

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**MOŽNOSTI VIBRAČNÍ SPEKTROMETRIE
V ANALÝZE KÁVY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Martin Kuba

Studijní obor:

B 1407 chemie

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. David Milde, Ph. D.

Olomouc 2010

SOUHRN

Tato práce se zabývá možnostmi molekulové vibrační spektrometrie v analýze kávy. V úvodní části je popsáno pěstování kávy, pražení zrn, závěrečná příprava kávových nápojů a hlavní rozdíly mezi nejčastěji pěstovanými druhy. Charakterizuje kofein z chemického hlediska a jako účinnou látku a jeho zastoupení v různých, běžně dostupných výrobcích. Uvádí základní principy používaných metod a instrumentální uspořádání přístrojů se zaměřením na nejpoužívanější druhy. V práci jsou zpracovány doposud provedené aplikace molekulové vibrační spektrometrie v oblasti analýzy kávy. Součástí práce je i experimentální část, která zkoumá kvalitativní změny, které nastávají při přípravě vařené kávy.

SUMMARY

This work concerns with the possibilities of molecular vibrational spektrometry in coffee analysis. Firstly, the growing of coffee, beans roasting, and coffee drinks preparation are described as well as the main differences between the most popular coffee types. Furthermore, caffeine is characterized as a chemical substance and as an effective matter, along with its distribution in forms of various, widely available products. This thesis shows the main principles of used methods and instruments arrangement with a focus on the most used types of coffee. Also, the performed applications of molecular vibrational spektrometry in coffee analysis conducted up until today are discussed. Finally, there is an experimental part, which investigates the qualitative changes occurring during the preparation of coffee drinks.

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Davidu Mildemu, Ph. D. za zájem, cenné rady a čas, který věnoval mé práci.

Poděkování patří rovněž mé rodině za jejich podporu po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 O kávě	2
2.1.1 Historie kávy.....	2
2.1.2 Pěstování kávy.....	2
2.1.3 Pražení zrn.....	3
2.1.4 Arabika a robota.....	4
2.1.5 Kofein jako účinná látka.....	5
2.1.6 Příprava kávy.....	7
2.2. Instrumentace.....	9
2.2.1 Princip molekulové spektrometrie.....	9
2.2.2 Infračervené spektrometry.....	11
2.2.3 Ramanovy spektrometry.....	15
2.3. Využití molekulové vibrační spektrometrie v analýze kávy.....	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 Přístrojové vybavení.....	21
3.2 Příprava vzorků.....	22
3.3 Použité chemikálie.....	22
4. VYHODNOCENÍ.....	23
5. ZÁVĚR	29
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	30
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	31

1. ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá možnostmi využití metod molekulové vibrační spektrometrie v analýze kávy a kávových produktů.

Kávu bychom mohli definovat jako horký nápoj připravený z vody a tepelně upravených semen kávovníku. Je jedním ze světově nejznámějších nápojů a má značný komerční i společenský význam. Nejdůležitější a nejznámější látkou, obsaženou v kávě je kofein, pro jehož stimulační účinky na lidský organismus, je káva především konzumována. Pěstování, výroba a příprava kávy jsou složité procesy. Například při pražení kávy dochází vlivem teploty k chemickým změnám, které ovlivňují výslednou chuť a vůni kávy. Proto jsou tyto procesy často námětem odborných prací, stejně jako rozlišení jednotlivých druhů kávy, které se mezi sebou liší v kvalitě i ceně.

Experimentální část této práce se zabývá kvalitativními změnami v infračervených spektrech, které nastávají při přípravě různých druhů vařené kávy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 O KÁVĚ

2.1.1 Historie kávy¹

O objevení kávy a jejích účinků se traduje celá řada legend a příběhů. Historikové zabývající se problematikou původu kávy se shodují, že původní zemí odkud se káva rozšířila, je dnešní Etiopie a Jemen. Tyto dvě oblasti jsou dnes také jedinými lokalitami, kde kávovník volně roste v přirozeném prostředí. O rozšíření kávy do celého světa se v počátcích zasloužil především Jemen, který byl dříve jedním z nejušnějších míst světa, odkud kávu cizinci a obchodníci rozšířili dále. S jistotou můžeme tvrdit, že již v 15. století se káva v Jemenu pěstovala a v 16. století byla známa po celé oblasti orientu. O masové rozšíření kávy po celém světě, se zasloužily zejména koloniální velmoci, jako byla Francie a zejména Holandsko, které začalo pěstovat kávu ve svých koloniích v Indonésii. Do Ameriky, odkud se potom dostala i do Brazílie, přivezli kávovník Francouzi. V 19. století již byla káva téměř celosvětově rozšířena. Dnes se káva pěstuje ve velkém množství na celém světě.

2.1.2 Pěstování kávovníků

Z botanického hlediska řadíme kávovníky do čeledi Mořenovité (lat. Rubiaceae), rodu *Coffea*. V němž se vyskytuje asi 60 druhů kávy, které se od sebe více či méně liší. Ne všechny z těchto druhů se pěstují pro komerční využití. Nejrozšířenějším druhem je *Coffea arabica*, *Coffea canephora* (robusta), *Coffea excelsa* a *Coffea liberica* (česky káva arabika, robusta, excelsa a káva liberica^{2, 5}). Tyto druhy tvoří více jak 95 % celkové světové produkce kávy. Z nichž 70 % připadá na kávu arabika 25 % na kávu robusta². V současné době pochází většina produkce kávy z jižní Ameriky, asi z jedné čtvrtiny z Afriky a zbytek z jiných menších oblastí. Kávovníky se pěstují v největší míře v tropickém a subtropickém pásmu. Optimální roční teplota pro pěstování arabiky je 17 až 24 °C a pro pěstování robusty 24 - 30 °C. Pokud teplota klesne pod bod mrazu, rostliny hynou. Důležitý je také celkový úhrn srážek minimálně 152 cm za rok a 90 % vlhkost. Pěstování kávovníků vyžaduje i příznivou nadmořskou výšku. Podle teploty a vlhkosti, se kávovníky mohou pěstovat

v nadmořských výškách nad 1000 m, ale stejně tak i téměř na úrovni mořské hladiny. Velmi důležitým aspektem při pěstování kávovníků je hnojení organickými hnojivy, zastíňování (zejména pro mladé rostliny), prořezávání a šlechtění^{1,2}.

Převaha druhů arabiky a robusty není dílem náhody. Pěstují se zejména kvůli dobré odolnosti vůči škůdcům. Nejodolnější odrůdou je robusta, která lépe odolává různým onemocněním a nepřízní počasí. Mezi největší škůdce patří cizopasná houba *Hamileia vastatrix*, která napadá listovou zeleň, a brouk *Stephanoderes coffea* (tzv. kávový brouk), který napadá zejména plody, ale také listy kávovníku. Kávovníky se dožívají velmi vysokého věku až třiceti let, v tomto období ale již neposkytují tak vysoké výnosy plodů¹.

Důležitou součástí pěstování kávovníku je sběr kávových zrn. První úrodu kávovníky poskytují 4 - 5 let po výsadbě. Zralá bobule má jasně červenou, lesklou barvu. Sklizeň bývá většinou jen jednou do roka, jelikož kávová zrna zrají v rozmezí 8 - 11 měsíců, v závislosti na konkrétní odrůdě. Samotný sběr je pak nutné provést v období, kdy jsou plody optimálně zralé. Přezralá nebo nezralá semena se nedají k dalšímu zpracování použít. Sběr je prováděn dvěma základními způsoby. Prvním způsobem je „pásové“ trhání, při tomto způsobu sběru je veškerá úroda posbírána najednou. Druhý způsob „výběrový“ je ekonomicky více náročný, sbírají se při něm jen ty nejvíce zralé plody v intervalu několika dní, tato metoda se používá jen při sběru arabiky¹.

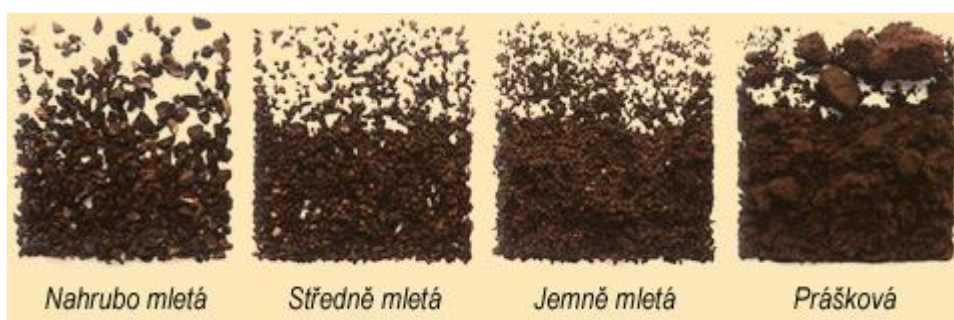
2.1.3 Pražení zrn

Poté, co jsou kávovníkové plody správně usušeny a roztříděny, exportují se ke koncovému zpracování. Pražení je jedním z nejdůležitějších kroků. Při nesprávném postupu totiž může dojít k totálnímu znehodnocení zrn. Tato oblast zpracování kávy byla dosud nejvíce prozkoumána. Pražení má na starosti speciálně vyškolený člověk – pražič. Aby káva byla dobře upražená, musí jít o zkušeného odborníka, který dokáže kávu vnímat všemi smysly a dokáže včas zastavit, popř. prodloužit pražicí proces. Při pražení kávy se používá ustálená terminologie. Stupeň a tedy i míru upražení kávy můžeme rozdělit do tří základních skupin, které se podle potřeby a zvyklostí mohou ještě dále anebo i jinak dělit. Upražení kávy může být „nízké“, „střední“ a „vysoké“. Používají se i označení podle vzhledu kávového zrna jako „světlé“, „střední“ a „tmavé“ (Obr. 1). Pro různé druhy káv jsou dobré různé stupně upražení. Také záleží na místních zvyklostech. Ve skandinávských zemích jsou upřednostňována světle pražená zrnka, naopak v Itálii mají rádi tmavě praženou kávu.

Takto zpracovaná zrna musí být před samotnou konzumací pomlety (Obr. 2). Při mletí zejména důležité dávat pozor, aby se kávová zrnka nepřehřívala, nepřipálila a nedošlo tak k poškození kvality¹.



Obr. 1. Různě upražená zrnka kávy (převzato z cit.⁵)



Obr. 2. Různým způsobem pomletá zrnka kávy (převzato z cit.⁵)

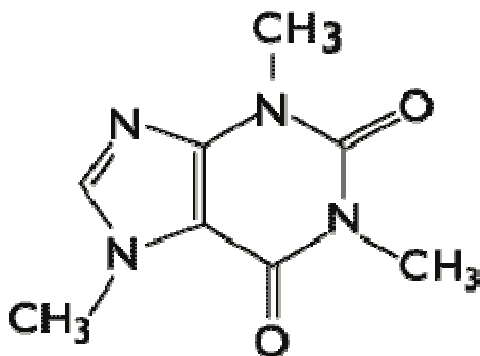
Po upražení zrn je nutné je včas ochladit. Chlazení kávových zrn se provádí na chladicích sítích, kde se zrno ochlazuje studeným vzduchem, čímž dochází k ukončení pražicích procesů. Rychlé chlazení zrn je velice důležité pro zachování vůně a kvality. Po upražení ztrácejí zrna část svojí hmotností, ovšem nabírají až 40 % na objemu¹.

2.1.4 Arabika a robusta²

Kávovník arabika bývá pěstován obvykle v hornatých oblastech (500 - 2000 m), v těchto oblastech je chladněji, ale nižší vlhkost zabraňuje výskytu škůdců. Kávovník robusta bývá obvykle pěstován ve vlhkých a teplých oblastech (200 - 500 m). Obecně se považuje arabika za ušlechtlejší druh kávy, který je jemný, voňavý a mírně kyselý, ovšem obsahuje méně kofeinu než silnější a hořčejší robusta. Arabika je aromatictější, jelikož se pěstuje ve vyšších nadmořských výškách. Výsledné kávové produkty dostupné na trhu, jsou často směsí výše uvedených druhů.

2.1.5 Kofein jako účinná látka

Chemický název kofeinu je 1,3,7 – trimethylxantin (Obr.3), náleží k methylovým derivátům xantinu, jehož chemický název je 2,6 - dihydroxypurin. Spolu s kofeinem patří mezi deriváty xantinu i další známé látky stimulující nervový systém, například v čaji obsažený theophyllin a v čokoládě teobromin³.



Obr. 3. *Strukturní vzorec kofeinu.*

Působení kofeinu na lidský organismus je velice složitý proces. Kofein je svou strukturou velice podobný adenosinu. Adenosin se v lidském těle uvolňuje při únavě nebo před spánkem a má za následek zpomalení nervové aktivity a rozšíření cév. Kofein, který se váže na stejné receptory jako adenosin, je schopen spánek a únavu oddálit. Také zapříčiňuje zúžení cév, což má za následek vzrůst krevního tlaku. Zvýšená mozková aktivita poté stimuluje nadledvinky, které začnou produkovat hormon adrenalin, který podporuje srdeční činnost a prohlubuje dýchání. Kofein taktéž zvyšuje koncentraci dopaminu, což je látka podporující přenos nervového vzruchu v mozku a vzbuzuje pocit spokojenosti a štěstí². V jakých volně dostupných výrobcích a v jakém množství se může náš organismus setkat s kofeinem, uvádí tabulka níže (Tab. II).

Rostliny kávovníků používají kofein jako prostředek obrany. Z celé rostliny je nejvíce kofeinu obsaženo v kávovém bobu. Kofein tu slouží jako účinná obranná látka. Po dozrání semene a jeho pádu na zem, se kofein začne louhovat do okolní půdy, kde blokuje růst ostatních rostlin a tím vytvoří kávovému semenu dostatek prostoru pro nový růst². Káva obsahuje kromě kofeinu i velké množství zejména organických látek (Tab. I).

Tabulka I: Látky obsažené v kávě. (převzato z cit.¹)

Přítomná látka	Obsah v hmotnostních %		Sloučeniny
	C. arabica	C. robusta	
sacharidy rozpustné	55 až 65	40 až 55	glukózy, galaktózy, arabinóza, sacharóza
sacharidy nerozpustné	33 až 35		polymery, manózy, galaktózy, arabinózy, polysacharidy: manán, celulózy
kyseliny a fenoly	8 až 11	9 až 17	-
prchavé kyseliny	0,1		kyselina octová, propionová, máslová, valerová
neprchavé kyseliny	2 až 2,9	1,3 až 2,2	kyselina citrónová, malonová, chinová, kávová
chlorgénové kyseliny	6,7 až 9,3	7,1 až 12,1	-
lipidické sloučeniny	15 až 18	8 až 12	kafestol, kahweol
vosky	0,2 až 0,3		
oleje	7,7 až 17,18		převážně estery kyseliny palmitové a stearové
dusíkaté sloučeniny	11 až 15		-
volné aminokyseliny	0,2 až 0,8		kys. glutamová, aspartová, asparagin
bílkoviny	8,5 až 12		-
kofein	0,8 až 1,4	1,4 až 4,0	-
trigonellin	0,6 až 1,2	0,3 až 0,9	-
minerální látky	3,0 až 5,4		draslík, vápník, fosfor, železo, hořčík

Tabulka II: Průměrné množství kofeinu v šálku kávy (cca 100 ml) a v některých oblíbených sycených nealkoholických nápojích (cca 150 ml). (převzato z cit.¹)

Výrobek	mg kofeinu
Káva překapávaná	115 - 175
espresso	100
Turecká káva	80-135
Instantní káva	60-100
Bezkofeinová turecká káva	3-4
Bezkofeinová instantní káva	2-3
Ledový čaj	70
Čaj čerstvě vyluhovaný	60
Nápoj Coca-Cola	45,6
Cola light s umělým sladidlem (dietní)	45,6
Nápoj Dr. Pepper	39,6
Nápoj Pepsi – Cola	37,2
Pepsi – Cola light s umělým sladidlem	35,4
Sycený nealko nápoj „NESPI“	36
Kakao	6

2.1.7 Způsoby přípravy kávy

Pomletím kávových zrněk ještě cesta ke konečnému spotřebiteli nekončí. Chuť a aroma výsledného šálku kávy může z velké části ovlivnit způsob, jakým je káva připravena, uvařena.

Turecká káva

Je nejznámější druh přípravy kávy, způsob přípravy je již po staletí stále stejný. Mezi širokou veřejností je známá jako „turek“, který se připravuje pouhým zalitím rozemleté kávy vroucí vodou. Při správném a tradičním způsobu přípravy se ale používá malá mosazná nádoba s dlouhým drždlem, zvaná džezva a káva se během přípravy přivede třikrát k varu¹.

Mokka

Tento druh kávy je uvařen z jemně mletých kávovníkových zrn, smíchaných s cukrem, které před konzumací projdou třikrát varem¹.

Espresso

Espresso je hustá, aromatická, silná, velmi tmavě upražená káva. Při tomto způsobu přípravy kávy je vodní pára pod tlakem protlačována přes velmi jemně namletá pražená kávová zrna. To podporuje uvolnění těkavých aromatických látek, které způsobují charakteristickou vůni espressa. Takto připravená káva má vynikající, jemnou chuť, která dlouho setrvává v ústech i po jejím vypití^{1, 2, 4}.

Cappuccino

Cappuccino, či česky "kapučíno", je silná černá káva s našlehaným mlékem, poprášená mletou skořicí. Jméno Cappuccino je italského původu. Vzniklo připodobněním tohoto nápoje k tvarově unikátním kapucím, které nosili mniši kapucíni, příslušníci římskokatolického řádu. A právě ona kápě se začala používat k popisu pěny, která se tvoří na povrchu Cappuccina⁴.

Instantní (rozpustná) káva

Instantní neboli rozpustná káva vyniká svou jednoduchostí přípravy, po zalití vroucí vodou totiž na dně šálku nevzniká nežádoucí nepoživatelná usazenina, jako je tomu u turecké kávy. Tohoto se docílí pomocí speciálního způsobu přípravy. Tekutá káva připravená z vody a mletých pražených kávových zrn se po přefiltrování zmrazí na - 40 °C. Poté projde procesem tzv. mrazové sublimace (lyofilizace), kdy se odpaří se zmražená voda za velmi nízkého tlaku. Vzniklý prášek si zachovává většinu původních látek i aroma kávy. Kvalita takto připravené kávy závisí samozřejmě na použitých surovinách, ale i na správně provedené lyofilizaci².

Bezkofeinová káva

Je káva se sníženým obsahem kofeinu, která během přípravy prochází procesem dekofeinace (odstranění kofeinu). Tento proces je aplikován již na zelená kávová zrna.

V závislosti na způsobu provedení dekofeinace, lze získat kávové boby s obsahem kofeinu sníženým až o 97 % oproti původnímu obsahu. Dekofeinace se může provádět několika způsoby. Nepřímá metoda je založená na louhování kofeinu pomocí organických rozpouštědel (metylchlorid, etylacetát), během této metody jsou zrna nejdříve napařována vodními parami, aby došlo k jejich rozevření a tím i zvětšení povrchu. Další metoda se nazývá „mokrá“, principem je namáčení zrn ve vodě, kde se vylouhuje kofein, který je zachytáván na aktivovaných uhlíkových filtrech. Zbývá voda, obsahující vonné látky, se zkoncentruje a postříkají se jí usušená kávová zrna. Všechny používané dekofeinační procesy mají negativní vliv na kvalitu kávy, jelikož výsledná káva většinou obsahuje chemické náhražky vonných látek, které se během procesu vytratily, a některé látky se při procesu mohou zcela vytratit. Z výše uvedeného plyne, že bezkofeinová káva se kromě obsahu kofeinu liší i v chuti a aroma¹.

2.2 INSTRUMENTACE

2.2.1 Princip molekulové spektrometrie

Záření, používané v molekulové spektrometrii, nemá tolik energie, aby dokázalo vybudit elektron do vyššího energetického stavu, ale má dostatek energie, aby změnilo vibrační nebo rotační stavy molekul. Pro zjednodušení popisu vibrací molekul v kondenzovaném stavu byla zavedena aproximace, kdy molekuly v kondenzovaném stavu nemohou rotovat⁵.

Molekulové vibrace a rotace

Atom, nacházející se v kartézské soustavě souřadnic, se může pohybovat podél všech 3 os a přiřazujeme mu tedy 3 stupně volnosti. Předpokládáme-li, že v systému se nachází n atomů, můžeme počet stupňů volnosti vyjádřit jako $3n$. V případě, že jsou atomy vázány v molekulách, není jejich pohyb nezávislý, jelikož vibruje celá molekula. Do výpočtu stupňů volnosti je nutno zahrnout navíc i 3 souřadnice pro popis rotace a 3 souřadnice pro popis těžiště molekuly. Tedy nelineární molekula má $3n - 6$ stupňů volnosti. U lineárních molekul vypočítáme počet stupňů volnosti jako $3n - 5$, jelikož odpadá význam rotace podél osy⁵.

Pro popis vibračních pohybů atomů v molekulách slouží model harmonického oscilátoru. Ve skutečnosti se ale molekuly chovají jako anharmonické oscilátory, jelikož u harmonického oscilátoru nemůže dojít k přetržení vazeb a disociaci. Při laboratorní teplotě se většina molekul (99 %) nachází v základním stavu $v = 0$ (vibrační kvantové číslo). Do vyššího energetického stavu se může dostat pomocí dovolených přechodů. Přejed od základního stavu, do stav $v = 1$ se nazývá fundamentální, pokud nastane přechod z $v = 1$ do $v = 2$, jedná se o tzv. horké přechody. V důsledku anharmonicky však dochází i k přechodům, kdy Δv je větší než 1, takové pak nazýváme svrchní tóny. Pokud má fundamentální přechod a svrchní tón stejnou nebo velmi podobnou frekvenci, objeví se místo očekávaného jednoho pásu pásy 2 (Fermiho dublet), tento jev se nazývá Fermiho rezonance^{5,6}.

Molekulové vibrace můžeme rozdělit na několik druhů. Ve dvouatomových molekulách dochází k vibraci, založené na natahování a smršťování vazeb, tento druh vibrace se nazývá valenční. U složitějších (polyatomových) molekul může však dojít i k vibracím, při kterých se mění úhel mezi vazbami v molekule, jsou to vibrace deformační. Tyto deformační vibrace můžeme dále dělit na symetrické, antisymetrické, rovinné a mimorovinné⁵.

V plynném skupenství může docházet i k molekulovým rotacím. Energie těchto rotací je o 1 až 3 řády menší než u vibračních hladin a projevuje se jemnou strukturou vibračních pásů⁵.

Při použití infračervené spektrometrie dojde ke změně vibračního stavu molekuly pouze tehdy, když se současně změní i její dipólový moment a jen takové vibrace se projeví ve spektrech. Ve spektrech získaných pomocí Ramanovy spektrometrie se projeví jen ty pásy, u nichž během vibrace dojde ke změně polarizovatelnosti molekuly. U molekul, majících střed symetrie, dochází k vzájemnému vyloučení: vibrace aktivní v infračervených spektrech jsou inaktivní v Ramanových a naopak^{5,6}.

Princip infračervené spektrometrie

Infračervená spektrometrie je založena na absorpci elektromagnetického záření o vhodné energii vzorkem, při němž dochází ke změně vibračních a rotačních stavu molekuly a současně ke změně dipólového momentu molekuly. Záření používané v infračervené spektroskopii můžeme rozdělit podle vlnových délek i vlnočtu na blízkou (near infrared, NIR) (800 – 2500 nm, 12000 – 4000 cm^{-1}), střední (middle infrared, MIR) (2500 – 5000 nm,

4000 – 200 cm^{-1}) a vzdálenou (far infrared, FIR) (5000 – 10000 nm, 200 – 10 cm^{-1}) infračervenou oblast. Při vyhodnocování infračervených spekter využíváme tři hlavních rysů absorpčních pásů, jejich polohu, počet, tvar a intenzitu ⁶.

Princip Ramanovy spektrometrie

Metoda je založena na měření Ramanova posunu, který vznikne po dopadu záření o vhodné energii na molekuly vzorku. Je nutné použít záření, jehož energie je dostatečně nízká, aby nedocházelo k excitaci valenčních elektronů. Po dopadu záření na vzorek, může dojít k jeho absorpci, průchodu nebo rozptylu. Rozptyl způsobený makroskopickými složkami vzorku označujeme jako Tyndalův a rozptyl způsobený molekulami jako Rayleighův. Při uplatnění těchto dvou rozptylů zůstává výsledný vlnčet stejný jako původní vlnčet použitého záření. U malé části záření můžeme pozorovat, že došlo k interakci mezi zářením a vzorkem a tedy i k posunu vlnčetů, tedy k Ramanovu posunu. Poloha Ramanova posunu je nezávislá na vlnčetu budícího záření⁶.

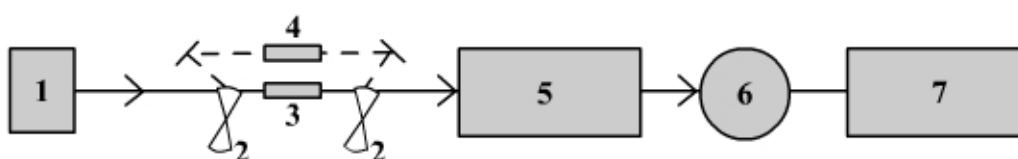
2.2.2 Infračervené spektrometry

V dnešní době jsou nejvíce používány spektrometry využívající tzv. Fourierovy transformace, což je výpočetní matematická metoda sloužící k převedení signálu na interpretovatelné spektrum. Vzhledem k principu metody je infračervená spektrometrie využívána v největší míře ke kvalitativnímu stanovení organických látek ve vzorku, ale také kvantitativní analýze a analýze anorganických látek. V praxi se používají 2 základní typy instrumentálních uspořádání. Disperzní infračervené spektrometry a přístroje využívající Fourierovy transformace⁶.

Disperzní infračervené spektrometry

Jsou konstrukčně starším a v současnosti méně používaným typem infračervených spektrometrů. Konstruovali se jako jedno paprskové nebo dvoupaprskové. Jednopaprskové se používaly jako jednoúčelové přístroje, které využívaly pouze jeden vlnčet. Jako zdroj polychromatického záření se zde používají rozžhavené tyčinky, např. Nernstova tyčinka,

globar. Rozklad infračerveného záření se provádí pomocí odrazových mřížek, které jsou vyrobeny z kovových materiálů. Dříve byla detekce infračerveného záření zajištěna pomocí termočlánků, vyrobených nejčastěji z Sb + Bi nebo Pb + Ag. V dnešní době se používají spíše pyroelektrické detektory, nejznámější TGS (triglycinsulfát) a DTGS (deuterovaný triglycinsulfát), nebo polovodičové detektory např. PbS a také MTC (Mercury-Cadmium-Telluride), který vyniká vysokou citlivostí a rychlou odezvou. Při použití disperzních infračervených spektrometrů bývají spektra zaznamenávána obvykle jako závislost transmitance na vlnočtu⁶.

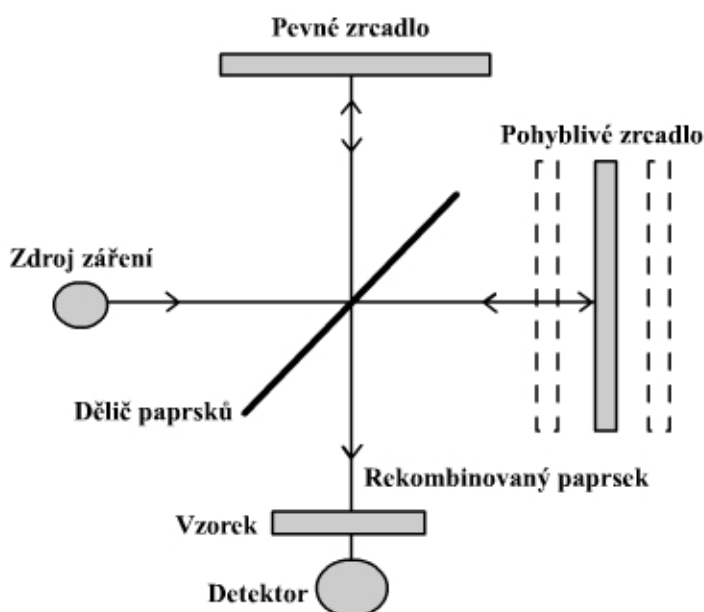


Obr. 4. Schéma jedno paprskového disperzního infračerveného spektrometru,
 1. Zdroj záření, 2. Chopper (rotující zrcadlové segmenty), 3. Kyveta se vzorkem, 4.
 Srovnávací prostředí, 5. Monochromátor, 6. Detektor, 7. Vyhodnocovací zařízení.
 (převzato z cit.⁷)

Spektrometry s Fourierovou transformací

Jsou v současné době nejpoužívanějším druhem infračervených spektrometrů. Na rozdíl od disperzních infračervených spektrofotometrů používají tyto přístroje místo monochromátoru Michelsonův interferometr. Jedná se soustavu složenou z polopropustného děliče paprsků a dvou na sebe kolmých zrcadel, z nichž jedno je pohyblivé a druhé pevně umístěné. Záření, které dopadá na polopropustný dělič paprsků, se z půlky odrazí k pohyblivému zrcadlu a druhá půlka dopadá na pevné zrcadlo. V důsledku pohybu pohyblivého zrcadla dochází po zpětném odrazu paprsků na polopropustném zrcadle k vyrušení nebo sčítání paprsků, tedy k interferenci. Rekombinovaný paprsek poté prochází vzorkem v kyvetovém prostoru a neabsorbované frekvence jsou přivedeny na detektor. Interferometrický signál se pak převede pomocí Fourierovy transformace (matematické metoda) na infračervené spektrum. Celý proces, včetně pohybu zrcadla v Michelsonově interferometru je plně řízen pomocí počítače⁶.

V infračervené spektrometrii s Fourierovou transformací se pro vzdálenou infračervenou oblast využívá jako zdroj vysokotlaká rtuťová výbojka, ve střední a blízké oblasti nejčastěji SiC (globar) a pro blízkou infračervenou a viditelnou oblast wolframová nebo halogenová žárovka. Vzhledem k tomu, že detektory pro disperzní infračervené spektrometry nesplňují podmínku velmi rychlé odezvy detektoru, využívá infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací pyroelektrické TGS, DTGS a polovodičové MTC⁶.



Obr. 5. Schéma Michelsenova interferometru (převzato z cit.⁶)

Spektrometry, využívající Fourierovy transformace, mají oproti disperzním přístrojům hned několik výhod. Jednou z nejdůležitějších výhod je velice dobrá rozlišovací schopnost, která u některých přístrojů může dosáhnout až $0,05 \text{ cm}^{-1}$. Vynikají také díky vysoké rychlosti záznamu i výpočtu a také umožňují měření v širokém rozsahu spektra. Oproti disperzním přístrojům mají také lepší poměr signálu a šumu⁶. U přístrojů s Fourierovou transformací, lze snadno zaměnit některé části přístroje (např.: zdroj, detektor) a upravit tak spektrální rozsah přístroje a interferometr má větší propustnost toku záření, jelikož není omezen vstupní a výstupní štěrbinou^{5, 6}.

Měření využívající průchodu (transmise) záření

Infračervená spektrometrie umožňuje měření spekter vzorků ve všech skupenstvích. Při vhodném vybavení je možné provádět analýzu vzorků v plynném skupenství. Vzhledem k nízké hustotě molekul plynu se k tomuto účelu používají kyvety ve tvaru dlouhého válce, které umožňují delší průchod paprsku vzorkem. Nebo také speciální kyvety s odraznými plochami, které zajistí několika násobný odraz vzorku v kyvetě, díky kterému dojde k prodloužení délky paprsku až na 20 m (tzv. dlouhocestné kyvety). Pomocí výše uvedeného postupu můžeme stanovit i koncentrace v řádech desítek ppb⁶.

Měření infračervených spekter roztoků se provádí nejčastěji v kyvetách vyrobených z materiálů, plně propouštějících IR paprsky a zároveň netečných ke zkoumané látce a použitému rozpouštědлу. Nejvíce dostupným materiálem jsou halogenidy alkalických kovů, ovšem jsou rozpustné ve vodě. Naopak vůči vodě inertní je např. CaF_2 , BaF_2 , AgCl , AgBr , ZnSe , Ge , Si a polyetylen⁶.

Tuhé matrice lze měřit více způsoby. Pro měření spekter makromolekulárních látek, můžeme použít přímo fólie, zhotovené ze zkoumané látky. Vzorky mající práškovou podobu lze měřit v podobě suspenze, např. s nujolem. Používaná je také tzv. tabletová metoda, při které je vysušený vzorek rozmělněn a homogenizován s nadbytkem vyžíhaného KBr . Ve speciálním lisu je poté pomocí forem a vysokého tlaku vylišována průhledná tabletka o tloušťce 1 – 2 mm a průměru asi 1 cm. Nevýhodou tohoto postupu, je možnost výskytu interferencí pásu vody, která se může vyskytovat v nedostatečně vysušeném KBr a ovlivnění kvality spektra v důsledku velikosti zrnění vzorku a KBr (rozptyl záření)⁶.

Měření využívající odrazu (reflexe) záření

Vzhledem k náročné přípravě vzorků při využití některé z transmisních metod měření, jsou v současné době stále více využívány metody založené na měření odrazu záření. Tyto metody jsou většinou mnohem méně náročné na předběžné zpracování vzorků⁶.

Metoda zeslabení úplného odrazu (Attenuated total reflection – ATR)

Při použití této metody je vzorek nanášen na podložku z materiálu propustného při infračervené záření (AgCl , ZnSe , Germanium). Část záření dopadajícího na podložku proniká do vzorku do hloubky několika μm . Dochází k absorpci vlnočtů odpovídajících

vibracím molekul ve vzorku a takto zeslabené záření je posléze vyhodnocováno. Výsledné infračervené spektrum je podobné běžnému spektru, liší se pouze v intenzitách získaných pásů⁶.

Metoda difúzního odrazu (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform – DRIFT)

Tato metoda je využívána zejména pro pevné matrice, které mají nepravidelný povrch a které nemůžeme rozpustit ve vhodných rozpouštědlech nebo použít jinou metodu přípravy vzorku. Lze analyzovat i velice malé množství vzorku, které je nanášeno na podložku z propustného materiálu. Infračervený paprsek je posléze fokusován na vzorek. Vzniklé difúzně rozptýlené záření je převedeno optickou soustavou na detektor. Výsledná spektra se vyjadřují v lineárních jednotkách Kubelka-Munk, tyto jednotky odpovídají jednotkám absorpance ve spektru měřeném pomocí KBr techniky⁸.

2.2.3 Ramanovy spektrometry

Ramanova spektrometrie patří spolu s infračervenou spektrometrií mezi metody vibrační molekulové spektrometrie. Byla pojmenována po indickém fyzikovi profesoru Ramanovi, který objevil v roce 1928 jev neelastického rozptylu, jenž je základem této metody. Metoda je především vhodná ke strukturní analýze a ke zkoumání složení vzorků. Je možné ji využít k analýze pevných vzorků, jako jsou kovy, polovodiče, polymery a i jiných krystalických i amorfních materiálů. Kapaliny můžeme analyzovat jako vodné i nevodné roztoky i jako čisté látky. V poslední době nalézá Ramanova spektrometrie i velké uplatnění v analýze povrchu a biologických systémů⁹.

Instrumentace

V dřívějších dobách se jako zdroj používali rtuťové výbojky. V současnosti se však používají výhradně lasery, které dokáží emitovat záření v blízké infračervené, viditelné, popřípadě záření v UV oblasti. Mezi nejčastěji používané lasery patří: He-Ne (632,8 nm), Nd-YAG (1064 nm) a diodové lasery (782 nebo 830 nm)¹⁰.

V dříve používaných disperzních Ramanových spektrometrech bylo záření rozkládáno pomocí dvojitých i trojitých mřížkových monochromátorů s nastavitelnou šterbinou⁶.

Měření vzorků

Aby se zabránilo rozkladu vzorku, lze použít chlazených a rotujících kyvet. Vzhledem k tomu, že laser můžeme lehce fokusovat (i měnit jeho intenzitu) lze analyzovat i velmi malé množství vzorku^{6, 10}. Pro měření v plynném stavu se používají kyvety s násobným průchodem podobně jako v infračervené spektrometrii⁶. Vzorky se mohou dávkovat do kyvet ze skla nebo jiných nefluoreskujících materiálů. Oproti infračervené spektrometrii, má Ramanova spektrometrie výhodu v tom, že voda nezpůsobuje interference. Lze tedy bez problémů měřit i kapalně vzorky. Pevné vzorky se měří buď ve formě monokrystalů anebo rozdrčené na jemný prášek^{6, 10}.

Povrchově zesílený Ramanův rozptyl, Surface - enhanced Raman Scattering (SERS)

Povrchově zesílený Ramanův rozptyl zahrnuje získávání Ramanových spekter obvyklou cestou na vzorcích, které jsou adsorbovány na povrchu částic koloidních kovů (obvykle stříbro, zlato nebo měď) nebo na zdrsňených površích kusů těchto kovů. Ramanovy linie adsorbovaných částic jsou zde zesíleny o 3 až 8 řádů. To umožňuje měřit velice nízké koncentrace 10^{-9} až 10^{-12} mol/l. Obvykle lze pomocí Ramanovy spektrometrie měřit roztoky o koncentraci větší než 0,1 mol/l¹⁰.

Rezonanční Ramanova spektrometrie

Jako zdroj záření se zde používá laser o energii, při které dochází k absorpci záření. Nastává zvýšení intenzity Ramanových linií o 10^2 až 10^6 , což umožňuje měřit koncentrace až 10^{-8} mol/l. Nevýhodou jsou interference způsobené fluorescencí. Rezonanční Ramanova spektrometrie nachází největší uplatnění v analýze biologických molekul¹⁰.

2.3 VYUŽITÍ MOLEKULOVÉ VIBRAČNÍ SPEKTROMETRIE V ANALÝZE KÁVY

Metody molekulové spektrometrie nacházejí uplatnění v potravinářském průmyslu. Například při rozlišení jednotlivých druhů kávy (lišící se v ceně i kvalitě), jejich zastoupení v kávových směsích, ale i při rozlišení zeměpisného původu kávových zrn a určení celkového obsahu kofeinu v nich. Významným přínosem v oblasti výroby kávy je i zkoumání vlivů teploty na kvalitu kávy, při pražících procesech.

Lyman D. a kolektiv zkoumali vliv pražících podmínek na chuť a vůni vařené kávy pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací a dávkování vzorku pomocí ATR. Použita byla kávová zrna z města Antigua v Guatemale. Pro poskytnutí údajů o vůni vařené kávy byla použita oblast $1800 - 1680 \text{ cm}^{-1}$. Studie, prováděná na světle, středně a tmavě pražených zrnech zjistila, že když míra tepla na začátku prvního a druhého pukání zrn byla ponechána konstantní, typy karbonylových sloučenin byly podobné, lišily se pouze v koncentraci. Tento rozdíl v koncentracích byl zřejmě zapříčiněn přídavným zahříváním kávových zrn při jejich druhém pukání. Když míra tepla na začátku prvního a druhého pukání byla proměnná, ovlivnilo to všechny typy karbonylových sloučenin vzniklých v průběhu pražení. Můžeme tedy říci, že podmínky pražení zelených kávových zrn na začátku prvního a druhého pukání jsou důležité determinanty základní chuti a aroma vařené kávy¹¹.

Pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací byla zkoumána i káva Kona, varianta kávy „Kona Typica“, rostoucí v severní a jižní části ostrova Kona, jenž je nositelem charakteristické známky regionu ostrova Hawai v USA. Excelentní kvalita zpracování kávy ji činí jedním z nejlepších kávových produktů na světě. Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu surové a vařené Kona kávy a směsí vyrobených z Kona kávy byla použita infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací ve spojení s ATR a vícerozměrná analýza. Kalibrační standardy Kona kávy se sestávaly z 10 různých směsí Kona kávy ze 14 různých farem na ostrově Hawai a směsi neobsahující Kona kávu ze 3 různých míst na Havaii. Pro vylepšení kalibračního modelu byla použita matematická vylepšení, jako je derivační transformace, škálování rozptylu, vícerozměrná regrese, metoda částečných nejmenších čtverců (PLS) a regrese hlavních komponent (PCR). Kalibrační model

byl úspěšně ověřen za použití devíti syntetických směsí Kona kávy a jejich příměsí, 100 % směsí Kona kávy. V oblasti $1900 - 800 \text{ cm}^{-1}$ byly nalezeny odlišné píky u surové a vařené kávy. Kalibrační model, sestavený pomocí metody částečných nejmenších čtverců, založený na vařené Kona kávě se zpracováním dat pomocí škálování rozptylu, ukázal nejvyšší správnost s nejnižší standardní chybou. Tento model byl dříve ověřen pomocí kvantitativní analýzy komerčních směsí Kona kávy. Výsledky ukazují, že FTIR může být rychlou alternativou ověření Kona kávy, když je potřeba rychlé a jednoduché přípravy vzorků¹².

Možnostmi využití infračervené spektrometrie v analýze kávy se zabývali Pizzaro C. a kolektiv. Spektrometrie v blízké infračervené oblasti kombinovaná s vícerozměrnými kalibračními metodami byla použita pro kvantifikaci pražených vzorků kávy druhu robusta, jako možnost pro kontrolu znehodnocování kávy, což je velice důležitá záležitost využívající se k vysvětlení vysoké různorodosti prodejních cen, závisících na původu odrůdy kávy. K tomuto účelu byla použita metoda regrese částečnými nejmenšími čtverci (PLS) a waveletová metoda předběžného zpracování, která byla dříve vynalezena a pojmenována OWAVEC¹³ (kombinace waveletové analýzy a ortogonálního algoritmu jako metody předběžného zpracování ve vícerozměrné kalibraci¹⁴) aby mohly současně fungovat dva rozhodující kroky předběžného zpracování ve vícerozměrné kalibraci: korekce signálu a komprese dat. Některé metody předběžného zpracování (centrování střední hodnoty, první derivace a metoda korekce na dva ortogonální signály – ortogonální korekce signálu OSC a přímá ortogonální korekce signálu DOSC) byly dodatečně aplikovány pro nalezení toho nejlepšího prediktivního modelu, jaký může být a pro vyhodnocení účinnosti OWAVEC metody, porovnávající příslušnou kvalitu vyrobených rozdílných regresních modelů. Kalibrační model vyrobený po před-zpracovací derivaci spektra pomocí OWAVEC poskytl vysokou kvalitu výsledků (0,79% RMSEP), procento robusty bylo určeno s větší spolehlivostí než při spojení modelů vyrobených z neupravených spekter a dat upravených metodou ortogonální korekce signálu (OSC), a poskytuje větší jednoduchost¹³.

Spektrometrie v blízké infračervené oblasti byla použita i při stanovení rozdílů mezi čistou kávou arabika a robusta a směsí těchto druhů. Metoda předběžného zpracování přímé ortogonální korekce signálu (DOSC) byla aplikována na sadu 191 NIR spekter pražené kávy z obou čistých druhů a směsí s proměnným obsahem odrůdy robusta od 0 do 60% (w/w), aby

byly odstraněny nesouvisející informace, způsobené různým složením vzorků. Upravená NIR spektra, byla použita pro vytvoření oddělených klasifikačních modelů pomocí potenciálně funkční metody jako technika třídního modelování, pro průzkum některých možností více či méně shodně omezujících konečný počet zvažovaných kategorií. Všechny získané klasifikační modely byly porovnány pro vyhodnocení jejich příslušných kvalit a pro ukázkou vhodnosti aplikace DOSC metody jako krok předběžného zpracování pro vývoj vylepšených klasifikačních modelů pro účely rozlišení kávových odrůd¹⁵.

Pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací byl zkoumán i obsah kofeinu ve vzorcích pražené kávy. Metoda zahrnuje smáčení kávových vzorků v 0,25 mol/l vodném roztoku amoniaku, extrakci kofeinu s CHCl_3 a měření absorbance při 1651 cm^{-1} se základní linií mezi $1900 - 830 \text{ cm}^{-1}$. Navržená procedura je rychlá, potřebuje pouze 16 minut extrakčního času pro každý vzorek a poskytuje značné snížení spotřeby organického rozpouštědla z 200 ml diethyletheru a 50 ml CHCl_3 potřebných pro každý vzorek při použití nízkotlaké kapalinové chromatografie s UV spektrometrickou detekcí, na pouhých 5 ml CHCl_3 . Metoda poskytuje limit detekce 3 mg/L kofeinu a relativní směrodatnou odchylku 0,4 % pro 3 nezávislé analýzy vzorku obsahujícího 18,6 % mg/g kofeinu. Úspěšnost této procedury byla potvrzena dřívějšími experimenty na spikovaných vzorcích, poskytujících hodnoty od 94,4 % do 100,1 % a z porovnání výsledků nalezených pro sadu komerčních vzorků, pomocí oficiálních srovnávacích procedur¹⁶.

Aplikací Ramanovy spektrometrie v analýze kávy se zabývá odborný článek, uveřejněný v Journal of Agricultural and Food Chemistry. Tento článek se zabývá rozlišením odrůd kávy arabika a robusta pomocí FT Ramanovy spektrometrie. Bylo zjištěno, že tyto dva typy kávy se liší v procentuálním zastoupení lipidu kahweol. Káva arabika obsahuje 0,1 - 0,3 % kahweolu, zatím co káva robusta pouze 0,01 %. Bylo zjištěno, že spektrum kávy arabika obsahuje dva charakteristické píky v oblasti 1567 cm^{-1} a 1478 cm^{-1} . Stejně píky byly zjištěny i při změření čistého kahweolu. Na spektra byla aplikována analýza hlavních komponent (PCA), která odhalila shlukování píků, souhlasící s druhy kávy. První hlavní komponenta analýzy hlavních komponent vysvětluje 93 % spektrálních variací a koresponduje s koncentrací kahweolu. Pomocí diagramu komponentního skóre první hlavní komponenty, dvě skupiny arabiky mohou být rozlišeny na následující: Jedna skupina

s vysokým obsahem kahweolu a druhá s nízkým obsahem. První skupina obsahuje vzorky pocházející z Keni a Jamajky, druhá vzorky pocházející z Austrálie. Hlavní rozdíly mezi těmito kávami je, že káva pěstovaná v Keni a na Jamajce se pěstuje ve vysokých nadmořských výškách, kdyžto káva z Austrálie se pěstuje v nižších nadmořských výškách¹⁷.

Briandet R. a kolektiv se zabývali dvěma ekonomicky nejvýznamnějšími druhy kávy, arabiky a robusty. V této práci byla použita infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací jako rychlá alternativa chemických metod pro autentizaci a kvantifikaci kávových produktů. PCA analýza byla aplikovaná na spektra lyofilizované instantní kávy, získaná pomocí DRIFT (Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform) a ATR (Attenuated Total Reflection) vzorkovacích metod, a ukázala shluky píků odpovídající kávovým druhům. Lineární diskriminační analýza poskytla 100 % správné rozdělení pro oba zkušební a testovací vzorky. Chemický původ stanovení byl prozkoumán pomocí interpretace zátěží analýzy hlavních komponent. Metoda regrese částečných nejmenších čtverců je aplikována na spektra směsí arabiky a robusty pro stanovení relativního obsahu každého druhu. Vnitřní křížová validace poskytla korelační koeficient 0,99 a standardní chybu určení na 1,20 % (w/w), což ilustruje potenciál metod pro industriální off-line kontrolu kvality¹⁸.

Alessandrini L. se spolupracovníky studoval vztah mezi některými pražicími změnami (ztráta váhy, hustoty, vlhkosti), pomocí infračervené spektrometrie v blízké oblasti, mezi zelenými a rozdílně praženými kávovými vzorky, aby se otestovala použitelnost NIR spektrometrie k určování pražicí teploty při pražení kávy. Byly vyvinuty oddělené kalibrační a validační modely, založené na regresi metody částečných nejmenších čtverců (PLS regrese), korelační NIR spektrální data 168 reprezentativních a vhodných vzorků zelené kávy. S použitím PLS regrese byla provedena predikce 3 modelových pražicích odezev. Byla získána vysoká správnost výsledků, jejíž standardní chyba odhadu byla v rozmezí od 0,02 do 1,23 %. Získaná data umožnila sestavení velkých a spolehlivých modelů pro určení pražicích podmínek neznámých kávových vzorků, uvažíme-li že naměřené a předurčené hodnoty ukázaly vysoké korelační koeficienty. Výsledky poskytnuté navrženými kalibračními modely byly srovnatelné s podmínkami správnosti běžných analýz a odhalily dobrou použitelnost NIR spektrometrie pro on-line nebo rutinní aplikace pro predikci a/nebo kontrolu pražicí teploty pomocí NIR spekter¹⁸.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Ke kvalitativní analýze pomocí infračervené spektrometrie byly vybrány celkem tři vzorky kávy, vyskytující se běžně na českém trhu. Káva SEGAFREDO Espresso Classico, Jihlavanka Extra Special a Nescafé Sensazione (rozpuštná káva). Od každého jednotlivého zkoumaného vzorku kávy byla získána 3 spektra (u instantní kávy jen 2). První spektrum bylo naměřeno z původního neuvařeného vzorku kávy, odebraného ze spotřebitelského obalu (dále jen původní káva). Druhé spektrum bylo získáno z uvařené kávy, která se uchytila na filtru po přefiltrování (dále jen kávová usazenina). Třetí spektrum charakterizuje kávu, která byla získána z přefiltrovaného vodného roztoku po odpaření vody (dále jen uvařená káva). Všechny spektra byla měřena v rozsahu $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ a rozlišení 4 cm^{-1} .

3.1 Přístrojové vybavení

Laboratoře Univerzity Palackého v Olomouci jsou vybaveny FT-IR spektrometrem Nicolet 6700 (Thermo, USA) pro vzdálenou, střední a blízkou infračervenou oblast. Při zaznamenávání spekter byl použit detektor DLaTGS/KBr a Ge/KBr dělič paprsků. Jako zdroj infračerveného záření posloužil vzduchem chlazený EverGlo. Vzorky byly nanášeny na Smart jednorázový nástavec se ZnSe krystalem a mikrometrickou přítlačkou. Vzorky byly na nástavec nanášeny pomocí nerezové špachtle.

3.2 Pracovní postup

Z každého vzorku kávy, bylo odebráno 5 g kávy, které byly posléze převedeny do připravené čisté kádinky o objemu 100 ml. Do kádinky bylo poté přilito 100ml vody o teplotě $98 \text{ }^\circ\text{C}$ a tento roztok byl ponechán v kádince po dobu 10 minut. Po uplynutí této doby byl roztok přefiltrován (do další kádinky o objemu 100 ml) na jednoduché filtrační aparatuře s použitím skládaného filtračního papíru. Kávová usazenina, zbylá ve filtračním papíru, byla usušena na vzduchu. Vzorek rozpuštné kávy z pochopitelných důvodů filtrován nebyl. Filtrát byl poté kvantitativně převeden do předem připravených teflonových kelímků. Tyto kelímky byly umístěny na vařič, na kterém posléze probíhalo odpaření přebytečné vody. Voda byla odpařena na cca 5 ml a tento zkoncentrovaný roztok kávy byl převeden do malých

plastových kelímků a dosušen za laboratorní teploty po dobu dvou týdnů. Uvedený pracovní postup byl pro každý jednotlivý vzorek kávy proveden dvakrát.

3.3 Použité chemikálie

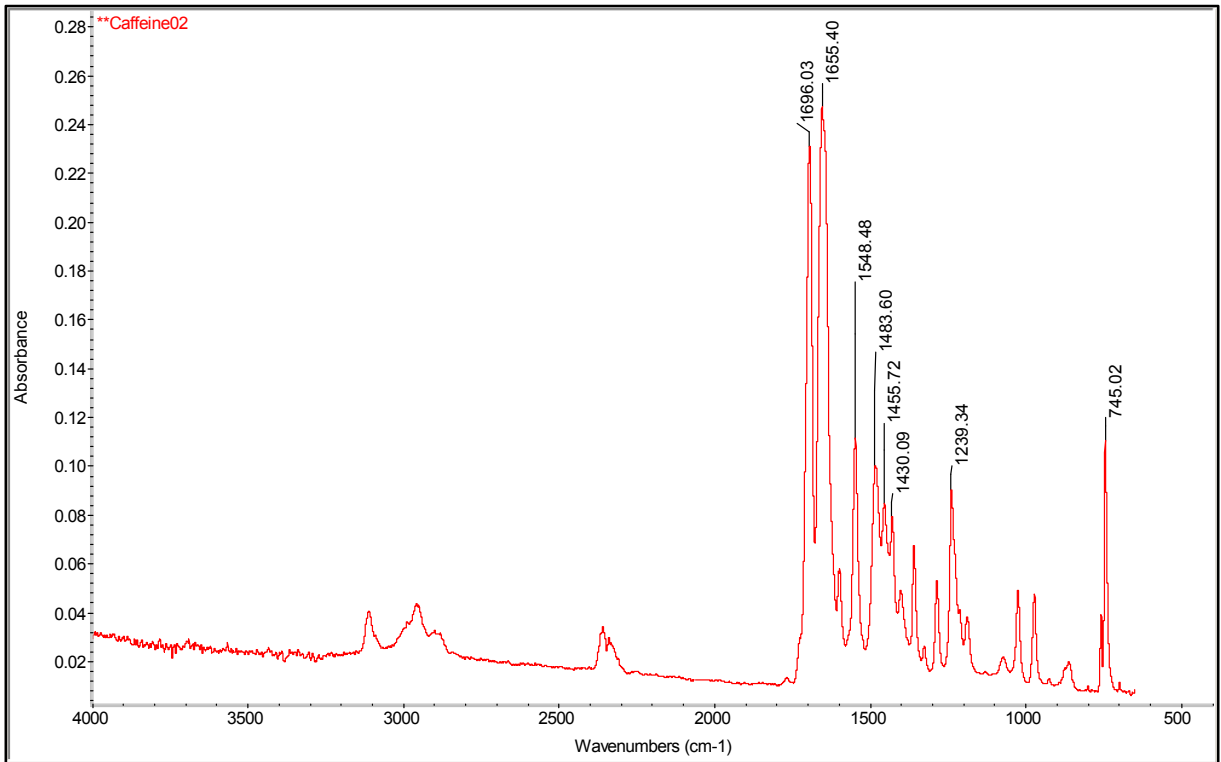
Pro zaznamenání infračerveného spektra kofeinu byl použit standard kofeinu: CAFFEINE ANHYDROUS, purum > 99 %, výrobce Fluka Německo. Naměřené spektrum bylo pro kontrolu porovnáno se spektrem kofeinu v odborných člancích a ve všech hlavních rysech se shodovalo. Bylo potvrzeno, že spektrum obsahuje pík při 1656 cm^{-1} , který je podle odborných článků charakteristický pro kofein^{16,17}.

4. VYHODNOCENÍ

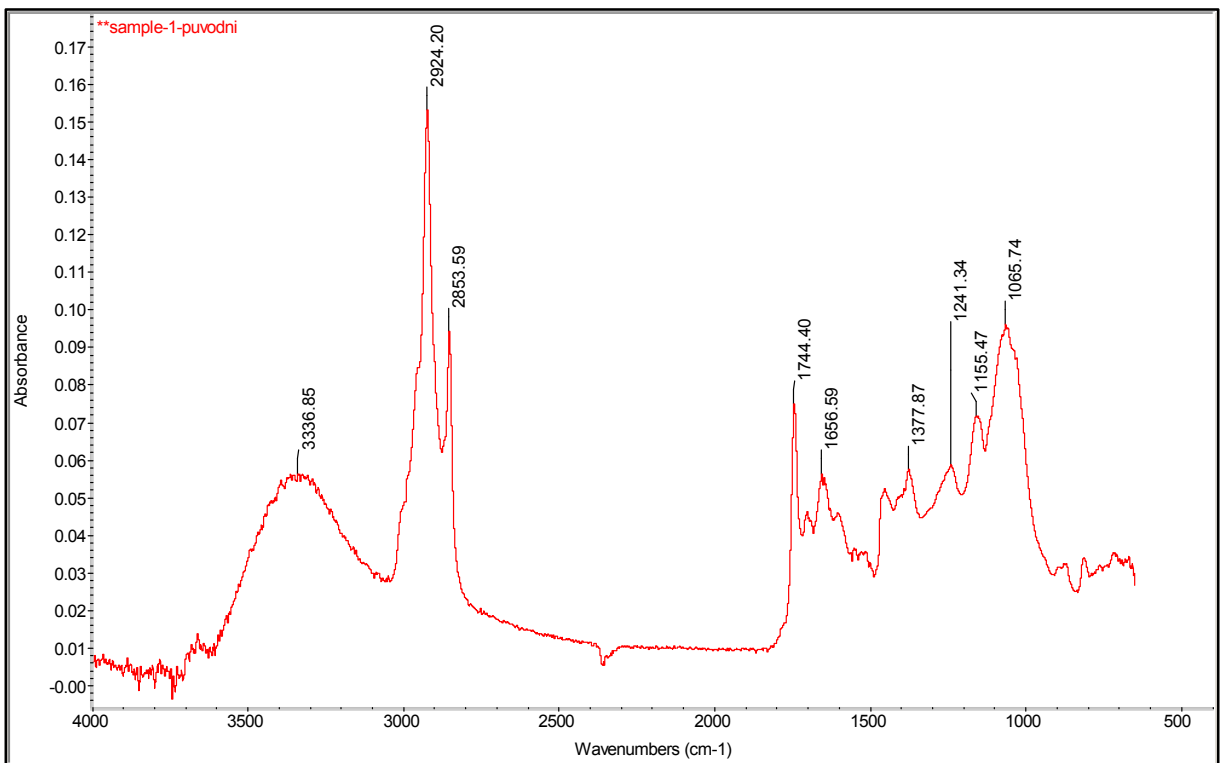
Vzhledem ke skutečnosti, že káva jako taková obsahuje velké množství různých organických látek, je přiřazení jednotlivých píků v kávě k jednotlivým konkrétním látkám věcí obtížnou. Tato bakalářská práce se zaměřila především na ověření přítomnosti kofeinu v kávě a porovnání jednotlivých spekter v souvislosti s možnými změnami, vzniknuvšími při vaření kávy. Všechna získaná spektra byla porovnávána se spektrem čistého kofeinu (Obr. 6) a také mezi sebou navzájem, aby bylo zjištěno, jestli v kávě došlo během přípravy ke změnám.

Ve spektru kávové usazeniny, uvařené i původní kávy byly nalezen široký pás v oblasti vlnočtů, charakteristických pro -OH skupiny. U uvařené kávy (Obr. 9, Obr. 11, Obr. 13) byl tento pás velmi intenzivní a částečně zřejmě mohl překrýt i vlnočty připadající methylovým skupinám. Intenzita tohoto pásu mohla být zapříčiněna nedokonalým vysušením vzorků, ale i přítomností látek, které obsahují -OH skupiny a které jsou v kávě také obsaženy. Takovými látkami mohou být například kyseliny nebo cukry. Ve spektrech původní kávy (Obr. 7, Obr. 8) a kávové usazeniny (Obr. 12, Obr. 13) byl objeven pík při 1744 cm^{-1} , který se ovšem ve spektru kávy uvařené nevyskytuje. Tento pík se také nevyskytoval u původního vzorku instantní kávy (Obr. 10). Vzhledem k technice výroby instantní kávy je zřejmé, že se v podstatě jedná o kávu již uvařenou, což vysvětluje absenci píku 1744 cm^{-1} objevenou ve spektrech uvařených káv (Obr. 9, Obr. 11, Obr. 14). Tento pík by mohl odpovídat charakteristickým vibračním karbonylové skupiny, ale vzhledem k rozmanitosti organických látek obsažených v kávě, není možné jej přímo přiřadit ke konkrétní látce.

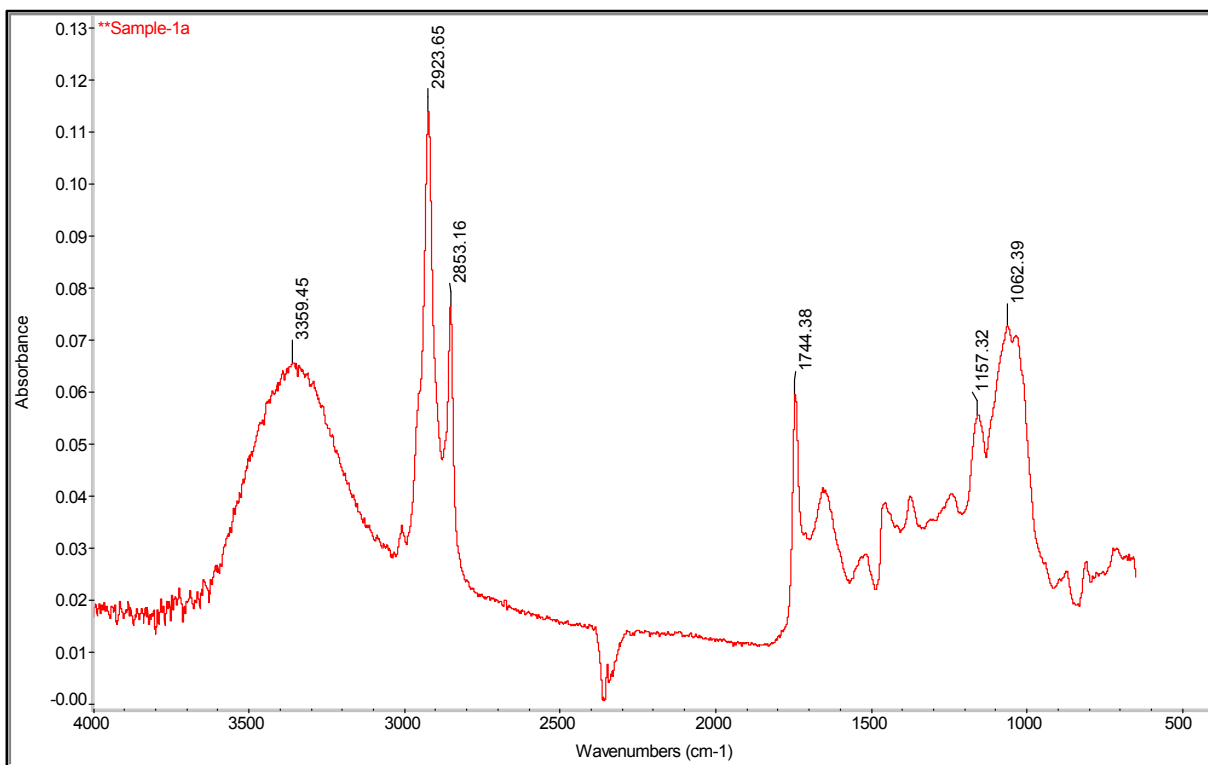
Ve všech spektrech původních káv a kávových usazenin byl objeven pík při 1656 cm^{-1} , který je charakteristický pro kofein^{16, 17} a potvrzuje tak přítomnost této látky ve vzorcích. Ve spektrech uvařené kávy nešel tento pík jednoznačně prokázat, jelikož mohl být překryt vysokou intenzitou sousedících píků. Píky nalezené v oblasti $1700 - 600\text{ cm}^{-1}$ odpovídají jednotlivým vibračním různým funkčních skupin látek, obsažených v kávě. Vzhledem k tomu, že se mohou různě překrývat a že byla prováděna pouze kvalitativní analýza, nebudou zde dále rozebírána. Bylo zjištěno, že spektra uvařené, neuvařené kávy a kávové usazeniny se v zásadě téměř neliší. Jediným výrazným nalezeným rozdílem byl pík při 1744 cm^{-1} . Podle předpokladů se potvrdilo, že během vaření kávy v ní nedochází k žádným výrazným chemickým změnám, které by mohly být zaznamenány infračervenou spektrometrií.



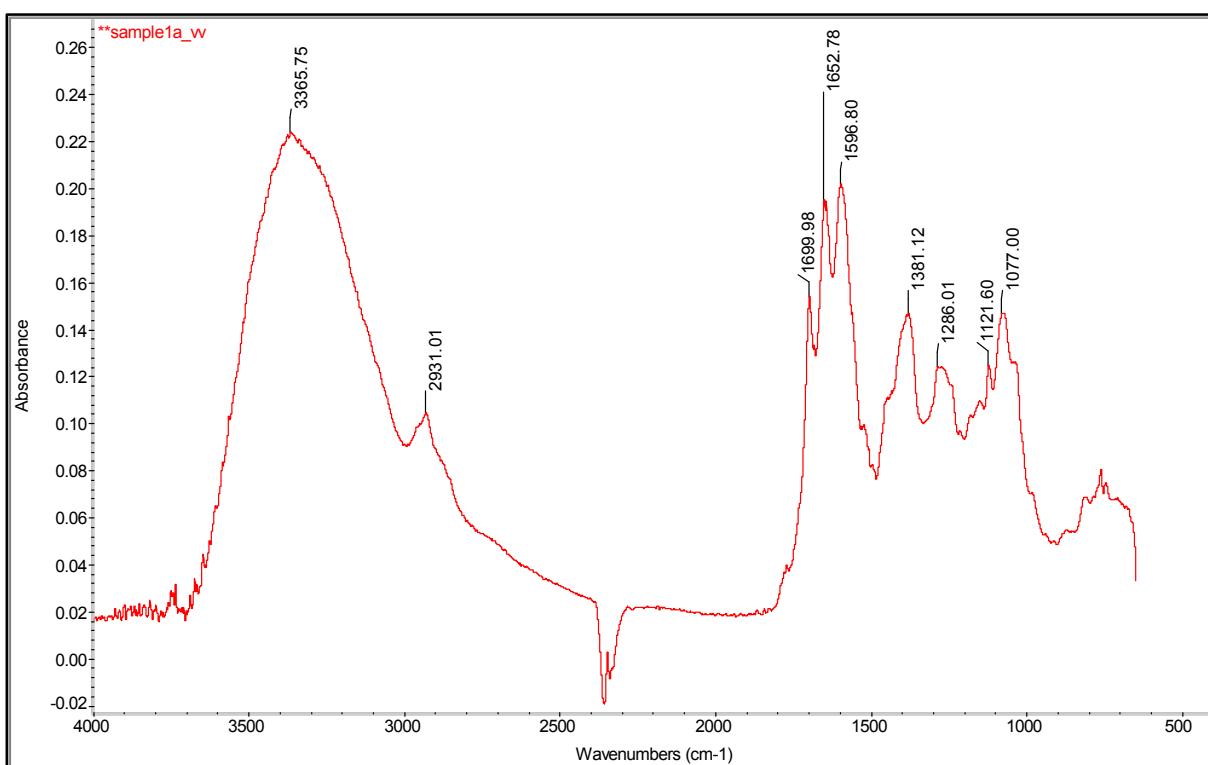
Obr. 6. Spektrum kofeinu



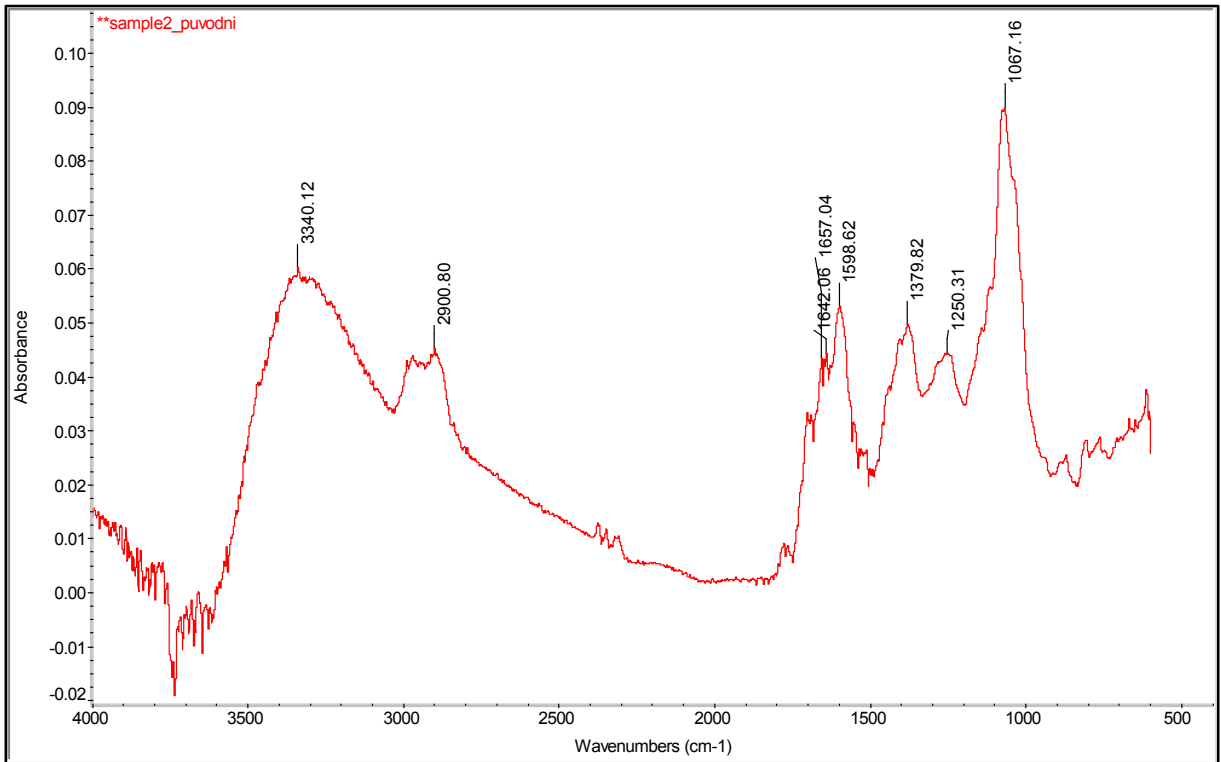
Obr. 7. Spektrum původní kávy (SEGAFREDO Espresso Classico)



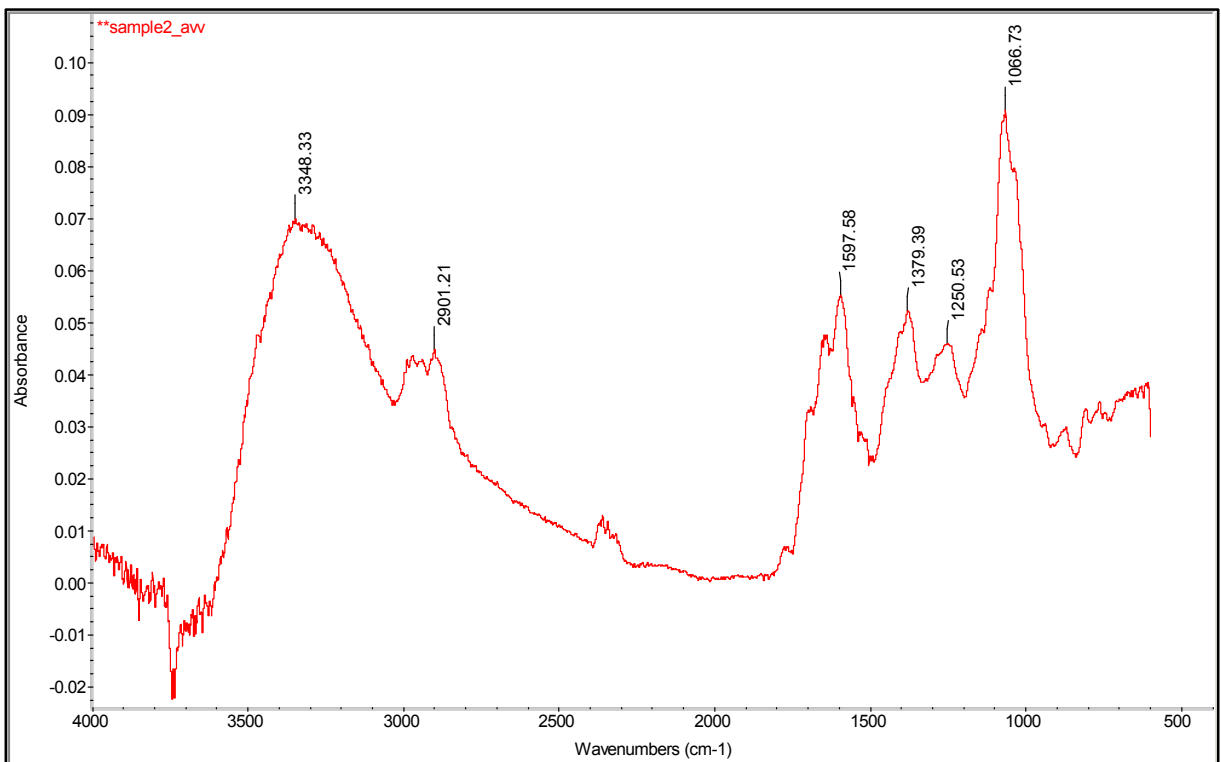
Obr. 8 Spektrum kávové usazeniny (SEGAFREDO Espresso Classico)



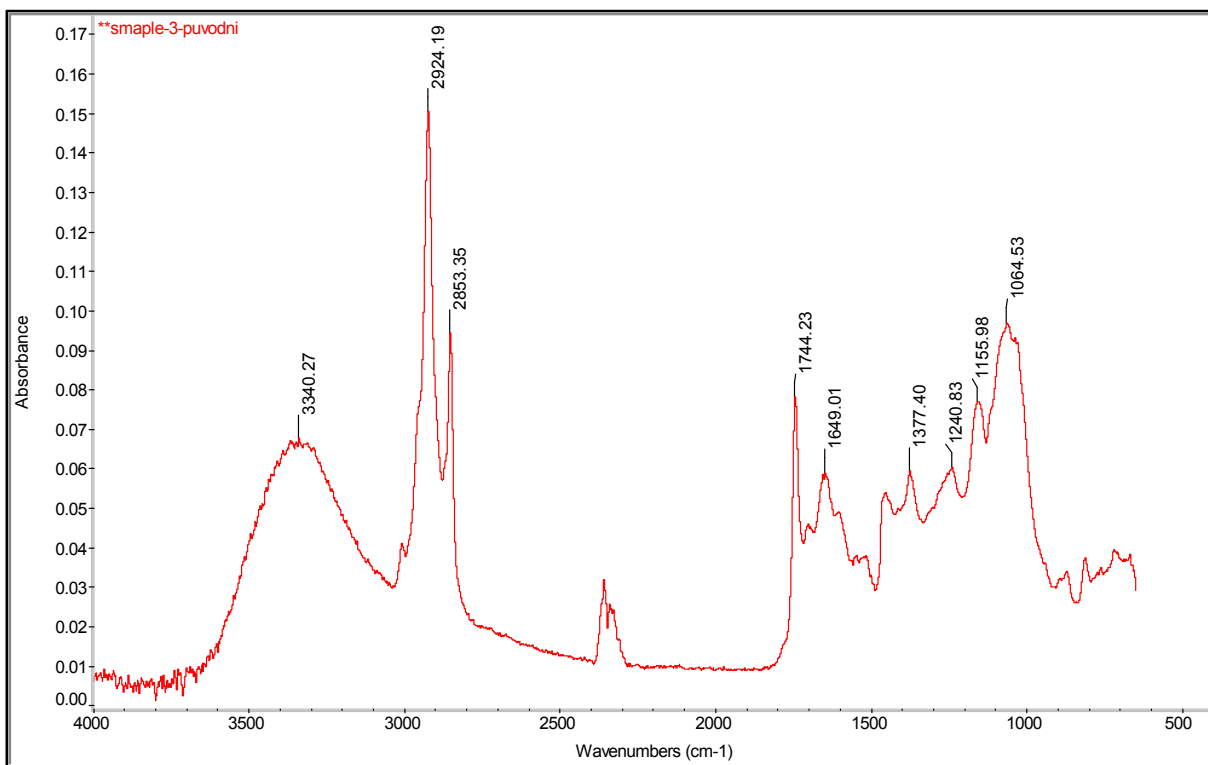
Obr. 9. Spektrum uvařené kávy (SEGAFREDO Espresso Classico)



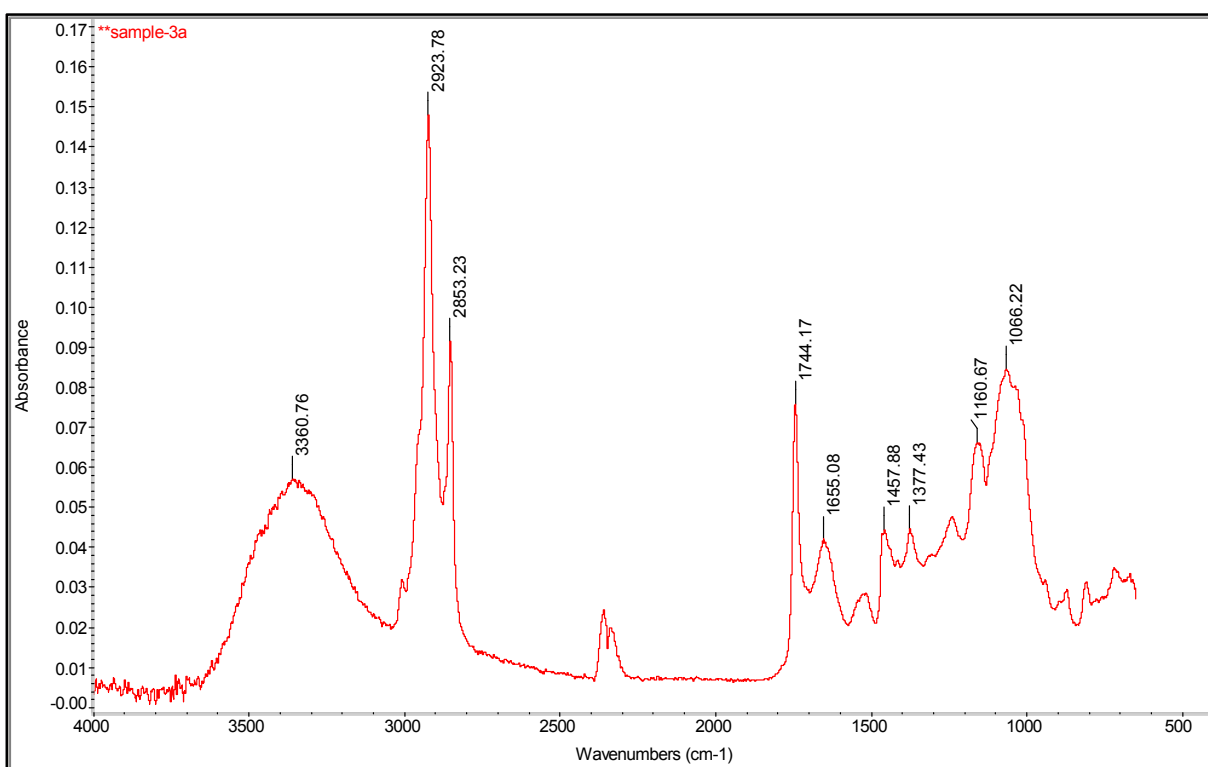
Obr. 10. Spektrum původní kávy (Nescafé Sensazione)



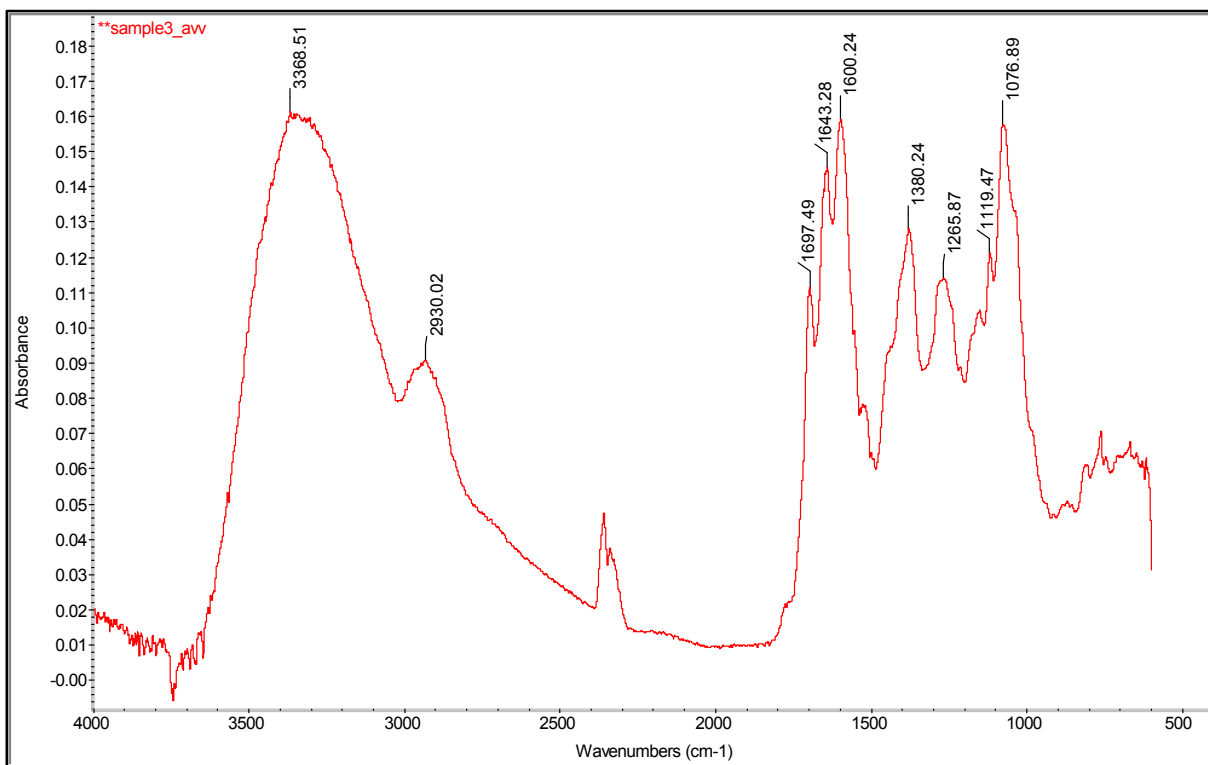
Obr. 11. Spektrum uvařené kávy (Nescafé Sensazione)



Obr. 12 Spektrum původní kávy (Jihlavanka Extra Special)



Obr. 13. Spektrum kávové usazeniny (Jihlavanka Extra Special)



Obr. 14. *Spektrum uvařené kávy (Jihlavanka Extra Special)*

5. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá použitím infračervené a Ramanovy spektrometrie v analýze kávy. Káva je celosvětově rozšířenou, ekonomicky velice významnou komoditou a procesy sní spojené (výroba, příprava) jsou často předmětem odborných článků. Tyto práce se zejména zabývají rozlišením nejčastěji pěstovaných druhů kávy (arabika a robusta), aby bylo možné zjistit zastoupení těchto druhů v kávových směsích, ale i rozpoznat, ze které oblasti nebo kontinentu daný druh kávy pochází. Zkoumána byla i káva v průběhu pražicího procesu, vliv teplot na výslednou chuť a vůni. Káva obsahuje velké množství, zejména organických látek. Nejčastěji analyzovanou látkou v kávě je kofein, ale bylo dokázáno, že zeměpisný původ druhů kávy jde vysledovat i pomocí zastoupení lipidu kahweol. Při analýze kávy se často využívají se statistické metody, jako jsou analýza hlavních komponent, vícerozměrná analýza a metoda částečných nejmenších čtverců. Další možností využití těchto metod by mohla být analýza zastoupení obsahu kofeinu v jednom druhu kávy, v závislosti na druhu hnojiv použitých při pěstování kávy. Z experimentální části vyplývá, že během vaření kávy v ní nedochází k žádným výrazným chemickým změnám, které by mohly být zaznamenány infračervenou spektrometrií

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Augustín J.: *Povídání o kávě*. Fontána, Olomouc 2003.
- [2] Mikeš V.: *Proč se klepou řízky, Chemie v kuchyni*. Dokořán, Praha 2008.
- [3] Gunasekaran S., Sankari, G. Ponnusamy S.: *Spectrochim. Acta Part A* **61**, 117 (2005).
- [4] www.kava.cz, 10.4.2010.
- [5] Volka K. a kolektiv, *Analytická chemie I*, VŠCHT, Praha 1995
- [6] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P., *Spektrometrické analytické metody I*. Karolinum, Praha 2004.
- [7] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Klouda, Ostrava 2003.
- [8] <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>, 8.4. 2010
- [9] <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 16.4.2010.
- [10] Skoog D., Holler F., Nieman T.: *Principles of Instrumental Analysis*. 5. vydání, kap. 16., Brooks Cole, 1997.
- [11] Lyman D., Benck R., Dell S., Merle S., Murray-Wijelath J.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3268 (2003).
- [12] Wang J., Jun S., Bittenbender H.C., Gautz L., Li Q.X.: *J. Food Sci.* **74**, C385 (2009).
- [13] Pizarro C., Esteban-Diez I., Gonzalez-Saiz J.M.: *Anal. Chim. Acta* **585**, 266 (2007).
- [14] Esteban-Diez I., Gonzalez-Saiz J.M., Pizarro C.: *Anal. Chim. Acta* **515**, 31 (2004).
- [15] Esteban-Diez I., Gonzalez-Saiz J.M., Saenz-Gonzalez C., Pizarro C.: *Talanta* **71**, 221 (2007).
- [16] Garrigues J.M., Bouhsain Z., Garrigues S., de la Guardia M.: *Fresenius' J. Anal. Chem* **366**, 319 (2000).
- [17] Rubayiza A.B., Meurens M., *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4654 (2005).
- [18] Briandet R., Kemsley E.K., Wilson R.H.: *J. Agric. Food Chem* **44**, 170 (1996).
- [19] Alessandrini L., Romani S., Pinnavaia G., Rosa M.D.: *Anal. Chim. Acta* **625**, 95 (2008).

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PCA – analýza hlavních komponent

PLS – metoda částečných nejmenších čtverců

PCR – regrese hlavních komponent

OSC – ortogonální korekce signálu

DOSC – přímá ortogonální korekce signálu

RMSEP – standardní chyba odhadu

FT-IR – infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

NIR – infračervená spektrometrie v blízké oblasti

ATR – Metoda zeslabení úplného odrazu