

Charakteristika alkaloidů a analýza kofeinu v kávových nápojích

Monika Hořavová

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika Hořavová**

Osobní číslo: **T11347**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Charakteristika alkaloidů a analýza kofeinu
v kávových nápojích**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika alkaloidů.
2. Popis kofeinu, zdroje, analytické metody stanovení kofeinu.
3. Káva a kávové nápoje, složení, vlastnosti, využití.

II. Praktická část

1. Stanovení obsahu kofeinu ve vybraných instantních kávových nápojích pomocí chromatografické techniky HPLC s UV detekcí.
2. Stanovení obsahu kofeinu ve vybraných vzorcích kávy metodou HPLC/UV.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 2. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.
- [2] PREEDY, Victor R. Caffeine: chemistry, analysis, functions and effects. Cambridge: RSC Publishing, 2012. ISBN 978-1-84973-367-0.
- [3] MASÁK, J., J. PELECHOVÁ a J. PLACHÝ. Speciální mikrobiální technologie. Praha: VŠCHT, 1992. ISBN 8070801425.
- [4] CHU, Yi-Fang. Coffee: emerging health effects and disease prevention. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell/IFT Press, 2012. ISBN 978-1-119-94989-3.
- [5] DOUŠA, Michal. Základy separačních metod se zaměřením na HPLC. Brno: ÚKZÚZ, 2002. ISBN 80-865-4809-0.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin

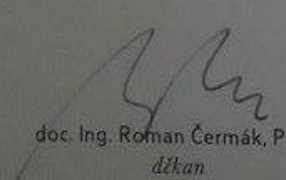
Datum zadání bakalářské práce:

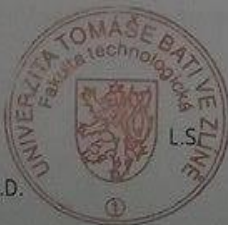
2. února 2015

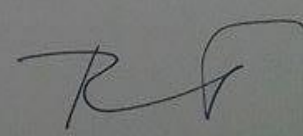
Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 2015

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HODÁNKOVÁ MONIKA Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 4.5.2015

Hodánková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V teoretické části bakalářské práce jsou charakterizovány alkaloidy. Teoretická část se také zabývá charakterizací kofeinu, jeho vlastností a výskytu. Popsány jsou i metody běžně používané ke stanovení kofeinu. Experimentální část je zaměřena na stanovení kofeinu v kávě a instantních kávových nápojích chromatografickou metodou HPLC s UV detekcí.

Klíčová slova: alkaloidy, kofein, HPLC, káva, kávové nápoje

ABSTRACT

In the theoretical part of the thesis alkaloids, caffeine, its properties and occurrence are characterized. In this section the methods commonly used for determination of caffeine are also describe. The experimental part is focused on the determination of caffeine in coffee and instant coffee beverages by chromatographic method HPLC with UV detection.

Keywords: alkaloids, caffeine, HPLC, coffee, coffee beverages

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Soně Škrovánkové, Ph.D. za čas a cenné rady, které mi poskytla při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu při studiu.

Za každou úspěšnou ženou je obrovské množství kávy.

Stephanie Piro

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ALKALOIDY	12
1.1 PYRIDINOVÉ ALKALOIDY	13
1.2 PIPERIDINOVÉ ALKALOIDY	14
1.3 PYRROLIZIDINOVÉ ALKALOIDY	15
1.4 CHINOLIZIDINOVÉ ALKALOIDY	16
1.5 CHINOLINOVÉ ALKALOIDY	17
1.6 KAPSAICINOIDY	17
1.7 STEROIDNÍ GLYKOALKALOIDY	18
1.8 PURINOVÉ ALKALOIDY	19
2 KOFEIN	21
2.1 ZDROJE KOFEINU	22
2.1.1 Kávovník a káva	22
2.1.1.1 Káva a kávové nápoje	24
2.1.2 Čajovník a čaj	25
2.1.3 Kakaovník a kakao	25
2.1.4 Kolovník	26
2.1.5 Guarana	26
2.2 ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ KOFEINU	26
2.2.1 Kapalinová chromatografie	26
2.2.2 Tenkovrstvá chromatografie	27
2.2.3 Plynová chromatografie	28
2.2.4 Hmotnostní spektrometrie	28
2.2.5 Spektrofotometrie	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
3 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	31
4 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	32
4.1 VZORKY KÁV A INSTANTNÍCH KÁVOVÝCH NÁPOJŮ	32
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	33
4.3 POUŽITÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE	33
5 METODIKA STANOVENÍ KOFEINU METODOU HPLC/UV	35
5.1 EXTRAKCE KOFEINU	35
5.2 STANOVENÍ OBSAHU KOFEINU POMOCÍ METODY HPLC/UV	35
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	37
6.1 KALIBRAČNÍ KŘIVKA STANOVENÍ STANDARDU KOFEINU METODOU HPLC/UV	37
6.2 STANOVENÍ KOFEINU V JEDNOTLIVÝCH VZORCÍCH KÁVY A INSTANTNÍCH KÁVOVÝCH NÁPOJŮ	38
6.2.1 Stanovení kofeinu v kávě	39
6.2.2 Stanovení kofeinu v instantních kávových nápojích	41
ZÁVĚR	44

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	47
SEZNAM OBRÁZKŮ	48
SEZNAM TABULEK	49
SEZNAM PŘÍLOH	50

ÚVOD

Alkaloidy jsou dusíkaté bazické sloučeniny, které vznikají jako sekundární metabolity. Podle základního členění se alkaloidy rozdělují na pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy. Také je možné alkaloidy rozdělovat podle struktury, kterou mají ve své molekule (purinové, chinolové alkaloidy atd.), nebo podle výskytu alkaloidů (např. alkaloidy tabáku).

Kofein je purinový alkaloid a patří do skupiny pseudoalkaloidů. V čistém stavu je kofein bílá látka, v podobě krystalků nebo prášku. Kofein nezapáchá, ale je charakteristický svou hořkou chutí. Metabolismus kofeinu probíhá v játrech, močí je vyloučeno maximálně 20 % kofeinu v nezměněné formě. Kofein je nejvyužívanějším stimulantem na světě, stejně jako jiné stimulanty má své pozitivní (stimulace CNS, zrychlení metabolismu a odbourávání tuků) a negativní účinky (riziko vzniku osteoporózy, zvýšení krevního tlaku).

Nejrozšířenějším nápojem na světě je káva, většinou se jedná o teplý nápoj připravený z plodů kávovníku. V naší oblasti jsou na trhu nejrozšířenější kávy typu Arabika a Robusta. Je známo několik variant káv, tato práce je zaměřena na kávu mletou a instantní. Než se z plodu stane káva, ze které je připravován nápoj, musí káva projít množstvím technologických operací (zpracování zrna, pražení, chlazení, mletí a balení).

Velkou oblibou mají v dnešní době instantní kávové nápoje, které jsou směsí instantní kávy a dalších přísad (cukr, mléko, smetana, stabilizátory, emulgátory atd.).

Kofein lze stanovit několika metodami, nejvyužívanějšími jsou metody spektrofotometrické a separační. Z metod separačních jsou to především metody chromatografické (plynová a kapalinová chromatografie). Ke stanovení kofeinu se běžně využívá vysokouúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), k dělení látek mezi dvěma fázemi.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ALKALOIDY

Alkaloidy zahrnují více než 10000 sloučenin. Jedná se o dusíkaté bazické sloučeniny, které vznikají jako sekundární metabolity. Některé z alkaloidů jsou považovány za produkty detoxikace, regulátory růstu a rezervní formy dusíku. Nejčastěji se vyskytují jako směsi látek příbuzného charakteru, a to jako volné látky, *N*-oxidy, soli karboxylových kyselin, jejich estery nebo amidy, také se mohou vyskytovat jako glykosidy. [1].

Alkaloidy nelze charakterizovat jako jednotnou skupinu přírodních látek. Některé alkaloidy jsou totiž také řazeny mezi přírodní antibiotika, protože jsou součástí obranných mechanismů rostlin proti elicitorům a predátorům. Další alkaloidy se zase naopak řadí mezi přírodní toxické aminokyseliny, biogenní aminy nebo mezi přírodní barviva. Alkaloidy mohou rovněž vznikat během termického zpracování potravin ze základních živin. Mailardovými reakcemi vznikají z tryptofanu indolové alkaloidy [1, 2].

Nacházejí se v různých částech cévnatých rostlin, vyskytují se v semenech, listech, kořenech, kůře atd. Také se nacházejí v určitých druzích mechů, hub, bakterií, bezobratlých živočichů (stonožek, brouků, koryšů, motýlů) a obratlovců (žab, mloků aj.) [1].

Převážná část alkaloidů jsou látky pevné, bezbarvé a bez zápachu. Při vyšších teplotách a za normálního tlaku se rozkládají. Jen několik alkaloidů je tekutých, mezi ně patří koniin, nikotin a spartein. Tyto alkaloidy se vyznačují charakteristickým zápachem a je možné je destilovat. Většina přirozených alkaloidů jsou opticky aktivní [3].

Běžně se alkaloidy klasifikují do tří hlavních skupin [1]:

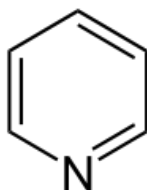
- Právě alkaloidy – obvykle se jedná o heterocyklické dusíkaté báze odvozené od aminokyselin, často jsou velmi toxické pro člověka a jiné živočichy, vykazují široké spektrum fyziologických účinků, (nikotin v tabáku).
- Pseudoalkaloidy – heterocyklické dusíkaté báze, jejichž prekurzory jsou terpenoidy nebo puriny, obvykle méně toxické (kofein v kávě, solanin v bramborech).

- Protoalkaloidy – bazické aminy odvozené od aminokyselin, ale dusík není součástí heterocyklického (aromatického) systému (kapsaicin v pálivých paprikách).

Běžnou klasifikací jednotlivých skupin alkaloidů je rozdělení podle heterocyklických sloučenin, od kterých jsou odvozeny jejich základní skelety – pyridinové, piperidinové a pyrrolidinové alkaloidy, pyrrolizidinové alkaloidy, chinolinové a chinolizidonové alkaloidy, kapsaicinoidy, purinové alkaloidy a steroidní glykoalkaloidy. Další klasifikací je klasifikace podle původu alkaloidu (např. tabákové alkaloidy) [1].

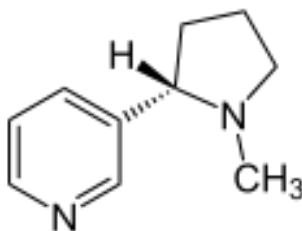
1.1 Pyridinové alkaloidy

Alkaloidy, jež obsahují ve své molekule pyridinový kruh (obr. 1). Kromě pyridinového kruhu obsahují některé sloučeniny také piperidinový (obr. 3) a pyrrolidinový kruh. Nejdůležitějšími pyridinovými alkaloidy jsou alkaloidy tabáku [1, 4].



Obr. 1. Chemický vzorec pyridinu

Hlavním alkaloidem komerčního tabáku je nikotin (obr. 2). Množství nikotinu v tabáku je závislé na druhu tabáku (tabák viržinský, tabák selský). V malém množství je nikotin přítomen i v jiných rostlinách, hlavně v lilkovitých, kam náleží brambory, rajčata a lilek. Biosyntéza nikotinu probíhá v kořenech rostliny a odtud je nikotin transportován do nadzemní části, především do listů. V tabáku je nikotin společně s dalšími třemi význačnými alkaloidy, normikotinem, anatabinem a anabasinem. Kromě těchto alkaloidů se v tabáku vyskytuje dalších asi 20 alkaloidů, ale ty už pouze jako minoritní látky [1].



Obr. 2. Chemický vzorec nikotinu

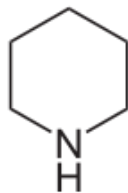
Během úpravy, sušení a fermentace obsah alkaloidů v tabáku klesá. Celkový obsah alkaloidů v tabáku kolísá od 0,3 do 3 % v sušině, záleží na druhu, odrůdě, části rostliny, klimatických a půdních podmínkách a na dalších faktorech [4].

Nikotin je účinným neurotoxinem, hlavně pro hmyz. V nízkých koncentracích u savců působí stimulačně, ale současně je také velmi návykovou látkou. Střední dávky zvyšují dýchací a motorickou aktivitu a nutí ke zvracení, vysoké dávky působí třes a mohou končit až komatem [1].

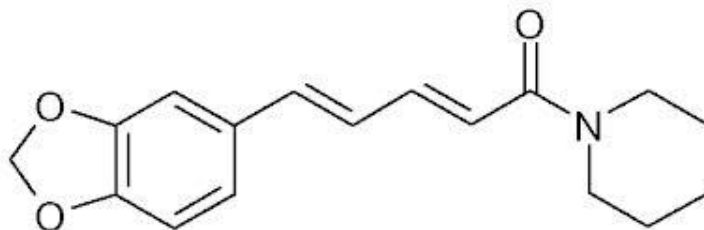
1.2 Piperidinové alkaloidy

Nejznámějšími alkaloidy obsahující piperidinový kruh (obr. 3) jsou alkaloidy pepře černého. Piperin (obr. 4) je amid piperové kyseliny a v pepři je nejrozšířenějším alkaloidem [1].

V pepři černém je také obsažen piperanin a v malém množství piperettin, piperolein A, piperolein B a piperylin. V olejoprskyřicích bývá doprovázen svými geometrickými isomery. Tyto isomery vykazují malou nebo žádnou štiplavost [4].



Obr. 3. Chemický vzorec piperidinu



Obr. 4. Chemický vzorec piperinu

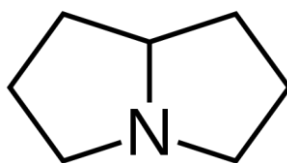
Nejvyšší obsah piperinu v plodech pepře bývá před plnou zralostí. Proto je v zeleném pepři, který je získávaný před plnou zralostí, nejvyšší obsah piperinu. Vysoký obsah piperinu je také v černém pepři, který se získává fermentací zelených semen. Poněkud méně piperinu je obsaženo v bílém pepři získávaném ze zralých červených semen. Obsah piperinu v pepři bývá v rozmezí 3-8 %, ovšem záleží na původu pepře. Piperin je stálý v nepoškozených semenech, mletý pepř na vzduchu velmi rychle oxiduje [1, 4]

Piperidin a jeho deriváty mají dráždivé, antimikrobní a insekticidní účinky. Piperin působí jako stimulant centrální nervové soustavy, vykazuje slabé antipyretické a mutagenní účinky a inhibuje některé enzymy, které se uplatňují při metabolismu a transportu xenobiotik a drog. Vyšší koncentrace piperinu mohou poškodit tkáň jazyka, snížit krevní tlak a rychlost dýchání [1].

1.3 Pyrrolizidinové alkaloidy

Jedná se o rozsáhlou a důležitou skupinu alkaloidů. Patří sem asi 250 alkaloidů, které jsou produkovány 6000 rostlinnými druhy náležejícími do 13 čeledí. Alkaloidy se v rostlinách vyskytují v malém množství jako komplexní směsi více jak deseti různých sloučenin. Nejdůležitější patří do čeledi brutnákovitých (kamejka lékařská, kostival hlíznatý, lopusník skloněný atd.), hvězdnicovitých (čekanka obecná, heřmánek pravý, devětsil bílý a další), otočnickovitých (otočník evropský), bobovitých (jetel luční, čočka jedlá, hrách setý, čičorka pestrá) a řešetlákovitých (krušina olšová, řešetlák počistivý) [1, 3].

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou odvozeny od pyrrolizidinu (obr. 5). Základem těchto alkaloidů jsou neciny odvozené od aminoalkoholů. Nejčastěji vyskytujícími neciny léčivých rostlin jsou supinidin, isomerní retronecin a heliotridin, platynecin, hastanecin, otonecin a některé další [1].



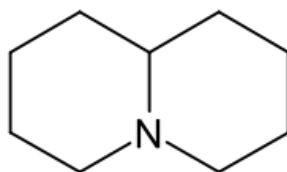
Obr. 5. Chemický vzorec pyrrolizidinu

Biosyntéza pyrrolizidinových alkaloidů probíhá v kořenech, a poté jsou transportovány do nadzemních částí rostliny a ukládány ve vakuolách. Obsah alkaloidů v toxických rostlinách se liší v různých částech rostliny a závisí na řadě faktorů. O stabilitě těchto alkaloidů nejsou informace [5].

Rostliny, jež obsahují pyrrolizidinové alkaloidy jsou toxické pro člověka i domácí zvířata. Toxicitu způsobují pyrrolové struktury, které vznikají z alkaloidů. Pyrrolizidinové alkaloidy jsou hepatoxiny a karcinogeny [1].

1.4 Chinolizidinové alkaloidy

Alkaloidy této skupiny obsahují ve své molekule chinolizidinovou strukturu (obrázek 6). Skupina těchto alkaloidů je zvláštní skupinou bicyklických, tricyklických a tetracyklických sekundárních metabolitů některých luštěnin. Také jsou sekundárními metabolity rostlin mečíkovitých, dřišťálovitých a lilkovitých [1].



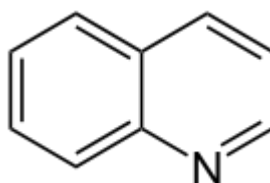
Obr. 6. Chemický vzorec chinolizidinu

Chemicky se jedná o deriváty norlupinanu. Jsou to alkaloidy semen lupiny. Lupina je vytrvalá, dvouděložná rostlina. Patří do čeledi bobovitých. V Austrálii se tato rostlina pěstuje kvůli likvidaci chorob v rámci systému střídání plodin. Hlavními alkaloidy, které jsou obsaženy v semenech lupiny, jsou lupanin, spartein, albin, angustifolin, lupinin a multiflorin [1, 3, 6].

Alkaloidy s chinolizidinovým cyklem vykazují různou toxicitu. Nejvíce toxický je lupanin a spartein. Požije-li člověk 11 – 25 mg lupinového alkaloidu na kilogram své tělesné hmotnosti, může dojít k vážnému poškození zdraví. Lupinové alkaloidy mohou silně poškozovat jaterní tkáň a způsobovat nekrózu [1].

1.5 Chinolinové alkaloidy

Alkaloidy odvozené od chinolinu (obr. 7) jsou velmi rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů rostlin. Je jich známo více jak 3000, také se nazývají jako terpenoidní indolové alkaloidy. Některé z těchto alkaloidů se využívají v medicíně, jako antimalarikum a antipyretikum. Nejdůležitějšími alkaloidy toho typu jsou alkaloidy obsažené v kůře chinovníku [1].



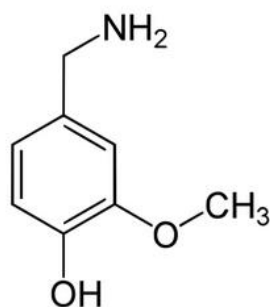
Obr. 7. Chemický vzorec chinolinu

V kůře chinovníku je nejrozsáhlejším alkaloidem chinin, dále se tam nachází také chinidin, cinchonin a cinchonidin [1].

Chinin se používá jako antimalarikum a analgetikum, protože tlumí centrum bolesti. Hojně se dnes využívá v potravinářství jako standard hořkosti a také jako hořčidlo tonizujících nealkoholických (tonic) a alkoholických nápojů. Na světle je nestálý, dochází k degradaci. V nápojích vystavených přímému slunečnímu záření dojde k rychlému rozložení chininu. Nápoj ztrácí svoji hořkou chuť [1, 4].

1.6 Kapsaicinoidy

Alkaloidy patřící do skupiny protoalkaloidů, jde o deriváty vanillylaminu (obr. 8). Vyskytují se hlavně v pálivých druzích paprik. V pálivých paprikách se z více jak 90 % vyskytuje kapsaicin a dihydrokapsaicin, další alkaloidy jsou pouze minoritními složkami. Také se v paprikách vyskytuje nepálivý alkaloidy (-)-kapsaicinol [1].



Obr. 8. Strukturální vzorec vanillylaminu

Množství kapsaicinoidů v paprice je závislé na odrůdě, stáří, zralosti, ročním období a agronomických podmínkách. Převážné množství alkaloidů se vyskytuje v dužině, menší koncentrace kapsaicinoidů se nacházejí v semenech a slupce. Maximální koncentrace kapsaicinoidů je v paprikách těsně před jejich sklizní, v průběhu dozrávání obsah narůstá [1, 6].

Tepelnými zákroky dochází ke ztrátám těchto alkaloidů. Jsou relativně odolné vůči hydrolyze. V kyselém i alkalickém prostředí vzniká hydrolyzou vanillylamin a příslušná mastná kyselina, respektive její sůl. Při pečení paprik na oleji mohou vznikat amidy odvozené od příslušných mastných kyselin [1, 5].

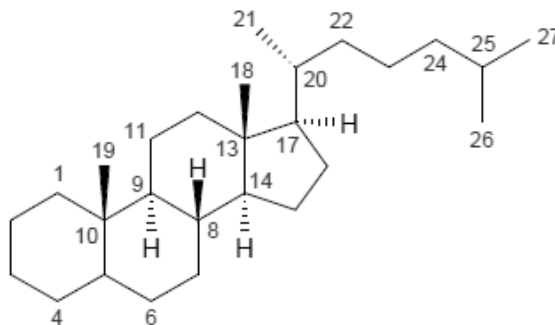
Kapsaicinoidy vykazují antimikrobní a antioxidační účinky. V lékařství jsou používány jako analgetikum. Také již byly využity k léčbě bolestivých stavů, rovněž stimulují peristaltiku střev a podporují tvorbu žaludečních šťáv. Kapsaicinoidy se vyskytují v chilli [7].

1.7 Steroidní glykoalkaloidy

Základním skeletem dusíkatých steroidních glykoalkaloidů je cholestan (obr. 9), skládá se ze tří kondenzovaných šestičlenných kruhů a jednoho pětičlenného. Glykoalkaloidy se též nazývají steroidní alkaminy. Vyskytují se v dvouděložných rostlinách čeledi lilkovitých, liliovitých a klejichovitých [1].

Podle struktury aglykonu se steroidní glykoalkaloidy dělí do pěti skupin, a to na solanidany, spirosolany, 22, 26-epiminocholestany, α -epiminocyklohemiketaly a 3-aminospirostany [1].

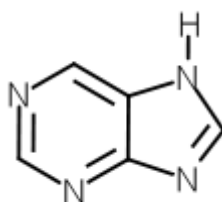
Potravinářsky významné jsou pouze rostliny čeledi lilkovitých, rodu *Solanum*. Do tohoto rodu se řadí brambory, baklažány a rajčata. Alkaloidy v těchto potravinách jsou při technologickém a kulinárním zpracování relativně stabilní. Nejznámější je solanin, který se vyskytuje v bramborách, a tomatin v rajčatech [1, 7].



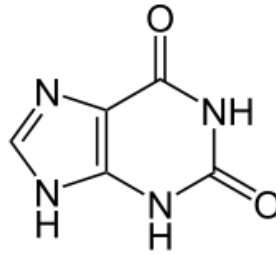
Obr. 9. Strukturální vzorec cholestanu

1.8 Purinové alkaloidy

Purinové alkaloidy jsou nejrozšířenějšími alkaloidy v potravinách. Jsou odvozené od purinu (obr. 10), respektive od produktu jeho oxidace xantinu (obr. 11). Jedná se o methylderiváty xantinu. Nejrozšířenějším purinovým alkaloidem je kofein (1, 3, 5 – trimethylxanthin), je doprovázen dimethylxanthiny theobrominem, theofylinem a paraxanthinem. Také společně s kofeinem se vyskytuje monomethylxanthin heteroxanthin a methylmočové kyseliny. Purinové alkaloidy se akumulují v rostlinách z důvodu ochrany před poškozením mladých listů, květů a plodů škůdci [1].



Obr. 10. Chemický vzorec purinu



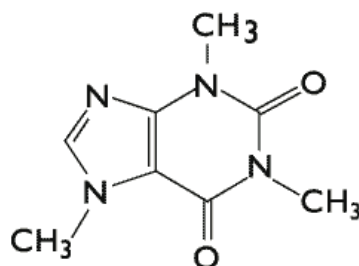
Obr. 11. Strukturní vzorec xanthinu

Methylxanthiny jsou stabilní sloučeniny, během technologického zpracování nedochází ke ztrátám obsahu alkaloidů, výjimkou jsou reakce při fermentaci. Při fermentacích se obsah alkaloidů mění [8].

Využívají se jako analgetika, která jsou schopná stimulovat určité části nervové soustavy, musí však být užita v malých dávkách. Při konzumaci vyšších dávek dochází k neuroendokrinním účinkům. Velmi vysoké dávky mohou působit teratogenně [1, 9].

2 KOFEIN

Z hlediska základního členění se kofein řadí do skupiny pseudoalkaloidů. Ve své molekule obsahuje cyklus purinu, takže se jedná o purinový alkaloid. Kofein je 1, 3, 7 - trimethylxanthin (obr. 12) [1].



Obr. 12. Strukturální vzorec kofeinu

Kofein je v čistém stavu bílé barvy, krystalického, nebo práškovitého charakteru. Kofein nezapáchá, ale chutná hořce. Hořkou chutí je kofein charakteristický. Základní fyzikálně – chemické vlastnosti kofeinu jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1) [10].

Tab. 1. Fyzikálně – chemické vlastnosti kofeinu [10]

	kofein (1, 3, 7 - trimethylxanthin)
sumární vzorec	$C_8H_{10}N_4O_2$
molární hmotnost	$194,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
bod tání	$234 - 236,5 \text{ }^\circ\text{C}$
hustota (20 °C)	$1,2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
skupenství (20 °C)	pevné
rozpustnost ve vodě (25 °C)	$0,217 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Do lidského organismu se kofein dostává převážně orálně (ústí). Z trávicího traktu je vstřebáván poměrně rychle, do krevního řečiště se dostává během 30 - 45 minut. V játrech je kofein metabolizován, pomocí jaterních mikrozomálních enzymových systémů dimethylxantináz, asi na 25 různých látek. V moči se vyloučí pouze 20 % kofeinu v nezměněné podobě. Průměrný poločas kofeinu v organismu je 4 hodiny, doba se však může prodloužit až na 24 hodin [11].

Kofein je nejvyžívanějším stimulantem na světě. Jako každý jiný stimulant má své žádoucí a nežádoucí účinky. Stimuluje centrální nervový systém, čímž snižuje únavu, zbystřuje myšlení a zlepšuje koncentraci. Dalším pozitivním účinkem je že, zrychluje tep, rozšiřuje tepny a stimuluje oběhový systém. Kofein zrychluje metabolismus a odbourávání tuků, což je také pozitivum. K negativním účinkům kofeinu patří zvýšení rizika vzniku osteoporózy, protože zvyšuje vylučování vápníku. Také může mírně zvyšovat krevní tlak a zrychlovat srdeční činnost. U citlivých jedinců může působit bolest žaludku z důvodu překyselení [1, 9].

2.1 Zdroje kofeinu

Kofein se vyskytuje v semenech, listech a ovoci více jak 60 druhů rostlin. Nejběžnějšími zdroji kofeinu je kávovník, kolovník, čajovník, kakaovník a guarana. Nejznámějšími produkty, které obsahují kofein je káva, čaj, kola, maté, kakao a guarana [1, 12].

2.1.1 Kávovník a káva

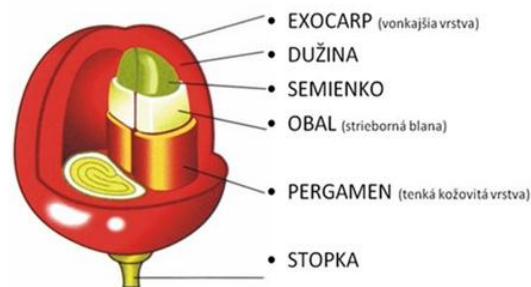
Rostlina rostoucí v celém tropickém a subtropickém pásmu. Řadí se mezi ovocné dřeviny, patří do rodu *Coffea* a do čeledi mořenovitých. Pěstuje se ve více jak 70 různých zemích světa (Brazílie, Kolumbie, Vietnam, Indonésie, Etiopie, Indie a další). Volně rostoucí kávovníky mohou dorůst až do výšky 15 m, na plantážích takovéto výšky nedosahují z důvodu obtížné sklizně [13].

Kávovník má velké (asi 15 cm), zelené a lesklé listy (obr. 13). Kvete několikrát do roka, může mít zároveň plody, jimiž jsou kávově třešně, a také kvést. Plody kávovníku zrají 9 – 14 měsíců. Doba než začne nová rostlina kávovníku plodit, trvá 3 – 4 roky od zasazení rostliny [13, 14].



Obr. 13. Kávovník [15]

Nezralé plody kávovníku jsou zelenkavé barvy, která se dozríváním mění v červenou nebo fialovou. Zrnka jsou schována v peckovicích, jsou velké asi 1,5 cm. Na povrchu zrna (Obr. 14) je slupka (exokarp) a pod ní dužina (mesokarp). V dužině jsou dvě zelená kávová zrnka, na sobě mají pergamen (endokarp), také jsou obaleny stříbřitou blankou (integument) [16].



Obr. 14. Struktura plodu kávovníku [17]

K výrobě kávy se nejčastěji využívá kávovník *Coffea arabica* a *Coffea robusta*.

Coffea arabica je kávovník, který roste ve vyšších nadmořských výškách (600 – 2000 m. n. m.). Tento kávovník je náročný na pěstování, ideální teplotou pro pěstování je 15 – 24 °C. Káva vyrobená z tohoto kávovníku obsahuje menší množství kofeinu, ale vyznačuje se kyselostí, která závisí na způsobu zpracování a na typech odrůd [16, 18].

Kávovník *Coffea robusta* roste v nižších nadmořských výškách (200 – 600 m. n. m.). Pro svůj růst vyžaduje teploty vyšší a to 24 – 29 °C, ale jinak je na pěstování méně náročný než Arabika (odolný vůči chorobám). Káva připravená z tohoto kávovníku obsahuje vyšší množství kofeinu než Arabika. Robusta je káva, která má výrazně hořkou chuť [16].

2.1.1.1 Káva a kávové nápoje

Káva patří mezi nejrozšířenější nápoje po celém světě. Káva je nápoj připravený z plodů kávovníku. Na českém trhu jsou nejrozšířenější kávy mleté a instantní [19].

2.1.1.1.1 Získávání kávy

Po uzrání plodů kávovníku jsou plody sklizeny. Sklizeň plodů trvá 6 – 8 týdnů. Existuje několik možností, kterými lze kávové plody z kávovníku posbírat (ruční sběr, česání, strojový sběr). Ruční sběr je velmi náročný, tímto způsobem se sbírají plody k výrobě drahé a kvalitní kávy. Dalším způsobem je česání, tento způsob je také ruční, ale už nejsou vybírány jen zralé plody. Očesávají se celé větve (plody zralé i nezralé) do košů. Posledním způsobem sklizně je strojový sběr, z keřů jsou otrhány kromě plodů i listy [16].

Nasbírané kávové plody jsou dále zpracovávány, zpracování má vliv na chuť kávy. Zpracování probíhá třemi metodami. Metody stanovení jsou suché, mokré a polo-promývané. Metody se liší způsobem zpracování a náročností [16].

Před další operací s kávou jsou zrna loupána a leštěna, dojde k odstranění pergamenové slupky [16].

Získaná zelená kávová zrna jsou pražena. Každá káva je pražena při jiné teplotě a různou dobu. Existuje několik stupňů pražení (světlé – tmavé). Po upražení dojde k rychlému zchlazení [16, 18].

Dalším zpracováním je míchání směsí kávy, mletí a balení [16].

2.1.1.1.2 Instantní káva

Z mletých pražených kávových zrn je udělán silný kávový extrakt, který je prudce zchlazen (100 °C → 4°C). Toto zchlazení má vliv na kvalitu budoucí kávy. Po zchlazení je kávový extrakt sušen sprejováním, nebo mražením [19].

2.1.1.1.3 Instantní kávové nápoje

Instantní kávové nápoje jsou směsí instantní kávy a dalších přísad. Přísadami k ochucení kávy je mléko, smetana a cukr. Jako další přísady se používají stabilizátory, emulgátory, ztužený rostlinný tuk, regulátory kyselosti, jedlá sůl, aromata, protispěková látka a další [20].

2.1.2 Čajovník a čaj

Čajovník je hustě olistěný keř rostoucí v tropickém nebo subtropickém podnebí. Čajovník patří do rodu *Camellia* a čeledi čajovníkovité. Jedná se o subtropické a tropické stromy a keře, které jsou stálezelené. K výrobě čaje se na plantážích čajovníky udržují ve formě keřů, z důvodu snadnějšího sběru lístků a vyšších výnosů. Listy čajovníku jsou světle až tmavě zelené, tuhé a mají pilovitý okraj. Květy čajovníku mají bílou až růžovou barvu, pro výrobu čaje jsou bezvýznamné. Plodem jsou malé tobolky hnědé barvy [18].

Čaj je nápoj připravený louhováním listů čajovníku, které prošly určitým stupněm technologického opracování. Čaj je považován ihned po pitné vodě za nejrozšířenější nápoj na světě. Je známo několik druhů čaje, nejznámějšími jsou čaje černé, zelené, bílé a polofermentované [21].

2.1.3 Kakaovník a kakao

Kakaovník pravý (*Theobroma cacao*) je vždy zelený strom, jeho listy dorůstají v průběhu celého roku. Přímo na kmeni a tlustších větvích vyrůstají květy, a poté plody. Strom plodí celý rok, plody dozrávají asi 5 měsíců. Plody jsou pokryté silou slupkou, a v průběhu zrání mění barvu od žluté až po červenou. Uvnitř plodu je dřeň, v níž jsou bílá, oválná semena. Těchto semen je v každém plodu 20 – 60 [22].

Kakao je prášek získaný z kakaových bobů. Tento prášek má extrémně hořkou chuť. Při získávání kakaového prášku se získává také kakaové máslo, které se používá k výrobě lahodné čokolády. Kakao se používá k přípravě kakaového nápoje, jako přísady do moučnicků nebo instantní kakaové nápoje (obsahují velké množství cukru) [22].

2.1.4 Kolovník

Kolovník zašpičatělý (*Cola acuminata*) je tropický strom, který je stálezelený. Plodem, který se konzumuje, jsou kolové ořechy. Plody kolovníku obsahují více kofeinu než listy čajovníku a plody kávovníku, v plodech kolovníku jsou obsaženy až 3 % kofeinu. Plody koly působí jako stimulanty, využívají se na výrobu nealkoholických nápojů, díky tonizujícím účinkům [23].

2.1.5 Guarana

Popínavá dřevnatá liána z čeledi mýdelníkovité dorůstá až 12 metrů. Má rýhovanou lodyhu a velké listy. Kvete drobnými bílými, nebo žlutými květy, které tvoří hrozny. Plody guarany jsou červené tobolky, obsahující jedno velké černé semeno. Jakmile plod dozrává, červená slupka plodu praská a je viditelné černé semeno uvnitř plodu. Plody dozrávají v říjnu a v listopadu [24].

Guarana je známá pro své povzbuzující účinky, vyrábí se z ní tabletky. Působí kladně na nervový i tělesný stav, stimuluje mozkové funkce a podporuje mozkovou činnost [24].

2.2 Analytické metody stanovení kofeinu

Ke stanovení kofeinu se využívají metody převážně spektrofotometrické a separační. Nejvyužívanějšími separačními metodami je kapalinová a plynová chromatografie [25].

2.2.1 Kapalinová chromatografie

Tato metoda je jednou z chromatografických separačních metod. Kapalinová chromatografie využívá dělení látek mezi dvěma fázemi. K dělení látek je používána chromatografická kolona. Kolona je skleněná, ocelová nebo plastová trubice o různých délkách, v níž jsou drobné částice vhodného materiálu (sorbentu). Stacionární fáze (nepohyblivá) je určitá část sorbentu, přístupná pro molekuly vzorku. Kolonou protéká kapalina, mobilní fáze (pohyblivá), tato kapalina protéká mezi částicemi sorbentu [25, 26].

Základem separace je rozdílná afinita složek vzorku k mobilní a stacionární fázi. Postupováním vzorku kolonou dochází k vytváření rovnovážných stavů na základě různých in-

terakcí mezi vzorkem a mobilní fází, vzorkem a stacionární fází a také mezi fázemi navzájem [26].

Mobilní fáze funguje jako přenašeč vzorku. Chemická interakce mobilní fáze a vzorku s kolonou určuje míru migrace a separace jednotlivých složek obsažených ve vzorku. Na základ průtoků mobilní fáze můžeme rozlišovat izokratickou a gradientovou eluci. Mobilní fáze používaná v izokratické eluci má konstantní složení. Všechny složky migrují již na počátku kolony, ale každá složka migruje jinou rychlostí, mají jinou eluční rychlost. V gradientové eluci jsou složky vzorku vymývány postupným zvyšováním síly organických rozpouštědel. Na počátku kolony má mobilní fáze nejnižší sílu a poté je síla zvyšována přidáváním většího množství rozpouštědla [27].

Složení vzorku je stanovováno pomocí detektoru. Detektor by měl být selektivní pro analyt a málo citlivý pro mobilní fázi. Detektory nejvyužívanější při kapalinové chromatografii jsou fotometrické, fluorescenční, refraktometrické a hmotnostní spektrometry. Výsledným záznamem kapalinové chromatografie je chromatogram [26].

Pro stanovení kofeinu metodou HPLC/UV musí být vzorek vhodně upraven. Jedná-li se o vzorek pevný, tak se extrahuje s vodou. V případě, že jde o vzorek kapalný, dojde pouze k odplynění vzorku v ultrazvukové lázni. Vzorky musí být následně zfiltrány pomocí mikrofiltru. Ke stanovení se používá vhodná analytická kolona a mobilní fáze. K detekci se běžně využívá fotometrický detektor (UV detektor). Identifikace obsahu kofeinu se následně provádí stanovením plochy píku kofeinu [27].

2.2.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie slouží pouze ke kvantitativnímu stanovení kofeinu. Detekce výsledků u této metody je možná pouhým okem na základě barviva, nebo identifikace skvrn pomocí fyzikálními či chemickými metodami [28].

Kofein lze kvantitativně stanovit pomocí denzitometru. Denzitometr převede skvrny analytů na chromatogram. Plocha píku na chromatogramu je úměrná obsahu příslušné složky [28].

2.2.3 Plynová chromatografie

Patří mezi nejrozšířenější chromatografické metody, používá se především pro analýzu těkavých látek a plynů. Velkou výhodou této metody je rychlé a jednoduché provedení analýzy, a také velmi účinná separace v malém množství vzorku. V plynové chromatografii se jako mobilní fáze používá nosný plyn, typ plynu se volí na základě detekčního systému. Vzorek je dávkován do proudu plynu, a tímto plynem je vzorek unášen na kolonu [28].

Vzorek kofeinu pro GC se musí ke stanovení smíchat s ethylacetátem a bezvodým sulfidem vápenatým. Připravený vzorek se následně stanovuje plynovou chromatografií, nosným plynem je helium. K detekci se používá hmotnostní spektrometr [27].

2.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Při stanovení je vzorek převáděn na ionizovanou plynovou formu a vzniklé ionty jsou separovány podle hodnoty podílu jejich hmotností a náboje. Analýza vzorku probíhá v hmotnostním spektrometru. Před vlastním stanovením musí být vzorek odpařen a poté ionizován. V ionizovaném vzorku dojde k akceleraci iontů do hmotnostního analyzátoru. Pomocí hmotnostního filtru jsou ionty separovány a poté detekovány [29].

Ke stanovení kofeinu se používá v kombinaci s kapalinovou chromatografií, hmotnostní spektrometr funguje jako detektor. Kofein je ve vzorku identifikován srovnáním retenčních časů a zjištěním relativní molekulové hmotnosti pomocí hmotnostního spektrometru. [27].

2.2.5 Spektrofotometrie

Spektrofotometrické stanovení spočívá v interakci mezi stanovovaným analytem a monochromatickým zářením. Určitá část monochromatického záření je absorbována stanovovaným vzorkem a zbývající část záření je detekována detektorem. Množství záření, které je absorbováno analyzovaným vzorkem je přímo úměrné množství stanovované látky. Stanovovanou veličinou je absorbance, což je množství záření pohlcené analyzovanou látkou [30].

Principem stanovení kofeinu je extrakce kofeinu ve vodném roztoku a poté měření absorpance při vlnové délce 273 nm. Obsah kofeinu ve vzorku je spektrofotometrickou metodou stanovován oproti vodě jako slepému vzorku. Koncentrace kofeinu se stanoví na základě kalibrační křivky, která se sestaví měřením standardů [30].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo stanovení obsahu kofeinu ve vybraných druzích kávy a instantních kávových nápojů pomocí chromatografické metody HPLC/UV.

1. Formou literární rešerše popsat alkaloidy, kofein, charakterizovat jeho vlastnosti, výskyt a působení na lidský organismus. Také popsat metody, které se využívají pro stanovení kofeinu.
2. V praktické části stanovit obsah kofeinu ve vzorcích kávy a instantních kávových nápojích pomocí metody HPLC s UV detekcí.

4 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

4.1 Vzorky káv a instantních kávových nápojů

V bakalářské práci byl obsah kofeinu stanovován ve 4 vzorcích mleté kávy, 4 vzorcích instantní kávy a v 11 vzorcích instantních kávových nápojů. Vzorky byly zakoupeny v obchodní síti.

Tab. 2. Vzorky instantních kávových nápojů

	Charakteristika	Výrobce	Datum spotřeby
Clever 3in1	instantní kávový nápoj	MOKATE Czech s.r.o.	18. 3. 2015
Jacobs 2in1	instantní kávový nápoj	Kraft Foods CR s.r.o.	12. 8. 2014
Jacobs 3in1	instantní kávový nápoj	Kraft Foods CR s.r.o.	14. 3. 2014
Jacobs Cafe Latte	instantní kávový nápoj	Kraft Foods CR s.r.o.	23. 6. 2014
Jacobs Ice Coffee	instantní kávový nápoj	Kraft Foods CR s.r.o.	21. 2. 2014
Mokate 2in1	instantní kávový nápoj	MOKATE Czech s.r.o.	8. 10. 2014
Mokate 3in1	instantní kávový nápoj	MOKATE Czech s.r.o.	27. 12. 2014
Nescafé 2in1	instantní kávový nápoj	Nestlé Česko s.r.o.	12. 9. 2014
Nescafé 3in1 Brown sugar	instantní kávový nápoj	Nestlé Česko s.r.o.	29. 9. 2014
Nescafé 3in1 Classic	instantní kávový nápoj	Nestlé Česko s.r.o.	3. 10. 2014
Nescafé 3in1 Mild	instantní kávový nápoj	Nestlé Česko s.r.o.	14. 12. 2014

Tab. 3. Vzorky mleté kávy a instantní kávy

	Charakteristika	Výrobce	Datum spotřeby
Douwe egberts paloma	mletá káva, káva Robusta	Sara Lee Czech Republic, a.s.	25. 7. 2014
Jacobs aroma standard	mletá káva, káva Robusta	Kraft Foods CR, s.r.o.	19. 6. 2014
Jacobs krönung espresso	instantní káva	Kraft Foods CR, s.r.o.	13. 11. 2014
Jihlavanka standard original	mletá káva, káva Robusta	Tchibo Praha, spol. s.r.o.	12. 8. 2014
Lavaza Carte Noire	mletá káva, káva Arabika	Coffeebreak, s.r.o	13. 5. 2014
Nescafé bez kofeinu	instantní káva	Nestlé Česko, s.r.o.	18. 12. 2013
Nescafé classic	instantní káva	Nestlé Česko, s.r.o.	2. 4. 2014
Tchibo exclusive mild	instantní káva	Tchibo Praha, spol. s.r.o.	9. 7. 2014

4.2 Použité chemikálie

- Methanol pro HPLC (Sigma – Aldrich, Francie)
- Acetátový pufr (pH = 5,5)
- Standard kofeinu (Sigma – Aldrich, Chine)
- Demineralizovaná voda

4.3 Použité pomůcky a přístroje

- Laboratorní sklo a pomůcky
- Analytické váhy (AFA 210 LC, CR)
- Mikrofiltry 0,45 µm (LUT Syringe Filters Nylon, UK)
- Filtrační papíry (FILTRAK No.390, Ø 15 cm)

Aparatura pro HPLC/UV/VIS (DIONEX – Ultimate 3000, USA)

- Binární pumpy SD pump

- Termostat kolon TCC-3000 SD
- Dávkovací ventil Autosampler WPS-3000 SL
- Kolona Watrex Nucleosil (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)
- Detektor DAD-3000 (RS)
- PC s vyhodnocovacím programem HyStar Post Processing (USA)

5 METODIKA STANOVENÍ KOFEINU METODOU HPLC/UV

Postupu přípravy vzorků a stanovení vhodných podmínek pro měření obsahu kofeinu metodou HPLC/UV. Stanovení podmínek je nutné pro přesné stanovení obsahu kofeinu ve vzorcích káv a instantních kávových nápojů.

5.1 Extrakce kofeinu

Ke stanovení byl navážen 1 g vzorku káv na čtyři desetinná místa. Navážené množství bylo extrahováno se 100 ml demineralizované vody o teplotě 80 °C. Vzorky mletých káv byly následně filtrovány a podle potřeby ředěny mobilní fází. Nejvhodnější směsí pro mobilní fázi je směs metanolu a acetátového pufru. Naředěný vzorek byl filtrován přes mikrofiltr do vialek.

Ke stanovení obsahu kofeinu byl navážen 1 g vzorku instantních kávových nápojů na čtyři desetinná místa. Navážené množství vzorku bylo extrahováno se 100 ml demineralizované vody o teplotě 80 °C a poté 5 minut louhováno. Vzorky byly podle potřeby ředěny mobilní fází (methanol : acetátový pufr). Naředěný vzorek byl filtrován přes mikrofiltr do vialek. Vzhledem k doporučené přípravě nápoje Jacobs Ice Coffee výrobcem, byla u vzorku použita jako extrakční činidlo také demineralizovaná voda o teplotě 10 °C. Připravený kávový extrakt byl louhován po dobu 5 minut, a poté byl zchlazen a podle potřeby zředěn.

5.2 Stanovení obsahu kofeinu pomocí metody HPLC/UV

Pro stanovení byla vybrána jako nejvhodnější mobilní fáze směs methanolu a acetátového pufru (poměr 3 : 7, v/v). Separace vzorku probíhala na koloně Watrex Nucleosil (250 mm x 4,6 mm; 5 µm). Do přístroje HPLC bylo dávkováno množství vzorku 20 µl. Byla provedena izokratická eluce, eluce probíhala při teplotě kolony 28 °C a průtoku mobilní fáze 1 ml.min⁻¹. Pomocí UV detektoru byla při vlnové délce 273 nm prováděna detekce kofeinu.

Analýza jednoho vzorku trvala 20 minut, pík kofeinu byl zobrazen v 10 – 12 minutě analýzy. Výsledky analýzy byly vyhodnoceny pomocí počítačového chromatografického softwaru (HyStar Post Processing).

Každý vzorek byl analyzován třikrát.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 5.1, obsah kofeinu v těchto vzorcích byl analyzován metodou HPLC/UV podle postupu, který je popsán v kapitole 5.2.

6.1 Kalibrační křivka stanovení standardu kofeinu metodou HPLC/UV

Kalibrační křivka je závislost plochy píku na koncentraci standardu kofeinu. K sestrojení kalibrační křivky byl použit standard kofeinu. Ze standardu kofeinu byla připravena kalibrační řada, která obsahovala 5 koncentrací (20; 10; 7,5; 5; 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Měření koncentrací standardů bylo prováděno podle postupu, uvedeného v kapitole 5.2. Výsledné hodnoty pro vytvoření kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4). Ze získaných hodnot byl vytvořen graf kalibrační křivky (Obr. 19).

Tab. 4. Stanovené plochy piků standardů kofeinu

koncentrace kofeinu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	průměrná plocha píku [mAU.s]	s
20	23411,5	0,02
10	11720,2	0,04
7,5	8335	0,07
5	5656,4	0,03
1	1106,8	0,05

Z kalibrační křivky byla stanovena rovnice regrese.

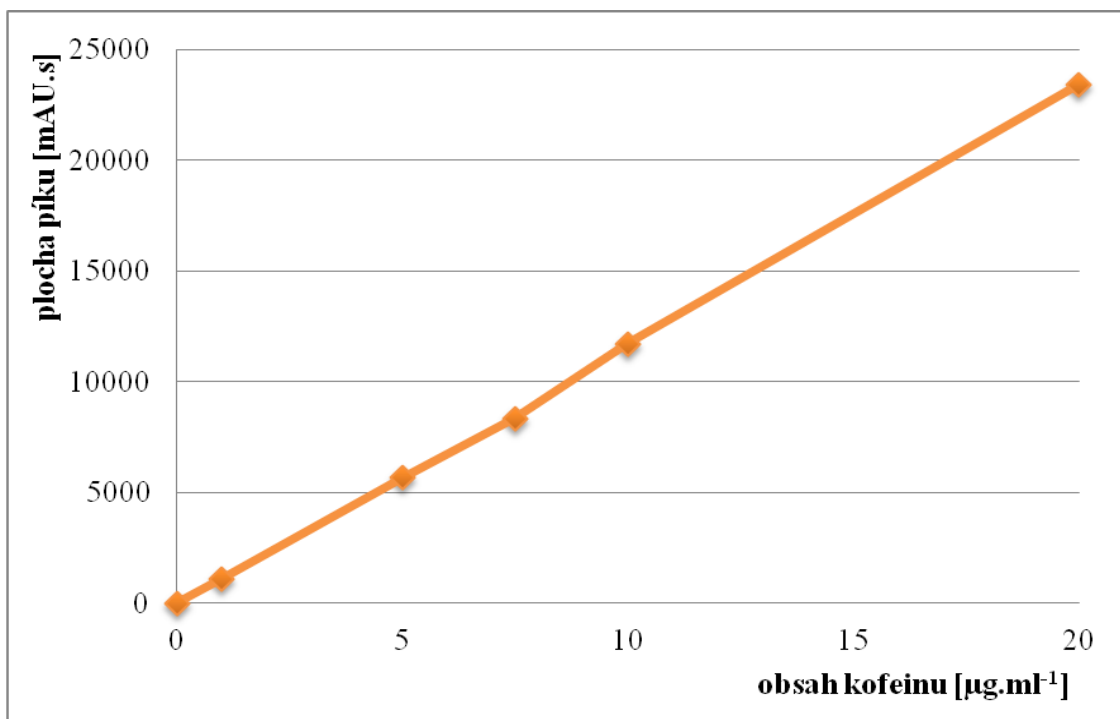
Rovnice regrese kalibrační křivky byla:

$$y = 1173,5x - 135,93$$

y – plocha píku [mAU.s]

x – koncentrace kofeinu ve vzorku [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]

Korelační koeficient: **R = 0,9996**



Obr. 15. Kalibrační přímka kofeinu

V příloze jsou uvedeny chromatogramy vybraných koncentrací kofeinu, použitých pro stanovení kalibrační křivky (PI).

6.2 Stanovení kofeinu v jednotlivých vzorcích kávy a instantních kávových nápojů

Obsah kofeinu byl stanoven ve 20 vzorcích káv a kávových nápojů. Ke stanovení byly použity vzorky mletých káv, instancích káv a instantních kávových nápojů běžně dostupných v obchodní síti. Stanovení bylo prováděno podle postupů uvedených v kapitole 5.1 a 5.2.

Každý vzorek byl proměřen třikrát, z průměrných ploch píků byla vypočítána koncentrace kofeinu ve vzorku. Jednotlivé koncentrace kofeinu byly vypočítány dosazením průměrných ploch píků do rovnice regrese (uvedena v kapitole 6.1).

Koncentrace kofeinu byly přepočítány na množství kofeinu v 1 g vzorku (mg.g^{-1}) a také na obsah kofeinu, který je obsažen v množství kávy, potřebném k přípravě jednoho šálku kávy nebo kávového nápoje. Mleté kávy je zapotřebí 6 g k přípravě jednoho šálku (100 ml) a

instantní kávy 2 g. Množství instantního kávového nápoje potřebného na přípravu jednoho šálku (150 ml) je v rozmezí 10 – 18 g.

Vybrané chromatogramy stanovení kofeinu jsou uvedeny v příloze (PII).

6.2.1 Stanovení kofeinu v kávě

Stanovené množství kofeinu v mleté a instantní kávě je uvedeno v tabulkách (tab. 5, tab. 6) a zároveň v grafu (obr. 20).

Analyzovaný obsah kofeinu byl porovnán s hodnotami běžně uváděnými v literatuře. Podle literatury [1, 10] byl obsah kofeinu v šálku mleté kávy (100 ml) v rozmezí 63 – 127 mg. Námi stanovený obsah kofeinu ve vzorcích mletých káv byl v rozmezí 9,85 – 18,79 mg/g. Množství kofeinu stanovené v jednom šálku mleté kávy (100 ml) bylo 59,07 – 112,75 mg. Nejnižší množství kofeinu bylo ve vzorku D, jednalo se o kávu Arabika, která má nižší obsah kofeinu než káva Robusta. Obsah kofeinu v této kávě byl o 35,7 % nižší než v kávě Robusta. Nejvíce kofeinu bylo stanovené ve vzorku A, množství kofeinu zde bylo 18,79 mg/g což je 112,75 mg kofeinu v jednom šálku (100 ml).

V šálku instantní kávy by měl být obsah kofeinu podle literatury [1, 19] v rozmezí 29 – 91 mg. Stanovený obsah kofeinu v 1 g vzorku instantní kávy byl v rozmezí 28,68 – 35,27 g. V jednom šálku instantní kávy bylo stanovené 57,36 – 70,53 mg kofeinu. Nejvyšší obsah kofeinu byl stanoven ve vzorku G (35,27 mg/g). Také byla jako vzorek použita instantní káva bez kofeinu, množství kofeinu v 1 g vzorku bylo 1,83 mg. Šálek připravený z instantní kávy bez kofeinu obsahoval 3,66 mg kofeinu. V literatuře [1] je uváděn obsah kofeinu v kávě bez kofeinu v rozmezí 1 – 9 mg v šálku (100 ml).

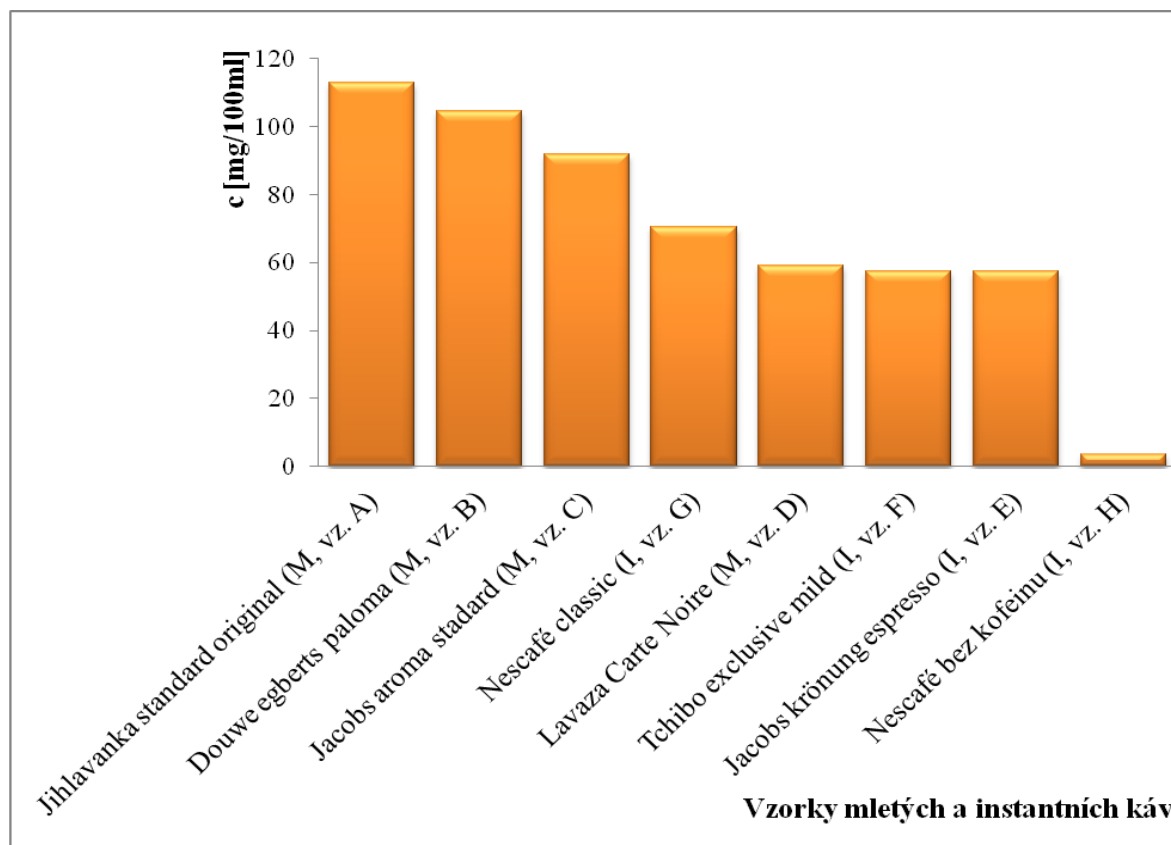
Obsah kofeinu v mleté a instantní kávě je odlišný, protože obsah kofeinu je závislý na celé řadě faktorů, jako je typ kávovníku, způsob pěstování, způsob přípravy kávy, době louhování atd.

Tab. 5. Stanovené hodnoty kofeinu u mletých a instantních káv

	Vzorek	Typ kávy	plocha píku [mAU.s]	obsah kofeinu [µg/ml]	s	obsah kofeinu [mg/g]
Jihlavanka standard original	A	mletá	8684,62	7,52	0,02	18,79
Douwe egebarts paloma	B		8033,07	6,96	0,08	17,4
Jacobs aroma stadard	C		7055,86	6,13	0,04	15,32
Lavaza Carte Noire	D		4485,4	3,94	0,04	9,85
Jacobs krönung espresso	E	instantní	13325,6	11,47	0,06	28,68
Tchibo exclusive mild	F		13346,9	11,49	0,02	28,72
Nescafé classic	G		16418,5	14,11	0,03	35,27
Nescafé bez kofeinu	H		722,26	0,73	0,07	1,83

Tab. 6. Obsah kofeinu v mleté a instantní kávě (100 ml nápoje)

	obsah kofeinu [mg/100 ml]	s
Jihlavanka standard original (M, vz. A)	112,75	0,02
Douwe egebarts paloma (M, vz. B)	104,42	0,08
Jacobs aroma stadard (M, vz. C)	91,93	0,04
Nescafé classic (I, vz. G)	70,53	0,03
Lavaza Carte Noire (M, vz. D)	59,07	0,04
Tchibo exclusive mild (I, vz. F)	57,45	0,02
Jacobs krönung espresso (I, vz. E)	57,36	0,06
Nescafé bez kofeinu (I, vz. H)	3,66	0,07



Obr. 16. Sestupné pořadí obsahu kofeinu ve 100 ml nápoje z kávy

6.2.2 Stanovení kofeinu v instantních kávových nápojích

Ke stanovení obsahu kofeinu v instantních kávových nápojích bylo použito 12 vzorků. Analyzované vzorky a stanovené hodnoty jsou uvedeny v tabulce (tab. 7, tab. 8) a v grafu (obr. 21).

Výrobci byl stanoven obsah kofeinu v těchto vzorcích v rozmezí 15 – 82 mg v připraveném šálku (150 ml). Množství kofeinu v instantních kávových nápojích bylo stanoveno v rozmezí 2,12 – 6,20 mg/g. Nejvyšší obsah kofeinu byl stanoven ve vzorku 4. Naopak nejnižší množství kofeinu obsahoval vzorek 3. Obsah kofeinu byl také přepočítán, na obsah kofeinu v jednom šálku (150 ml). Obsah kofeinu v šálku instantního kávového nápoje byl v rozmezí 33,98 – 94,27 mg. U vzorků nápojů 2 a 5 jde o stejný vzorek, se liší typem extrakce - teplotou extrakčního činidla. Ve vzorku 2, extrahovaném demineralizovanou vodou s vyšší teplotou, byl obsah kofeinu vyšší než ve vzorku, který byl extrahován za studena. Obsah kofeinu v těchto vzorcích se lišil o 18,7 %.

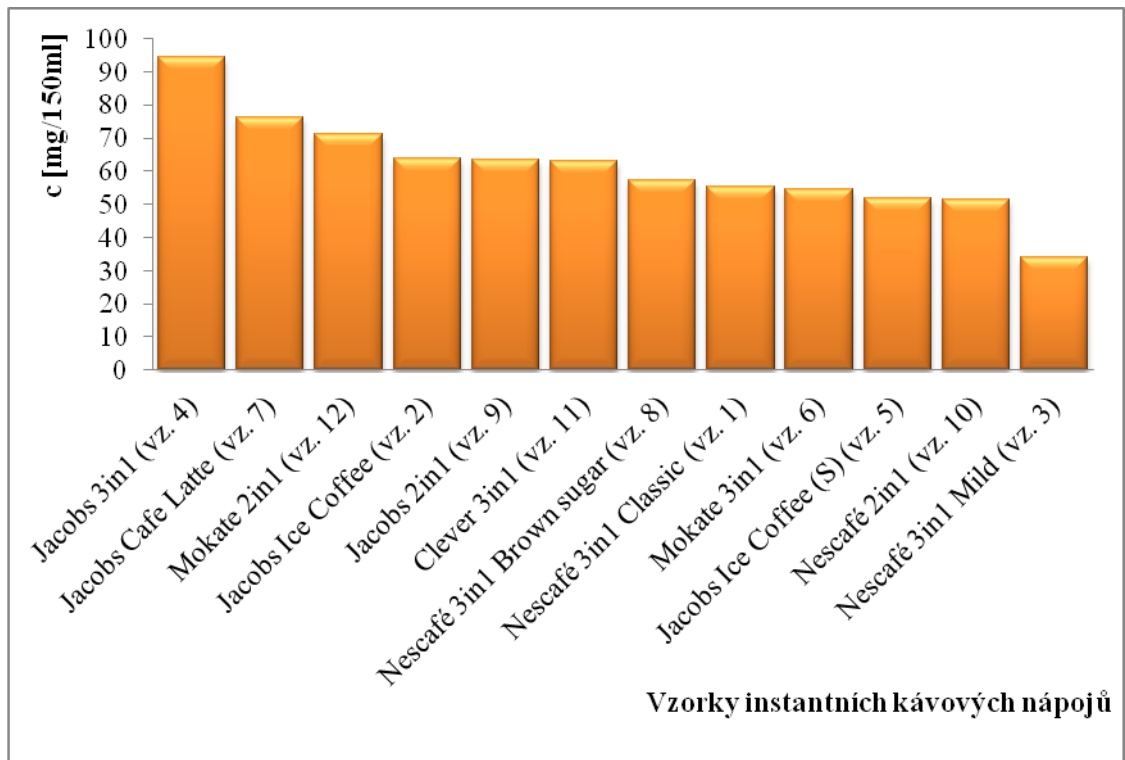
Obsah kofeinu v instantních kávových nápojích ovlivňuje mnoho podmínek (typ instantní kávy, způsob přípravy nápoje, doba louhování a další).

Tab. 7. Obsah kofeinu v instantních kávových nápojích

	popis vzorku	plocha píku [mAU.s]	obsah kofeinu [$\mu\text{g/ml}$]	s	obsah kofeinu [mg/g]
Nescafé 3in1 Classic	1	7356,74	6,15	0,08	3,08
Jacobs Ice Coffee	2	8433,82	7,07	0,03	3,54
Nescafé 3in1 Mild	3	5119,78	4,25	0,07	2,12
Jacobs 3in1	4	14692,3	12,4	0,07	6,2
Jacobs Ice Coffee (S)	5	6881,19	5,75	0,05	2,87
Mokate 3in1	6	7260,48	6,07	0,02	3,04
Jacobs Cafe Latte	7	12941,6	10,91	0,09	5,46
Nescafé 3in1 Brown sugar	8	8038,51	6,73	0,03	3,37
Jacobs 2in1	9	9457,75	7,94	0,04	3,97
Nescafé 2in1	10	12185	10,27	0,04	5,13
Clever 3in1	11	8355,65	7,00	0,06	3,5
Mokate 2in1	12	12055,5	10,16	0,02	5,08

Tab. 8. Obsah kofeinu v instantních kávových nápojích (150 ml nápoje)

	obsah kofeinu [mg/150 ml]	s
Jacobs 3in1 (vz. 4)	94,27	0,07
Jacobs Cafe Latte (vz. 7)	76,39	0,09
Mokate 2in1 (vz. 12)	71,1	0,02
Jacobs Ice Coffee (vz. 2)	63,64	0,03
Jacobs 2in1 (vz. 9)	63,55	0,04
Clever 3in1 (vz. 11)	63,04	0,06
Nescafé 3in1 Brown sugar (vz. 8)	57,24	0,03
Nescafé 3in1 Classic (vz. 1)	55,38	0,08
Mokate 3in1 (vz. 6)	54,64	0,02
Jacobs Ice Coffee, S (vz. 5)	51,73	0,05
Nescafé 2in1 (vz. 10)	51,34	0,04
Nescafé 3in1 Mild (vz. 3)	33,98	0,07



Obr. 17. Množství kofeinu v instantních kávových nápojích seřazeno sestupně

ZÁVĚR

Kofein se vyskytuje ve více jak 60 druzích rostlin. Nejběžnějšími rostlinami je kávovník, čajovník, kolovník a kakaovník. Jde o alkaloid využívaný jako stimulant. Má pozitivní i negativní účinky na lidský organismus. Hlavním pozitivem kofeinu je, že dokáže stimulovat centrální nervovou soustavu. V lidském těle se kofein metabolizuje v játrech.

V experimentální části bakalářské práce byl stanoven obsah kofeinu v kávě a instantních kávových nápojích. Káva je po čaji nejrozšířenějším nápojem po celém světě, připravuje se z plodů kávovníku. Obsah kofeinu v kávě je závislý na mnoha faktorech (druh kávy, zemi původu, způsobu pěstování, klimatických podmínkách, zpracování, přípravě nápoje, době louhování).

Stanovení kofeinu bylo prováděno metodou HPLC/UV. Je to chromatografická separační metoda. Podmínky stanovení byly: mobilní fáze - metanol a acetátový pufr, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Stanovení probíhalo na koloně Watrex Nucleosil (250 mm x 4,6 mm; 5 μm). Kofein byl detekován 10 – 12 minutě analýzy pomocí UV detektoru (detektor DAD-3000 (RS)) při vlnové délce 273 nm.

Touto metodou byl stanoven obsah kofeinu ve 20 vzorcích káv a instantních kávových nápojů. Množství kofeinu bylo stanoveno v 1 g vzorku a také v množství vzorku, které je potřebné k přípravě jednoho šálku.

Nejvyšší obsah kofeinu ve vzorku mleté a instantní kávy byl ve vzorku instantní kávy Nescafé Clasic. Obsah kofeinu v tomto vzorku byl 35,27 mg/g. Nejméně kofeinu, kromě instantní kávy bez kofeinu, bylo stanoveno ve vzorku mleté kávy typu Arabika, obsahovala 9,85 mg kofeinu v 1 g vzorku. V instantní kávě bez kofeinu bylo obsaženo 1,83 mg/g kofeinu. Po přepočtu na obsah kofeinu v šálku bylo množství kofeinu vyšší u káv mletých, protože pro jejich přípravu se používá větší množství kávy.

V instantních kávových nápojích byl obsah kofeinu stanoven v rozmezí 4,25 – 12,40 mg/g. Nejvyšší obsah kofeinu v šálku instantního nápoje byl 94,27 mg, ve vzorku Jacobs 3in1. Nejmenší množství kofeinu bylo analyzováno ve vzorku instantního nápoje Nescafé 3in1 Mild, který obsahuje 33,98 mg kofeinu v šálku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [2] MASÁK, Jan, Jana PELECHOVÁ a Jiří PLACHÝ. *Speciální mikrobiální technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1992, 300 s. ISBN 80-708-0142-5.
- [3] STANĚK, Jaroslav. *Alkaloidy*. Praha: Nakl. Československé akademie věd, 1957.
- [4] SAXENA, P. B. *Chemistry of alkaloids*. New Delhi: Discovery Publishing. House, 2007. ISBN 978-818-3563-161. Dostupné také z: <http://books.google.cz/books>
- [5] *Alkaloidy*. [online]. [cit. 2014-03-08].
Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>
- [6] *Kapsaicín*. [online]. [cit. 2014-04-12].
Dostupné z: <http://chillichilli.sk/>
- [7] SOBOTKOVÁ, Denisa. *Paprika ve výživě člověka*. Brno: MU, 2013.
- [8] SPILLER, Gene A. *Caffeine*. Boca Raton, Florida.: CRC Press, 1998, 374 p. ISBN 08-493-2647-8. Dostupné také z: <http://books.google.cz/books>
- [9] DOSTÁL, J., H. PAULOVÁ, J. SLANINA a E. TÁBORSKÁ. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: MU, 2009. ISBN 978-80-210-5020-4.
- [10] AUGUSTÍN, Jozef. *Povídání o kávě*. Olomouc: Fontána, 2003. ISBN 80-733-6040-3.
- [11] PREEDY, Victor R. *Caffeine: chemistry, analysis, functions and effects*. Cambridge: RSC Publishing, 2012. ISBN 978-1-84973-367-0
- [12] LÜLLMANN, H., K. MOHR a M. WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlady 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1. Dostupné také z: <http://books.google.cz/books>
- [13] PÖSSL, Martin. *Káva jako životní styl*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2822-3. Dostupné také z: <http://books.google.cz/books>
- [14] *Kávovník* [online]. [cit. 2014-04-25].
Dostupné z: http://www.svetkavy.cz/info_kavovnik.php
- [25] *Kávovník*. [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: www.druhykavy.cz

- [16] VESELÁ, Petra. *Knih o kávě: průvodce světem kávy s recepty na její přípravu*. Vyd. 1. Praha: Smart Press, 2010. ISBN 978-80-87049-34-1.
- [17] Plod kávovníku. [online]. [cit. 2014-04-20].
Dostupné z: <http://www.dobrakava.eu/tajemstvi-kavovych-tresni.xhtml>
- [18] ŽÁČEK, Jan. *Zajímavě o kávě a čaji*. Praha: Vydavatelství vnitřního obchodu, 1960.
- [19] *Instantní káva* [online]. [cit. 2014-04-12].
Dostupné z: <http://www.delikommat.cz/zajimavosti/ze-sveta-kavy/instantni-kava>
- [20] *Instantní kávový nápoj* [online]. [cit. 2014-04-30].
Dostupné z: <http://www.nestleprofessional.com/czech/cz/>
- [21] KREJČÍ, Ivan. *O kávě a čaji, aneb, Víme proč je pijeme?*. Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 978-807-1695-356.
- [22] MIHÁL, Martin. *Kakaovník* [online]. [cit. 2014-04-30].
Dostupné z: <http://www.chocolatewrappers.info/Cz/kakao.htm>
- [23] KYBAL, Jan; J., KAPLICKÁ. *Naše a cizí koření*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988.
- [24] PANTŮČEK, Jiří. Guarana - Paulinie nápojná. In: [online]. [cit. 2014-04-30].
Dostupné z: <https://www.topvet.cz/herbar/guarana-paulinie-napojna>
- [25] *Moderní analytické metody*. [online]. [cit. 2014-04-30].
Dostupné z: www.vscht.cz
- [26] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [27] DOUŠA, Michal. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. 1. vyd. Brno: ÚKZÚZ, 2002. ISBN 80-865-4809-0.
- [28] KACHEL, Martin. *Stanovení obsahu kofeinu v nápojích*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně
- [29] FALTÝNKOVÁ, Martina. *Obsah kofeinu a možnosti jeho stanovení*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [30] *Spektrofotometrie*. [online]. [cit. 2014-04-05].
Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie.

UV Ultrafialové.

CNS Centrální nervová soustava.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Chemický vzorec pyridinu	13
Obr. 2. Chemický vzorec nikotinu	14
Obr. 3. Chemický vzorec piperidinu	14
Obr. 4. Chemický vzorec piperinu	15
Obr. 5. Chemické vzorec pyrrolizidinu	16
Obr. 6. Chemický vzorec chinolizidinu	16
Obr. 7. Chemický vzorec chinolinu	17
Obr. 8. Strukturní vzorec vanillylaminu	18
Obr. 9. Strukturní vzorec cholestanu	19
Obr. 10. Chemický vzorec purinu	19
Obr. 11. Strukturní vzorec xanthinu	20
Obr. 12. Strukturní vzorec kofeinu	21
Obr. 13. Kávovník	23
Obr. 14. Struktura plodu kávovníku	23
Obr. 15. Kalibrační přímka kofeinu	38
Obr. 16. Sestupné pořadí obsahu kofeinu ve 100 ml nápoje z kávy	41
Obr. 17. Množství kofeinu v instantních kávových nápojích seřazeno sestupně	43

SEZNAM TABULEK

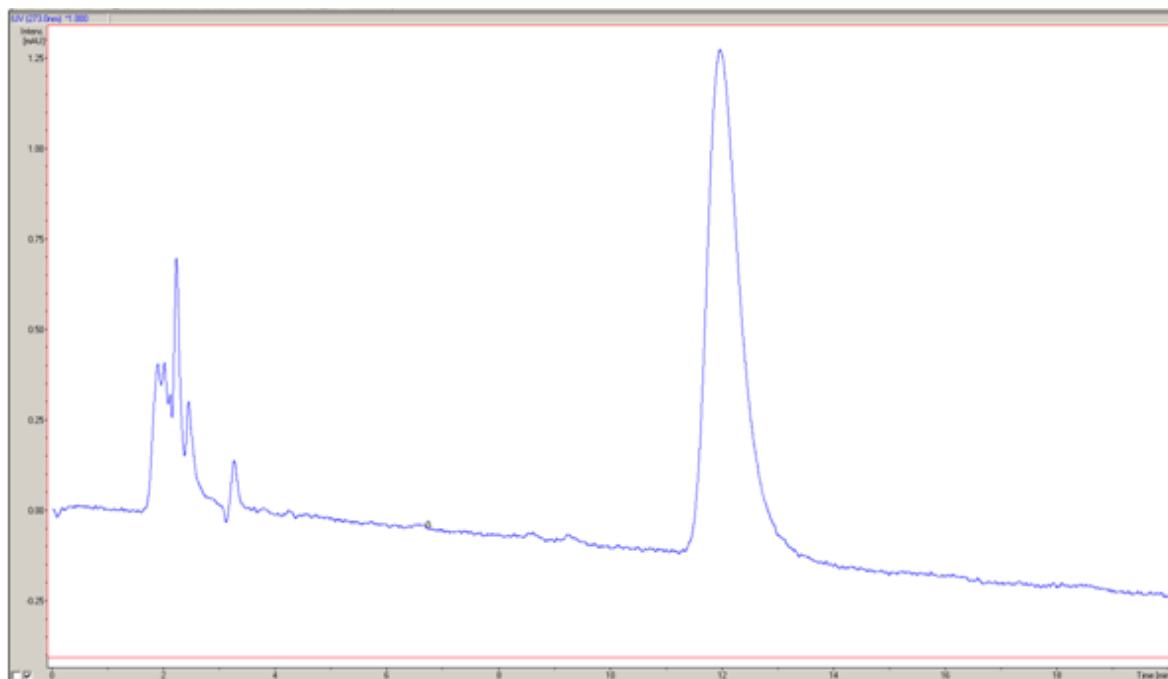
Tab. 1. Fyzikálně – chemické vlastnosti kofeinu	21
Tab. 2. Vzorky instantních kávových nápojů	32
Tab. 3. Vzorky mleté kávy a instantní kávy	33
Tab. 4. Stanovené plochy píků standardů kofeinu	37
Tab. 5. Stanovené hodnoty kofeinu u mletých a instantních káv	40
Tab. 6. Obsah kofeinu v mleté a instantní kávě (100 ml nápoje)	40
Tab. 7. Obsah kofeinu v instantních kávových nápojích.....	42
Tab. 8. Obsah kofeinu v instantních kávových nápojích (150 ml nápoje)	42

SEZNAM PŘÍLOH

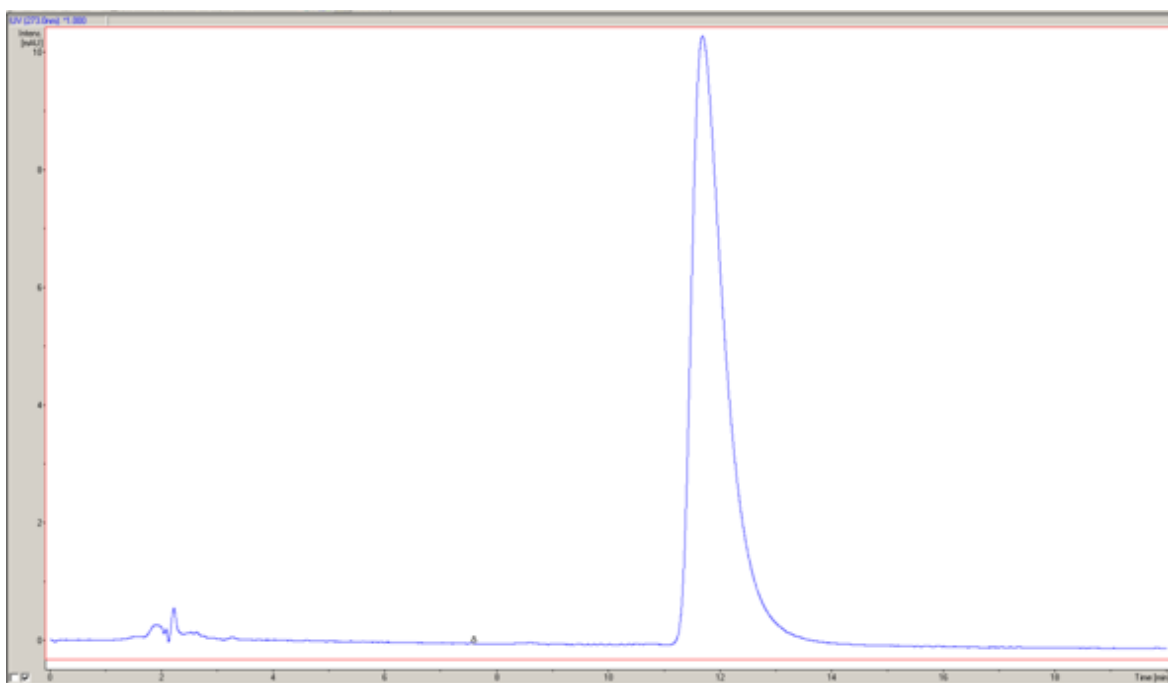
- PI Chromatogram standardu kofeinu ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- PII Chromatogram mleté kávy, instantní kávy a instantního kávového nápoje

PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAM STANOVENÍ STANDARDU KOFEINU

1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$

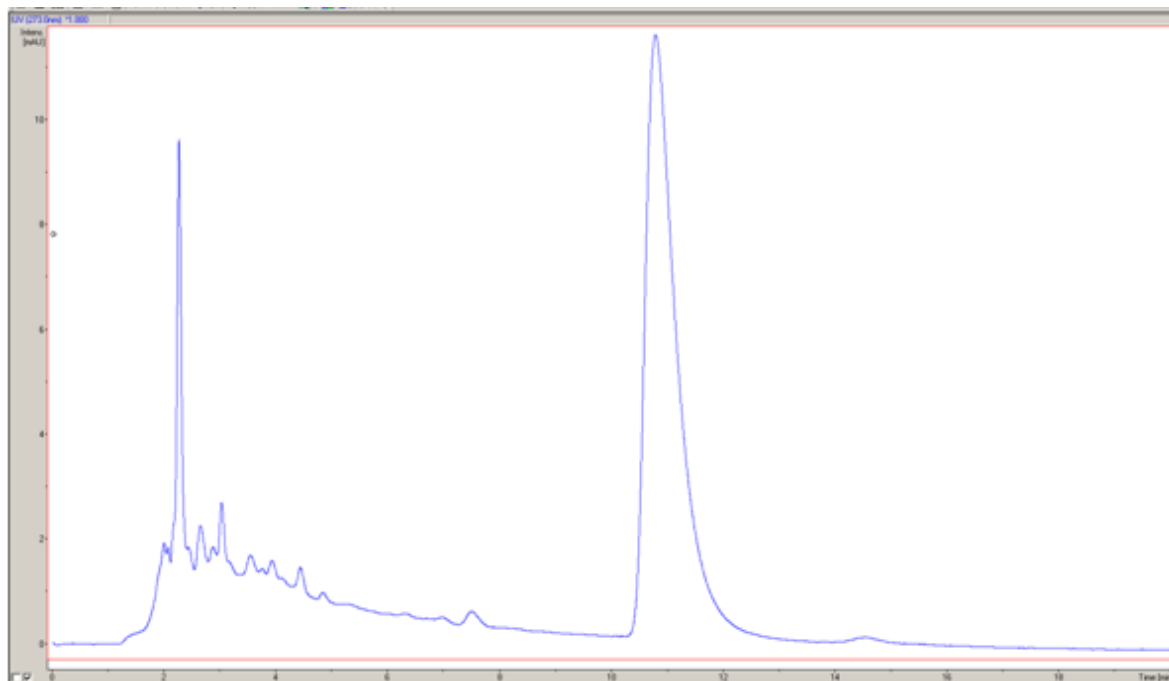


7,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$

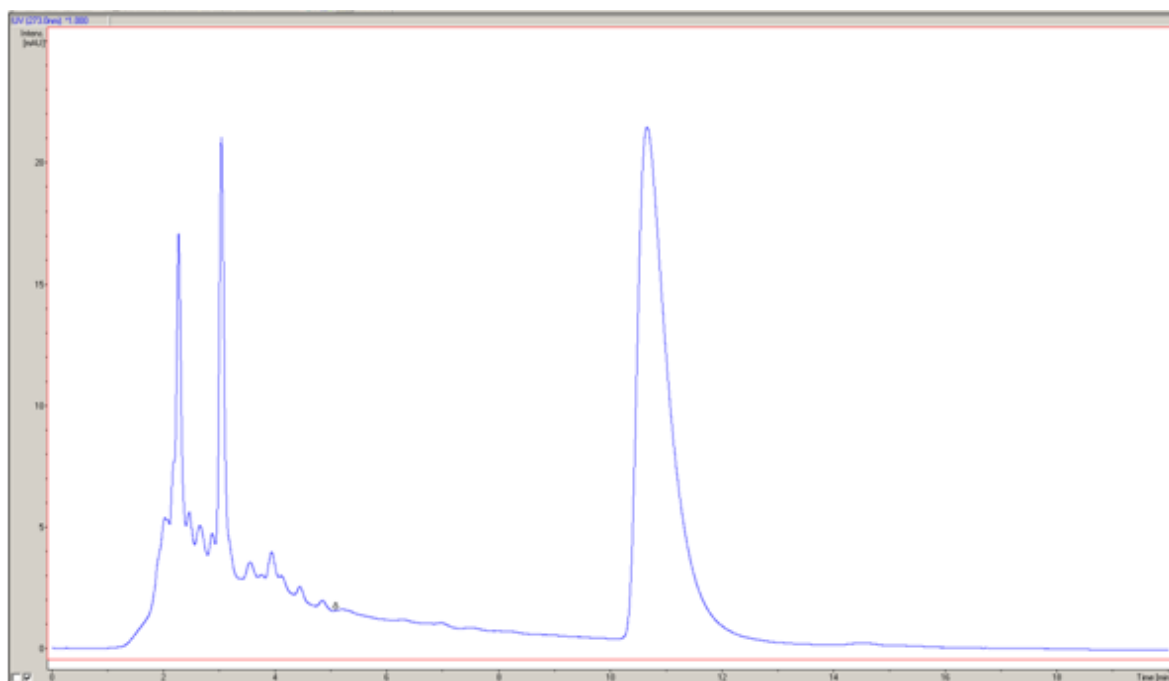


PŘÍLOHA P II: CHROMATOGRAM STANOVENÍ OBSAHU KOFEINU

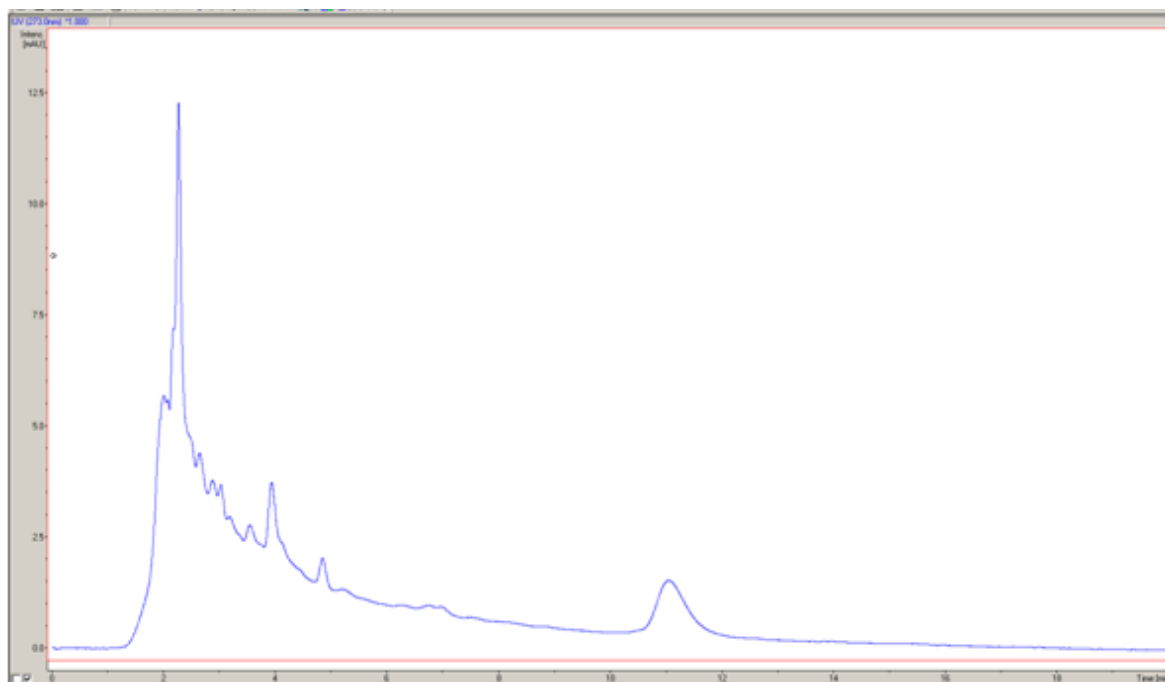
Mletá káva (Jihlavanka standard original)



Instantní káva (Nescafé Classic)



Instantní káva bez kofeinu (Nescafé bez kofeinu)



Instantní kávový nápoj (Jacobs 2in1)

