V případě, že v pozici 5 je navázán derivát hydroxyskořicové kyseliny (5-O-ester), nemůže ze sterických důvodů dojít ke vzniku laktonů, jak je ukázáno na Obr. 4. Hlavní laktony, které můžeme nalézt v pražených kávových zrnech, jsou:

- lakton 3-kafeoyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 4-kafeoyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 3-feruoyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 4-feruoyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 3-p-kumaroyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 4-p-kumaroyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 3,4-dikafeoyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 3,4-diferuoyl-1,5-chinové kyseliny
- lakton 3,4-di-p-kumaroyl-1,5-chinové kyseliny

Obr. 4: Tvorba laktonů z chlorogenových kyselin



Nedávno bylo zjištěno, že laktony chlorogenových kyselin mohou mít vliv na funkčnost mozku. V roce 2002 publikovali De Paulis a kol. svá pozorování inhibičního efektu laktonu 3,4-dikaffeoyl-chinové kyseliny na adenosinový transportér a tím snižování stimulačního efektu kofeinu v kávě [37]. Dále byla u laktonů CGA zjištěna vazebná afinita na μ-opiové receptory (MOR-1) [38-40]. Hlavním senzorickým projevem těchto látek je typická hořká chuť, které se promítá do konečné chutě kávových nápojů. Nejvýrazněji se senzorický vliv těchto látek projevuje u lehce a středně pražené kávy [41].

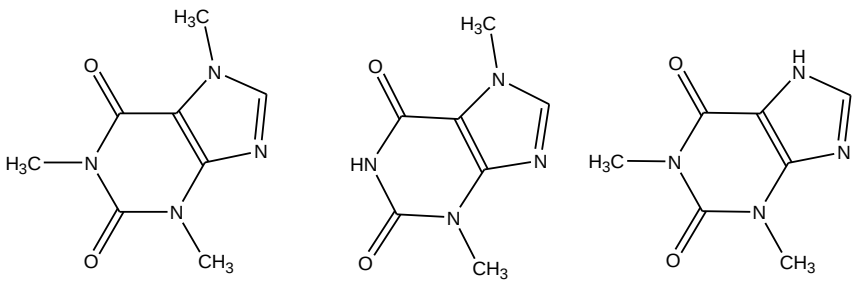
2.2.3 Purinové alkaloidy

Purinové alkaloidy jsou látky odvozené od xanthinu, oxidačního produktu purinu, a jedná se o nejrozšířenější alkaloidy v potravinách. Nejvíce zastoupeným methylderivátem xanthinu v kávových zrnech je kofein, též známý jako 1, 3, 5-trimethylxanthin. V menší míře můžeme nalézt další dva methylderiváty xanthinu - theobromin a theofylin (Obr. 5). Dalšími methylderiváty xanthinujsou paraxanthin, monomethylxanthin a heteroxanthin. Jejich obsah je však oproti výše zmíněným xanthinům pouze stopový. Většina těchto látek se nachází v semenech, listech a plodech více než 60 druhů rostlin, kde mají pravděpodobně ochrannou funkci před škůdci [42].

Methylderiváty xanthinu jsou látky velmi odolné vůči teplotnímu rozkladu a proto se při pražení kávy kávy sleduje poměr mezi obsahem kofeinu a alkaloidu trigonelinu, který se rozkládá na kyselinu nikotinovou a těkavé pyridiny. Tento poměr je možno také použít pro odhad stupně pražení kávy.

Biologické účinky tří majoritníc methylxantinů obsažených v pražené kávě jsou dobře prostudovány. Kofein, jak bylo zmíněno dříve, působí jako stimulant nervového systému a jako látka močopudná už při nízkých dávkách (<3 $mg.kg^{-1}$ tělesné váhy) [42]. Při středně vysokých dávkách (50 $mg.kg^{-1}$ tělesné váhy) můžeme pozorovat neuroendokrinní účinky [43] a při extrémně vysokých dávkách (100 $mg.kg^{-1}$ tělesné váhy) působí údajně teratogenně [44]. Theobromin a theofylin jsou výrazně slabší stimulanty než kofein a při vyšších dávkách mohou působit abnormality spermatogenních buněk. Theofylin se v některých případech využívá k léčbě respiračních problémů, jako je například chronické zánětlivé onemocnění průdušek (bronchiální astma) [42].

Obr. 5: Struktury kofeinu, theobrominu a theofylinu



kofein theobromin theofylin

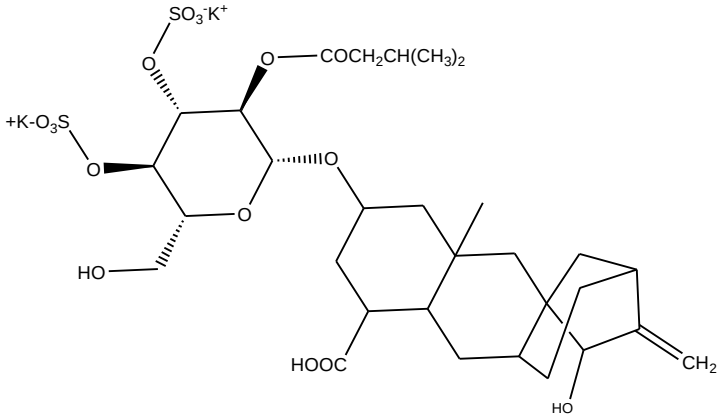
2.2.4 Deriváty atraktylosidů

Atraktylosidy (ATR) jsou látky ze skupiny diterpenoidních glykosidů, které byly izolovány již v roce 1868 francouzským vědcem Lefrancem z rostliny Pupava klejnatá (*Atractylis gummifera L.)* [46]. Toxický efekt atraktylosidů na lidský organismus byl objeven při náhodném otrávení několika italských školaček v roce 1955, kdy dívky požily sladké oddenky této rostliny [47]. Do dnešních dní se tyto látky v malé koncentraci používají pro léčbu syfilitických vředů, bělení zubů a v některých zemích se používá k vyvolání potratu [48-49]. Ve větší množství působí jako jed a to je důvod, proč byla tato rostlina používána k sebevraždám a vraždám [50].

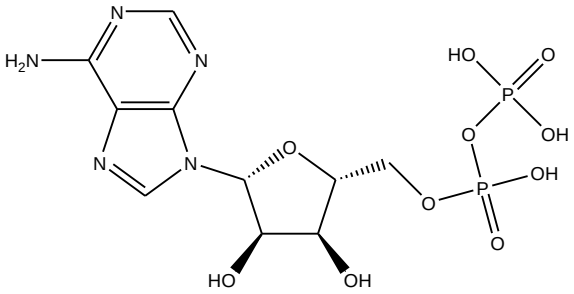
Chemická struktura glykosylovaného atraktylosidu byla poprvé navrženě Lefrancem v roce 1868 [46], ale detailně popsána až o necelých sto let později (v roce 1966) Piozzim a kol. [51]. Atraktylosid se vyskytuje nejčastěji jako hydrofilní glykosid. Po odtržení glukózy vázané beta-glykosidickou vazbou vzniká aglykon (atraktyligenin), kyselina s penhydrofenantrenovou strukturou [51]. Aglykon je 150x méně toxický než glykosylovaný ATR [52-56]. Karboxylová skupina na atraktyligeninu v poloze 4 je klíčová pro toxicitu celé molekuly. Po redukci této karboxylové skupiny na hydroxyl dojde ke ztrátě toxicity [57].

Toxicita atraktylosidů spočívá v jejich bránění transportu adenosindifosfátu (ADP) přes mitochondriální membránu a vzniku adenosintrifosfátu (ATP). Tím dojde k narušení glukogeneze a následné smrti buňky z důvodů energetického vyhladovění [58-59]. Vignais a kol. (1978) navrhují, že na inhibičním efektu se podílí celá molekula z důvodů podobné geometrie a velikosti atraktylosidu a molekuly ADP (Obr. 6). Polární charakter sulfátových skupin atraktylosidu odpovídá vlastnostem fosfátových skupin u ADP, glykosidická skupina nahrazuje ribózu a pentahydrofenantrenová část molekuly má geometricky podobnost k purinové struktuře adeninu [60].

Obr. 6: Struktury atraktylosidu a adenosindifosfátu



Atraktylosid draselný



Adenosindifosfát

Atraktylosidy se v přírodě vyskytují v mnoha rostlinách, ale pouze jedna je využívána jako potravina - kávovník arabský. V zelených zrnech této rostliny se nacházejí deriváty atraktylosidu v množství 34,5 - 624 mg/kg [61]. Při pražení dochází ke snížení obsahu atraktylosidů na množství 17,5-32 mg/kg. Množství atraktylosidu v pražených zrnech již podle literatury není pro běžného konzumenta kávy zdravotním rizikem [62-63].

V předkládané práci jsou detailně prostudovány změny v obsazích chlorogenových kyselin a atraktylosidů a je navrženo jejich využití pro popis pražicího procesu a určení pražicího stadia kávy v připraveném nápoji typu espresso.

3 Praktická část

3.1 Chemikálie

Standardy chlorogenových kyselin (3-kaffeoylchinová kys., 4-kaffeoylchinová kys., 5-kaffeoylchinová kys., 1,5-dikaffeoylchinová kys., 3,4-dikaffeoylchinová kys.) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Deionizovaná voda byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Millipore Direct Q UV (Millipore S.A.S, Molsheim, Francie). Pro přípravu mobilní fáze a roztoku standardu byl používán methanol (gradient grade, BIOSOLVE; Valkensward, Nizozemí a gradient grade, MALINCKRODT BAKER, Derenter, Nizozemí), kyselina mravenčí 99,7 %, p.a. (LACHEMA Brno, Česká Republika).

3.2 Přístroje a vybavení

3.2.1 Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr

Experimenty byly prováděny s využitím kapalinového chromatografu UPLC Acquity (Waters, Milford, USA) vybaveného vysokotlakým čerpadlem – ACQUITY UPLC Binary solvent manager, autosamplerem – ACQUITY UPLC Autosampler, kolonovým termostatem - ACQUITY UPLC Column manager a detektorem s diodovým polem - ACQUITY-PDA UPLC detector. Vzorek byl dávkován přeplněním dávkovací smyčky („full loop“, 20 µl). Separace byla prováděna na koloně Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm, dp = 2,7 µm, povrchově porezní siligelové částice s tloušťkou porézní vrstvy 0,5 µm, Sigma-Aldrich). Pro identifikaci analytů (měření m/z hodnot rodičovských iontů a vznikajících fragmentů) během jejich chromatografické separace byl použit hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier (Waters) vybavený ionizací elektrosprejem (Z-sprej) a hybridním tandemovým analyzátorem typu kvadrupól – detektor doby letu. Všechny analýzy byly prováděny s použitím ionizace elektrosprejem s negativní ionizací.

3.2.2 Ostatní laboratorní vybavení

Pro přípravu roztoku standardu byly využity analytické váhy Sartorius (Sartorius AG, Goettingen, Německo). Odplynění a dodatečné rozpuštění látek pomocí ultrazvuku bylo provedeno pomocí ultrazvukové lázně Elma, S 40 H, Elmasonic (Elma Hans Schmidbauer, Singen, Německo).

3.3 Příprava mobilní fáze a optimalizace retence

Jako mobilní fáze A byl použit 0,1% (v/v) roztok kyseliny mravenčí v deionizované vodě a jako mobilní fáze B methanol okyselený 0,1% kys. mravenčí. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,350 ml/min. Látky byly separovány s využitím gradientové eluce (profil gradientu viz Tab. 2)

Tab. 2: Gradientová eluce

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	100	0
5	100	0
55	0	100
58	100	0
60	100	0

3.4 Příprava vzorků

3.4.1 Pražení kávových zrn

Zelená kávová zrna odrůdy *Coffea arabica*, původem z Brazílie, regionu Cerrado (Minas de Gerais, 1150m nad mořem) byla pražena v pražírně Laura Coffee při teplotě 220°C a následně při 235°C pražičkou Novoroaster (Novoroaster GMBH, Německo). Délka trvání jednotlivých fází – first a second crack – nelze přesně určit, neboť pražící proces byl plně automatizován. Pražení probíhalo ve čtyřech různých časových intervalech (průměrné hodnoty časů: 9,8; 11,6; 13,9 a 20,5 min.) pro získání čtyř různých pražících stádií – lehce pražené, středně pražené, tmavě pražené a přepražené. Jednotlivé pražící stupně byly určeny experimentálně na základě hmotnostního úbytku v průběhu pražení. Podrobné parametry postupu pražení jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Parametry postupu pražení

		LEHCE PRAŽENÁ				STŘEDNĚ PRAŽENÁ				TMAVĚ PRAŽENÁ				PŘEPRAŽENÁ			
Parametry stroje	Větrák	186°C															
First Crack	Vzduch	220°C															
	Káva	200°C															
Second Crack	Vzduch	235°C															
	Káva	213°C				216°C				219°C				222°C			
		vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4
Zelená zrna (g)		1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
Upražená zrna (g)		1055	1054	1055	1055	1037	1035	1054	1037	1023	1029	1021	1031	998	998	992	989
Průměrný hmotnostní úbytek		12,1 %				13,3 %				14,5 %				17,2 %			
Délka pražení (min)		9:50	10:15	10:21	9:50	11:45	11:49	12:09	11:35	14:09	13:40	14:12	14:08	18:13	20:31	21:38	22:19

Legenda: Větrák - na počátku pražícího procesu byl nastaven na 186°C, poté je výkon větráku (teplota) hlídán automaticky pražičkou. Hlavní funkcí větráku je zajistit, aby zrna příliš nenadskakovala a byla rovnoměrně promíchávána – tedy rovnoměrně pražena. Vzduch – teplota vzduchu, který je vháněn do pražícího tubusu a udržuje kávu na požadované pražící teplotě – 200°C, 213°C, 216°C, 219°C a 222°C.

3.4.2 Příprava vzorků kávy pro LC/MS analýzu

Kávová zrna byla rozemleta pomocí kávomlýnku Mahlkoenig VARIO KS 30 (Mahlkoenig, Německo). Káva espresso byla připravena kávovarem La Marzocco GS3 (La Marzocco, Italy) jako tzv. „double shoot“, tedy dvojitá dávka kávy na jeden šálek (18 g kávy na 60 ml), aby bylo možné v navazujícím výzkumu srovnávat tato data se vzorky kávy připravené jinými metodami (french-press; džezva, chemex atp.), kde používáme také 18 g mleté kávy. Všechny vzorky byly připraveny ve čtyřech opakováních a z každého vzorku bylo odebráno 800 µl k analýze. Pro odstranění sacharidů bylo ke každému vzorku přidáno 200 µl methanolu a roztok byl následně centrifugován a filtrován přes PTFE mikrofiltr (Cronus) o velikosti pórů 0,22 µm a průměru 13 mm (Labicom, Česká republika)

3.4.3 Příprava vzorků pro organoleptickou analýzu

Vzorky pro organoleptickou analýzu byly připravovány standardním způsobem pro přípravu espressa (9 g kávy na 60 ml) pomocí kávomlýnku Mahlkoenig VARIO KS 30 (Mahlkoenig, Německo) a kávovaru La Marzocco GS3 (La Marzocco, Italy). Posloupnost vzorků k degustaci byla od nepražených kávových zrn k přepraženým. S každým vzorkem kávy byla zároveň podávána voda pro vypláchnutí ústní dutiny, a zamezení ovlivnění chuti stávajícího vzorku kávy předchozím.

3.5 Statistické vyhodnocení dat

Data naměřená pomocí UPLC-DAD-ESI-MS/MS byla zpracována (filtrována) s využitím softwaru MarkerLynx, statistické nadstavby softwaru MassLynx (Waters, Milford, MA, USA). Parametry metody pro zpracování dat byly následující: rozsah retenčních časů 5-35 min., rozsah hmot 100-1000 Da, tolerance (odchylka) měření m/z hodnoty iontů 0,01 Da, eliminace šumu: úroveň 2. Pomocí softwaru MarkerLynx byl získán seznam m/z hodnot, které vykazují významné rozdíly v obsahu mezi analyzovanými vzorky z různých pražicích stadií (seznam m/z hodnot potenciálních markerů pražicích stadií). Zpracovaná data byla následně studována analýzou hlavních komponent s využitím programu EZinfo, verze 2.0.0.0 (Umetrics, Malmö, Sweden).

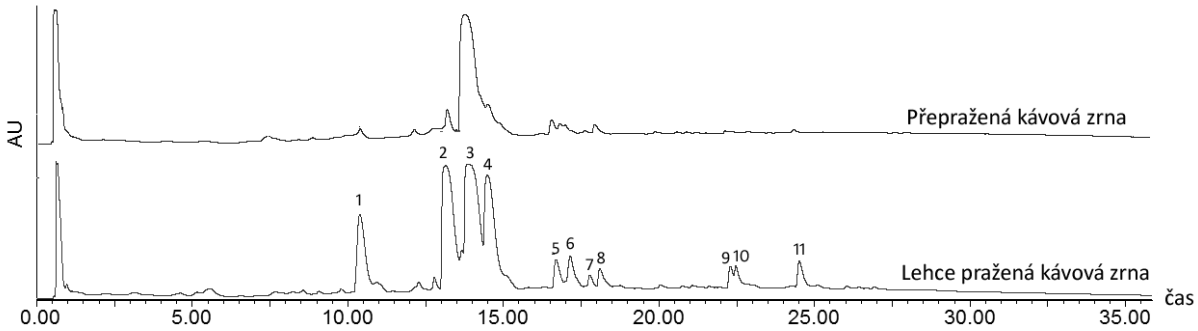
4 Výsledky a diskuze

4.1 UHPLC-MS analýza espressa

Pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-DAD-ESI-MS) byl sledován vliv pražícího procesu na látky přítomné v kávových zrnech (Obr. 7). Naměřená data byla následně studována pomocí softwaru MarkerLynx XS (parametry metody viz předchozí kapitola).

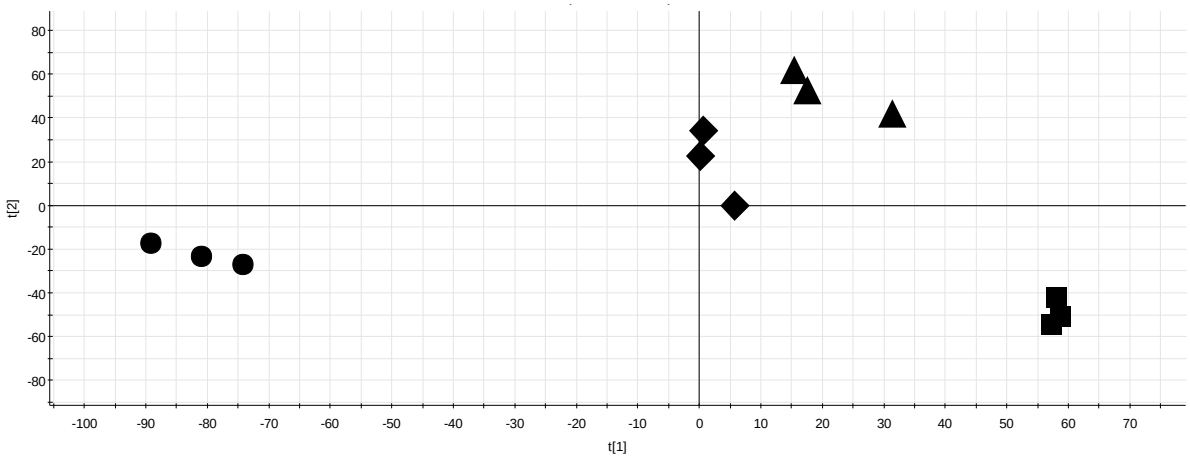
Látky vykazující nejvýznamnější rozdíly v obsazích (odezvách hmotnostního spektrometru) – markery jednotlivých pražicích stadií byly identifikovány na základě měření přesné a správné hodnoty m/z rodičovských iontů, fragmentačních spekter (získaných po izolaci rodičovských iontů v kolizní cele hmotnostního spektrometru a jejich kolizní disociaci; MS/MS spekter), retenčních časů a srovnáním získaných dat s literaturou [64-70]. Graf 1 ukazuje rozdělení vzorků z jednotlivých pražicích stadií po zpracování dat analýzou hlavních komponent na základě nalezených markerů. Tyto markery zahrnují tři významné skupiny látek: chlorogenové kyseliny (CGA), laktony kyseliny chlorogenové (CGL) a deriváty atraktylosidů (ATR). Seznam nalezených látek v pořadí rostoucí retence je uveden v Tab. 4.

Obr. 7: Porovnání chromatogramů espressa připraveného z lehce pražených a přepražených kávových zrn (detekce při UV = 254 nm).



1) 5-kaffeoylchinová kyselina; **2)** 3-kaffeoylchinová kyselina; **3)** kofein; **4)** 4-kaffeoylchinová kyselina; **5)** lakton kaffeoylchinové kyseliny a 5-feruloylchinová kyselina; **6)** lakton kaffeoylchinová kyseliny a 4-feruloylchinová kyselina; **7)** lakton kaffeoylchinové kyseliny; **8)** lakton feruloylchinové kyseliny; **9)** dikaffeoylchinová kyselina; **10)** 1,5-dikaffeoylchinová kyselina; **11)** 3,4-dikaffeoylchinová kyselina

Graf 1: Analýza hlavních komponent LC/MS analýz espressa připraveného z různě pražených kávových zrn



Lehce pražené stádium (Čtverce); Středně pražené stádium (Trojúhelníky);
Tmavě pražené stádium (Kosočtverce); Přepražené stádium (Tečky)

CGA skupina zahrnuje veškeré látky v kávových zrnech obsahující estery hydroxyskořivé a chinové kyseliny: kafeoylchinovou kyselinu (CQA), feruloylchinovou kyselinu (FQA), p-kumaroylchinovou kyselinu (pCoQA), dikafeoylchinovou kyselinu (diCQA), diferuloylchinová kyselina (diFQA), p-kumaroyl-kafeoylchinovou kyselinu (pCoCQA) a kafeoyl-feruloylchinovou kyselinu (CFQA). Podobně, CGL skupina zahrnuje látky obsahující hydroxyderiváty skořicové kyseliny a lakton chinové kyseliny: lakton kafeoylchinové kyseliny (CQL), lakton feruloylchinové kyseliny (FQL) a lakton dikafeoylchinové kyseliny (diCQL). Skupina ATR zahrnuje atraktylsid I (ATR-I); atraktylosid II (ATR-II), atraktylosid III (ATR-III) a atraktyligenin (ATG)

Tab. 4: Markery získané pomocí filtrace LC/MS dat programem MarkerLynx a studované pomocí PCA analýzy

Látka	Zkratka	Retenční čas	$[M-H]^-$	odchylka od vypočtené hodnoty, dtm (mDa)	Fragmenty v MS/MS spektrech
5-kaffeoylchinová kys.	5-CQA	10,39	353,0896	-2,2	191,0806
					179,0582
					135,0629
3-p-kumaroylchinová kys.	3-pCoQA	12,21	337,0938	-1,5	191,0781
					163,0586
					119,0628
3- kaffeoylchinová kys.	3-CQA	13,15	353,0901	-2,7	191,0808
					179,059
					135,0641

3-feruloylchinová kys.	3-FQA	13,61	367,1037	-2,4	193,0708
					134,0498
lakton kaffeoylchinové kys._1	CQL_1	13,87	335,076	0,5	179,0481
					161,0388
					135,0573
4- kaffeoylchinová kys.	4-CQA	14,51	353,0903	-2,9	191,0817
					179,0592
					135,0632
5-p-kumaroylchinová kys.	5-pCoQA	15,81	337,0911	1,2	191,0768
					163,058
					119,0615
lakton kaffeoylchinové kys._2	CQL_2	16,62	335,0788	-2,3	179,0481
					161,0341
					135,053
5- feruloylchinová kys.	5-FQA	17,13	367,1009	0,4	193,0708
					134,0498
lakton kaffeoylchinové kys._3	CQL_3	17,17	335,0767	-0,2	179,0481
					161,0341
					135,0573
4- feruloylchinová kys.	4-FQA	17,75	367,1017	-0,4	193,0708
					134,0498
lakton kaffeoylchinové kys._4	CQL_4	18,4	335,078	-1,5	179,053
					161,0388
					135,0573
lakton feruloylchinové kys._1	FQL_1	19,98	349,0933	-1,5	193,0554
					175,0401
lakton feruloylchinové kys._2	FQL_2	20,4	349,0918	0	193,0554
					175,045
neznámá látka 1	L1	20,54	552,2884	-	507,2914
					341,1811
					228,0981
lakton feruloylchinové kys._3	FQL_3	21,3	349,0923	-0,5	193,0554
					175,045
atraktylosid II	ATR-II	21,39	481,2456	-4	463,288
					319,2338
					301,2132
1,5-dikaffeoylchinová kys.	1,5-diCQA	22,24	515,1212	-2,9	353,0634
					191,0901
					173,0753
p-kumaroyl-kaffeoylchinová kys._1	pCo-CQA_1	24,2	499,1241	-2,8	353,1528
					337,1479
					173,0751
kaffeoyl-feruloylchinová kys._1	CFQA_1	24,22	529,134	-2,9	367,1505
					335,1191

					193,0753
kaffeoyl-feruloylchinová kys._2	CFQA_2	24,45	529,1331	-2	367,1508
					335,1183
					193,0772
3,4-dikaffeoylchinová kys.	3,4-diCQA	24,48	515,1202	-1,9	353,0619
					191,09
					173,0756
neznámá látka 2	L2	25,38	388,1887	-1,5	257,0923
					130,0871
atraktyligenin	ATG	25,72	319,1897	1,2	275,2003
					255,1742
					219,1737
p-kumaroyl-kaffeoylchinová kys._2	pCo-CQA_2	26,25	499,1227	-1,4	353,1465
					337,1498
					173,0757
kaffeoyl-feruloylchinová kys._3	CFQA_3	26,39	529,1318	-0,7	367,1508
					335,123
					173,0673
kaffeoyl-feruloylchinová kys._4	CFQA_4	26,63	529,1336	-2,5	367,1518
					335,1222
					173,0681
lakton dikaffeoylchinové kys._1	diCQL_1	26,83	497,1069	1,7	335,0822
					179,0344
neznámá látka 3	L3	28,09	651,3359	-	537,3393
					311,1713
diferuloylchinová kys.	diFQA	28,48	543,1508	-1,8	367,1557
					173,0752
lakton dikaffeoylchinové kys._2	diCQL_2	28,69	497,1237	-15,1	335,0821
					179,0369
atraktylosid I	ATR-I	29,4	727,3519	7,5	643,2939
					565,2946
					481,2419
					319,1943
neznámá látka 4	L4	29,81	773,3268	4,8	727,3546
					319,1943
neznámá látka 5	L5	29,82	660,3337	-3,6	335,2219
					323,0975
					179,0531
atraktylosid III	ATR-III	31,18	565,3008	7,1	481,3088
					463,2903
					319,245
					301,2189
atraktylosid III	ATR-III	31,39	565,3013	6,6	481,3003
					463,2993

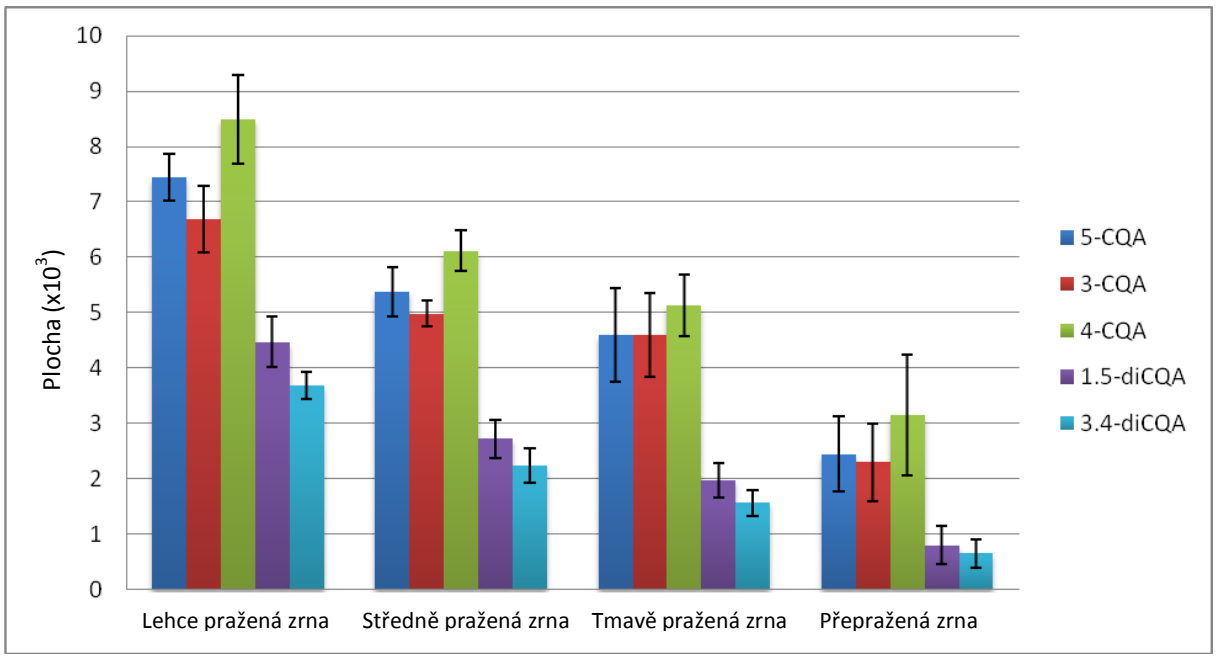
					319,2265
					301,2176
atraktylosid III	ATR-III	32,29	565,3002	7,7	481,3011
					463,3013
					319,2253
					301,2176

Retence látek je s ohledem na jejich chemickou strukturu logická. Velkou roli sehrává hydrofobicita, která se u látek pozvolna zvyšuje s retenčním časem. Odchylka měřené hodnoty m/z rodičovských iontů od vypočtené ze sumárního vzorce je dobrá. Největší odchylka (dtm, -15,1 mDa) byla pozorována u laktonu kafeoylchinové kyseliny, který eluuje v čase 28,69 min. Odchylky u zbylých látek se dtm pohybovaly v rozmezí od -2,7 do 7,7 mDa. Fragmentace rodičovských iontů dobře odpovídá procesům očekávaným u navržených struktur U kafeoyl-, feruloyl- a p-kumaroylchinových kyselin byly mezi fragmenty nalezeny chinová kyselina a všechny odpovídající hydroxyskořicové kyseliny, které ji acylují (tj. kávová, ferulová a p-kumarová kyselina). Hydroxyskořicové dále fragmentují za ztráty oxidu uhelnatého. Podobné fragmenty byly také nalezeny při fragmentaci dikafeoyl-, diferuloyl-, kafeoyl-feruloyl- a p-kumaroyl-kafeoylchinových kyselin. Fragmentací laktonů chlorogenových kyselin získáme příslušné výše uvedené hydroxyskořicové kyseliny a jejich fragmenty (vznikající zejména dehydratací a dekarboxylací). Fragmentace atraktylosidů vyžaduje podrobnější komentář a je diskutována níže v samostatném odstavci.

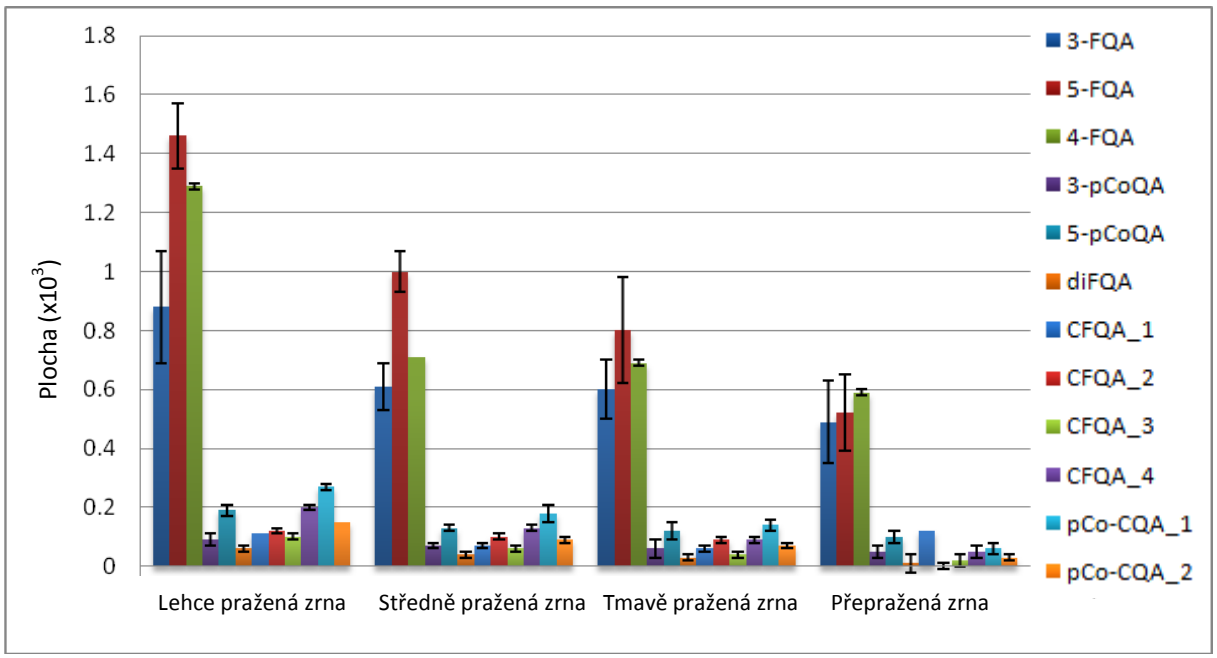
Vliv pražení na obsah těchto markerů je zobrazen na grafech 1-4 a byl vyhodnocován pomocí ploch píků v chromatogramech rekonstruovaných pro jednotlivé studované hodnoty m/z.

Graf 2 a 3 zobrazuje pozvolné klesání koncentrace CGA v závislosti na době pražení. U této skupiny látek dochází s největší pravděpodobností k eliminaci molekuly vody z kyseliny chinové a vzniku laktonů chlorogenových kyselin. Průběh změn koncentrací laktonů chlorogenových kyselin můžeme vidět na Grafu 4. kde v prvních třech stádiích (lehce, středně a tmavě pražená zena) dochází k nárůstu koncentrace laktonů kaffeoylchinových kyselin 1, 2 a laktonu feruloylchinové kyseliny 2. V posledním pražícím stádiu již dochází k následnému rozkladu těchto laktonů a jejich koncentrace klesá. Látky označené diCQL_1 a diCQL_2 vykazovali pozvolný pokles v průběhu celého pražícího procesu. U zbylých laktonů chlorogenových kyselin jsme pozorovali stejnou koncentraci v prvních třech stádiích pro látky FQL_3 a CQL_4 a pokles v druhém, a následně nárůst v třetím, pražícím stádiu pro CQL_3 a FQL_1. Ve čtvrté pražícím stádiu (přepražená kávová zrna) již docházelo k degradaci těchto látek.

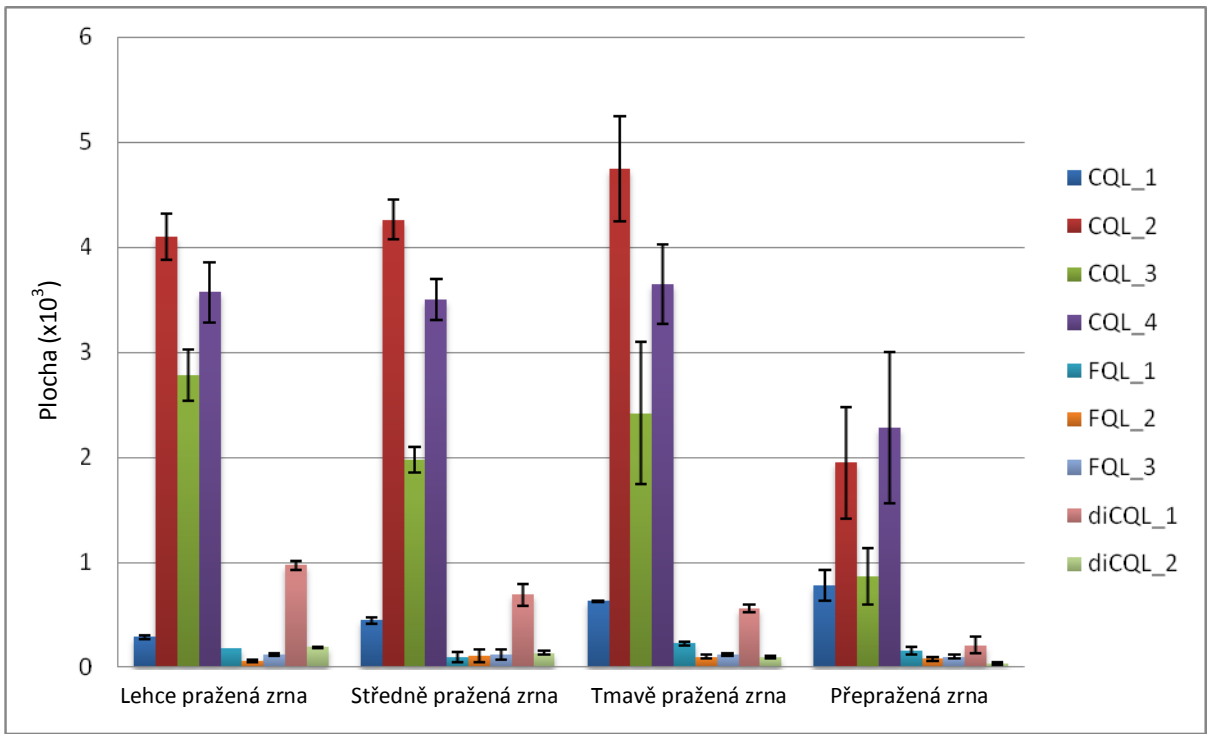
Graf 2: Vliv pražícího procesu na skupinu chlorogenových kyselin – kafeoyl-chinové kyseliny (chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce ze 4 měření dané látky)



Graf 3: Vliv pražícího procesu na skupinu chlorogenových kyselin – další deriváty hydroxyskořicových kyselin navázány na kyselinu chinovou (chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce ze 4 měření dané látky).

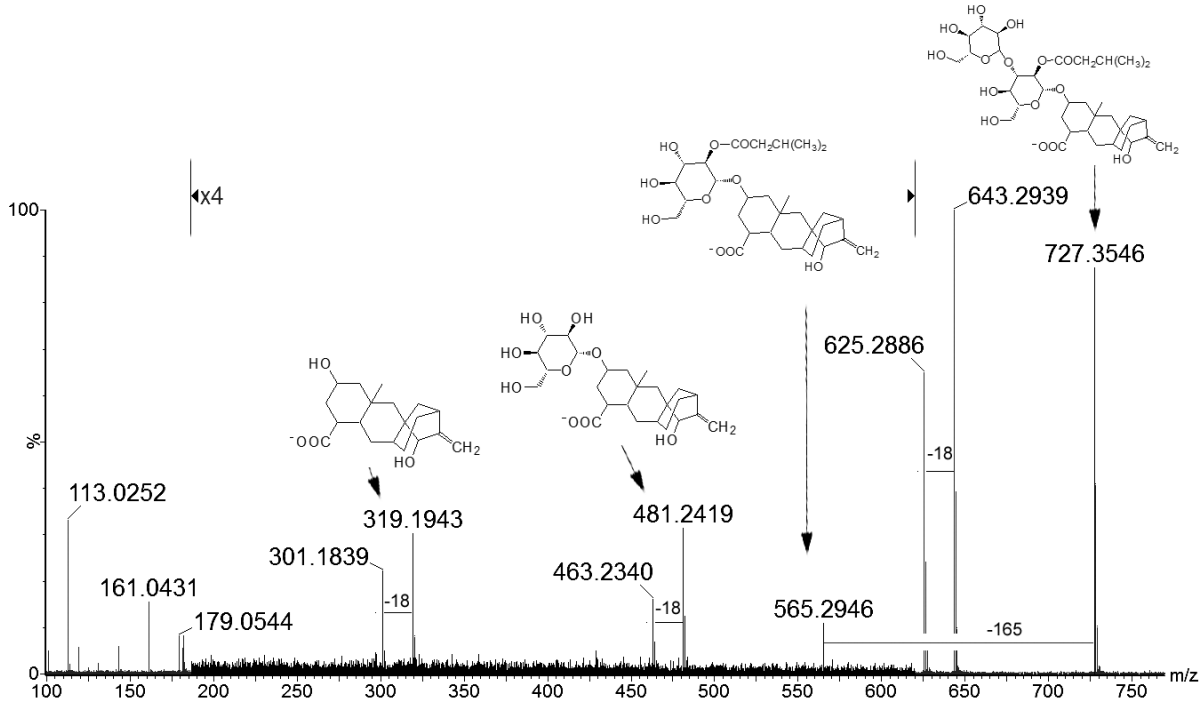


Graf 4: Vliv pražícího procesu na skupinu laktonů chlorogenových kyselin (chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce ze 4 měření dané látky).



V chromatografickém záznamu byly nalezeny 4 látky, které na základě MS/MS experimentů byly identifikovány jako deriváty atraktylosidů. Fragmentační spektrum atraktylosidu I (ATR-I) s hodnotou m/z 727,3546 je zobrazeno na Obr. 8. Ztrátou 3-methyl-butylaldehydu z rodičovského iontu vzniká fragment s m/z 643,2939, který dále ztrácí molekulu glukózy za tvorby derivátu atraktylosidu II (m/z 481,2416, ATR-II). Pokud v prvním kroku dochází ke ztrátě molekuly glukózy namísto 3-methyl-butylaldehydu vzniká fragment s hodnotou m/z 565.3079 náležící derivátu atraktylosidu III (ATR-III). Seznam jednotlivých fragmentů s odchylkou od vypočítaných hodnot dle sumárního vzorce je uveden v Tab. 5.

Obr. 8: Fragmentační spektrum ATR-I (727,3546)



Tab. 5: Seznam hlavních fragmentů při fragmentaci ATR-I (727,3546)

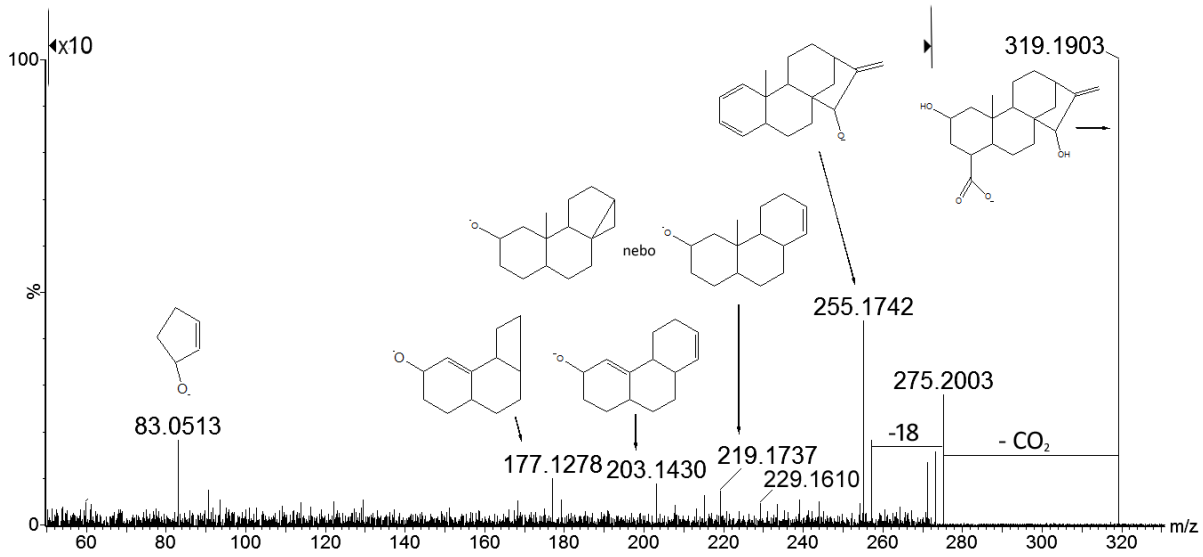
Marker, $[M-H]^-$	Fragment	Sum. Vzorec	Dtm (mDa)
727,3546		$C_{36}H_{56}O_{15}$	0,0
	643,2939	$C_{31}H_{48}O_{14}$	-3,2
	625,2886	$C_{31}H_{46}O_{13}$	2,0
	565,2946	$C_{30}H_{46}O_{10}$	-7,2
	481,2419	$C_{25}H_{38}O_9$	-2,4
	463,2340	$C_{25}H_{36}O_8$	0,3
	319,1943	$C_{19}H_{28}O_4$	2,8
	301,1839	$C_{19}H_{26}O_3$	3,0

Dtm popisuje odchylku naměřené hodnoty od hodnoty rodičovských iontů a fragmentů vypočtené z uvedeného elementárního složení.

Deglykosylací derivátů atraktylosidů vzniká atraktyligenin (m/z 319,1897). Identifikace atraktyligeninu probíhala pomocí MS/MS experimentů. Jako první můžeme ve fragmentačním spektru pozorovat ztrátu molekuly oxidu uhličitého a kyseliny mravenčí následovanou ztrátou molekuly vody. Tyto majoritní fragmentační ztráty jsou následovány fragmentací kruhu – z fragmentu m/z 255,1742 vzniká po ztrátě ketenu m/z 229,1610. Fragment m/z 177,1278 vzniká z největší pravděpodobností z iontu m/z 275,2003, který ztrácí molekulu cyklopent-2-enolu (ion m/z 83,0513). Fragmentační spektrum atraktyligeninu s navrhovanými strukturami je zobrazeno na Obr. 9

a seznam fragmentů v Tab. 6. Ačkoli struktury zejména fragmentů s menšími hodnotami m/z jsou hypotetické, je patrna dobrá shoda hodnot m/z s hodnotami teoretickými. Spektrum tedy dobře koresponduje s procesy očekávanými při fragmentaci atraktyligeninu.

Obr. 9: Fragmentační spektrum atraktyligeninu (m/z 319,1897, kolizní energie 20 eV)



Tabulka 6: Seznam fragmentů vzniklých fragmentací Atraktyligeninu

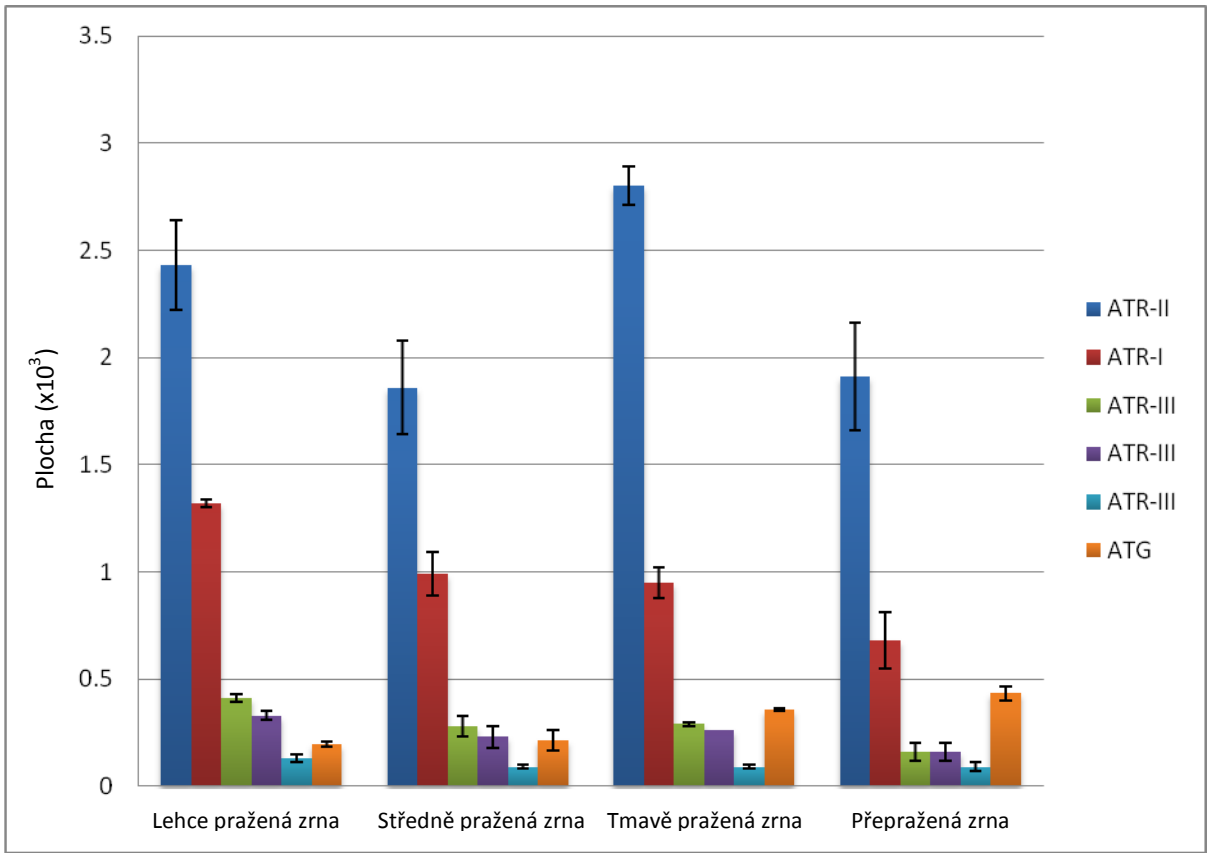
Marker, $[M-H]^-$	Fragment	Sum. vzorec	Dtm (mDa)
319,1903		$C_{19}H_{27}O_4$	-0,6
	275,2003	$C_{18}H_{27}O_2$	-0,8
	273,1844	$C_{18}H_{25}O_2$	-1,1
	255,1742	$C_{18}H_{23}O$	-0,7
	229,1610	$C_{16}H_{21}O$	1,8
	219,1737	$C_{15}H_{23}O$	-1,2
	203,1430	$C_{14}H_{19}O$	-0,6
	177,1278	$C_{12}H_{17}O$	-0,1
	83,0513	C_5H_7O	1,6

Dtm popisuje odchylku naměřené hodnoty od hodnoty rodičovských iontů a fragmentů vypočtené z uvedeného elementárního složení.

V průběhu pražení dochází k významným změnám v obsazích atraktylosidů jak jednoznačně ukazuje Graf 5. Obsah ATR-II je proměnlivý. V počátku pražícího procesu dochází k poklesu koncentrace ATR-II, poté se obsah tohoto derivátu zvýší nad počáteční hodnotu. V přepražené kávě je obsah ATR-II přibližně stejný jako v druhém pražícím stádiu. Nicméně, rozdíl v obsahu mezi prvním a čtvrtým stadiem (výrazně nižší obsah ve čtvrtém stadiu) je statisticky významný. Koncentrace

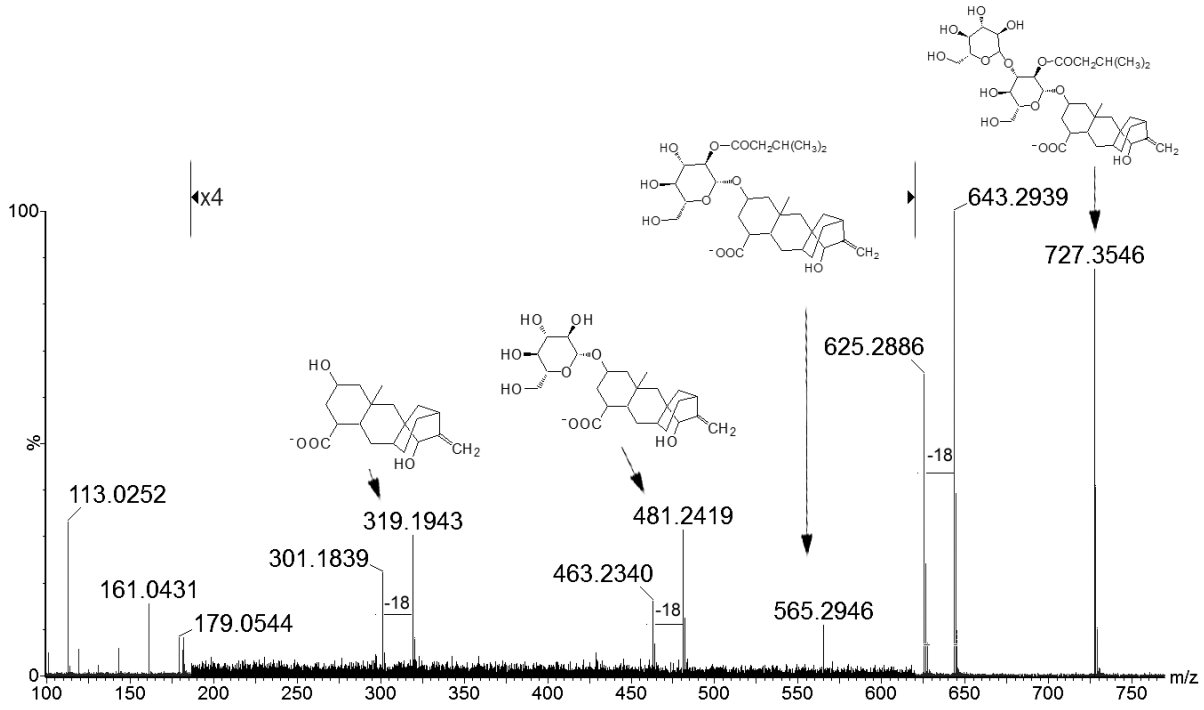
zbylých dvou derivátů ATR-I a ATR-III měla v průběhu celého pražícího procesu sestupný charakter. Oproti tomu koncentrace atraktyligeninu stoupala v kávových zrnech s dobou pražícího procesu a v přepražených kávových zrnech je koncentrace této látky dvojnásobná.

Graf 5: Vliv pražícího procesu na skupinu derivátů atraktylosidů (chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce ze 4 měření dané látky).

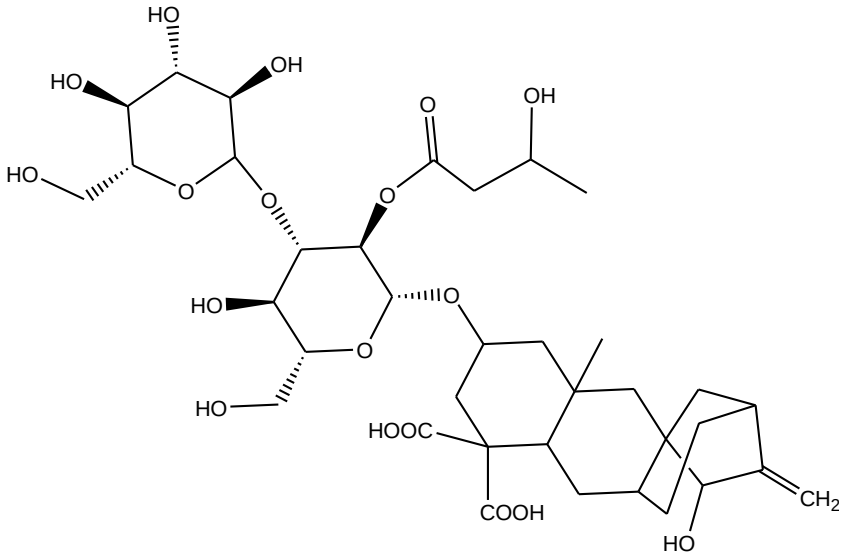


Neznámá látka 4 s hodnotou m/z 773,3184 pravděpodobně patří do skupiny derivátů atraktylosidů. V roce 2013 Lang a kol. nalezli v zelených kávových zrnech několik předtím neznámých derivátů atraktylosidů. Mezi látkami identifikovanými ve zmíněné práci byl derivát atraktylosidu s hodnotou m/z rodičovského iontu 771,3441 (3'-O-β-D-glucopyranosyl-2'-O-isovaleryl-2β-(2-desoxy-carboxyatractyligenin)-β-D-glucopyranoside). Tato látka fragmentuje podobně jako marker nalezený naší LC/MS^2 analýzou s m/z 773,3268 [45] Fragmentací této látky vzniká atraktylosid I (m/z 727,3536), který dále fragmentuje výše popsaným způsobem (Obr. 10, Tab. 7). Teoreticky vypočtená hodnota m/z pro látku $C_{36}H_{53}O_{18}$ velmi dobře odpovídá námi nalezené látce (dtm 4,8 mDa). Hypotetická struktura neznámé látky 4 je zobrazena na Obr. 11.

Obr. 10. Fragmentační spektrum látky s m/z 773,3268. MS/MS experimenty byly provedeny s CE 20 eV.



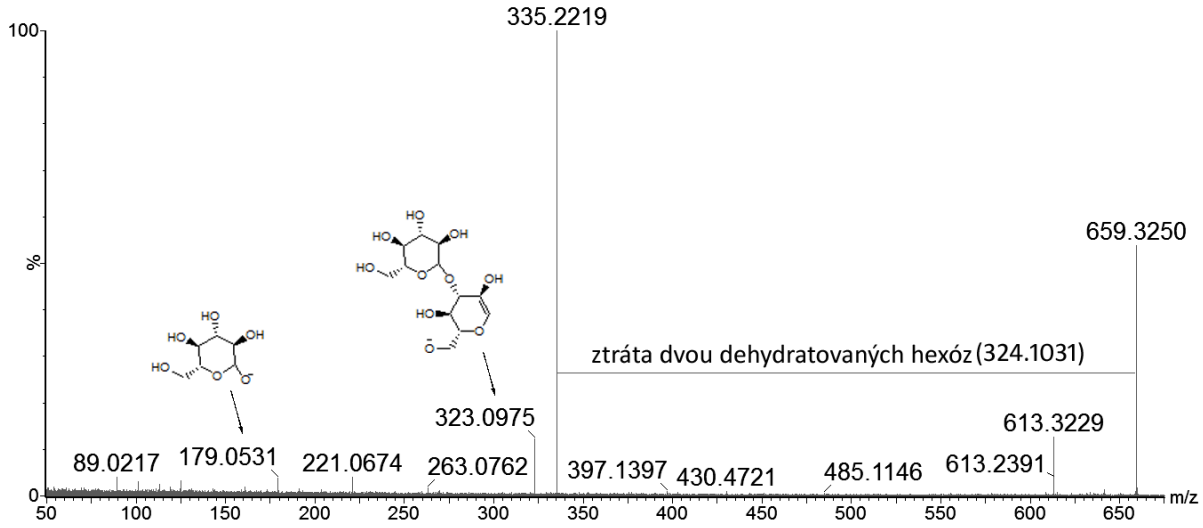
Obr. 11: Hypotetická struktura neznámé látky 4 s hodnotou m/z rodičovského iontu 773,3184



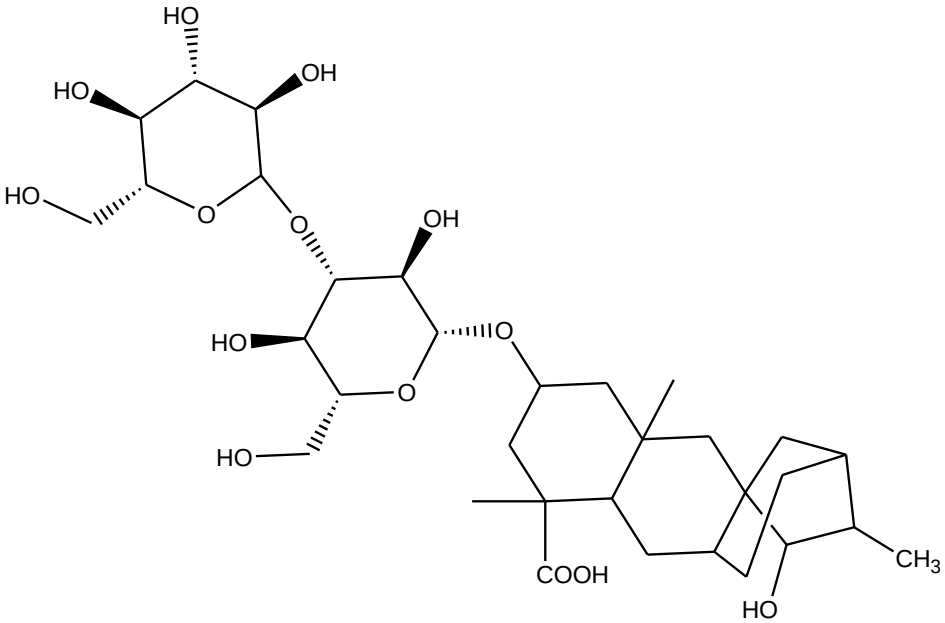
Neznámá látka 5 s m/z 660,3337 odpovídá prvnímu izotopickému píku k iontu s m/z 659,3266. Hypotetická struktura této látky je zobrazena na Obr. 13. Také tento ion má pravděpodobně rovněž souvislost s deriváty atraktylosidů. Ve fragmentačním spektru (Obr. 12) je patrná neutrální ztráta 324,1031, která odpovídá dvěma dehydratovaným molekulám glukózy– fragment 323,0975 (dtm 0,3

mDa). Fragment m/z 335,2219 odpovídá látce methyl-dihydroatraktyligenin (0,3 mDa). Seznam hlavních fragmentů těchto dvou markerů je uveden s Tab. 6. Pro tuto látku byl spočítán sumární vzorec $C_{36}H_{53}O_{18}$ s dtm -3,6 mDa.

Obr. 12: Fragmentační spektrum látky s m/z 659,3250. (kolizní energie 20 eV)



Obr. 13: Hypotetická struktura neznámé látky 5 s hodnotou m/z rodičovského iontu 659,3250



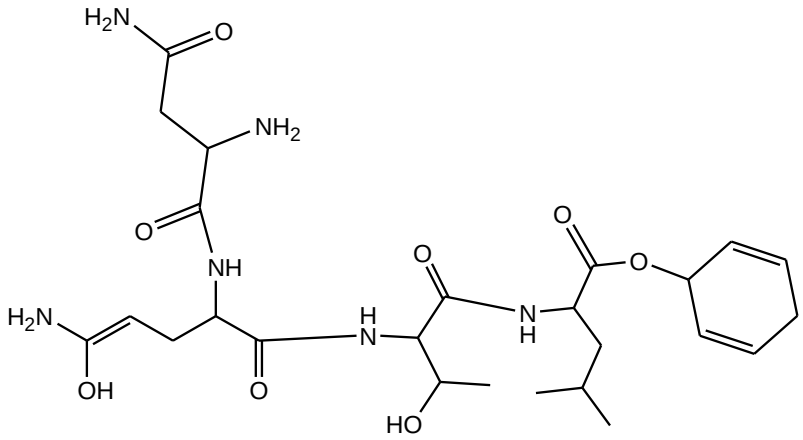
Tab. 7: Seznam hlavních fragmentů látek m/z 773,3268 a m/z 659,3250

$[M-H]^-$	Fragment	Sum. vzorec	mDa
773,3200		$C_{36}H_{53}O_{18}$	-3,2
	727,3536	$C_{36}H_{55}O_{15}$	-0,5
	643,2959	$C_{31}H_{47}O_{14}$	-0,7
	625,2849	$C_{31}H_{45}O_{13}$	-1,1
	565,3018	$C_{30}H_{45}O_{10}$	0,5
	481,2428	$C_{25}H_{37}O_9$	-1,0
	319,1902	$C_{19}H_{27}O_4$	-0,7
659,3250		$C_{32}H_{51}O_{14}$	-2,9
	613,3229	$C_{31}H_{49}O_{12}$	0,5
	335,2219	$C_{20}H_{31}O_4$	-0,3
	323,0975	$C_{12}H_{19}O_{10}$	-0,3
	179,0531	$C_6H_{11}O_6$	-2,5

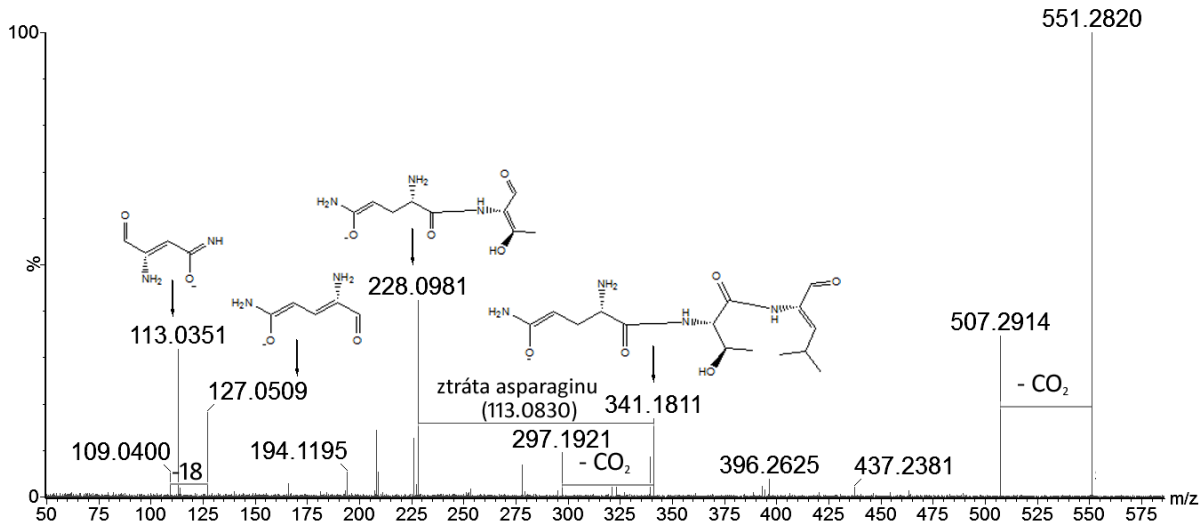
Dtm popisuje odchylku naměřené hodnoty od hodnoty rodičovských iontů a fragmentů vypočtené z uvedeného elementárního složení.

Ion s m/z 552,2884 náležící neznámé látce 1 odpovídá izotopickému iontu látky s m/z 551,2859 (Obr. 14). Při fragmentaci tohoto markeru jsme zaznamenali fragmenty odpovídající ztrátám některých aminokyselin. Dominantní fragment m/z 228,0981 odpovídá signálu dehydratovaného dipeptidu glutamin-threonin (dtm 0,3 mDa). Dále byla nalezena neutrální ztráta 114,0450 odpovídající m/z hodnotě dehydratované molekuly asparaginu (dtm -2,1 mDa). Ve spektru můžeme nalézt rovněž odpovídající fragment m/z 113,0351. Fragmentační spektrum je zobrazeno na Obr. 15 a fragmenty jsou uvedeny v Tab. 8.

Obr. 14: Hypotetická struktura neznámé látky 1 s hodnotou m/z rodičovského iontu 551,2859

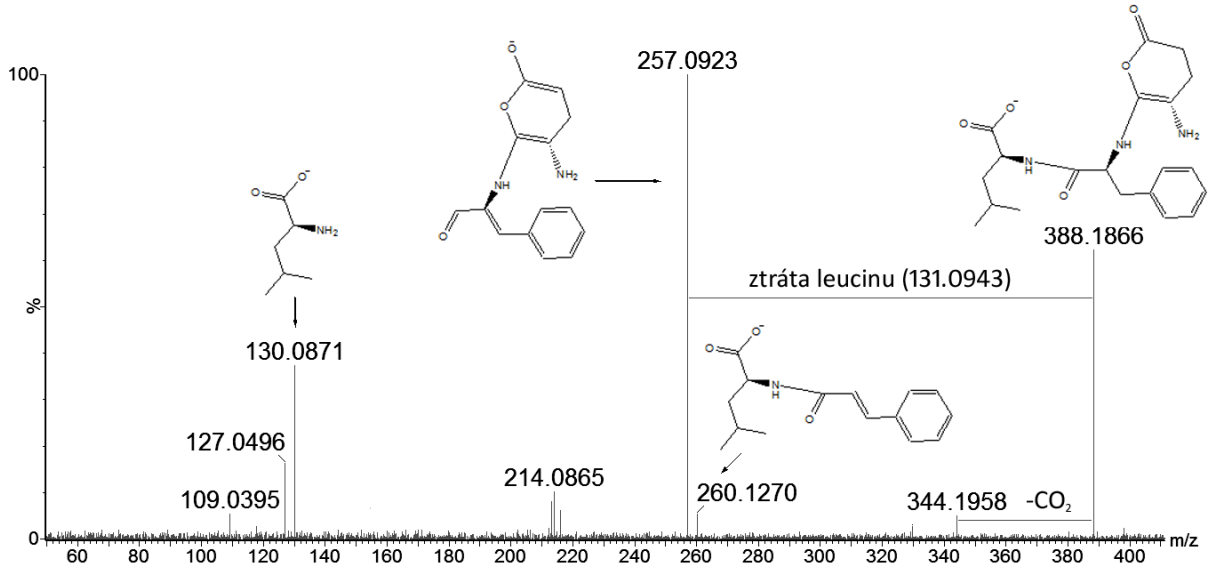


Obr.15: Fragmentační spektrum markeru m/z 551,2859. (kolizní energie 30 eV)

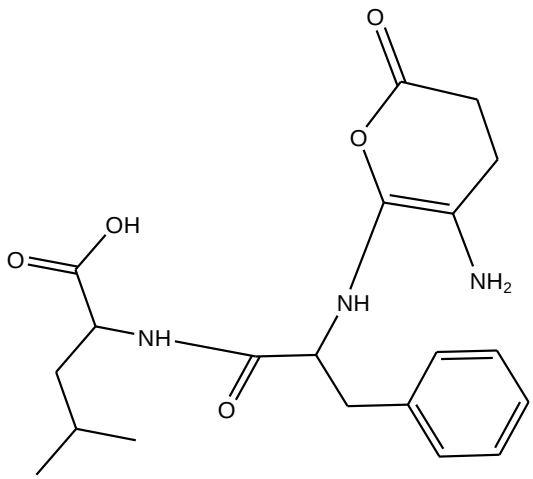


Při fragmentaci neznámé látky 2 s hodnotou m/z 388,1887 byly pozorovány ztráty typické pro fragmentaci řetězců některých aminokyselin (Obr. 16; Tab. 8). Neutrální ztráta 131,0934 ve fragmentačním spektru odpovídá volné aminokyselině leucinu nebo isoleucinu (dále označované jako (iso)leucin) (dtm 1,2 mDa) a ztráta 128.0579 odpovídá dehydratované molekule glutaminu (dtm 0,7 mDa). Fragment s m/z 257,0924 odpovídá dehydratovanému dipeptidu fenylalanin – glutamin (dtm 0,8 mDa) vznikajícího po ztráte (iso)leucinu. Podobně lze ve fragmenačním spektru nalézt fragment odpovídající dehydratovanému dipeptidu (iso)leucin-fenylalanin vznikajícího po ztrátě glutaminu a jedné molekuly NH_3 s m/z 260,1270 (1,7 mDa). Tato látka je tedy patrně dehydratovaný tripeptid tvořený aminokyselinami (iso)leucinem, fenylalaninem a glutaminem. Hypotetická struktura této látky je zobrazena na Obr. 17.

Obr. 16: MS/MS spektrum markeru s m/z 388,1887. (kolizní energie 20 eV)



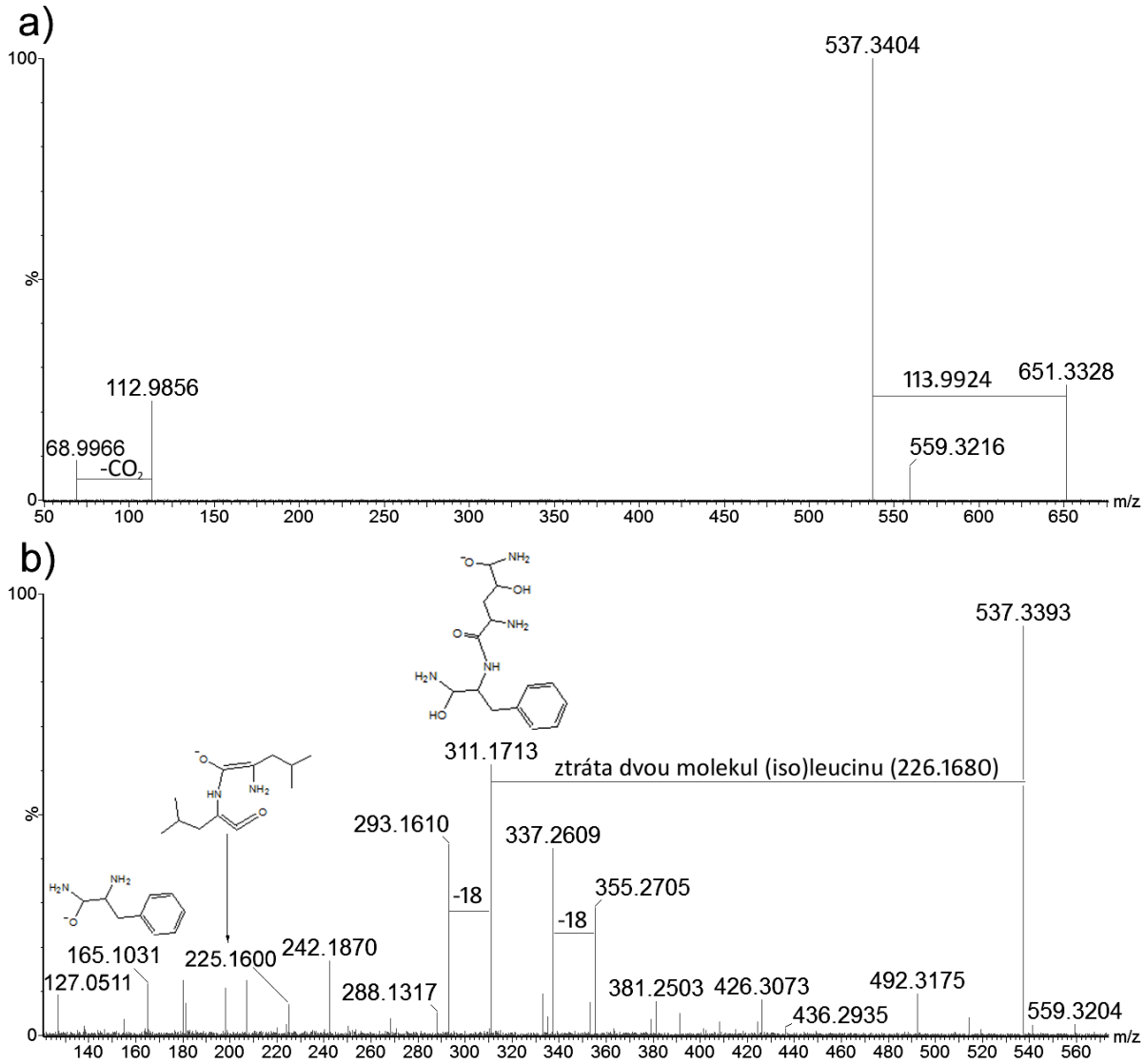
Obr. 17: Hypotetická struktura neznámé látky 1 s hodnotou m/z rodičovského iontu 388,1887



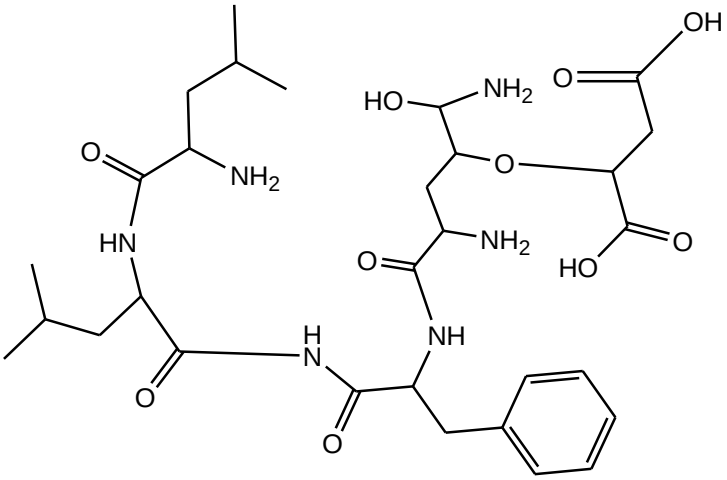
Neznámá látka 3 (m/z 651,3359) obsahuje pravděpodobně ve své struktuře také aminokyseliny glutamin, fenylalanin a (iso)leucin (Obr.18, Tab. 8). Toto tvrzení podporuje neutrální ztráta 226,1679 (0,2 mDa), a komplementární fragment s m/z 225,1600 (odchylka od teoretické hodnoty, dtm, 0,3 mDa), odpovídající dvěma molekulám (iso)leucinu bez jedné molekuly vody. Fragment m/z 311,1713 odpovídá molekule glutamin-1,2-diamino-3-phenyl-propan-1-olu (dtm 0,6 mDa). Návrh této struktury je však předběžný a fragment je třeba dále zkoumat. Jeho následnou fragmentací dochází ke ztrátě molekuly vody a vzniká ion s m/z 293,1610 (dtm 0,4 mDa). Hypoteticky by hydroxy skupina mohla být navázána na molekulu glutaminu. Anion 1,2-diamino-3-phenyl-propan-1-olu může mít souvislost s aminokyselinou fenylalaninem, avšak potenciální mechanismus jeho vzniku zatím nebyl vysvětlen. Na tento ion je přes aminoskupinu patrně navázán peptidickou vazbou glutamin a na karboxylovém

konci je vázána jiná látka Při následném rozpadu tohoto fragmentu můžeme pozorovat dva signály: ion s m/z 127,0511 odpovídající dehydratované molekule glutaminu (dtm 0,3 mDa) a m/z 165,1031 odpovídající 1,2-diamino-3-phenyl-propan-1-olu (dtm 0,3 mDa). Dominantním fragmentem vznikajícím v kolizních spektrech markeru s m/z 651,3359 je ion s m/z 112,9855 odpovídající neurální ztrátě 113,9924 v prvním kroku fragmentace rodičovského iontu. Tato neutrální ztráta odpovídá elementárnímu složení kyseliny but-2-ynedionové (1,9 mDa). Přítomnost karboxylu v tomto fragmentu potvrzuje následná fragmentace za ztráty oxidu uhličitého a vzniku fragmentu s m/z 68,9966 (1,1 mDa). Původ fragmentů s m/z 377,2606 a 355,2705 nebyl však v průběhu řešení této studie objasněn. Návrh struktury je zobrazen na Obr. 19.

Obr. 18: MS/MS spektrum markeru m/z 651,3359. (a. kolizní energie 20 eV, b. zoom spektra, kolizní energie 40 eV;)



Obr. 19: Hypotetická struktura neznámé látky 3 s hodnotou m/z rodičovského iontu 651,3359



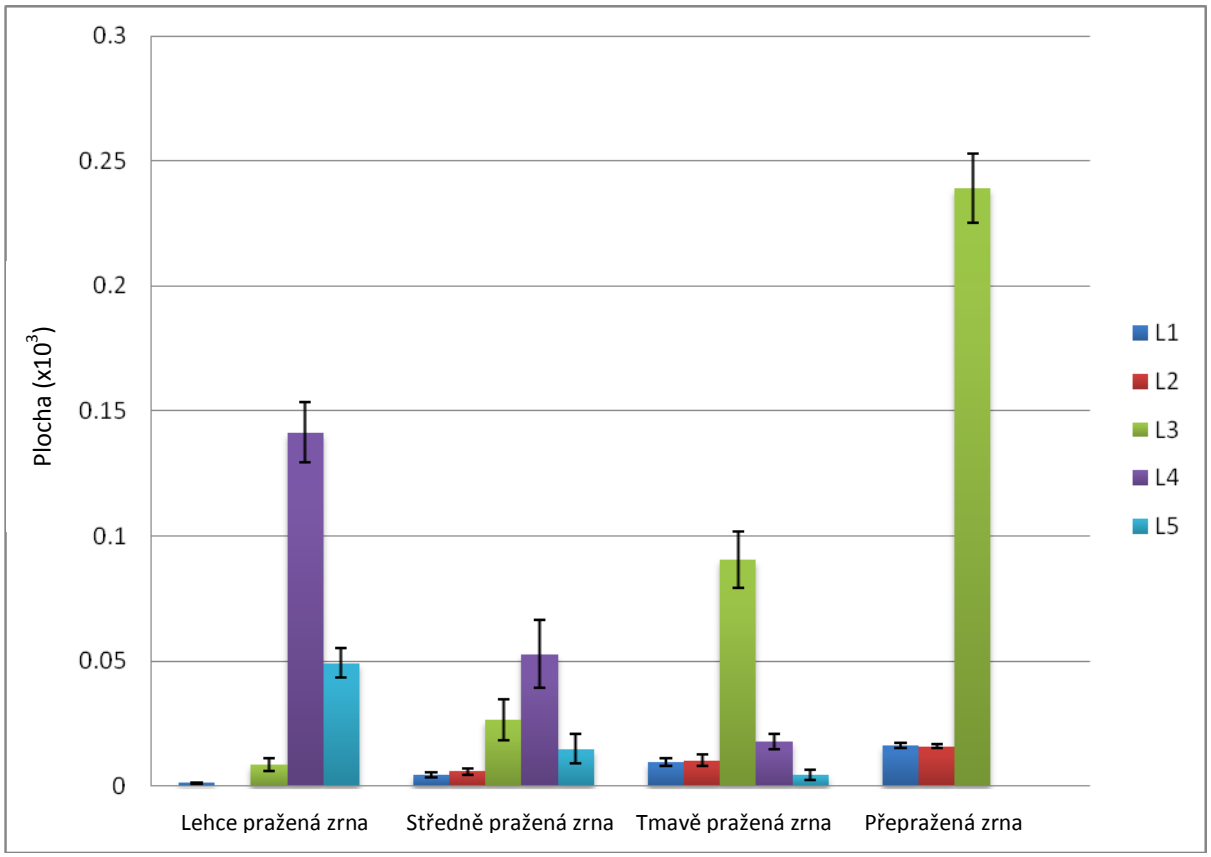
Tab. 8: Seznam fragmentů pro markery tmavě pražených a přepražených kávových zrn

Marker, $[M-H]^-$	Fragment	Sum. vzorec	Dtm (mDa)
388,1858		$C_{20}H_{26}N_3O_5$	-1,4
	344,1966	$C_{19}H_{26}N_3O_3$	-0,8
	260,1279	$C_{15}H_{18}NO_3$	-0,8
	257,0924	$C_{14}H_{13}N_2O_3$	-0,2
	130,0870	$C_6H_{12}NO_2$	0,2
	127,0501	$C_5H_7N_2O_2$	-0,7
651,3323		$C_{30}H_{47}N_6O_{10}$	-3,1
	537,3393	$C_{26}H_{45}N_6O_6$	-0,8
	311,1713	$C_{14}H_{23}N_4O_4$	-0,6
	293,1610	$C_{14}H_{21}N_4O_3$	-0,4
	225,1600	$C_{12}H_{21}N_2O_2$	-0,3
	165,1031	$C_9H_{13}N_2O$	0,3
	127,0511	$C_5H_7N_2O_2$	0,3
	112,9856	C_4HO_4	-1,9
	68,9966	C_3HO_2	-1,1
551,2820		$C_{25}H_{39}N_6O_8$	-0,9
	507,2912	$C_{24}H_{39}N_6O_6$	-1,9
	341,1809	$C_{15}H_{25}N_4O_5$	-1,6
	228,0981	$C_9H_{14}N_3O_4$	-0,3
	127,0507	$C_5H_7N_2O_2$	-0,1
	113,0351	$C_4H_5N_2O_2$	0,0

Dtm popisuje odchylku naměřené hodnoty od hodnoty rodičovských iontů a fragmentů vypočtené z uvedeného elementárního složení.

Změny v obsahu sledovaných látek v pražených kávových zrnech zobrazuje Graf 6. Látky 4 (m/z 773,3184) a 5 (m/z 660,3337) – deriváty atraktylosidu - byly nalezeny pouze v prvních třech stádiích (lehce, středně a tmavě pražená káva) a jejich obsah klesal s dobou pražení. Největší obsah těchto látek byl v prvním pražícím stádiu a ve druhém pražícím stádium byla koncentrace těchto látek již pouze třetinová. Naproti tomu látky 1 (m/z 552,2884), 2 (m/z 388,1887) a 3 (m/z 651,3359) – všechny identifikované, jako fragmenty proteinů, resp. produktů Maillardoy reakce - vykazovaly nárůst koncentrace s dobou pražení. Největší nárůst koncentrace byl pozorován u látky 3 (m/z 651,3359) jejíž obsah byl v přepražené kávě zhruba třicetinásobný oproti lehce praženým kávovým zrnům.

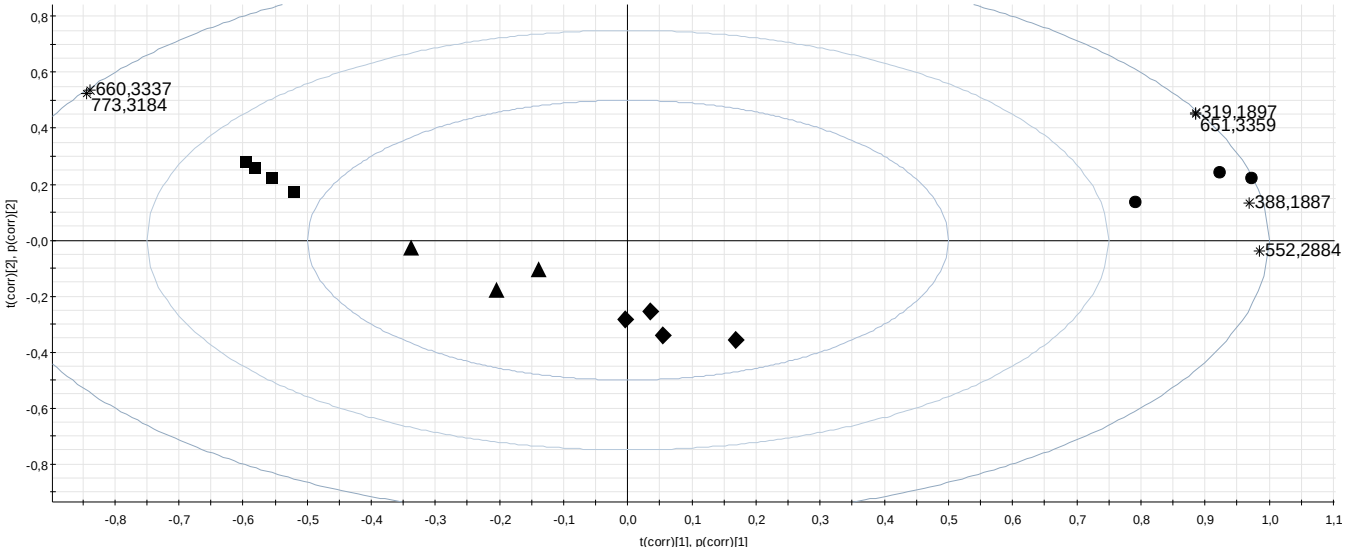
Graf 6: Obsah sledovaných markerů (chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce ze 4 měření dané látky).



Pro hodnocení významu šesti sledovaných markerů byla použita opět analýza hlavních komponent. Graf 6 ukazuje bi-plot získaný při hodnocení signálů těchto látek v analyzovaných vzorcích. Oddělení jednotlivých pražicích stadií v tomto grafu je evidentní. Poloha markerů potom jednoznačně ukazuje význam všech těchto látek pro rozlišení použitých postupů pražení. Nejmenší

vzdálenost je patrná mezi středně praženými a tmavě praženými stádii. Nicméně stále je zřetelné oddělení těchto dvou stádií. Nejvíce odlehlé jsou body náležející přepraženým kávovým zrnům.

Graf 7: Analýza hlavních komponent espressa



Lehce pražené stádium (Čtverec); Středně pražené stádium (Trojúhelník);
Tmavě pražené stádium (Kosočtverec); Přepražené stádium (Tečka)

Přítomnost atraktylosidů s m/z 773,33 a 660,33 umožňuje jednoznačně oddělit lehce a středně praženou kávu od ostatních dvou stádií. Jak již bylo diskutováno výše, obsah těchto látek klesá s dobou pražení a ve třetím pražícím stádiu (tmavě pražená zrna) je koncentrace těchto látek okolo 10% obsahu v lehce pražené kávě. V espressu připraveném z přepražených kávových zrn již tyto látky nebyly detekovány. Oproti tomu přítomnost fragmentů proteinů/produktů Mailardovy reakce s m/z 319,19; 388,19; 552,28 a 651,34 nám dovoluje rozlišit tmavě praženou a přepraženou kávu. Koncentrace látek s m/z 319,19, 388,19 a 552,28 narůstal pozvolně v průběhu pražení a v posledním pražícím stádiu byl obsah zhruba dvojnásobný oproti lehce pražené kávě. Nejvýznamnější změny v obsahu byly pozorovány u látky 3 s hodnotou m/z rodičovského iontu 651,3359, jehož obsah se proti prvnímu stádiu zvětšil o 96,3 %.

4.2 Organoleptická analýza kávy

Espressa připravená z různě pražených kávových zrn byla hodnocena organoleptickými zkouškami (Příloha 1). Skupina 7 mužů (26-41 let) a 8 žen (26-36 let) hodnotila u jednotlivých vzorků káv vůni, příchuť, aciditu, doznívání, tělo a celkový dojem. Grafy k jednotlivým parametrům jsou uvedeny v Příloze 2. Graf 8 ukazuje výsledky hodnocení vůně espressa připraveného z různě pražených kávových zrn. Testovací skupina vyhodnotila kávu připravenou ze středně pražených kávových zrn jako vzorek s nejvíce příjemnou vůní. Káva připravená z tmavě pražených kávových zrn byla nejlépe hodnocena při posuzování příchutě (Graf 9). Dalším sledovaným parametrem byla kyselost (acidita). Z hlediska tohoto parametru byly nejlépe hodnoceny vzorky káv připravené ze zelených zrn a tmavě pražených zrn. Nejhůře byl hodnocen vzorek kávy připravené z lehce praženého stádia, jak můžeme vidět na Grafu 10. Poslední dvě kategorie zahrnovaly hodnocení těla kávy (Graf 11) a doznívání chuti (Graf 12).

Vzorky kávy připravené ze středně a tmavě pražených zrn získaly nejvyšší hodnocení při posuzování těla kávy. Káva připravená z tmavě pražených zrn získala také nejvyšší hodnocení při posuzování perzistence (doznívání chuti).

Dle celkového porovnání káv typu espresso z různě pražených kávových zrn nejlépe dopadla káva připravená z tmavě pražených kávových zrn. Ostatní kávy byly hodnoceny spíše negativně. Zajímavé je uspokojivé hodnocení kávy připravené ze zelených zrn (Graf 13).

5 Závěr

V průběhu pražícího procesu při výrobě kávy dochází k rozkladu látek přirozeně přítomných zelených zrnech a vzniku látek nových. Připravené vzorky espressa ze čtyř různých stádií pražení – lehce, středně, tmavě pražené a přepražené, byly analyzovány pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Na vzorcích byl sledován vliv pražení na profil látek následně extrahovatelných do kávového nápoje (espressa). Výrazné změny v koncentraci byly pozorovány u chlorogenových kyselin, hlavních antioxidantů obsažených v kávě. Obsah chlorogenových kyselin v průběhu pražení klesal. Zároveň dochází k nárůstu koncentrace laktonů kaffeoylchinových kyselin (CQL_1 a CQL_2) a laktonu feruloylchinové kyseliny (FQL_2), které vznikaly v důsledku ztráty molekuly vody z chlorogenových kyselin. Naměřená LC/MS data byla následně zpracována programem MarkerLynx a „filtrovaná data“ (seznam markerů odpovědných za rozdíly mezi studovanými vzorky) by vyhodnocen pomocí analýzy hlavních komponent. Tímto postupem byly zevrubně popsány odlišnosti v jednotlivých vzorcích kávy připravené z různě pražených kávových zrn odrůdy *Coffea arabica L.* Studiem zpracovaných dat a detailní interpretací hmotnostních spekter bylo nalezeno šest specifických látek, které můžeme označit jako markery jednotlivých stádií pražení. Tyto látky nám dovolují rozlišit jednotlivá stádia pražení v závislosti na přítomnosti těchto látek. Látky s m/z = 773,3184 a 660,3337 jsou specifickými markery pro lehce a středně praženou kávu. V tmavě pražené kávě se tyto dvě látky vyskytují pouze ve stopových množstvích a v přepražené kávě nebyly detekovány. MS/MS spektra těchto látek odpovídají derivátům atraktylosidů. Pro tmavě praženou a přepraženou kávu byly nalezeny čtyři jednoznačné markery. Jedná se o látky s m/z 319,1897; 388,1887; 552,2884 a 651,3359. Marker s m/z 319,1897 byl identifikován jako aglykon atraktylosidů – atraktyligenin. Ze zbylých tří markerů byl dokonale popsán pouze marker s m/z 388,1887. Jedná se o tři aminokyseliny spojené peptidickou vazbou – leucin a/nebo isoleucin, fenylalanin a glutamin po ztrátě molekuly vody (dehydratovaný tripeptid). Látky s m/z 651,3359 a 551,2859 obsahují dle MS/MS experimentů také aminokyseliny. Detailnímu popisu struktur těchto látek bude věnován další výzkum.

Vzorky espressa připravené z různě pražených a zelených kávových zrn byly současně analyzovány pomocí organoleptických zkoušek skupinou 15 lidí. Testovací skupina hodnotila u jednotlivých káv kyselost, vůni, tělo (chuť), příchuť, doznívání a celkový dojem. Nejlépe byla hodnocena káva připravená z tmavě pražených kávových zrn, což je pravděpodobně způsobeno tím, že většina kávových zrn na evropském trhu je tmavě pražena a konzumenti kávy jsou na tuto chuť již

navyklí. Pro lidský organismus je ovšem takto pražená káva méně přínosná než lehce pražená káva, která, jak ukazují i výsledky této studie si zachovává výrazně větší množství antioxidantů - chlorogenových kyselin.

Literatura

[1] Oestreich-Janzen, S., Chemistry of Coffee in: Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology: 10 Volume Set, L. Mander and H.-W. Liu, Elsevier Science, 2010.

[2] Borrelli, R.C., a kol., J. Agric. Food Chem., 2002, 50(22), p. 6527-6533.

[3] Cague, R., Millard, M., Gibson, D., Beyond the Bean: Redefining Coffee Quality, Chemomics International Inc., Washington, 2009.

[4] Farah, A., Donangelo, C.M., Braz. J. Plant Physiol., 2006, 18(1), p. 23-36.

[5] Basurto-Islas, G., a kol., Neurobiol. Aging, 2014, 35(12), p. 2701-2712.

[6] Feng, R.T., a kol., J. Biol. Chem., 2005, 280(30), p. 27888-27895.

[7] Nunes, F.M., Coimbra, M.A., J. Agric. Food Chem., 2007, 55(10), p. 3967-3977.

[8] Petracco, M., Organoleptic Properties of Espresso Coffee as Influenced by Coffee Botanical Variety, in Coffee Biotechnology and Quality, T. Sera, et al., Springer Netherlands, 2000.

[9] Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., Coffee, Tea, Cocoa. Vatican Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2009.

[10] Weinberg, B. A., Bealer, B. K., The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug, Routledge, New York, 2001.

[11] Clifford, M.N., Willson, K.C., Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverage. Croom Helm, London, 1985.

[12] Davis, A. P., Adansonia, 2001, 23(2), p. 337-345.

[13] Neznámý, Coffee species: Arabica, Robusta and Liberica, citováno 1. 7. 2014, dostupné online na: http://rashyidramli93.wordpress.com/2013/09/30/coffee-species-arabica-robusta-and-liberica/

[14] Illy, A. a Viani, R., Espresso Coffee: The Chemistry of Quality Londres, UK, 1995: Academic Press.

[15] Schenker, S. R., Investigations on the Hot Air Roasting of Coffee Beans, Swiss Federal Institute of Technology, Curych, 2000.

[16] Eggers, R., Pietsch, A., Coffee: Recent Developments, Blackwell Science Ltd, Oxford, 2001.

[17] Schenker, S. a kol., J. Food Sci., 2002, 67(1), 60-66.

[18] Baggenstoss, J. a kol., J. Agric. Food Chem., 2008, 56(14),5836-5846.

[19] Sivetz, M, Growth in use of automated fluid bed roasting of coffee beans. In In 14th International Scientific Colloquium on Coffee, USA, 1991.

[20] Rothstein, S. B, The Coffee FAQ – Brewing Techniques, citováno 11. 11. 2014, dostupné na: http://www.thecoffeefaq.com

[21] Russwurm, H. J., Fractionation and analysis of aroma precursors in green coffee. In Fourth International Colloquium on the Chemistry of Coffee pp. 103-107. Amsterdam, 1970

[22] Flament, I., Coffee flavor chemistry, John Wiley & Sons, Geneva 2002.

[23] Shibamoto, T., An Overview of Coffee Aroma and Flavour Chemistry. In In 14th International Scientific Colloquium on Coffee, 107-116. San Francisco, USA, 1991.

[24] Czerny, M., Mayer, F., Grosch, W., J. Agric. Food Chem., 1999, 47(2), 695-699.

[25] Tono, T., Fujita, S., Kawabe, M., J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol., 1989, 36(7), p. 587-591.

[26] Trugo, L.C., Macrae, R., Food Chem., 1984, 15(3), p. 219-227.

[27] Kono, Y., a kol., Biochim. Biophys. Acta, 1997, 1335(3), p. 335-342.

[28] Luzia, M.R., a kol., Int. J. Food Sci. Tech., 1997, 32(1), p. 15-19.

[29] Herling, A.W., a kol., Diabetes, 1998, 47, p. A293-A293.

[30] Shearer, J., a kol., J. Nutr., 2003, 133(11), p. 3529-3532.

[31] Arion, W.J., a kol., Arch. Biochem. Biophys., 1997, 339(2), p. 315-322.

[32] Robinson, W.E., a kol., Mol. Pharmacol., 1996, 50(4), p. 846-855.

[33] Robinson, W.E., a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93(13), p. 6326-6331.

[34] McDougall, B., a kol., Antimicrob. Agents Chemother., 1998, 42(1), p. 140-146.

[35] Trute, A., a kol., Planta Med., 1997, 63(2), p. 125-129.

[36] Stich, H.F., Rosin, M.P., Bryson, L., Mutat. Res., 1982, 95(2-3), p. 119-128.

[37] de Paulis, T., a kol., Eur. J. Pharmacol., 2002, 442(3), p. 215-223.

[38] Wynne, K.N., a kol., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1987, 14(10), p. 785-790

[39] Boublik, J.H., a kol., Nature, 1983. 301(5897), p. 246-248.

[40] de Paulis, T., a kol., , Psychopharmacology, 2004, 176(2), p. 146-153.

[41] Frank, O., Zehentbauer, G., Hofmann, T., Eur. Res. Food Technol., 2006, 222(5-6), p. 492-508.

[42] Velíšek, J., Cejpek, K., Biosynthesis of Food Components, OSSIS, Tábor 2008

[43] Spindel, E., a kol., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1980. 214(1): p. 58-62.

[44] Elmazar, M.M.A., McElhatton, P.R., Sullivan, F.M., Toxicology, 1982, 23(1), p. 57-71.

[45] Lang, R., a kol., Phytochem., 2013, 93, p. 124-135.

[46] Lefranc, M., Compt. Rend. 1868, 67, p. 954–961.

[47] Santi, R., Cascio, G., Arch. Ital. Sci. Farmacol., 1955, 5, 534–563.

[48] Capdevielle, P., Darracq, R., Med. Trop. 1980;40(2), p. 137–142.

[49] Georgiou, M., Siandidou, L., Hatzis, T., Papadatos, .J, Koutselinis, A., Clin. Toxicol. 1988, 26, p. 487–93.

[50] Piozzi, F., The chemistry of atractyloside. In: Santi R, Luciani S, Atractyloside: chemistry, biochemistry and toxicology, Piccin Medical Books, Padova 1978, 13–32.

[51] Piozzi, F., Quilico, A., Mondelli, R., Ajello, T., Sprio, V., Melera, A., Tetrahedron 1966, 11(8), p. 515–28.

[52] Bruni, A., Contessa, A., Luciani, S., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 60, 301–311.

[53] Cascio, G., Mantia, G., Mazza, A., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1968, 44(4), p. 253–257.

[54] Bye, S., Dutton, M., J. Ethnopharmacol., 1991, 34, p. 253–259.

[55] Brookes, K., Candy, H., Pegel, K., S. Afr. J. Chem., 1983, 36(2), p. 65–68.

[56] Brookes, K., A chemical study of the rootstock of Callilepis laureola, Diplomová práce, University of Natal, Durban 1979.

[57] Vignais, P, Duee, E, Vignais, P, Huet, J., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 118, p. 465–483.

[58] Heldt, H, Jacobs, H, Klingenberg, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1965, 18, p. 174–179.

[59] Luciani S, Carpenedo F, Tarjan E. Effects of atractyloside and carboxyatractyloside in the whole animal. In: Santi R, Luciani S, Atractyloside: chemistry, biochemistry and toxicology, Piccin Medical Books, Padova 1978.

[60] Vignais P, Vignais P, Defaye C. Structure-activity relationship of atractyloside and diterpenoid derivatives on oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocation in mitochondria. In: Santi R, Luciani S, Atractyloside: chemistry, biochemistry and toxicology, Piccin Medical Books, Padova 1978.

[61] Matzel, U., Maier, G. Z. Lebensm. Unters. Forsch, 1978, 176, p. 281-284

[62] Ludwig, H., Obermann, H., Spiteller, G., Chem. Ber., 1974, 107, p. 2409-2424.

[63] Obermann, H., Spiteller, G., Chem Ber., 1976, 109, p. 3450-3461.

[64] Alves, R.C., a kol., J. Agric. Food Chem., 2010. 58(23): p. 12221-12229.

[65] Farah, A., a kol., J. Agric. Food Chem., 2005. 53(5): p. 1505-1513.

[66] Correia, A.M.N.G., Leitao, M.C.A., Clifford, M.N., Food Chem., 1995. 53(3): p. 309-313.

[67] Jaiswal, R., a kol., Food Funct., 2012. 3(9): p. 976-984.

[68] Moon, J.K., Yoo, H.S., Shibamoto, T., J. Agric. Food Chem., 2009. 57(12): p. 5365-5369.

[69] Rodrigues, N.P., Bragagnolo, N., Journal of Food Composition and Analysis, 2013. 32(2): p. 105-115.

[70] Stalmach, A., a kol., Braz. J. Plant. Fyziol., 2006. 18(1): p. 253-261.

Seznam použitých zkratek

ATR	atraktylosid
CFQA	kaffeoyl-feruloylchinová kyselina
CGA	chlorogenová kyselina
CGL	lakton kyseliny chlorogenové
CQA	kaffeoylchinová kyselina
CQL	lakton kaffeoylchinové kyseliny
DAD	diodové pole
diCQA	dikaffeoylchinová kyselina
diCQL	lakton dikaffeoylchinové kyseliny
diFQA	diferuloylchinová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
FQA	feruloylchinová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
PCA	analýza hlavních komponent
pCo-CQA	p-kumaroyl-kaffeoylchinová kyselina
pCoQA	p-kumaroychinová kyselina
PTFE	polytetrafluorethylen
UPLC	ultra-účinná kapalinová chromatografie

Příloha 1

FORMULÁŘ PRO SENZORICKOU ANALÝZU KÁVY

Věk..... Datum..... Pohlaví..... Čas.....

Určete senzorickou jakost vzorku pomocí uvedené bodové stupnice:

1 - jakost vynikající

2- jakost střední, průměrná

3 - jakost uspokojivá

4 - jakost mírně horší než průměrná

5 - jakost špatná, nevyhovující

Vzorek.....

Hodnocení vůně

zakroužkujte své hodnocení 1 2 3 4 5

Hodnocení acidity

zakroužkujte své hodnocení 1 2 3 4 5

Hodnocení chutě – tělo kávy

zakroužkujte své hodnocení 1 2 3 4 5

Hodnocení příchutě

zakroužkujte své hodnocení 1 2 3 4 5

Hodnocení doznívání

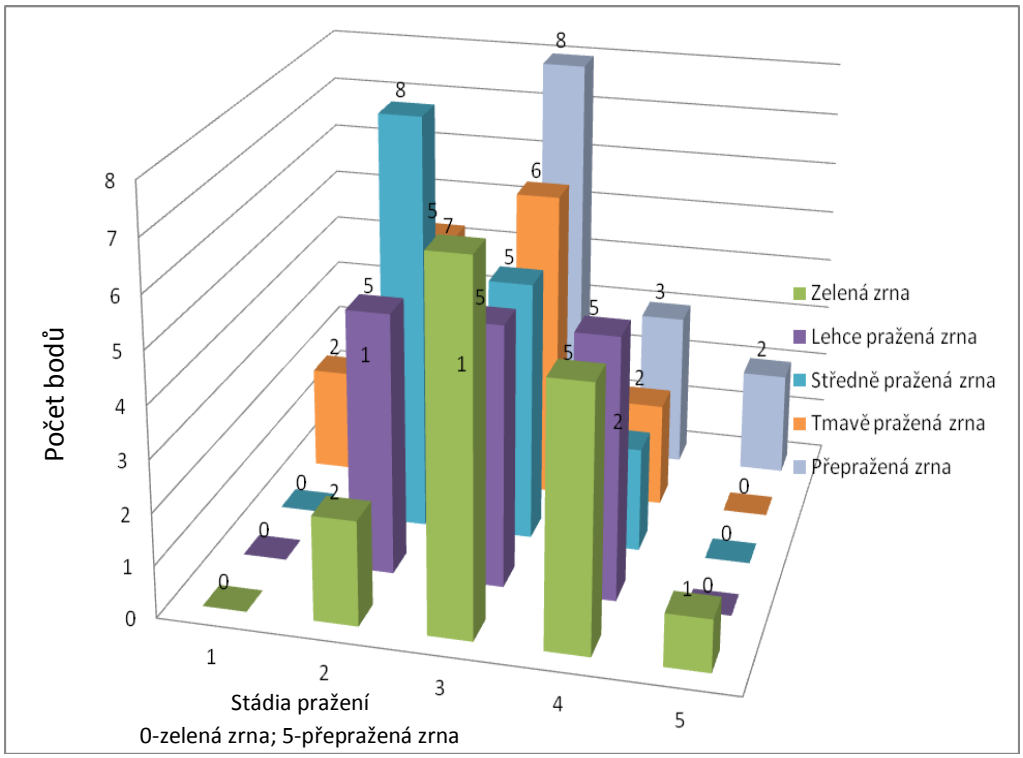
zakroužkujte své hodnocení 1 2 3 4 5

Celkové hodnocení

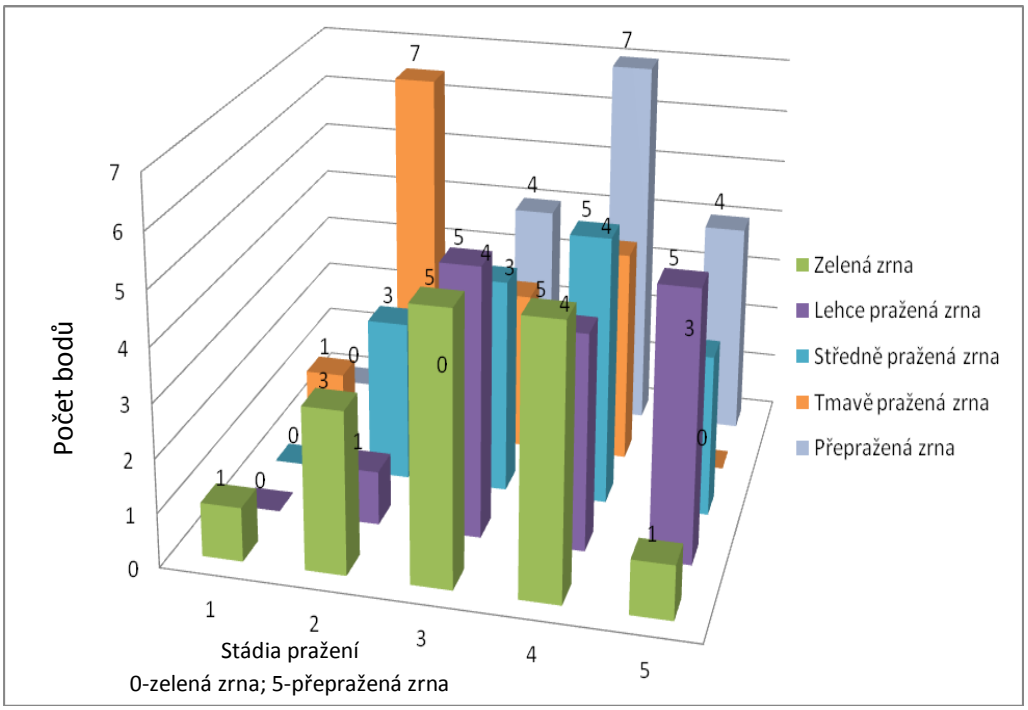
zakroužkujte své hodnocení 1 2 3 4 5

Příloha 2

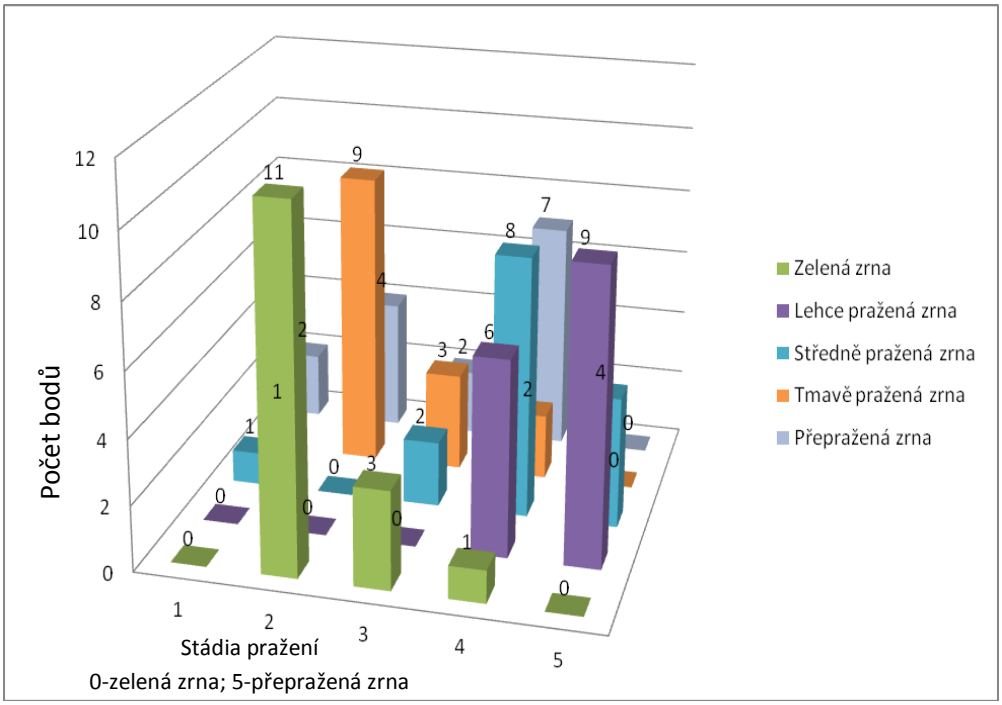
Graf 8: Hodnocení vůně



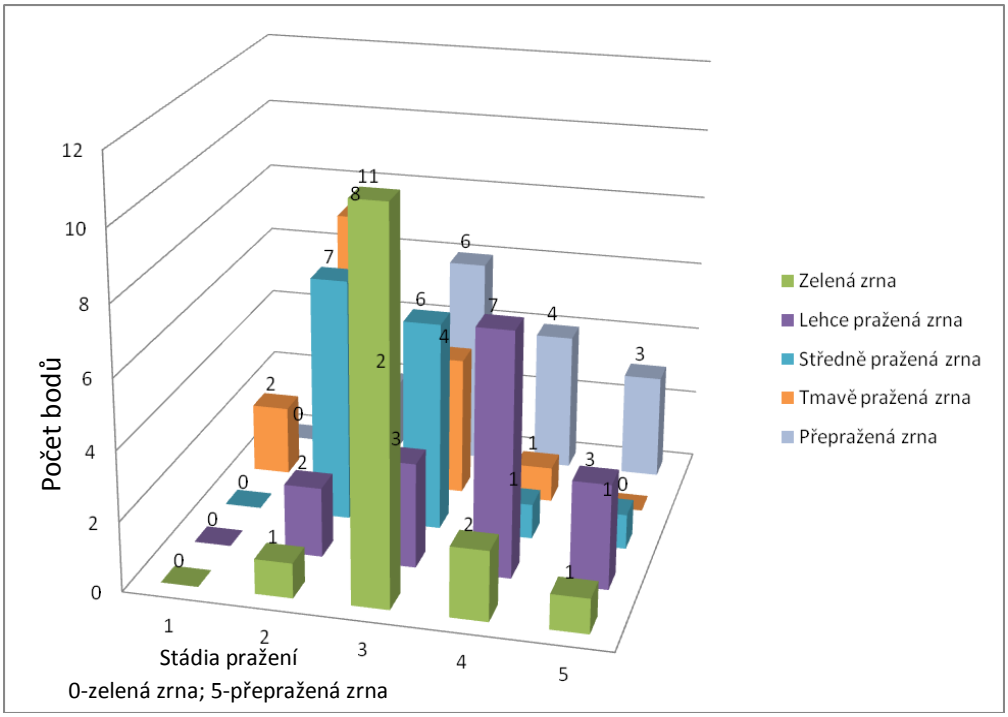
Graf 9: Hodnocení příchutě



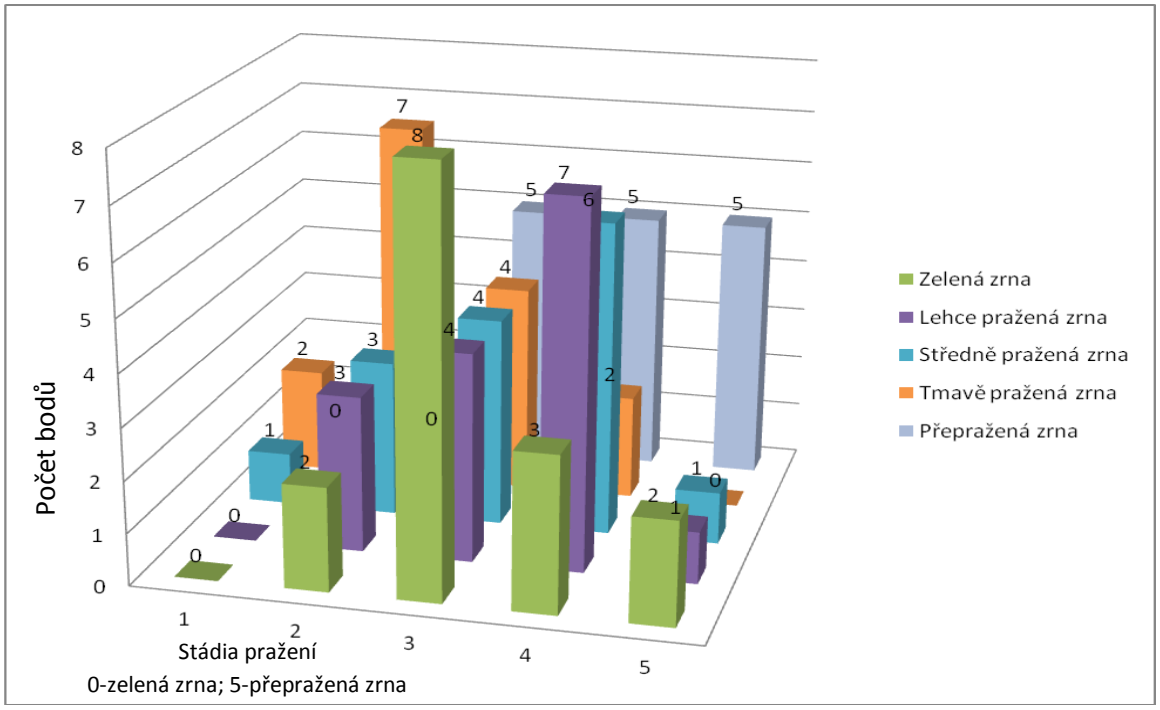
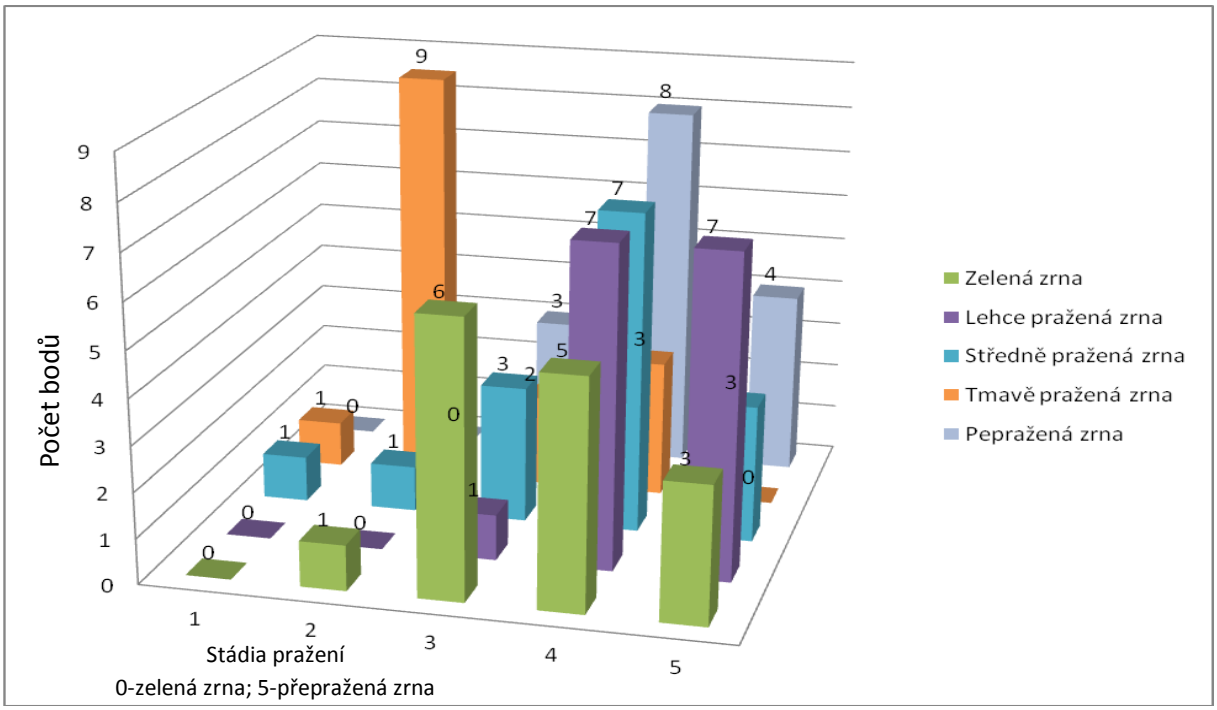
Graf 10: Hodnocení acidity



Graf 11: Hodnocení těla



Graf 12: Honocení doznívání



Graf 13: Celkové hodnocení