



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## STANOVENÍ OBSAHU AKRYLAMIDU V KÁVĚ

DETERMINATION OF ACRYLAMIDE CONTENT IN COFFEE

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vlasta Janíčková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zdeněk Svoboda

BRNO 2017

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1100/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Vlasta Janíčková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Zdeněk Svoboda**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Stanovení obsahu akrylamidu v kávě

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Zpracování literární rešerše na téma:
  - a) Káva a její zpracování
  - b) Akrylamid v kávě a možnosti jeho stanovení
- 2) Experimentální část:
  - a) Stanovení obsahu akrylamidu v kávě metodou plynové chromatografie
  - b) Vyhodnocení výsledků a jejich porovnání s literaturou

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Vlasta Janíčková  
student(ka)

-----  
Ing. Zdeněk Svoboda  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Cílem bakalářské práce bylo stanovení obsahu akrylamidu ve vybraných vzorcích pražených mletých káv. Jednotlivé vzorky kávy se od sebe lišily obchodní značkou a druhem. V praktické části práce bylo provedeno stanovení obsahu akrylamidu v jednotlivých vzorcích káv metodou plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostním detektorem.

## **ABSTRACT**

The aim of this bachelor thesis was determination of the acrylamide levels in selected types of roasted ground coffee. The particular samples of coffee differed in brand and composition. In practical part the determination of acrylamide levels in coffee extracts was analyzed by using gas chromatography in combination with mass spectrometry.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Káva, Arabica, Robusta, akrylamid, Maillardova reakce, GC/MS

## **KEYWORDS**

Coffee, Arabica, Robusta, acrylamide, Maillard reaction, GC/MS

JANÍČKOVÁ, V. *Stanovení obsahu akrylamidu v kávě*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 38 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdeněk Svoboda

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu práce Ing. Zdeňkovi Svobodovi za odborné rady, trpělivost a ochotu pomoci při zpracování bakalářské práce.

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Historie kávy.....	8
2.2	Kávovník .....	8
2.2.1	Coffea arabica .....	9
2.2.2	Coffea canephora .....	9
2.2.3	Coffea Dewevrei .....	9
2.2.4	Coffea Stenophylla .....	9
2.3	Pěstování kávovníku.....	9
2.4	Sklizeň .....	10
2.5	Zpracování .....	10
2.5.1	Suchá metoda.....	10
2.5.2	Mokrý metoda .....	10
2.5.3	Polomokrý zpracování .....	11
2.6	Loupání a leštění.....	11
2.7	Pražení .....	11
2.8	Chemické složení kávy.....	12
2.8.1	Sacharidy .....	14
2.8.2	Bílkoviny .....	14
2.8.3	Lipidy.....	14
2.8.4	Organické kyseliny .....	14
2.8.5	Kofein .....	15
2.8.6	Trigonelin, kyselina nikotinová .....	16
2.8.7	Minerální látky.....	16
2.8.8	Melanoidy .....	17
2.8.9	Aromatické látky.....	17
2.9	Antioxidační aktivita kávy.....	17
2.9.1	Polyfenoly .....	17
2.9.2	Kyselina chlorogenová .....	18
2.9.3	Flavonoidy .....	18

2.10	Kontaminanty.....	19
2.10.1	Furan .....	19
2.10.2	Ochratoxin A.....	19
2.10.3	Akrylamid .....	20
3	Akrylamid .....	21
3.1	Vznik akrylamidu v potravinách .....	21
3.1.1	Maillardova reakce .....	22
3.1.2	Tvorba akrylamidu z akroleinu .....	23
3.1.3	Neoxidativní tvorba akrylamidu .....	23
3.1.4	Termální degradace asparaginu .....	24
3.2	Legislativa .....	24
3.3	Možnosti stanovení obsahu akrylamidu v kávě.....	24
3.3.1	Kapalinová chromatografie.....	24
3.3.2	Plynová chromatografie .....	25
3.3.3	Detektory .....	26
4	Experimentální část.....	27
4.1	Materiály a metody .....	27
4.1.1	Pomůcky a příslušenství .....	27
4.1.2	Chemikálie .....	27
4.1.3	Materiál .....	28
4.1.4	Příprava vzorků kávy .....	28
4.1.5	Instrumentace a chromatografické stanovení .....	28
5	Výsledky a diskuze .....	31
6	Závěr .....	34
7	Seznam použitých zdrojů .....	35
8	Seznam použitých zkratk a Symbolů .....	38

# 1 ÚVOD

V současnosti se klade vysoký důraz na kvalitu a bezpečnost potravin. Potraviny jsou kontaminovány jak mikroorganismy, tak nejrůznějšími chemickými látkami. Mezi toxické látky, které vznikají během technologického a především tepelného zpracování potravin, patří i procesní kontaminant akrylamid. Akrylamid je toxická látka, která byla zařazena do skupiny 2A, jako pravděpodobný lidský karcinogen, dále má neurotoxické, mutagenní, teratogenní a genotoxické vlastnosti, včetně negativního vlivu na reprodukci. [1]

Akrylamid byl nalezen v tepelně zpracovaných potravinách, a to převážně v pečených, pražených nebo smažených produktech. Vysoký obsah akrylamidu ve zpracovaných potravinách nejvíce souvisí s vysokým obsahem škrobu v surovině, jako jsou například brambory nebo obiloviny. Akrylamid vzniká v průběhu Maillardovy reakce a jeho prekurzory jsou redukující cukry a aminokyselina asparagin. [2] Nižší množství akrylamidu se tvoří alternativními reakcemi. Akrylamid lze nalézt v pražené kávě.

Káva patří mezi nejvíce konzumované nápoje na světě a je druhou nejvíce obchodovanou komoditou hned po ropě. Od roku 1950 do roku 1960 vzrostla produkce o 100 %. Brazílie, Vietnam, Kolumbie a Indonésie patří mezi největší producenty kávy na světě. Dalšími významnými producenty jsou jižní Amerika, Asie, Střední Amerika a Afrika. V roce 2008 činila světová produkce 7 680 000 tun kávových zrn. [3] Za rok 2016 činila světová spotřeba kávy 9 097 440 tun kávových zrn. Káva tedy může být velkým zdrojem příjmu akrylamidu, z toho důvodu je nutné obsah akrylamidu v kávě sledovat.

Množství akrylamidu v kávě závisí na druhu kávy, podmínkách pražení a přítomnosti nezralých plodů, které obsahují vyšší množství asparaginu oproti zralým. [1] Všeobecně platí, že vyšší obsah akrylamidu je v kávě typu Robusta, což souvisí s vyšší koncentrací volného asparaginu. Akrylamid se tvoří v počátku pražení kávových zrn, s vyšší teplotou i delší dobou tepelného působení obsah akrylamidu klesá. [4]

Pro stanovení obsahu akrylamidu se využívají metody plynové nebo kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostním detektorem. Jako další metody stanovení akrylamidu lze využít také kapilární elektroforézu. [5]

Cílem této práce je stanovení obsahu akrylamidu v kávě metodou GC/MS.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Historie kávy

Objev kávy a vývoj její kultury samotné je částečně založen na legendách. Jedna z nich vypráví o pastýři Khaldimu, který žil v oblasti, pravděpodobně na území Turecka, kde kávovníky rostly velmi hojně. Jeho ovce byly při putování v horkém dni velmi líné. Poté co se napásly ovoce ze stromů v okolí, začaly být velmi aktivní. Khaldi si následně sám povařil část plodů ve vodě a vypil ji. Během chvíle jeho energie vzrostla. [6]

Historické prameny uvádí, že první káva byla uvařena kolem roku 1000 n. l. v Arábii. Od 13. století pili muslimové kávu z nábožných důvodů. S rozšířením Islámu došlo i k rozšíření kávy do severní Afriky, východního Středomoří a Indie. Arabové začali vyvážet kávu zpracovanou vysušením nebo vařením, aby kávová semena neklíčila mimo Afriku nebo Arábii a to až do roku 1600 n. l. V této době začala expanze kávy do Evropy.

V roce 1615 přivezl kávu do Evropy benátský kupec. V roce 1616 Holandsko překonalo prvotní potíže a poprvé se začala káva pěstovat v Evropě. V roce 1696 našli druh původní evropské kávy také v kolonii Jáva v Indonésii.

Kolem roku 1714 získal Ludvík XIV. od Holandska kávovník. Kávovník byl umístěn do královské botanické zahrady Jardin des Plantes v Paříži. O několik let později se výhonek této rostliny, díky námořnímu důstojníkovi Gabrieli Mathieu de Clieu, podařilo vysadit a rozmnožit na Martiniku.

V roce 1727 se brazilská vláda rozhodla ukončit trh s kávou a začít pěstovat kávu vlastní. Pomocí lsti získal plukovník Francisco de Melo Palheta několik výhonků od guvernéra Francouzské Guyany. Již v roce 1800 byly v Brazílii obrovské sklizně a Brazílie se stala kávovou velmocí. Od této chvíle se káva rozšiřuje do celého světa. [7]

Káva se v dnešní době pěstuje na všech kontinentech. [9] Největšími producenty jsou Brazílie, která produkuje 25 % kávových zrn ze světové produkce, Vietnam, Kolumbie a Indonésie, dále pak jižní Amerika, Asie, Střední Amerika a Afrika. [3] Její spotřeba k roku 2016 činila 9 097 440 tun kávových zrn.

### 2.2 Kávovník

Kávovník je rozšířená rostlina tropického a subtropického pásma, protože pro svůj růst potřebuje teplejší a stálější klima. Tuto rostlinu řadíme do ovocných dřevin a pěstuje se asi v 70 různých zemích. Pěstuje se zvláště pro její semena. Kávovník se nejčastěji pěstuje ve Střední a Jižní Americe, v Africe, Austrálii a Asii. [8]

Kávovník je rostlina z rodu *Coffea*, čeleď mořenovitě (*Rubiaceae*). Tato čeleď zahrnuje asi 60 různých druhů rostlin. Kávovník dorůstá různé výšky, má velké lesklé listy s eliptickou, kožovitou, lesklou případně chmýřnatou čepelí. Větve i listy jsou vstřícné, občasné je i výskyt v přeslenu. Kávovník kvete bílými květy s omamnou vůní. Plod kávovníku je peckovice o velikosti asi 1,5 – 1,8 cm. Plod je nejdříve zelený, později barva přechází přes zelenožlutou až do třešňové. Kávovníky začínají plodit až okolo třetího roku od vysazení a nejvyšší výnosy dávají až po pátém roce. [8], [9]

Plod kávovníku má kožovité oplodí (exokarp), nasládlý míšek (mezokarp), který je bohatý na sacharidy, tuhou pergamenovou slupku (endokarp) a vlastní semena. Plod většinou obsahuje dvě semena. Občas se stává, že jedno ze semen zakrní a vznikne tak semeno pouze

jedno. Takto vzniklé semeno se označuje jako „zrno perlové“ a připravená káva jako „káva perlová“. Mezi hospodářsky významné druhy kávovníků patří *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea liberica*, *Coffea Dewevrei* a *Coffea Stenophylla*. [9]

### 2.2.1 *Coffea arabica*

*Coffea arabica* nebo také *Coffea vulgaris* Moench, bývá také označována jako kávovník arabský nebo Arabica. Řadí se mezi nejlepší a nejkvalitnější kávy a tvoří zhruba 75 % světové produkce. Oproti *Coffea canephora* má tento druh menší procento obsahu kofeinu. Jde o stálezelený keř nebo strom, jehož plod má elipsoidní tvar a při dozrávání se mění jeho barva ze zelenožluté až k fialově červené. Tento druh bývá často napadán listovou rzí a jeho plody a semena pak kávovým broukem. Zrno je ploché a protáhlé se zakřivenou rýhou uprostřed, barva je zelená až s namodralým tónem. [9]

### 2.2.2 *Coffea canephora*

*Coffea canephora* také *Coffea robusta*, bývá označována pouze jako „Robusta“. Patří mezi levnější a také méně kvalitní kávy. Tvoří zhruba 25 % světové produkce kávy. Tento druh se pěstuje ve Vietnamu a je odolnější vůči vnějším vlivům a ve směsi s arabicou tvoří základ pro instantní kávu. Jde o keř či strom, který má široké zvlněné a veliké listy. Na rozdíl od druhu *Coffea arabica* má Robusta vypouklejší a zaoblenější zrna, rýha je rovná a barva zrnka je světle zelená s nahnědlým případně našedlým odstínem. [9] Semena jsou menší než u Arabicy. Křížením druhu *Coffea canephora* a *Coffea arabica* vznikl hybrid „arabusta“.

*Coffea liberica*, nebo také „liberica“, tvoří asi 1 % světové produkce. Pro tento druh je charakteristická hořká a trpká chuť, proto se používá ve směsích. Její kříženec s arabicou dává tzv. sloní zrna, neboli „maragogipe“. Jde o strom, či keř, jehož semena jsou velká, světle žlutá až žlutozelená. Je rozšířen převážně v deštných pralesích v Angole, Sierra Leone, Pobřeží slonoviny a Libérii. [9]

### 2.2.3 *Coffea Dewevrei*

*Coffea Dewevrei* je káva s nízkou kvalitou a velmi ostrou, výraznou až odpornou vůní. Její předností je vysoký obsah kofeinu. [9]

### 2.2.4 *Coffea Stenophylla*

*Coffea Stenophylla* je vysoce odolná proti listové rzí a její chuť je velmi uspokojivá. [9]

## 2.3 Pěstování kávovníku

Káva se pěstuje v mnoha oblastech na všech kontinentech. Největšími producenty kávy jsou Brazílie, která produkuje více než 25 % světové sklizně, dále Kolumbie, Mexiko, Indie, Vietnam, Indonésie a Etiopie. Kvalita kávy velmi úzce souvisí s oblastí pěstování, rozhoduje nadmořská výška a také složení půdy. [9]

Optimální podmínky pro pěstování druhu *Coffea arabica* jsou v rovníkových oblastech v nadmořské výšce 1500-2000 m, s průměrnou roční teplotou 16 – 24 °C a srážkami 1800 mm za rok. Nejvhodnější podnebí je monzunové. Právě střídání období sucha a dešťů ovlivňuje periodu kvetení a tedy i sklizeň plodů. Tento druh vyžaduje hluboké a propustné půdy, dokáže růst také na půdách chudších a šterkovitých. Optimální pH pro pěstování je 4,4 – 6. [9]

Teplotní optimum pro druh *Coffea canephora* je mezi 25 – 28 °C, v jiných ohledech je méně náročná na podmínky pěstování než *Coffea arabica*. Roste v nížinách tropického pásma a to do výšky 1500 m. Pro její růst jsou optimální srážky 1500 – 1800 mm za rok. Nároky na půdu jsou obdobné jak u druhu *Coffea arabica*. [9]

Tabulka 1: Produkce kávových zrn v roce 2006 (1000 t) [11]

Kontinent	Množství kávy	Země	Množství kávy
Svět	7843	Brazílie	2593
Afrika	922	Vietnam	854
Střední Amerika	1020	Kolumbie	696
Severní Amerika	3	Indonésie	653
Jižní Amerika a Karibik	4782	Mexiko	288
Asie	2069	Indie	274
Evropa	-	Etiopie	260
Oceánie	68	Guatemala	257
		Honduras	191
		Peru	175
		∑ (%) ze světové produkce	75

## 2.4 Sklizeň

Pro oblast od rovníku po obratník Raka probíhá sklizeň kávy od prosince do února, oproti tomu v oblasti od rovníku po obratník kozoroha probíhá sklizeň od května do srpna. Kávové bobule se sklízí ručně, nebo česáním a většina z nich musí být vyzrálé. Sklizeň může probíhat také sběrem popadaných bobulí ze země. [9]

## 2.5 Zpracování

Kávovníkové plody se po sklizni plaví ve velkých nádržích, kde se čistí. K odstranění dužiny bobulí se využívají tři metody - suchá, mokrá a polomokrá. [9] Při takovéto úpravě kávových zrn vzniká tzv. surová neboli zelená káva. Zelená káva se dále praží. [9]

### 2.5.1 Suchá metoda

Suchá metoda, nebo také přírodní, se používá v Brazílii a zahrnuje rychlý přesun sklizených bobulí na určené místo, kde se rozloží na terasách. Zde se nechají sušit, dokud se zrnka neoddelí od dužiny. [11] Během sušení se několikrát za den přehazují. [9] Pomocí loupacího stroje se z bobulí odstraní suchá slupka a pergamenová slupka. Oloupaná a čistá kávová zrna jsou roztříděna podle velikosti a balena do pytlů po 60 kg. [11]

### 2.5.2 Mokrá metoda

Mokrá metoda je sofistikovanější než metoda suchá. Používá se pro arabskou kávu, kromě Brazílie, ve Střední Americe, Kolumbii a Africe. Čerstvě sklizené bobule se dají do drtiče, ve kterém jsou zrna sevřena mezi rotující válec nebo disk a desku s nastavitelnou šterbinou. Převážná část dužiny se oddělí od kávových zrn v pergamenové slupce. Zbytky

dužiny se odstraní v nádržích fermentací. Kávová zrna se dobře vyperou se suší na slunci při teplotě 65 – 85 °C. Často se označují jako káva pergamino, díky pergamenové slupce. V loupacím stroji se kávová zrna vyloupou a vytřídí se nezralé a lehké plody. [11]

### 2.5.3 Polomokrý zpracování

Dalším možným způsobem zpracování kávových bobulí je polomokrý, nebo také polopromytý zpracování. Podobně jako u mokré metody jsou kávové bobule drceny pomocí drtícího stroje. Pro produkci polomokrý arabicy se nepoužívá fermentační tank a kávová zrna se suší na slunci v pergamenové slupce. Po 6 dnech je konečný obsah vody asi 12 % ve vlhkém stavu. [12]

## 2.6 Loupání a leštění

Před exportem se ze zpracovaných zrn odstraňuje pergamenová slupka. Proces loupání probíhá ve speciálních strojích. Loupání kávových zrn, které byly zpracovány mokrou metodou, je mnohem náročnější než u zrn zpracovaných suchou metodou. [8]

Po odstranění pergamenové slupky se zrna leští ve strojích, které jsou podobné strojům loupacím. Při leštění může docházet ke spálení zrn. Někteří odběratelé žádají, aby na kávových zrnkách část pergamenové slupky zůstalo. [8]

Po leštění zůstávají zrna uskladněna po dobu asi 1 – 2 měsíců, následně se třídí podle různých faktorů, jako je kvalita, velikost, případně tloušťka. Při třídění se vyřazují zrna vadná a defektní. Třídění probíhá ručně nebo mechanicky, pomocí sít nebo silný proud vzduchu, při kterém těžká zrna padají dolů jako první. [8]

## 2.7 Pražení

Pro zelené boby je typická zemitá vůně. Z toho důvodu musí být tepelně ošetřeny v procesu, který se nazývá pražení. Pražením získávají kávová zrna charakteristické aroma a chuť. V tomto procesu dochází v kávových zrnech k podstatným změnám. [11] Vysoká teplota ovlivňuje řadu fyzikálních a chemických změn v kávových zrnech. [13] Pražení probíhá v teplotním rozmezí mezi 100 °C a cca 200 °C. Kávová zrna zvýší svůj objem, a to o 50 – 80 %, a změní se jejich struktura a barva. Zelená barva je nahrazena hnědou, zrno ztrácí 11–20 % hmotnosti a získává typickou praženou chuť kávového zrna. [11]

Pražení má čtyři hlavní fáze, sušení, vývoj, rozklad a plné pražení. K prvním změnám dochází při teplotě 50 °C, nebo nad ní, kdy protein obsažený v tkáňových buňkách denaturuje a dochází k odpařování vody. Při teplotě cca 100 °C dochází k hnědnutí, dále k pyrolýze organických sloučenin, která je doprovázená bobtnáním. Počáteční suchou destilací při asi 150 °C dochází k uvolnění těkavých produktů, jako je voda, oxid uhelnatý a oxid uhličitý. To má za následek zvětšení objemu kávových bobů. [11] Chemické změny v této fázi jsou relativně malé v porovnání se změnami na konci procesu. [13]

Fáze rozkladu probíhá při teplotě 180 – 200 °C. Pro tuto fázi je charakteristické vyskočení zrna a jeho prasknutí podél drážky nebo brázdy. Tvoří se namodralý kouř a dochází k uvolnění kávového aroma. [11] V této fázi probíhají Maillardovy reakce a reakce Streckerovy, které zahrnují sacharidy ve formě redukcujících cukrů, bílkoviny a další třídy sloučenin, které mají nízkou nebo vysokou molekulovou hmotnost, jako jsou například melanoidiny, a jsou současně degradovány a zároveň produkovány. [13]

V poslední plné fázi pražení dochází k optimální karamelizaci a obsah vlhkosti kávového zrna klesne na konečnou hodnotu 1,5 – 3,5 %. [11]

Během pražení dochází k přenosu tepla kontaktem zrn o stěnu pražičky, horkým vzduchem nebo pomocích spálených plynů (konvekci.) Skutečný kontakt není důležitý, protože k přenosu tepla dochází nerovnoměrně a je proto nutné uvést délku pražení. Ta se pohybuje okolo 20 – 40 minut. Při kontaktně-konvekčním pražení probíhá pražení okolo 6 – 15 minut. [11]

Parametry pražení, jako je množství kávy v pražičce, teplota, doba pražení a rychlost cirkulace horkého vzduchu používaného k dosažení jednotného stupně pražení, se mohou značně lišit. Rychlost, při které kávové zrno dosáhne požadované barvy, je ovlivněna řadou fyzikálně-chemických a chemických parametrů. Mezi tyto parametry patří také chuť a biologická aktivita nápoje. Z toho vyplývá, že dva vzorky stejné kávy pražené na stejné úrovni mohou mít různé chemické složení, a to v případě, že pražení probíhalo v různých podmínkách. [13]

## **2.8 Chemické složení kávy**

Složení zelené kávy závisí na odrůdě, původu zpracování nebo klimatu. [11] Netěkavé složky zelené kávy jsou složeny z vody, sacharidů a vlákniny, bílkovin a volných aminokyselin, lipidů, minerálních látek, organických kyselin, kyseliny chlorogenové, trigonelinu a kofeinu. Sloučeniny nalezené v zelené kávě, jako jsou chlorogenové kyseliny, kofein, trigonelin, rozpustná vláknina a diterpeny z lipidové frakce mohou být biologicky aktivní. Přispívají také k chuti kávy po pražení. [13]

Fenolické sloučeniny, jako jsou antokyany a lignity, jsou v minoritním zastoupení. Byly také prohlášeny za zbytky ovoce. Stopy teofylinu a teobrominu byly identifikovány v kávových zrnech a označeny za metabolity kofeinu. [11]

Tabulka 2: Složení zelených zrn druhu *Coffea arabica* a *Coffea robusta* v % sušiny [11]

<b>Přítomná látka</b>	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea robusta</i>	<b>Sloučeniny</b>
<b>Rozpuštěné sacharidy</b>	9 – 12,5	6 – 11,5	Fruktosa, glukosa, galaktosa, arabinosa
<b>Ner rozpustné sacharidy</b>	46 – 53	34 – 44	
Hemicelulosa	5 – 10	3 – 4	Polymery galaktosy, arabinosy, manosy
Celulosa	41 – 43	32 – 40	
<b>Kyseliny a fenoly</b>			
Těkavé kyseliny	0,1		
Netěkavé kyseliny	2 – 2,9	1,3 – 2,2	Kyselina octová, jablečná, chinová
Chlorogenová kyselina	6,7 – 9,2	7,1 – 12,1	
Lignin	1 – 3		
<b>Lipidické sloučeniny</b>	15 – 18	8 – 12	
Vosky	0,2 – 0,3		
Oleje	7,7 – 17,7		Hlavně estery kyseliny palmitové a linolové
<b>Dusíkaté sloučeniny</b>	11 – 15		
Volné aminokyseliny	0,2 – 0,8		Kyselina glutamová, asparagová, asparagin
Bílkoviny	8,5 – 12		
Kofein	0,8 – 1,4	1,7 – 4,0	Teobromin a teofylin
Trigonelin	0,6 – 1,2	0,3 – 0,9	
<b>Minerální látky</b>	3 – 5,4		

Složení pražené kávy se značně liší. Záleží na odrůdě a stupni pražení. Složení pražené kávy, při středním stupni pražení, je uvedeno v tabulce 3. [11]

Tabulka 3: Složení pražené kávy druhu *Coffea arabica* a *Coffea robusta* v % sušiny [11]

<b>Přítomná látka</b>	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea robusta</i>
Kofein	1,3	2,4
Tuky	17,0	11,0
Bílkoviny	10,0	10,0
Sacharidy	38,0	41,5
Trigonelin, niacin	1,0	0,7
Alifatické kyseliny	2,4	2,5
Chlorogenové kyseliny	2,7	3,1
Těkavé sloučeniny	0,1	0,1
Minerály	4,5	4,7
Melanoidy	23,0	23,0

### 2.8.1 Sacharidy

Většina sacharidů v kávě, jako je celulóza a polysacharidy, se skládá z manózy, galaktózy a arabinózy, které nejsou rozpustné. Během pražení dochází k degradaci části polysacharidů do fragmentů, které jsou rozpustné. Sacharóza, která je přítomná v zelené kávě, a to až do koncentrace 0,4 – 2,8 %, se v kávě při pražení rozkládá. Monosacharidy se v pražené kávě vyskytují jen velmi málo. [11]

### 2.8.2 Bílkoviny

Při zahřívání bílkovin v přítomnosti sacharidů dochází u bílkovin k rozsáhlým změnám. Dochází k přesunu ve složení aminokyselin kávových kyselé hydrolyzovaných bílkovinách, a to před a po pražení kávových zrn. Celkový obsah aminokyselin klesá přibližně o 30 %, a to z důvodu značné degradace. Obsah argininu, kyseliny asparagové, cysteinu, histidinu, lysinu, serinu, treoninu a metioninu, které jsou obzvláště reaktivními aminokyselinami, klesá v pražené kávě. Na druhou stranu, obsah stabilních aminokyselin, zejména alaninu, kyseliny glutamové a leucinu se relativně zvyšuje. Volné aminokyseliny se v pražené kávě vyskytují pouze ve stopových množstvích. [11]

### 2.8.3 Lipidy

Frakce lipidů jsou velmi stabilní a proces pražení je téměř nezmění. Převládající mastnou kyselinou je kyselina linolová. Druhou nejčastější je kyselina palmitová. Vosky nezpracované kávy, spolu s hydroxytryptamidovými estery různých mastných kyselin (arachidonová, bendová, lignocerová), pocházejí z epikarpu zrna. Tyto sloučeniny jsou z 0,06 – 0,1 % obsaženy v pražené kávě. Z diterpenů jsou přítomny látky cafestol, 16-O-methylcafestol a kahweol. Látky cafestol a kahweol jsou v procesu pražení degradovány. Diterpen 16-O-methylcafestol byl objeven v kávě robusta, je tedy vhodným indikátorem pro detekci mísení kávy druhu arabica s robustou, a to i v případě instantní kávy. [11]

### 2.8.4 Organické kyseliny

Mezi těkavými kyselinami převažují kyselina mravenčí a kyselina octová. Mezi netěkavé kyseliny řadíme kyselinu mléčnou, kyselinu vinnou, kyselinu pyrohroznovou a kyselinu citrónovou. Vyšší mastné kyseliny a kyselina malonová, kyselina jantarová, kyselina glutarová a kyselina jablečná jsou zastoupeny v minoritním množství. Nejčastějšími kyselinami v kávě jsou kyseliny chlorogenové. Obsah těchto kyselin klesá v závislosti na pražení. [11]

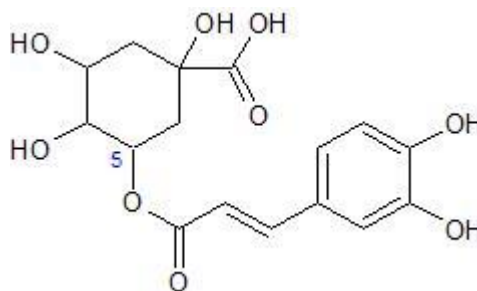
Zelená a pražená káva obsahuje více než 30 esterů hydroxykyselinových kyselin. Názvem chlorogenová kyselina se označují všechny přírodní estery kyseliny chinové. Jsou to hlavní kyseliny zelené kávy, které se vyskytují v 7 – 10 % sušiny. Při pražení dochází k degradaci z 30 až 70 %, a vznikají fenoly a jiné sloučeniny. Můžeme rozlišit základní tři skupiny estrů chinové kyseliny podle polohových isomerů, a to na monoestery (diestery) v poloze C-3, C-4 a C-5. V každé z těchto skupin se podle druhu a počtu molekul vážou fenolové kyseliny, které rozlišují podskupiny esterů. Diestery a smíšené diestery dikaffeoyl-chinové kyseliny a feruloylkaffeoyl-chinové kyseliny spolu s N-Kaffeoyl-L-tryptofan a N-kaffeoyl-L-tyrosin se vyskytují pouze u druhu robusta, v kávě arabské se nevyskytují. [15]

Tabulka 4: Obsah hlavních hydroxyskořicových kyselin v pražené kávě (*Coffea arabica*) [15]

Kyselina	Obsah v g/kg
3-kaffeolyl-chinová (chlorogenová)	20
4-kaffeolyl-chinová (kryptochlorogenová)	2
5-kaffeolyl-chinová (neochlorogenová)	1
3,4-dikaffeolyl-chinová (isochlorogenová)	0,1
3,5-dikaffeolyl-chinová (isochlorogenová)	0,9
4,5-dikaffeolyl-chinová (isochlorogenová)	0,1

Tabulka 5: Obsah kyseliny chlorogenové v % sušiny [11]

Stupeň pražení	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea robusta</i>
Syrové	6,9	8,8
Světlé	2,7	3,5
Střední	2,2	2,1
Tmavé	0,2	0,2



Obrázek 1: Chemický vzorec kyseliny chlorogenové [15]

### 2.8.5 Kofein

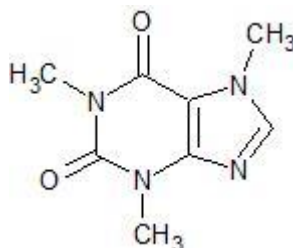
Alkaloid kofein je nejznámější dusíkatá sloučenina v kávě, a to díky jeho fyziologickým účinkům. Kofein stimuluje centrální nervový systém, zvyšuje krevní oběh a dýchání. Krystalizuje s jednou molekulou vody za tvorby hedvábných, bílých jehliček, které tají při teplotě 236,5 °C, a sublimuje bez rozkladu při teplotě 178 °C. Obsah kofeinu v neupravené kávě arabica je 0,9 – 1,4 %, zatímco u odrůdy robusta je obsah 1,5 – 2,6 %. V průběhu pražení dochází k mírnému poklesu podílu kofeinu. [11]

Čistý kofein má charakteristickou nahořklou chuť a je mírně toxický, dokonce čtyřikrát více toxický než morfin. [14]

Množství kofeinu v kávě je závislé na způsobu přípravy, teplotě vody a době extrakce. Průměrný obsah kofeinu v jednom šálku kávy je přibližně 80 mg, v dekofeinované kávě 1 – 6 mg, v instantní kávě 29 – 91 mg, v překapávané 37 – 132 mg a filtrované 93 – 127 mg (ve 100 ml kávy). Káva bez kofeinu se vyrábí pomocí extrakce kofeinu organickými rozpouštědly, jako je dichlormethan nebo oxid uhličitý. [15]

Kofein, který se získá přírodním způsobem, a syntetický kofein má využití ve farmaceutickém průmyslu a při výrobě nealkoholických nápojů. Syntetický kofein se získává metylací xantinu, který se syntetizuje z kyseliny močové a formamidu. [11]

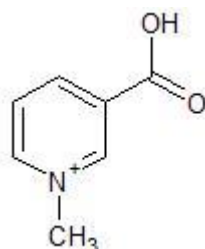
Mezi další alkaloidy přítomné v kávě patří theobromin a theofylin. V kávě jsou obsaženy v menších množstvích než kofein (theobromin v *Coffea arabica*: 36 – 40 mg/kg, *Coffea robusta* 26 – 82 mg/kg; a theofylin v *Coffea arabica* 7 – 23 µg/kg, *Coffea robusta* 86 – 344 µg/kg). [11]



Obrázek 2: Chemický vzorec molekuly kofeinu [11]

### 2.8.6 Trigonelin, kyselina nikotinová

Trigonelin, kyselina N-methylnikotinová, je přítomen v zelené kávě až do 0,6 %. V průběhu pražení dochází k jeho rozkladu, a to z 50 %. Degradční produkty zahrnují nikotinové kyseliny, pyridin, 3-methyl-pyridin a další látky. [11]



Obrázek 3: Chemický vzorec trigonelinu [16]

### 2.8.7 Minerální látky

Podobně jako v jiných rostlinných materiálech, v kávovém popelu převládá draslík, následuje ho vápník a hořčík. Z převládajících aniontů jsou zde fosfáty a sulfáty. Mnoho dalších prvků jsou přítomny ve stopovém množství. [11]

Tabulka 6: Nejvíce zastoupené minerály v pražené kávě

Minerální látky	Zastoupení v %
Draslík	1,1
Vápník	0,2
Hořčík	0,2
Fosfáty	0,2
Sulfáty	0,1

### 2.8.8 Melanoidy

Melanoidy, hnědé látky, jsou přítomny v rozpustné frakci pražené kávy. Jejich molekulová hmotnost je v rozmezí 5 – 10 kDal a jsou odvozeny od Maillardových reakcí případně z karamelizace sacharidů. Struktury těchto sloučenin nebyly dosud objasněny. Na reakcích hnědnutí se zřejmě podílí i kyselina chlorogenová. [11]

### 2.8.9 Aromatické látky

Těkavé látky se podílí z 0,1 % na hmotnosti pražené kávy druhů rodu *Coffea*. Je známo přes 800 sloučenin, které se podílí na aroma pražené kávy a více než 200 těchto látek bylo prokázáno v kávě zelené. Na aroma kávy se výrazně uplatňuje pouze 60 těchto sloučenin. [17]

V pražené kávě je obsažen velký počet heterocyklických sloučenin, a to furany, pyrroly, indoly, pyridiny, chinoliny, pyraziny, chinoxaliny, thiofeny, thiazoly, oxazoly a jiné. Tyto látky vznikají Maillardovou reakcí a při pražení kávy karamelizací. Na aroma se podílí také alifatické sloučeniny, jako jsou uhlovodíky, alkoholy, karbonylové sloučeniny, karboxylové kyseliny, estery, alifatické sírné a dusíkaté sloučeniny, ketony a aromatické sloučeniny. [17]

Tyto složky sami o sobě nevykazují typické aroma kávy, výjimkou jsou 2-furan-methanthiol a 5-methyl-2-furanmethanthiol, které vydávají praženou vůni připomínající kávu. [17]

## 2.9 Antioxidační aktivita kávy

Káva patří mezi nápoje s vysokou spotřebou, zvláště v Evropě a Americe, a to díky své jedinečné chuti a vůni. I přes její účinky na zdraví je káva uznávána jako bohatý zdroj látek s antioxidačními účinky. [17]

Zelená káva obsahuje účinné rostlinné antioxidanty, jako jsou kyseliny chlorogenové, fenolické kyseliny, polyfenolů a alkaloidy. Jejich obsah se liší druhem kávovníku, ale také jejich původem. [17] Káva druhu *robusta* vykazuje vyšší antioxidační aktivitu než extrakt z druhu *arabica*. *Robusta* obsahuje také více redukujících látek než *arabica*. [18]

V závislosti na podmínkách pražení jsou přírodní antioxidanty v kávě často rozkládány nebo vázány v polymerních strukturách. Bylo dokázáno, že antioxidační kapacita pražené kávy převyšuje zelená kávová zrna. Optimální antioxidační účinek má středně pražená káva.

### 2.9.1 Polyfenoly

Fenolové sloučeniny jsou sekundárním metabolity, které se podílejí na adaptaci rostliny na stresové podmínky prostředí. Hlavní složkou fenolové frakce zelených kávových zrn jsou kyseliny chlorogenové a příbuzné látky. Dosahují 14 % sušiny základu. Tyto sloučeniny mají prospěšné vlastnosti, které souvisí se silnou antioxidační aktivitou. [19]

Fenolové sloučeniny jsou složky vyšších rostlin, které se nacházejí v běžně konzumovaných rostlinných potravinách, jako je ovoce, zelenina a luštěniny, v nápojích rostlinného původu, jako je víno, čaj nebo káva. Všechny tyto sloučeniny se podílejí na ochraně proti ultrafialovému záření nebo proti patogenům. [19]

V kávové dřevě a slupce se nacházejí třísloviny, které jsou hlavními fenolickými sloučeninami v těchto částech plodů. Kávová dřevina a slupka se využívá jako krmivo. Je nutné dát si ale pozor, protože jsou považovány za anti-živiny pro přežvýkavce. Kávová dřevina

a slupka obsahují také malé množství nerozpustných kondenzovaných taninů, kde představují asi 0,8 – 2,8 % sušiny. [19]

Polyfenoly vykazují vyšší antioxidační aktivitu, než mají např. kyselina askorbová a tokoferoly. Tyto sloučeniny jsou přítomné ve větších množstvích v zelenině a ovoci. Polyfenoly mají širokou rozmanitost struktur a biologické dostupnosti. [14]

### 2.9.2 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová, jako ester kyseliny kávové a kyseliny chinové, je hlavní fenolickou sloučeninou v kávě. [21] Obsah chlorogenových kyseliny v pražené kávě závisí na druhu kávovníku a také na způsobu pražení semen. Pro semena kávy arabica platí, že obsahují méně chlorogenových kyseliny než semena kávy robusta. Při pražení semen dochází k rozkladu kyseliny chlorogenové, a to z 30 – 70 %, kdy vznikají fenoly a jiné sloučeniny. [1]

Lze rozlišit základní tři skupiny esterů chinové kyseliny, a to podle polohových isomerů, na monoestery nebo diestery. V těchto skupinách se vážou podle druhu a počtu molekul fenolové kyseliny rozlišující podskupiny esterů. Diestery a smíšené diestery dikaffeolyl-chinové kyseliny a feruloylkaffeolyl-chinové kyseliny spolu s N-Kaffeolyl-L-tryptofan a N-kaffeolyl-L-tyrosin se vyskytují pouze u druhu robusta, v kávě arabské se nevyskytují.[15]

Tabulka 7: Obsah hlavních hydroxyskořicových kyselin v pražené kávě [15]

Kyselina	Obsah v g/kg
3-kaffeolyl-chinová (chlorogenová)	20
4-kaffeolyl-chinová (krytochlorogenová)	2
5-kaffeolyl-chinová (neochlorogenová)	1
3,4-dikaffeolyl-chinová (isochlorogenová a)	0,1
3,5-dikaffeolyl-chinová (isochlorogenová b)	0,9
4,5-dikaffeolyl-chinová (isochlorogenová c)	0,1

### 2.9.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické látky izolované z cévnatých rostlin. Je známo více než 8000 jednotlivých sloučenin. Flavonoidy se v rostlinách chovají jako antioxidanty, antimikrobiální látky nebo fotoreceptory. Vykazují také biologickou aktivitu, antialergickou, antivirovou, protizánětlivou a vasodilatační aktivitu. Mají schopnost snižovat tvorbu volných radikálů a zachycovat je. [22]

Flavonoidy ve své struktuře obsahují dva benzenové kruhy, kruh A a kruh C, které jsou spojeny pomocí tříuhlíkového řetězce. Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2H-chromenu, na kterém je v poloze 2 substituován fenylovou skupinou. Tato sloučenina se nazývá flavan.

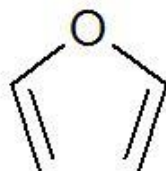
V několika případech vytvořen šestičlenný heterocyklický kruh B, který je v isomerní otevřené formě nebo je nahrazen pětičlenným heterocyklickým kruhem. [1]

## 2.10 Kontaminanty

Kvalitu kávy ovlivňuje obsah kontaminujících toxických látek, a to zejména furan, ochratoxin A a akrylamid. Tyto látky jsou v kávě nežádoucí a způsobují zdravotní rizika. [23]

### 2.10.1 Furan

Furan je jednoduchá heterocyklická sloučenina. Vzniká termickým rozkladem přírodních materiálů, které obsahují pentosy a celulosu. Furan je výchozím produktem pro řadu průmyslových organických syntéz a hydrogenací. [1]



Obrázek 4: Furan

Přítomnost furanu v potravinách byla prokázána v 70. letech 20. století. Největší nálezy furanu byly zjištěny právě v pražené kávě, dále pak v karamelu nebo sterilovaných potravinách. [1]

Tabulka 8: Obsah furanu v kávě a kávovinách [1]

Druh potraviny	Obsah furanu ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )			Počet vzorků
	Průměrná hodnota	Minimum	Maximum	
Mletá káva	2676,8	959,0	5938,0	7
Nápoj z mleté kávy	78,0	13,0	199,0	14
Instantní káva	929,0	44,0	2150,0	9
Nápoj z instantní kávy	18,8	2,0	51,3	15
Náhražka rozpustné kávy	710,7	171,0	1770,0	3
Nápoj z náhražky instantní kávy	3,0	1,0	5,0	3
Cikorka	282,0	282,0	282,0	1
Nápoj z cikorky	10,5	6,0	15,0	2
Ledová káva	106,0	106,0	106,0	1

Furan se do organismu rychle vstřebává, a to díky snadnému prostupu přes biologické membrány. V organismu dochází k jeho biotransformaci a vzniká reaktivní cis-but-2-en-1,4-dialdehyd. Ten je silně cytotoxický, váže se na proteiny a nukleosidy. [1]

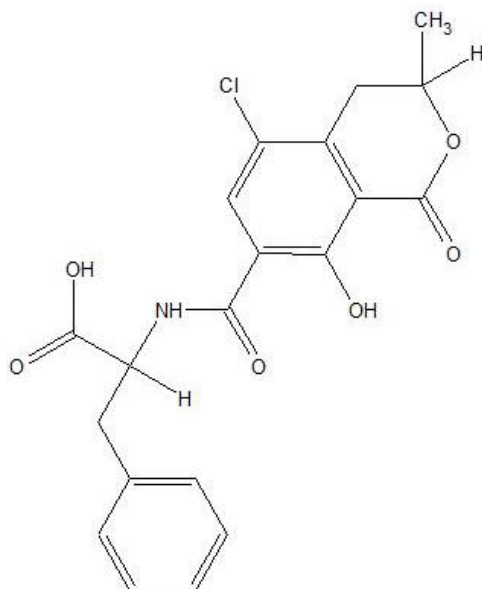
Furan byl organizací The International Agency on Research on Cancer (IARC) klasifikován jako potenciální lidský karcinogen. [1]

### 2.10.2 Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA) je mykotoxin, který vyrábí dva rody vláknité houby *Aspergillus* a *Penicillium*. Ochratoxin A se vyskytuje v potravinách, převážně obilovinách a kávových zrnech. [24]

Ochratoxin A je nejvýznamnějším zástupcem mykotoxinů. Ve své molekule obsahuje fenylalanin se substituovaným (3R)-3,4-dihydromethylisokumarinem. [1]

U ochratoxinu A byla prokázána hepatotoxicita, genotoxicita a imunotoxicita a karcinogenní potenciál. [1]



Obrázek 5: Ochratoxin A

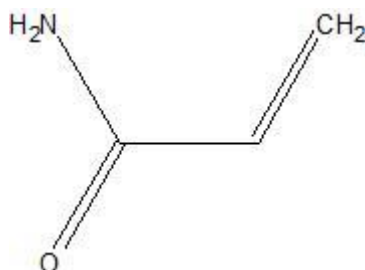
### 2.10.3 Akrylamid

Akrylamid je jednou z toxických látek, která se přirozeně v potravinách nevyskytuje, ale vzniká v průběhu technologického a tepelného zpracování. Jedná se tedy o procesní kontaminant. [30]

### 3 AKRYLAMID

Akrylamid, nebo také amid akrylové kyseliny případně prop-2-enamid, je bílá krystalická látka, bez chuti a bez zápachu. Jeho teplota tání je 84,5 °C a bod varu je 125 °C. V pevném skupenství je akrylamid stabilní při laboratorní teplotě, může ale dojít k polymerizaci při zahřívání nebo při oxidativním působení. [5] Akrylamid je toxická sloučenina, která se vyskytuje ve smažených, pražených nebo pečených potravinách, které jsou bohaté na škrob. [1]

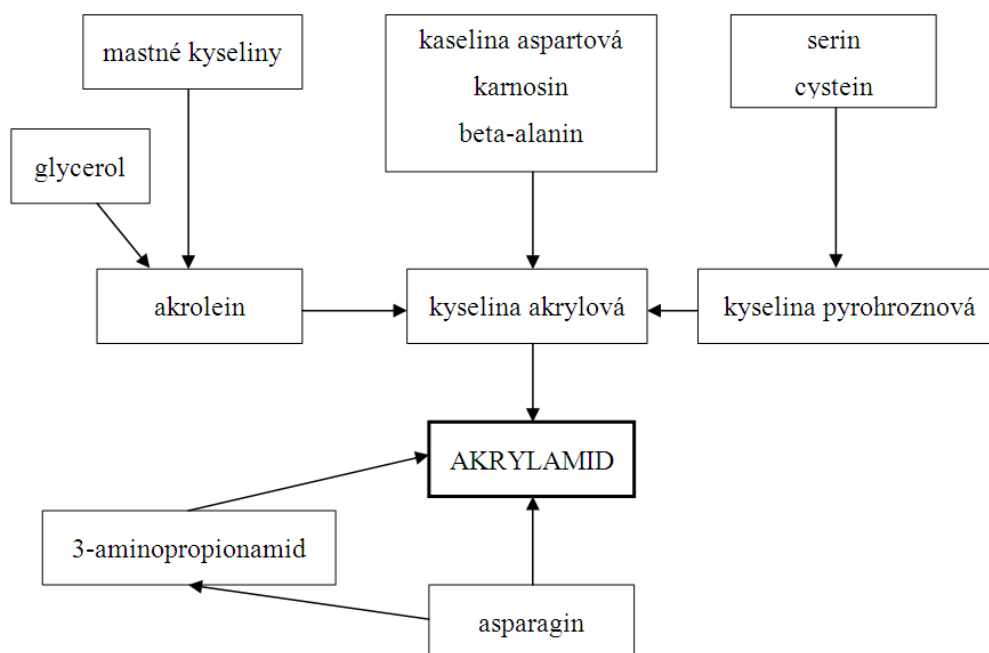
Poprvé byl akrylamid syntetizován v Německu v roce 1893, komerčně byl pak vyráběn od roku 1954. [21] Hlavní využití akrylamidu je výroba polyakrylamidu, který se používal po dlouhou dobu v různých průmyslových procesech, zejména k úpravě pitné vody. Nejnovější studie ale prokázali, že akrylamid se v krvi váže na hemoglobin, je metabolizován na reaktivní epoxid glycidamid a je karcinogenní na chronické expozici při testech na zvířatech. [11] Akrylamid má kromě neurotoxických, karcinogenních, mutagenních, teratogenních a genotoxických vlastností i negativní vliv na reprodukci. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**



Obrázek 6: Struktura akrylamidu

#### 3.1 Vznik akrylamidu v potravinách

Akrylamid vzniká v průběhu Maillardovy reakce a jeho prekurzory jsou redukující cukry a aminokyselina asparagin. [2] Nižší množství akrylamidu se tvoří alternativními reakcemi.



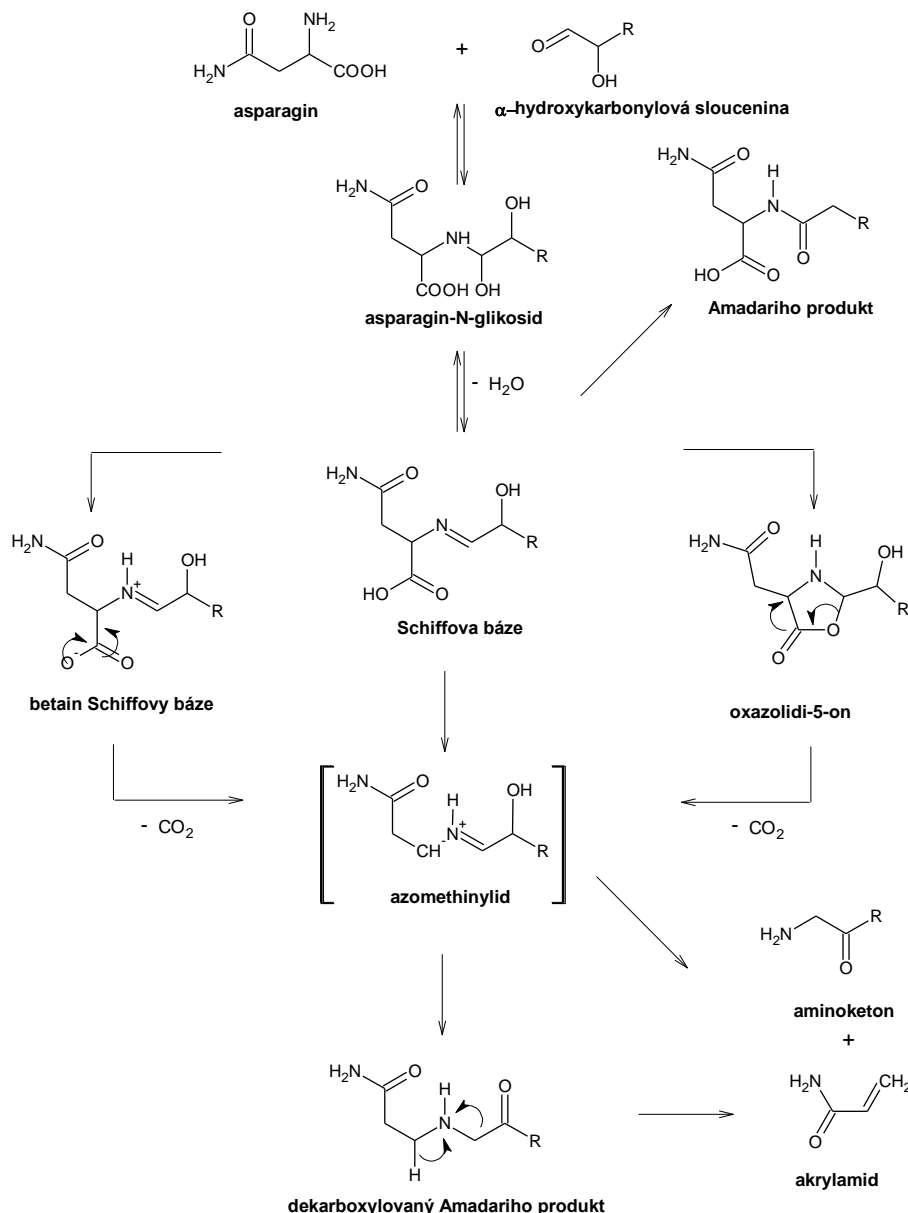
Obrázek 7: Možnosti vzniku akrylamidu v potravinách[34]

### 3.1.1 Maillardova reakce

Akrylamid v potravinách vzniká v průběhu Maillardovy reakce. Jeho prekursory jsou redukující cukry a aminokyselina asparagin. Mechanismus reakce vzniku akrylamidu v potravinách závisí na složení potravin a na podmínkách zpracování. Jako hlavní mechanismus vzniku akrylamidu se považují reakce mezi volnou geneticky kódovanou neesenciální aminokyselinou, asparaginem, a redukujícími cukry, a to při teplotách nad 120 °C. Při teplotách nad 120 °C vznikají velmi reaktivní karbonylové sloučeniny.

Ve směsi glukosy a asparaginu byl zjištěn vliv teploty a doby zahřívání. Při teplotách 120 – 140 °C byla tvorba akrylamidu velmi nízká. Při teplotách 160 – 180 °C se obsah akrylamidu zvýšil. Po dosažení teploty 180 °C tvorba akrylamidu klesá, protože akrylamid jako meziprodukt Maillardovy reakce dále reaguje. [5]

Maillardova reakce probíhá ve třech fázích. První fáze se nazývá počáteční fáze a tvoří se v ní glykosylamin a následně probíhá Amadoriho přesmyk. Ve střední fázi dochází k dehydrataci a fragmentaci sacharidů a probíhá Streckerova degradace aminokyselin. V závěrečné fázi se Streckerův aldehyd dále redukuje a dehydratuje za vzniku akrylamidu. [5] Průvodním jevem této reakce je vznik hnědých pigmentů melanoidů, a z toho důvodu se reakce nazývá také reakce neenzymového hnědnutí. Při této reakci dochází ke vzniku sensoricky žádoucích sloučenin, které zajišťují charakteristické zbarvení, chuť a vůni.[1]



Obrázek 8: Mechanismus tvorby akrylamidu z asparaginu v přítomnosti  $\alpha$ -hydroxykarbonylových sloučenin [4]

### 3.1.2 Tvorba akrylamidu z akroleinu

Akrolein (2-propenal) je tříuhlíkatý nenasycený aldehyd, který svou strukturou připomíná akrylamid. Může vznikat transformací lipidů, degradací aminokyselin, proteinů a sacharidů, nebo v Maillardově reakci. [31] Akrolein vzniklý z glycerolu se oxiduje na kyselinu akrylovou. Kyselina akrylová následně reaguje s amoniakem za vzniku akrylamidu. [32]

### 3.1.3 Neoxidativní tvorba akrylamidu

Při vyšších teplotách dochází v rostlinných tkáních k disociaci škrobových komplexů na volný škrob, která dále degraduje za vzniku volných cukrů, jako je D-glukóza. D-glukóza podléhá enolizacím a izomeracím a vzniká meziprodukt 2,4-deoxycukr. Následně 2,4-deoxycukr prochází keto-enolizací a vytváří tak 2,5-deoxydillózu, která je nestálá a štěpí se na

hydroxylaceton a hydroxymethylglyoxal. Hydroxylaceton se dále rozkládá za vzniku acetaldehydu a formaldehydu, které spolu kondenzují za vzniku 2-propenalu. Dvě molekuly 2-propenalu podstupují Cannizzarovu reakci za vzniku kyseliny akrylové a 2-propenolu. Akrylová kyselina dále reaguje s amino-báze, která se uvolňuje z Streckerovi degradace asparaginu a vzniká akrylamid. [33]

### **3.1.4 Termální degradace asparaginu**

Jedna z možných cest vzniku akrylamidu je termicky indukovaná dekarboxylace asparaginu na 3-aminopropanamid, který se následně deaminuje. Pro tuto reakci je ale nutná přítomnost redukujících sacharidů, které zajišťují efektivní konverzi asparaginu na akrylamid. [4]

## **3.2 Legislativa**

V současnosti nejsou pro akrylamid stanoveny žádné limitní hodnoty. Evropská komise vydala doporučení č. 331/2007/ES ze dne 3. května 2007 o celoevropském monitoringu hladin akrylamidu v potravinách. [17] V roce 2010 bylo toto doporučení doplněno o doporučení Komise č. 307/2010/EU ze dne 2. června 2010. Monitorování bylo zaměřeno na potraviny známé vysokým obsahem akrylamidu. Dne 8. listopadu 2013 bylo vydáno doporučení č. 647/2013 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách obsahující směrné hodnoty pro jednotlivé potraviny. [37], [38], [39]

Ministerstvo zdravotnictví ve vyhlášce č. 252/2004 Sb. ze dne 22. dubna 2004 stanovuje hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu. Maximální limity pro obsah akrylamidu v pitné vodě jsou určeny na 0,1  $\mu\text{g/l}$ . Směrnice Evropské rady 98/83/ES ze dne 3. listopadu 1998 o jakosti vody určené k lidské spotřebě uvádějí stejné limity. [36]

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č.38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami stanovuje maximální množství akrylamidu při migraci látky z obalových materiálů na hodnotu 0,01 mg/kg. [35]

## **3.3 Možnosti stanovení obsahu akrylamidu v kávě**

Pro stanovení obsahu akrylamidu se využívají zejména dvě metody, a to vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií a plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií. [5]

Chromatografie je separační metoda oddělující jednotlivé složky, které jsou obsaženy ve vzorku. Jedná se o metodu kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá a mobilní je pohyblivá. Vzorek je mobilní fází unášen přes stacionární fázi, jednotlivé složky jsou zachycovány na stacionární fázi a separují se. [29]

### **3.3.1 Kapalinová chromatografie**

Použití kapalinové chromatografie pro stanovení akrylamidu udávají jeho hydrofobní vlastnosti a vysoký stupeň verifikace ve spojení s hmotnostní spektrometrií. [43] Výhodou je možnost analýzy akrylamidu bez derivatizace.[45]

Mobilní fázi v kapalinové chromatografii je kapalina. Separace složek vzorku závisí na stacionární fázi a velmi výrazně i na mobilní fázi. Analyt se během separace rozděluje mezi

mobilní a stacionární fázi. Kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci nestálých a netěkavých sloučenin. Oproti plynové chromatografie, kapalinová chromatografie má nižší příspěvek molekulární difuze složky, a to z důvodu vyšší viskozity kapaliny. Pro účinnou separaci se používají dostatečně malá zrna sorbentu, která kladou kapalině odpor. Z toho důvodu je nutné pracovat při vyšším tlaku. Na základě interakcí lze kapalinovou chromatografií rozdělit na adsorpční kapalinovou chromatografií (LSC), která využívá mezimolekulové přitažlivé síly mezi stacionární fází a analytem. Dále rozdělovací kapalinovou chromatografií (LLC), kde se analyt rozděluje mezi dvě nemísitelné kapalně fáze, iontově-výměnná chromatografie (IEC), ve které je stacionární fází měnič iontů, a gelová permeační chromatografie (GPC), ve které jsou molekuly separovány podle velikosti. [29]

### **3.3.1.1 Kolony**

V kapalinové chromatografii se používají kolony pouze náplňové. Kolony se liší délkou, vnitřním průměrem a náplní. Jsou zhotoveny nejčastěji z nerezové oceli. Kolony s malým vnitřním průměrem (1 – 2 mm) mají vysokou účinnost a malou spotřebu rozpouštědla. [29]

### **3.3.1.2 Detektory**

Předpokladem detektoru v kapalinové chromatografii je selektivita a malá citlivost na mobilní fázi. Nejpoužívanějšími detektory jsou detektory fotometrické, refraktometrické a fluorescenční. Fotometrické detektory patří mezi nejběžnější a měří absorbanci eulátu, který vychází z kolony. Refraktometrický detektor měří rozdílný index lomu eulátu a čisté mobilní fáze. Fluorescenční detektor je založen na schopnosti látek absorbovat UV záření a vysílat záření o vyšší vlnové délce. V kapalinové chromatografii se podobně jako v plynové chromatografii využívá hmotnostní spektrometr. [29]

## **3.3.2 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie vyžaduje derivatizaci akrylamidu. Tím se redukuje polarita akrylamidu, zlepší retenční čas, získá symetrické píky a optimalizuje ukazatele a parametry. [43] Výhodou derivatizace je zlepšení selektivitu, volatility, citlivosti. Nevýhodou je neúplnost a časová náročnost. [44]

V plynové chromatografii se vzorek dávkuje do proudu plynu, který vzorek dále unáší kolonou. Mobilní fáze se tedy nazývá nosný plyn. Pro přenos je nutné vzorek přeměnit na plyn, v koloně se pak složky vzorku odseparují a dále se indikují detektorem. Plynová chromatografie se používá k separaci plynů, nedisociovatelných kapalin, pevných organických molekul a organokovových látek. Tato metoda není použitelná pro separaci makromolekul, organických nebo anorganických solí. [29]

### **3.3.2.1 Nosný plyn**

Nosný plyn je inertní plyn, který v plynové chromatografii působí jako mobilní fáze. K dispozici je v čisté formě, jako je argon, helium, vodík nebo dusík. Volba nosného plynu je určena typem detektoru, viskozitou plynu, jeho účinností, čistotou, reaktivitou nebo cenou. [27]

### **3.3.2.2 Kolony**

V koloně se nachází stacionární fáze. Kolony v plynové chromatografii lze rozdělit na dva základní druhy, a to na kapilární a náplňové. [28]

Náplňové kolony bývají nejčastěji vyrobeny z nerezové oceli nebo skla. Jsou vybaveny zrnitým materiálem z kapaliny, který je potažen na inertním pevném nosiči. Nejčastěji se

používá pro absorpční chromatografii např. silikagel a pro rozdělovací chromatografii např. oxid křemičitý (křemelina). [28]

Kapilární kolony, dnes nejpoužívanější, jsou tvořeny z kapiláry z křemenného skla. Vnitřní stěna je potažena stacionární fází a vnější stěna je potažena vrstvou polyamidového materiálu pro zvýšení pevnosti a snížení možnosti poškození. [28]

### **3.3.3 Detektory**

Detektory jsou měřicí zařízení, ve kterých je fyzikálně chemická vlastnost analytu převáděna na elektrický signál. [28] Pro plynovou chromatografii je dostupné velké množství detektorů. Každý z nich nabízí určité výhody jako citlivost (detektor elektronového záchytu) nebo selektivitu (atomově emisní detektor). Mezi nejběžnější detektory patří plamenově ionizační detektor (FID), detektor tepelné vodivosti, detektor elektronového záchytu, plamenově fotometrický detektor, impulzní plamenový fotometrický detektor nebo fotoionizační detektor. [28]

#### **3.3.3.1 Hmotnostní spektrometr (MS)**

Plynovou chromatografii lze kombinovat s MS. Analyt separovaný GC je v iontovém zdroji MS ionizován. Jednotlivé ionty jsou v hmotnostním spektrometru separovány podle  $m/z$  pomocí elektromagnetického analyzátoru a následně jsou detekovány. Spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem se používá pro identifikaci neznámých složek směsí. Pro jednotlivé složky lze získat hmotnostní spektrum a dále identifikovat porovnáním spektra s knihovnou spekter sloučenin. [30]

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiály a metody

#### 4.1.1 Pomůcky a příslušenství

- Plynový chromatograf TRACE GC ULTRA 2000 (Thermo Finnigan, USA)
- Hmotnostní spektrometr TRACE DSQ (Thermo Finnigan, USA)
- Kapilární kolona DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (J&W Scientific, USA)
- Tlaková láhev Hélium – čistota 5,5 (Siad, ČR)
- Analytické váhy GE 512 – OCE (Sartorius, Hamburg Německo)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S60 (ELMA, Německo)
- Centrifuga 3-16K (SIGMA, Německo)
- Centrifuga 2 – 16K (SIGMA, Německo)
- Centrifuga – Minispin (Eppendorf, Německo)
- Chladnička (Liebherr, Německo)
- Laboratorní sklo (Erlenmayerovy baňky (50 ml), odměrný válec (50 ml), odměrné baňky (25 ml), kádinky (800 ml, 150 ml), skleněné vialky, pipety dělené (5; 2 ml))
- Automatické pipety (1 ml, 0,3 ml), Hamilltonova stříkačka, rtuťový teploměr, plastové mikrozskumavky (2 ml), plastové centrifugační zkumavky (70 ml, 15 ml)
- Laboratorní lžíce, lodička

#### 4.1.2 Chemikálie

- Izotopicky značený akrylamid (1,2,3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, 99 %), c (1 mg/ml) v metanolu (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA)
- Bromid draselný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina bromovodíková (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Brom, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Thiosíran sodný pentahydrát, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Etylacetát (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Triethylamin – (99,5%), (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2,3-dibrompropionamid – c (1000 μl/ml) v methanolu, Absolute Standards, Inc., USA)
- Deionizovaná voda

Z uvedených chemikálií byly připraveny roztoky:

- Roztok Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5 H<sub>2</sub>O o koncentraci 1 mol/l
- Bromová voda, připravena rozpuštěním 1,5 ml Br<sub>2</sub> v 50 ml deionizované vody.

### 4.1.3 Materiál

Pro analýzu bylo vybráno 9 pražených mletých káv, jak je uvedeno v tabulce 9. Jednotlivé vzorky se liší značkou, druhem i cenou.

Tabulka 9: Analyzované kávy

Označení vzorku	Druh kávy
vzorek 1	Směs Arabica a Robusta
vzorek 2	Robusta
vzorek 3	Směs Arabica a Robusta s převahou Arabica
vzorek 4	Směs Arabica a Robusta
vzorek 5	Směs Arabica a Robusta
vzorek 6	Neuvedeno
vzorek 7	100% Arabica
vzorek 8	100% Arabica
vzorek 9	100% Arabica

### 4.1.4 Příprava vzorků kávy

K navážce 2,5 g vzorku kávy bylo přidáno 5  $\mu$ l vnitřního standardu izotopicky značeného akrylamidu a 50 ml deionizované vody o teplotě 60 °C. Směs byla extrahována v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut. Po extrakci byla směs převedena do plastových centrifugačních zkumavek (70 ml) a odstředěna po dobu 15 minut při 6500  $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$ . Z centrifugačních zkumavek bylo 10 ml supernatantu převedeno do plastových centrifugačních zkumavek (15 ml) a následně centrifugován po dobu 30 minut. Z centrifugačních zkumavek bylo pomocí pipety odebráno 5 ml supernatantu pro derivatizaci. K 5 ml supernatantu v Erlenmayerových baňkách byly přidány 2 g bromidu draselného a takové množství kyseliny bromovodíkové, aby výsledné pH směsi bylo 0 – 1. Vzorky byly umístěny asi na 10 min do chladničky a po vychlazení byly přidány 2 ml bromové vody. Obsah baněk byl promíchán a vzorky byly umístěny do nádoby s ledem na 10 hodin do chladničky.

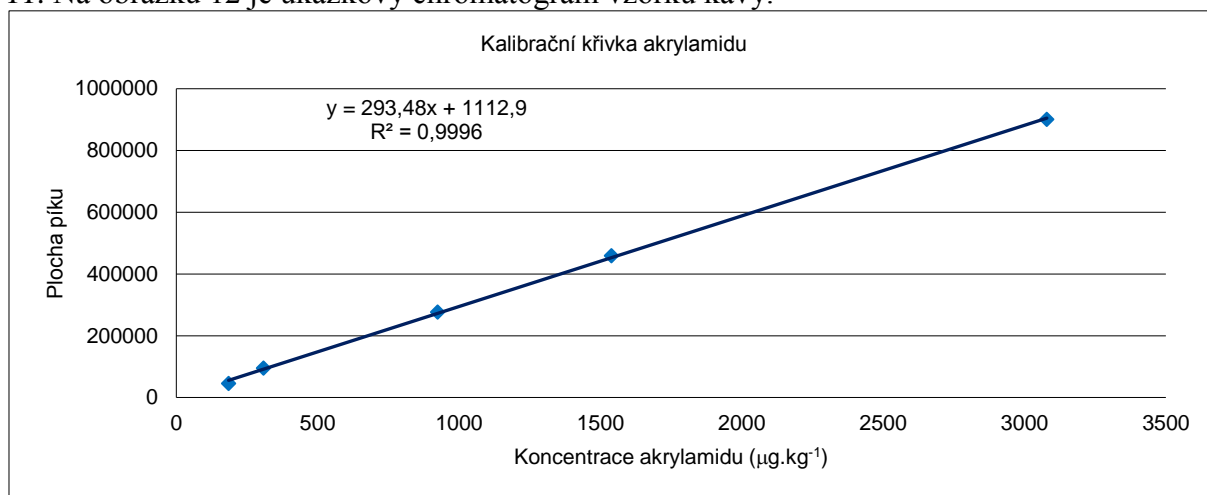
Po derivatizaci byl přebytečný brom titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného o koncentraci 1  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Obsah baněk byl převeden do centrifugačních zkumavek, bylo přidáno 2,5 ml ethylacetátu a směs byla intenzivně protřepána třikrát po dobu 1 minuty. Vzorek byl odstředěn při 5000  $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$  po dobu 5 minut. Z odstředěného vzorku byl odebrán 1 ml organické fáze do plastové mikrozkuhavky a bylo přidáno 0,2 ml triethylaminu. Směs byla protřepána a po 15 minutách odstředěna při 5000  $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$  po dobu 5 minut. Po odstředění byl obsah mikrozkuhavek převeden do skleněných vialek, které byly následně uzavřeny víčkem se septem. Takto připravené vzorky byly analyzovány metodou GC/MS.

### 4.1.5 Instrumentace a chromatografické stanovení

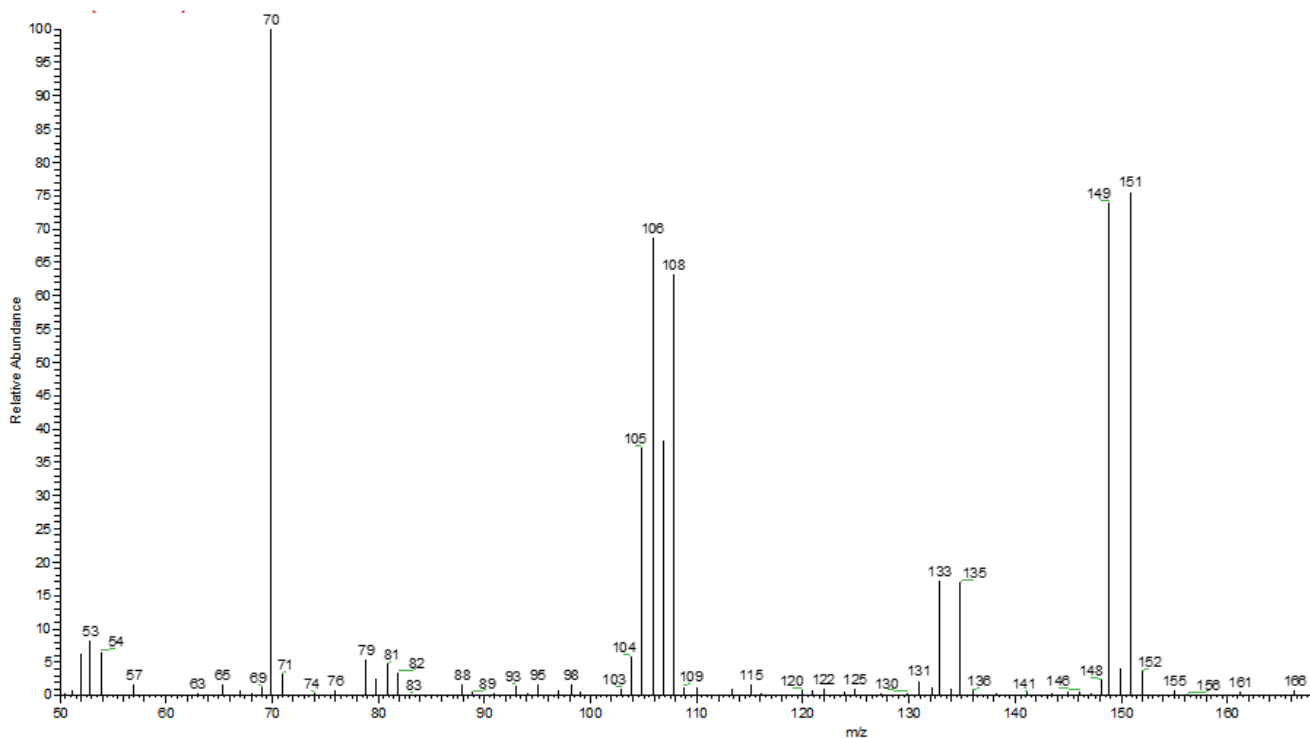
Akrylamid byl derivatizován a následně jako 2-brompropenamid analyzován ve vzorcích kávy pomocí plynového chromatografu v kombinaci s hmotnostním detektorem. Separace proběhla na kapilární koloně, která byla udržována při teplotě 50 °C po dobu 1 minuty. Následně byla kolona zahřívána rychlostí 15 °C/min na 150 °C a tato teplota byla udržována po dobu 20 minut. Průtok nosného plynu helia byl nastaven na 1,5 ml/min. Teplota injektoru byla nastavena na 200 °C – Splitless mód po dobu 1 minuty. Teplota transfer zóny

byla 200 °C. Hmotnostně selektivní detektor pracoval v kombinaci módu Full scan pro m/z 50 – 200 a SIM módu pro m/z 149, 151, 152 a 154. Iontový zdroj měl teplotu 200 °C a elektronová ionizace probíhala při energii 70 eV.

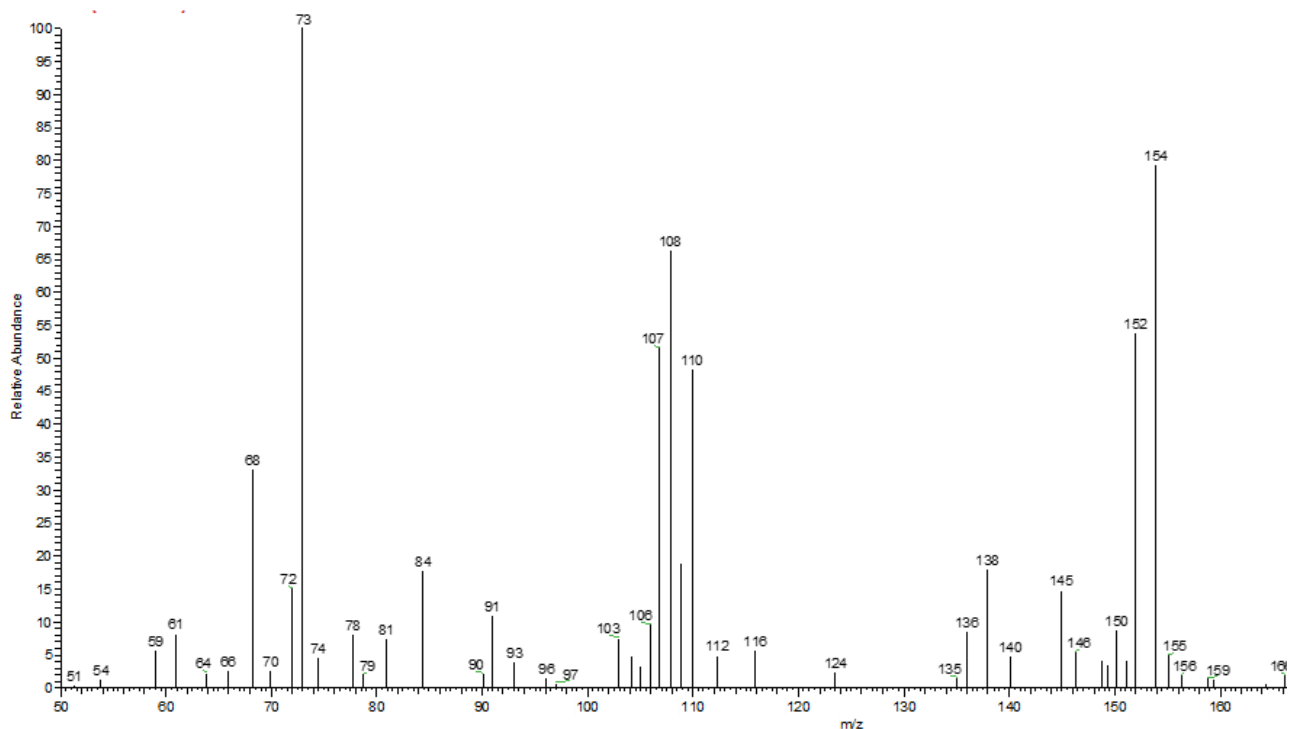
Identifikace 2-brompropenamidu z chromatogramu bylo provedeno pomocí retenčního času a z hmotnostního spektra na základě specifických iontů m/z 149 a 151, jak je uvedeno na obrázku 10. Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky znázorněné na obrázku 9. Rozsah kalibrační křivky byl v rozmezí 185 – 3079  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Jako vnitřní standard byl použit bromovaný derivát izotopicky značeného akrylamidu 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$  se specifickými ionty m/z 152 a 154. Hmotnostní spektrum derivátu izotopicky značeného akrylamidu je uvedeno na obrázku 11. Na obrázku 12 je ukázkový chromatogram vzorku kávy.



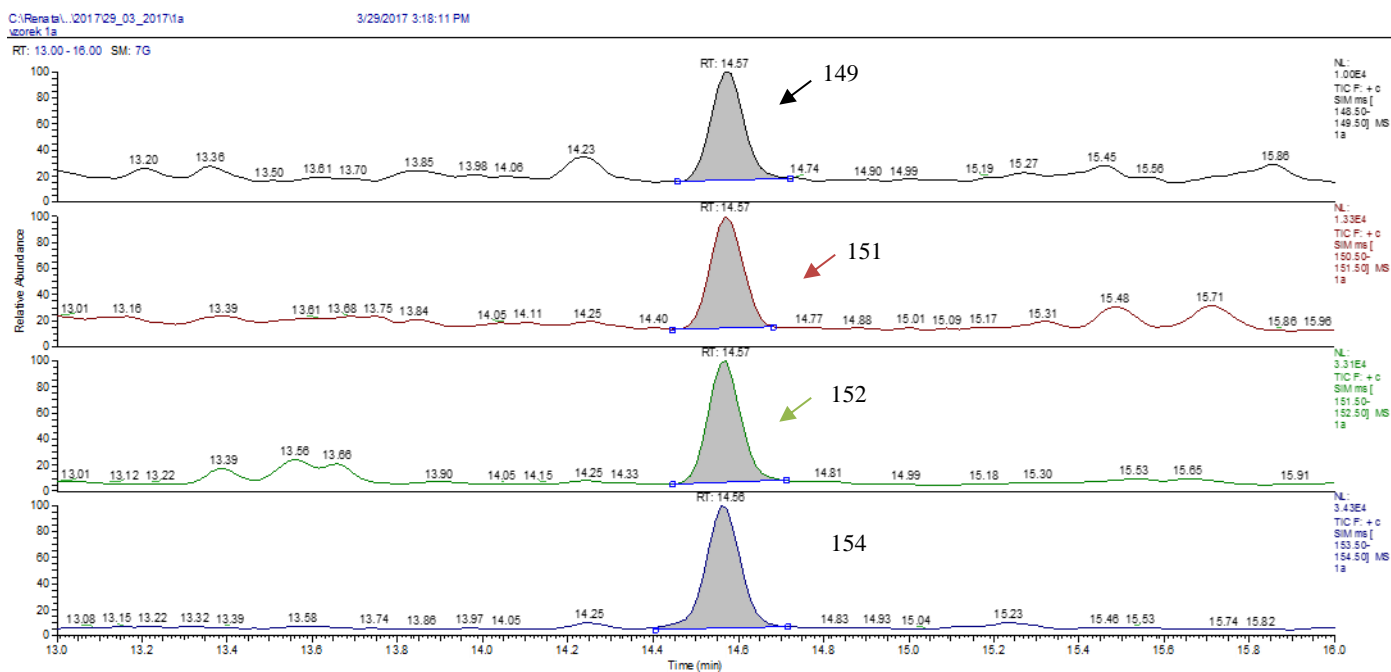
Obrázek 9: Kalibrační křivka



Obrázek 10: Hmotnostní spektrum 2 - brompropenamidu



Obrázek 11: Hmotnostní spektrum derivátu značeného akrylamidu (1,2,3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>)



Obrázek 12: Chromatogram vzorku 1

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

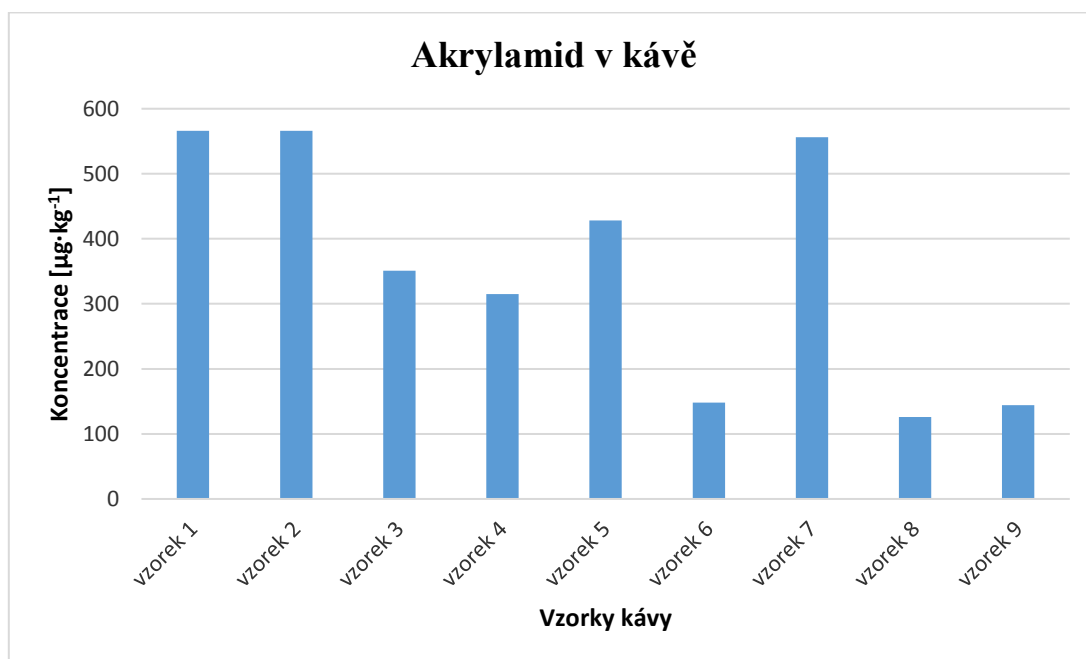
Akrylamid v kávě byl stanoven metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií po derivatizaci bromem. Akrylamid byl převeden na 2,3-dibrompropionamid přidáním bromidu draselného, kyseliny bromovodíkové a bromové vody. Tato reakce probíhala v kyselém prostředí za teploty 0 °C a bez přístupu světla, po dobu 10 hodin. Pro odstranění bromu se roztok titroval thiosíranem sodným do odbarvení roztoku. Takto vzniklý dibrom-derivát byl extrahován do nepolárního organického rozpouštědla. Sloučenina 2,3-dibrompropenamid není stabilní a z toho důvodu byla převedena na stabilnější 2-brompropenamid přidáním triethylaminu. [41] Kalibrační křivka obsahu akrylamidu v kávě byla lineární v rozmezí 185 – 3079  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9996$ ). Mez stanovení (LOQ) byla stanovena na 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Mez detekce (LOD) byla stanovena na 15  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejistota metody byla 12 %.

Výtěžnost extrakce a derivatizace byla stanovena na vnitřní standard, který byl přidán ke vzorku před extrakcí. Výtěžnost extrakce se pohybovala v rozmezí 75 – 90 %.

Každý vzorek byl analyzován dvakrát. Průměrný obsah akrylamidu v analyzovaných vzorcích uvádí tabulka 10. Obsah akrylamidu v jednotlivých druzích káv je znázorněn v grafu 1.

Tabulka 10: Obsah akrylamidu v analyzovaných vzorcích

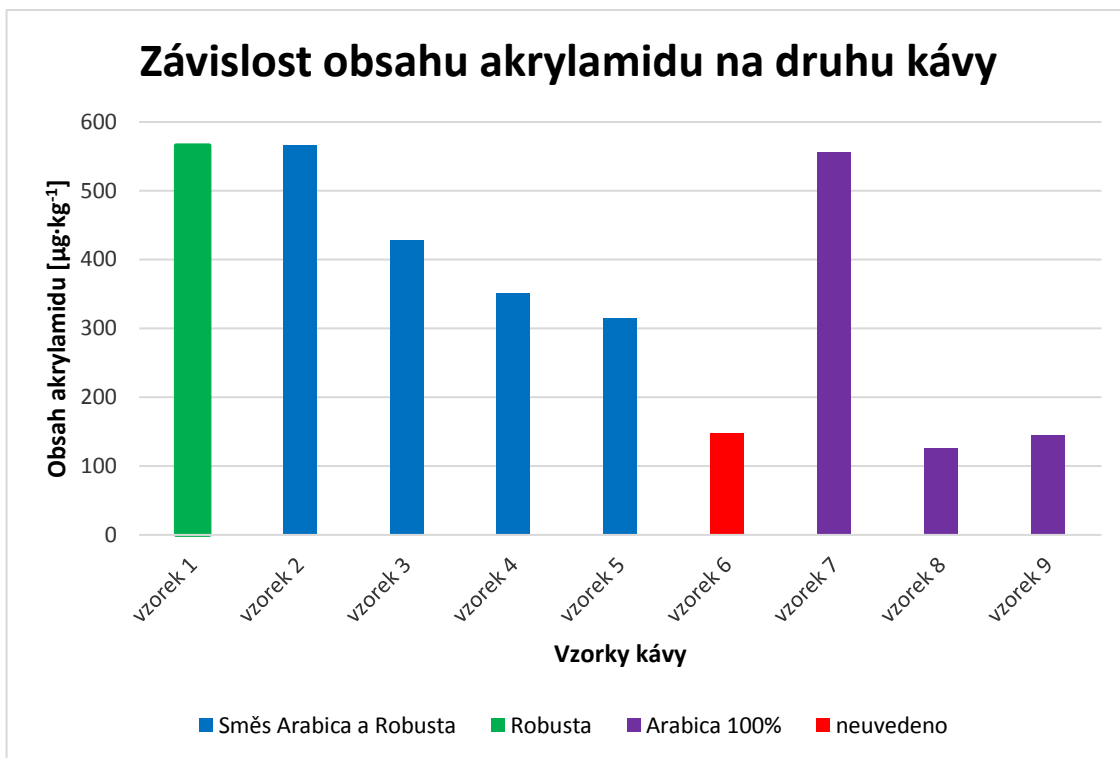
Analyzované vzorky	Průměrný obsah akrylamidu [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
vzorek 1	566
vzorek 2	566
vzorek 3	351
vzorek 4	315
vzorek 5	428
vzorek 6	148
vzorek 7	556
vzorek 8	125
vzorek 9	144



Graf 1: Obsah akrylamidu v jednotlivých vzorcích kávy

Hodnoty obsahu akrylamidu ve vzorcích kávy se pohybovaly v rozmezí od 125 až 566  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , což odpovídá výsledkům kontrolního měření SZPI během let 2011 – 2012, kdy pražené mleté kávy obsahovaly množství akrylamidu do 910  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Mojska ve své práci uvedla obsah akrylamidu v mleté kávě 818  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . [41] Andrzejewski ve své práci uvádí hodnoty do 374  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . [47] Doporučení Evropské komise č. 647/2013/EU uvádí směrnou hodnotu obsahu akrylamidu v pražené kávě 450  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . [38] Nejvyšší obsah akrylamidu byl zjištěn u vzorku 1 a 2, naopak nejnižší obsah akrylamidu byl stanoven u vzorku 8 české pražírny. Analyzované vzorky se liší složením, jak je uvedeno v tabulce 9.

Z grafu 2 je patrné, že množství akrylamidu v kávě se liší v závislosti na složení jednotlivých vzorků. Nejvyšší zastoupení akrylamidu je v kávě Robusta, což je způsobeno vyšší koncentrací volného asparaginu. [34] Oproti tomu nejnižší zastoupení akrylamidu je v kávě Arabica, což ve své práci potvrdil i Svoboda. [31] Výjimku tvoří káva vzorek 7, kde výrobce na obalu uvádí složení 100% Arabica. Vysoký obsah akrylamidu v tomto vzorku může také souviset s teplotou a dobou pražení. Vznik akrylamidu negativně ovlivňuje i způsob pražení, což ve své práci potvrdil Murkovic, Yaylayan a Stadler, Mikulíková a Sobotková, ale i obsah vadných kávových zrn, která mohla být při výrobě použita, jak ve své práci uvádí Guenther. [48], [49], [50] Vyšší doba pražení snižuje koncentrace akrylamidu, jak uvádí Murkovic. [49] Nejnižší hodnoty obsahu akrylamidu měly vzorky 8 a 9 české pražírny výběrové kávy. Vysoký obsah akrylamidu byl stanoven u vzorku 1, u které výrobce uvádí složení směs Arabica a Robusta. Z měření lze vyvodit, že ve směsi výrazně převažuje Robusta. U vzorku 6 nebylo od výrobce uvedeno složení kávy. Z měření lze usoudit, že složení kávy je 100% Arabica.



Graf 2: Obsah akrylamidu v závislosti na složení kávy

## 6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovení obsahu akrylamidu ve vzorcích kávy. V teoretické části se práce zaměřila na historii kávy, významné druhy kávovníků, pěstování a technologické zpracování kávy, chemické složení kávového zrna, charakterizaci karcinogenních látek v kávě a možnosti stanovení akrylamidu v kávě.

Obsah akrylamidu v kávě byl stanoven metodou plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostním detektorem. Mez detekce činila u analyzovaných vzorků  $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a mez stanovení  $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Výtěžnost extrakce byla stanovena na 75 – 90 %. Nejistota metody byla 12 %.

V praktické části práce byl v extraktech různých druhů kávy stanoven obsah akrylamidu. Vzorky kávy byly zakoupeny v obchodních sítích supermarketů na území České republiky a v české pražirně. Obsah akrylamidu ve vzorcích byl stanoven v rozsahu 125 až  $566 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Vzorky 1, 2 a 7 překročily na základě měření doporučení Evropské komise č. 647/2013/EU, kde směrná hodnota obsahu akrylamidu činí  $450 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvyšší hodnoty obsahu akrylamidu byly stanoveny u vzorků 1 a 2, naopak nejnižší obsah akrylamidu byl stanoven u vzorku 8 české pražirny.

Analýzou byla prokázána závislost obsahu akrylamidu ve vzorcích na složení jednotlivých vzorků. Nejvyšší obsah akrylamidu byl stanoven v kávě Robusta, která byla zastoupena vzorkem 1. Naopak nejnižší obsah akrylamidu byl naměřen v kávě Arabica, která byla zastoupena vzorky české pražirny. Vzorek 7 uvádí složení 100% Arabica, hodnoty obsahu akrylamidu byly vysoké, což je pravděpodobně způsobeno nižším stupněm pražení.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CWIKOVÁ, O. Toxické účinky akrylamidu a jeho výskyt v potravinách. *Chem. Listy*, 2014, 108: 205-210.
- [2] VELÍŠEK, J.; HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [3] International Coffee Organization. International Coffee Organisation [online]. International Coffee Organization, 2017 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>
- [4] CIESAROVĚ, Z. Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách. *Chem. Listy*, 2005, 99: 483-491.
- [5] BASAŘOVÁ, G. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu.* Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [6] KÜÇÜKKÖMÜRLER, S., et al. Coffee and Turkish coffee culture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2009, 8.10: 1693-1700.
- [7] Coffee. National Geographic [online]. 1999 [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <http://www.nationalgeographic.com/coffee/ax/frame.html>
- [8] VESELÁ, P. *Kniha o kávě: průvodce světem kávy s recepty na její přípravu.* Praha: Smart Press, 2010. ISBN 978-80-87049-34-1.
- [9] KADLEC, P.; MELZUCH, K.; VOLDŘICH, M. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin.* Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [10] TAUFEROVÁ, A. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II.* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-692-6.
- [11] BELITZ, H., GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food chemistry.* 4th, rev. and extended ed. Berlin: Springer, c2009. ISBN 978-3-540-69933-0.
- [12] KNOPP, S.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *European Food Research and Technology*, 2006, 223.2: 195-201.
- [13] CHU, Y. *Coffee: emerging health effects and disease prevention.* Ames: Wiley-Blackwell, 2012. IFT Press. ISBN 978-0-470-95878-0.
- [14] BRADY, J. W. *Introductory food chemistry.* Ithaca: Comstock Publishing Associates, 2013. ISBN 978-0-8014-5075-4.
- [15] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin. 3. Vyd. 2. upr.* Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-02-X.
- [16] MASTRONARDI, G. *Quality of coffee: effects of origin and roasting process on the aromatic and sensorial composition of coffee.* Saarbrücken: Edizioni Accademiche Italiane, 2014. ISBN 978-3-639-85778-8.
- [17] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin. 2. Vyd. 2. upr.* Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.
- [18] JESZKA-SKOWRON, M., et al. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, 2016, 1-7

- [19] BREZOVÁ, V.; ŠLEBODOVÁ, A.; STAŠKO, A. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, 2009, 114.3: 859-868.
- [20] FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2006, 18.1: 23-36.
- [21] OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. CH.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of nutrition*, 2001, 131.1: 66-71.
- [22] PIETTA, P.. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 2000, 63.7: 1035-1042.
- [23] Ochratoxin A (OTA), furan, akrylamid a vliv na lidské zdraví [online]. 2011 [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <http://www.zbynekmlcoch.cz/informace/texty/zdravi/ochratoxin-a-ota-furan-akrylamid-a-vliv-na-lidske-zdravi>
- [24] STUDER-ROHR, I.; et al. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and chemical toxicology*, 1995, 33.5: 341-355.
- [25] POOLE, C. F. Gas chromatography. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-385540-4.
- [26] CHRISTIAN, G. D., DASGUPTA, D. P.;SCHUG, K. Analytical chemistry. 7th ed. Hoboken: Wiley, c2014. ISBN 978-0-470-88757-8.
- [27] NIELSEN, S. S. Food analysis. 4th ed. New York: Springer, 2010. ISBN 978-1-4614-2589-2.
- [28] ČÁSLAVSKÝ, J. ŠEVČÍK, J. G. K. Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [29] KLOUDA, P. Moderní analytické metody. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [30] SVOBODA, Z., Mikulíková, R., Cwíková, O., Běláková, S., Benešová, K., 2015: Sledování obsahu akrylamidu ve vybraných potravinách. *Kvasny Prum.*, 61(7-8): 206-211. ISSN 0023-5830, doi: 10.18832/kp2015021
- [31] LINGNERT, H., et al. Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 2002, 46.4: 159-172
- [32] FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51.16: 4504-4526.
- [33] VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2003, 4.3: 331-338.
- [34] ERIKSSON, S. Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. 2005. PhD Thesis. Institutionen för miljö kemi.
- [35] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy
- [36] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody
- [37] Evropská komise: Doporučení Komise č. 331/2007/ES ze dne 3. 5. 2007
- [38] Evropská komise: Doporučení Komise č. 307/2007/EU ze dne 2. 6. 2010

- [39] Evropská komise: Doporučení Komise č. 647/2013/EU ze dne 8. 11. 2013
- [40] PAPOUSEK, R., et al. Analysis of Acrylamide by GC-MS. *Chem. Listy*, 2013, 107.3: 255-260.
- [41] MOJSKA, H.; GIELECINSKA, I. Studies of acrylamide level in coffee and coffee substitutes: influence of raw material and manufacturing conditions. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 2013, 64.3.
- [42] MUSSATTO, S. I., et al. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4.5: 661.
- [43] ZHANG, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1075.1: 1-21.
- [44] ZHANG, Y.; REN, Y.; ZHANG, Y. New research developments on acrylamide: analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation recipes. *Chemical reviews*, 2009, 109.9: 4375-4397.
- [45] TAEYMANS, D., et al. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2004, 44.5: 323-347.
- [46] ANDRZEJEWSKI, Denis, John A. G. ROACH, Martha L. GAY a Steven M. MUSSER. Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**(7), 1996-2002. DOI: 10.1021/jf0349634. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0349634>
- [47] YAYLAYAN, V.,A., STADLER, R. H. (2005): Acrylamide Formation in food: A mechanistic perspective. *Journal of AOAC Int.*, 88 (1) 268–275.
- [48] BAGDONAITÉ, Kristina, Karin DERLER a Michael MURKOVIC. Determination of Acrylamide during Roasting of Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56(15), 6081-6086. DOI: 10.1021/jf073051p. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf073051p>
- [49] GUENTHER, H., ANKLAM, E., WENZL, T., STANDLER, R.H., 2007: Acrylamide in coffee: Review of progress in analysis, formation and level reduction. *Food Additives and Contaminants*, 24 (1) 60-70. doi: 10.1080/02652030701243119
- [50] MIKULÍKOVÁ, R., SOBOTOVÁ, K., 2007: Determination of acrylamide in malt with GC/MS: *Acta Chim. Slov.*, 54: 98-101. ISSN 1318-0207

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

GC	Plynová chromatografie
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
LSC	Adsorpční kapalinová chromatografie
FID	Plamenově ionizační detektor
LLC	Rozdělovací kapalinová chromatografie
IEC	Iontově-výměnná chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie
např.	například