

# Karakterizacija klorogenskih kiselina iz kave primjenom protočne stripping kronopotencijometrije

---

Mandić, Ivo

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:845769>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Ivo Mandić**

**KARAKTERIZACIJA KLOOROGENSKIH KISELINA IZ KAVE PRIMJENOM  
PROTOČNE *STRIPPING* KRONOPOTENCIOMETRIJE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj 2019.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij procesno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Fizikalna kemija

**Tema rada** je prihvaćena na I. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 30.10.2018.

**Mentor:** dr. sc. *Ivana Tomac*, znanstveni suradnik

### Karakterizacija klorogenskih kiselina iz kave primjenom protočne *stripping* kronopotencimetrije

*Ivo Mandić*, 0113140936

**Sažetak:** Klorogenske kiseline ubrajaju se u hidrosicimetne kiseline, a nastale su reakcijom između kafeinske i kina kiseline. Prema svom sadržaju, klorogenske kiseline najzastupljenije su u kavi. Kava je jedan od omiljenih napitaka uz čaj i kakao. Zadatak ovog diplomskog rada bio je primjena protočne *stripping* kronopotencimetrije na elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina u mljevenim kavama (Barcaffé Classic, Franck Jubilarna Sensual, Arabesca Minas, Gloria Minas) i *instant* kavama (Jacobs Monarch, Nescafé Gold, Jacobs Cronat Gold i Franck Classic). Radna elektroda je bila usitnjeni staklasti ugljik, srebro/srebro klorid kao referentna elektroda i platina kao pomoćna elektroda. Elektrokemijska mjerenja odvijala su se u fosfatnom puferu različitih pH vrijednosti. Na osnovi istraživanja elektrokemijskih svojstava klorogenske kiseline u usporedbi s kafeinskom kiselinom, a primjenom FTSCP metode, može se zaključiti da na njihova elektrokemijska svojstva značajno utječe kemijska struktura, primijenjena višestruka uzastopna polarizacija i koncentracije analita. Rezultati sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u ispitivanim kavama dobiveni primjenom elektrokemijske metode uspoređeni su s rezultatima ukupnih polifenola dobivenih primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode. Prema sadržaju klorogenskih kiselina može se zaključiti da su ispitane vrste kave sličnog sadržaja klorogenskih kiselina.

**Gljučne riječi:** Klorogenske kiseline, kava, protočna *stripping* kronopotencimetrija, ukupni polifenoli

**Rad sadrži:** 44 stranice  
27 slika  
4 tablice  
24 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. doc. dr. sc. <i>Valentina Bušić</i>             | Predsjednik   |
| 2. dr. sc. <i>Ivana Tomac</i>                      | član-mentor   |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | Član          |
| 4. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i>             | zamjena člana |

**Datum obrane:** 21. siječanj 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Applied Chemistry and Ecology  
Subdepartment of Applied Chemistry and Instrumental Methods  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Process Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Physical Chemistry

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. I. held on October 30, 2018.

**Mentor:** *Ivana Tomac*, PhD

### ***Characterization of Chlorogenic Acids in Coffee Using Flow Through Stripping Chronopotentiometry***

*Ivo Mandić, 0113140936*

**Summary:** Chlorogenic acids are hydroxycinnamic acids and formed between caffeic acid and quinic acid. According to its content, chlorogenic acids are abundant in coffee. Coffee is one of the favourite drinks together with tea and cocoa. The aim of this work was to apply a flow through stripping chronopotentiometry on electrochemical properties of chlorogenic acids in ground coffee (Barcaffè Classic, Franck Jubilarna Sensual, Arabesca Minas, Gloria Minas) and in instant coffee (Jacobs Monarch, Nescafé Gold, Jacobs Cronat Gold and Franck Classic). The working electrode was crushed glassy carbon, silver/ silver chloride as reference electrode and platinum as auxiliary electrode. Electrochemical measurements were carried out in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer pH 7.0. Based on the research, the electrochemical properties of chlorogenic acid compared to caffeic acid, and applying the FTSCP method, it can be concluded that their electrochemical properties are significantly influenced by the chemical structure, the multiple polarization and the different concentration range of the analyte. The results of the total chlorogenic acids content in the investigated coffee extracts obtained using the electrochemical method were compared with the results of the total polyphenols obtained using the spectrophotometric Folin-Ciocalteu method. According to the chlorogenic acids content, it can be concluded that all types of investigated coffee samples are similar in total content of chlorogenic acids.

**Key words:** chlorogenic acids, coffee, flowthrough *stripping* chronopotentiometry, total polyphenols

**Thesis contains:** 44 pages  
27 figures  
4 tables  
24 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Valentina Bušić</i> , PhD, assistant prof.       | chair person |
| 2. <i>Ivana Tomac</i> , PhD.                           | Supervisor   |
| 3. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, associate prof. | Member       |
| 4. <i>Antun Jozinović</i> , PhD, assistant prof.       | stand-in     |

**Defense date:** January 21, 2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

***Rad posvećujem svom anđelu na nebu, prerano preminulom rođaku Darku.***

*Zahvaljujem se dragom Bogu na ostvarenju ovog cilja, smislu i utočištu u trenucima slabosti.*

*Zahvaljujem mentorici dr. sc. Ivani Tomac na stručnom i brižnom vodstvu uz brojne savjete tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Od srca hvala mojoj mnogobrojnoj obitelji, djevojci i prijateljima koji su na bilo koji velik i malen način bili moja snaga i podrška.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. HIDROKSICIMETNE KISELINE .....	4
2.1.1. KLOGROGENSKE KISELINE.....	5
2.2. KAVA.....	6
2.2.1. VRSTE KAVE .....	9
2.3. METODE ODREĐIVANJA KLOGROGENSKIH KISELINA U KAVI .....	11
2.3.1 ELEKTROKEMIJSKE METODE KARAKTERIZACIJE KLOGROGENSKIH KISELINA U KAVI .....	12
2.3.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	14
3.1. ZADATAK .....	15
3.2. MATERIJALI I METODE.....	15
3.2.1. KEMIKALIJE .....	15
3.2.2. UZORCI.....	15
3.2.3. PRIPREMA OTOPINA STANDARDA I VODENOG EKSTRAKTA UZORAKA KAVA .....	16
3.2.4. PRIMJENA PROTOČNE <i>STRIPPING</i> KRONOPOTENCIOMETRIJE NA ELEKTROKEMIJSKU KARAKTERIZACIJU KLOGROGENSKIH KISELINA I UZORAKA KAVA .....	17
3.2.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA SPEKTROFOTOMETRIJSKA FOLIN-CIOCALTEU METODOM .....	18
4. REZULTATI .....	19
4.1. ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA KLOGROGENSKIH KISELINA PRIMJENOM PROTOČNE <i>STRIPPING</i> KRONOPOTENCIOMETRIJE.....	20
4.2.    ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA VODENIH EKSTRAKATA KAVA PRIMJENOM PROTOČNE <i>STRIPPING</i> KRONOPOTENCIOMETRIJE.....	23
4.2.1. UTJECAJ VIŠESTRUKA UZASTOPNE POLARIZACIJE NA KARAKTERIZACIJU VODENIH UZORAKA KAVA .....	28
4.2.2. UTJECAJ PROMJENE PH VRIJEDNOSTI OSNOVNOG ELEKTROLITA NA KARAKTERIZACIJU VODENIH UZORAKA KAVA .....	30
4.2.3. KVANTIFIKACIJA SADRŽAJA UKUPNIH KLOGROGENSKIH KISELINA U VODENIM UZORCIMA KAVA .....	31
4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA U KAVAMA PRIMJENOM SPEKTROFOTOMETRIJSKE FOLIN-CIOCALTEU METODE.....	32
4.4. KORELACIJE SADRŽAJA KLOGROGENSKIH KISELINA U KAVAMA .....	34
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČAK .....	39
7. LITERATURA .....	42

## Popis oznaka, kratica i simbola

<b>CFA</b>	kafeinska kiselina ( <i>engl.</i> caffeic acid)
<b>CGAs</b>	klorogenske kiseline ( <i>engl.</i> chlorogenic acids)
<b>CGLs</b>	laktoni klorogenske kiseline ( <i>engl.</i> chlorogenic acid lactones)
<b>CQAs</b>	kafeoil-kina kiseline ( <i>engl.</i> caffeoyl quinic acids)
<b>DF</b>	faktor razrjeđenja ( <i>engl.</i> dilution factor)
<b>diCQAs</b>	dikafeoil-kina kiseline ( <i>engl.</i> dicaffeoyl quinic acids)
<b>Ep</b>	potencijal pika ( <i>engl.</i> peak potential)
<b>FA</b>	ferulična kiselina ( <i>engl.</i> ferulic acid)
<b>FQAs</b>	feruloil-kina kiseline ( <i>engl.</i> feruloyl quinic acids)
<b>FTSCP</b>	protočna stripping kronopotenciometrija ( <i>engl.</i> flow-through stripping chronopotentiometry)
<b>GAE</b>	ekvivalenti galne kiseline ( <i>engl.</i> gallic acid equivalent)
<b>HPLC</b>	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ( <i>engl.</i> high performance liquid chromatography)
<b>Ip</b>	struja pika ( <i>engl.</i> peak current)
<b>LOD</b>	granica detekcije ( <i>engl.</i> limit of detection)
<b>LOQ</b>	granica kvantifikacije ( <i>engl.</i> limit of quantification)
<b>PBS</b>	fosfatni pufer ( <i>engl.</i> phosphate buffer saline)
<b>PTFE</b>	membranski filter ( <i>engl.</i> polytetrafluoroethylene membrane filters)
<b>QA</b>	kina kiselina ( <i>engl.</i> quinic acid)

## **1. UVOD**



Kava je zimzelena biljka. Ubraja se u porodicu *Rubiaceae*, a najznačajnije vrste kava su *C. arabica* i *C. robusta*. Bobica kave je tamnocrvene boje, a unutar bobice su najčešće dva zelena zrna. Procesom prženja zelenih zrna dobiju se pržena zrna od kojih se priprema kava, napitak. Napitak kave je, nakon vode, najčešće konzumirani napitak. Popularnost kave proizlazi zbog njenog ugodnog mirisa, specifičnog okusa i stimulativnih učinaka na centralni živčani sustav. Kompleksnog je sastava kojeg čine ugljikohidrati, ulja, proteini, minerali, polifenoli i slično. Od polifenolnih spojeva najzastupljenije su klorogenske kiseline (Šimunac, 2004.).

Klorogenske kiseline (CGAs) ubrajaju se u hidroksicimetne kiseline, a predstavljaju grupu polifenolnih spojeva nastalih kao mono-, di-, tri- i/ili miješani esteri nekih hidroksicimetnih kiselina (kafeinske, ferulične i *p*-kumarinske kiseline) esterifikacijom s (-)-kina kiselinom. Najvažnije CGAs u kavi su kafeoil-kina kiseline (CQAs), a dominantna CQAs u kavi je 5-*O*-kafeoil-kina kiselina (5-CQA) (Belitz i sur., 2004.).

Do danas je razvijeno nekoliko metoda za analizu sadržaja klorogenskih kiselina iz kave. Najčešće primjenjivana tehnika za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz primjenu različitih detektora (Farah i sur., 2015.). Danas veliki značaj u karakterizaciji organskih spojeva zauzimaju elektrokemijske metode. Od elektrokemijskih metoda primjenjuju se diferencijalna pulsna voltimetrija i pravokutnovalna voltimetrija uz primjenu različitih radnih elektroda. Protočna *stripping* kronopotencimetrija prvotno se primjenjivala za karakterizaciju anorganskih spojeva u realnim uzorcima, a od nedavno i na karakterizaciju organskih spojeva odnosno klorogenskih kiselina u uzorcima kave.

Zadatak ovog diplomskog rada bio je primjena elektrokemijske tehnike protočne *stripping* kronopotencimetrije na identifikaciju klorogenskih kiselina, 5-*O*-kafeoilkina kiseline, u uzorcima *instant* i mljevenih kava, zatim se ispitaio utjecaj fosfatnog pufera različitih pH vrijednosti na elektrokemijska svojstva *instant* i mljevenih kava i utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na uzorke *instant* i mljevenih kava. Također, izvršena je kvantifikacija sadržaja klorogenskih kiselina, odnosno 5-*O*-kafeoilkina kiseline u *instant* i mljevenim uzorcima kava te se odredila koncentracija ukupnih polifenola iz *instant* i mljevenih kava primjenom spektroskopske Folin-Ciocalteu metode. Nadalje, usporedio se sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina primjenom elektrokemijske i spektroskopske tehnike.

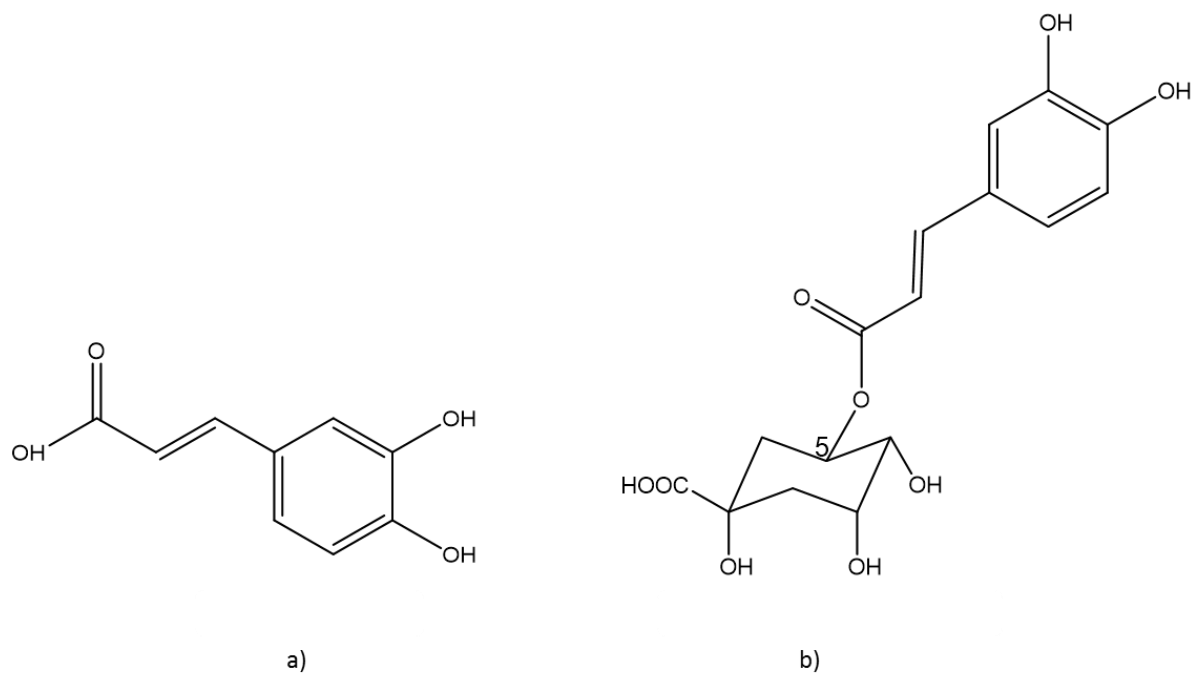
## **2. TEORIJSKI DIO**

---

## 2.1. HIDROKSICIMETNE KISELINE

Fenolne kiseline čine hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Fenolne kiseline mogu nastati preko dva metabolička puta, sintezom iz šikiminske kiseline odgovorne za nastanak fenilpropanoida i sintezom iz octene kiseline pri čemu nastaju jednostavni fenoli. Hidroksicimetne kiseline i njezini derivati su široko rasprostranjeni kako u biljkama tako i u hrani biljnog podrijetla. Zbog njihove prisutnosti u hrani biljnog podrijetla, unos fenolnih kiselina je prisutan kroz svakodnevnu prehranu. Hidroksicimetne kiseline u biljkama sudjeluju u procesu fotosinteze i u reakcijama s proteinima. Biološki utjecaj hidroksicimetnih kiselina kod ljudi je njihov značajan antiradikalni utjecaj te sprječavanje različitih upalnih procesa organizma. Primijećen je značajan pozitivan utjecaj hidroksicimetnih kiselina u sprječavanju kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, Parkinsonove bolesti, Alzheimerovog oboljenja te raka. Također, potvrđeno je i njihovo antimikrobno djelovanje na ljudski organizam, što daje ovoj skupini kiselina i farmakološki utjecaj.

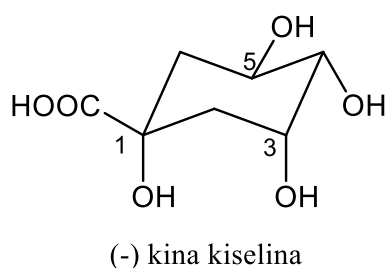
Prema kemijskoj strukturi, hidroksicimetne kiseline sastoje se od fenilpropanske jedinice C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> i karboksilne skupine na bočnom lancu. Razlika između hidroksicimetnih kiselina je u broju i položaju hidroksi skupina na aromatskom prstenu. Kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina i ferulična kiselina su značajne hidroksicimetne kiseline koje su prisutne skoro u svakoj biljci. U biljkama hidroksicimetne kiseline mogu biti u konjugiranom obliku ili u obliku estera. Među najzastupljenijim hidroksicimetnim kiselinama u biljkama je kafeinska kiselina i njezini derivati, kao što su klorogenske kiseline (**Slika 1**). Hidroksicimetne kiseline mogu se naći kao esteri, eteri vezani za celulozu, proteine, lignine, flavanoide, glukozu, kina kiselinu, terpene (Vinholes i sur., 2015.).



**Slika 1** Kemijska struktura (a) kafeinske kiseline i (b) 5-*O*-kafeoil-kina kiseline

### 2.1.1. KLOROGENSKE KISELINE

Kafeinska kiselina povezana s kina kiselinom tvori klorogenske kiseline, kao jedne od najzastupljenijih hidrokscimetnih kiselina u voću, povrću i kavi. Klorogenske kiseline (CGAs) su grupa polifenolnih spojeva nastali esterifikacijom CFA, FA ili *p*-kumarinske kiseline s kina kiselinom. S obzirom na vrstu i broj esterskih skupina CGAs se mogu razvrstati u više podskupina: monoesteri (npr. kafeoil-kina kiseline, CQAs), diesteri (npr. dikafeoil-kina kiseline, diCQAs) i miješani diesteri (npr. kafeoil-feruloil-kina kiseline). Na **Slici 2** prikazana je kina kiselina kao strukturalna jedinica klorogenskih kiselina.



**Slika 2** Strukturna jedinica klorogenskih kiselina, kina kiselina

---

Klorogenske kiseline sadrže jednu ili dvije kateholne skupine s dvije hidroksilne (-OH) skupine u *ortho*-položaju. Na kemijsku strukturu CQAs utječe esterska skupina -COOR, koja ima jaki elektron akceptorski efekt koji prevladava nad elektron donorskim efektom dvostruke veze.

Kemijska struktura CGAs ima veliki utjecaj na elektrokemijska svojstva CGAs. diCQAs imaju veći oksidacijski potencijal i viši oksidacijski strujni odziv od CQAs (Namazian i Zare, 2005.; Gil i sur., 2013.).

## 2.2. KAVA

Stablo ili zimzeleni grm kave pripada biljkama iz porodice *Rubiaceae*. Pod generičkim nazivom *Coffea* samo dvije od sedamdeset vrsta kava imaju ekonomski značaj pri uzgoju, a to su *C. arabica* (75 % od ukupne proizvodnje kave) i *C. Robusta* (25 % od ukupne proizvodnje). Grm ili stablo kave može narasti 3-12 metara visine, ali se sječe na 2-2,5 metara visine kako bi se olakšala berba. Tropski grm ili stablo kave sadrži čvrste, duguljaste tamnozeleno listove koji u vrijeme cvatnje imaju kremasto-bijele cvjetove koji mirisom podsjećaju na miris cvijeta jasmina, iz kojih se kasnije razvijaju bobičasti plodovi promjera veličine 1,5 cm. Dozrijevanjem bobica kave mijenja boju iz zelene u tamnocrvenu ili tamnoljubičastu, a sadrži dvije eliptične hemisfere spljoštenih zrna. Biljka kave raste u toplim tropskim krajevima na nadmorskim visinama od 600 do 1200 m i temperaturama od 15 do 25 °C te umjerenj vlažnosti zraka. Cvjetanje grma kave kreće 3-4 godine nakon sadnje, a puna plodnost postiže nakon 6 godina. Grm može donositi plodove do četrdesete godine starosti, ali maksimalan prinos postiže se od desete do petnaeste godine starosti. Iz jednog grma kave može se dobiti 2,7 kg ploda bobica, a od toga 0,9 - 1,1 kg se odnosi na sirovo zeleno zrno (Belitz i sur., 2004.).

### Berba i prerada sirovog zrna kave

Berba sirovih zrna kave najzahtjevniji je postupak u ciklusu proizvodnje kave. Ovisno o regiji u kojoj se proizvodi (sjeverna i južna hemisfera) u različito vrijeme dozrijeva. Sama berba se vrši ručno tako da se svaka dozrela bobica ubire ili kupi sa tla, a drugi način je mehanički pomoću posebnih strojeva za berbu. Preferira se ručna berba bobica kave jer se ubiru samo zrele bobice, dok su kod mehaničkog branja prisutne različite primjese (listovi, kamenčići, trule bobice, grančice) što u konačnici utječe na kvalitetu proizvoda (napitka kave). Obrada

sirovog zrna kave započinje uklanjanjem mesnate pulpe koristeći suhi, mokri ili kombinirani postupak.

### **Suhi ili prirodni postupak odvajanja bobice kave**

Proces uključuje brzi transport ubranih bobica kave do mjesta prerade, gdje ih se ravnomjerno raspodjeli na podlogu gdje se suše prirodnim putem na suncu. Proces sušenja traje do trenutka dok se pokožica ne odvoji od zrna. Nakon sušenja, plodu se uklanjaju pulpa i pokožica. Ovim postupkom dobiju se suha zelena zrna, pogodna za pakiranje, skladištenje i transport (Farah, 2012.; Clifford i Willson, 1985.; Duarte i sur., 2010.).

### **Mokri postupak uklanjanja bobice kave**

Postupak se temelji na uranjanju sirovih bobica kave u vodu. Bobice kave se potiskuju između rotirajućeg diska i podesivih oštrica te na taj način dolazi do drobljenja i ispiranja vodom, odnosno odvajanja pokožice i pulpe od zrna bez njegova oštećenja. Zrna kave su u spremniku s vodenom parom ostavljena da fermentiraju (12-48 h). Fermentacijom se uklanja zaostala pulpa i mukozni sloj uz pomoć pektolitičkih enzima, a pH se smanjuje sa 6,8 na 4,2. Nakon toga, zrna se suše prirodnim putem na Suncu ili u mehaničkim sušionicama u struji toplog zraka, a konačna vlažnost zrna je do 11 %. Zrna kave zadržavaju pergament ovojnicu te se poliraju do glatke i sjajne površine (Belitz i sur., 2004.). Konačno, dobije se zrno veće kvalitete u usporedbi sa suhim postupkom.

### **Kombinirani postupak uklanjanja bobice**

Za razliku od suhog i mokrog postupka, kod kombiniranog postupka drobljenje i čišćenje dijelova bobice odvija se bez pranja, dok se sušenje vrši sa ostacima usplođa te se konačno dobije aromatičnije zrno slađeg okusa.

Nakon postupka obrade bobica kave, dobivena zelena zrna se sortiraju ručno ili mehanički, a oštećena zrna i nečistoće se uklanjaju. Tako dobivena zrna kave idu na skladištenje i transport do željene lokacije (Belitz i sur., 2004.; Farah, 2012.; Clifford i Willson, 1985.; Duarte i sur., 2010.).

### **Postupak prženja sirovog zrna kave**

Sirova zrna kave imaju miris po zemlji, a prženjem dobivaju finu aromu. Prženje kave podrazumijeva različite fizikalno-kemijske promjene zelenog zrna (povećanje volumena zrna,

smanjenje udjela vlage, stvaranje tipičnog mirisa i arome, zelena boja prelazi u smeđu te promjena kemijskog sastava). Proces prženja je osjetljiv i zahtjeva visoke temperature (100-200 °C) pa tako zrna pržena na višoj temperaturi sadrže manje kafeina od onih zrna prženih pri nižoj temperaturi. Vrsta zrna uvjetuje okus i kvalitetu kave, a jakost kave ovisi o stupnju prženja zrna. Sušenje, razvoj, dekompozicija i puno prženje su četiri osnovne faze prženja zrna kave. Razlikuju se dvije metode prženja kave: tradicionalna i industrijska.

Prženje kave tradicionalnom metodom odvija se kroz pet koraka: prva vatra, prvo pucketanje, prvi grad, drugo pucketanje i duboko prženje. Proces se provodi 10-15 minuta na temperaturi 200-220 °C u pržioniku.

Industrijsko prženje kave provodi se na rotirajućim grijanim plinskim pržionicima ili u nepokretnim pržionicima tijekom 15 do 20 min pri temperaturi do 220 °C. Primjenjuje se konvekcijski prijenos topline jer je brži u odnosu na kondukcijski. Nakon procesa prženja, zrna se poprskaju vodom čime se zaustavlja daljnje prženje, cijeli proces se odvija pod računalnim nadzorom (Šimunac, 2004.). Danas se sve više primjenjuju novije metode zbog ekonomičnosti, a jedna od takvih je "*flash*" metoda, koja se provodi 90 sekundi pri 800 °C. Na **Slici 3** prikazani su stupnjevi prženja zelenog zrna kave.



**Slika 3** Stupnjevi prženja zelenog zrna kave (web 1)

Tijekom procesa prženja zelenog zrna kave dolazi do značajne promjene organoleptičkih svojstava kave te nadalje utječe na niz kemijskih reakcija. CGAs zbog svoje temperaturne nestabilnosti mogu gotovo u potpunosti biti degradirane u fenolne derivate tijekom procesa prženja zelenih zrna kave. Kemijske reakcije koje se događaju na klorogenskim kiselinama (CGAs) prilikom prženja zelenog zrna kave su izomerizacija, epimerizacija, laktonizacija i hidroliza. Osim toga, na visokim temperaturama prženja nastaju molekule male molekularne mase (fenoli i kateholi) koje zajedno s ostalim spojevima produciraju melanoidine, spojeve koji su zaslužni za razvoj boje i arome. Prilikom procesa prženja najznačajniji je nastanak laktone klorogenske kiseline (1,5- $\gamma$ -laktoni) jer upravo oni, uz sadržaj kafeina, utječu na

gorčinu i kvalitetu napitka kave. Ovisno o vrsti obrade, stupnju pečenja i analitičkim uvjetima, ukupni udio CGAs u komercijalnom prženom zrnu kave iznosi od 0,5-7 % (Farah, 2012.).

### **2.2.1. VRSTE KAVE**

Danas su na tržištu prisutne čiste, izvorne, originalne kave i mješavine od različitih vrsta zrna iz različitih dijelova svijeta. Brojne specijalne kave su mješavine zrna iz određenih područja svijeta, npr. Nikaragve i Kostarike. Najčešće se upotrebljavaju mješavine zbog dva osnovna razloga. Prvi razlog je taj da se dobije kvalitetnija kava, potpunijeg okusa, arome, kiselosti te jakosti. Drugi razlog je kombinacija loših i manje kvalitetnih zrna sa kvalitetnijim zrnima, radi postizanja više cijene na tržištu (Šimunac, 2004.).

#### **Mljevena kava**

Mljevena kava dobiva se procesom mljevenja prženog zrna kave na nekoliko različitih vrsta mlinova. Nekada se sami proces mljevenja vršio ručno, dok se danas koriste moderni i tehnološki usavršeni mlinovi s diskovima. Kavu je najbolje samljeti neposredno prije kuhanja jer tada daje najbolji okus.

S obzirom na granulaciju zrna samljevena kava kategorizira se kao sitno, srednje i krupno mljevena kava. Bitno je naglasiti da što su sitnije čestice mljevene kave to je brže oslobađanje aromatičnih sastojaka. Tijekom pripreve napitka, sitnije mljevenu kavu treba kraće izlagati vodi nego onu krupnije granulacije. Za pripremu kave u *expresso* aparatima koristi se fino mljevena kava, dok se za kuhanje kave u džezvi ili loncima najbolje koristiti grubo mljevenu kavu (Šimunac, 2004.).

Mljevena kava prilikom doticaja sa zrakom počinje gubiti organoleptička svojstva (aromu, okus te esencijalna ulja), stoga je vrlo važno skladištiti je na prikladan način, a najbolje je skladištiti u limenkama, plastičnim ili platnenim vrećama 1-3 godine. Optimalna kvaliteta arome je prisutna 8-10 tjedana. Mljevena kava se pakira pod vakuumom kako bi ostala duže vrijeme svježā (6-8 mjeseci), dok nakon otvaranja zadržava svježinu 1-2 tjedna.





Slika 4 Mljevena kava različitih proizvođača

### **Instant kava**

*Instant* ili topljiva kava dobiva se ekstrakcijom iz pržene kave. Mljevena kava se kontinuirano ekstrahira u ekstraktorima pod tlakom, gdje je temperatura vode do 200 °C, a temperatura ekstrakta na izlazu 40-80 °C. Nakon toga voda se otpari u vakuum uparivačima. S obzirom da se tijekom procesa gubi određeni udio arome, koncentrat arome se može izolirati te dodati naknadno prije ili poslije sušenja.

Sušenje raspršivanjem i liofilizacija su procesi koji se koriste za sušenje. Postupak liofilizacije temelji se na zamrzavanju tekućeg ekstrakta u struji hladnog zraka ili inertnog plina na temperaturu do -40 °C te granuliranju do veličine čestica od 2-3 mm te na kraju sušenju u vakuumu. Konačno, dobiva se higroskopan proizvod (prah) koji se pakira u limenke, staklenke te vrećice od aluminijske folije. Instant kava sadrži 1,0-6,0 % vlage. Tijekom procesa dobivanja instant kave količina kafeina znatno raste te može biti duplo veća nego u običnoj mljevenoj kavi. Osim povećanja kafeina povećava se i količina minerala do 10 %. Danas je na tržištu dostupan i *instant* cappuccino koji se dobiva na način da se na tretirana zrna kave arabice dodaje određena količina mlijeka u prahu. *Instant* napitci imaju prednost zbog jednostavnosti i brzine pripreve.



Slika 5 Instant kava

### Bezkafeinska kava

Ova vrsta kave je namijenjena za sve one koji iz određenih razloga žele izbjeći kafein, a s druge strane žele uživati u bogatom okusu i mirisu određene kave.

Danas se primjenjuje moderan postupak proizvodnje koji uključuje ekstrakciju sa superkritičnim CO<sub>2</sub> pri temperaturi od 70 do 90 °C i tlaku od 100 do 200 bara na zrna kave obrađena vodenom parom. Konačni proizvod je siguran, bez ostatka otapala (Belitz i sur., 2004.).

### Kavovine

Kavovine predstavljaju zamjenu za kavu, a najčešće se koriste prženi ječam i pržena cikorija. Cikorija sadrži inulin iz kojeg se prženjem oslobađaju šećeri i brojne gorkaste arome koje daju sličan okus pravoj kavi. Prženi ječam daje gorčinu i okus nagorenosti. Zamjene za kavu nikad ne mogu u potpunosti doseći okus i aromu prave kave (Šimunac, 2004.).

## 2.3. METODE ODREĐIVANJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVI

Karakterizacija klorogenskih kiselina u kavi provodi se primjenom različitih instrumentalnih metoda analiza koje uključuju: kromatografske, elektrokemijske i spektroskopske metode.

## 2.3.1 ELEKTROKEMIJSKE METODE KARAKTERIZACIJE KLOGENSKIH KISELINA U KAVI

### Protočna *stripping* kronopotenciometrijska analiza

Protočna *stripping* kronopotenciometrija (engl. *Flow-Through Stripping Chronopotentiometry*, FTSCP) je elektrolitička metoda koja se odvija u dva stupnja. U prvom stupnju mjereni analit se elektrokemijski akumulira iz otopine na radnu elektrodu na pripadajućem depozicijskom potencijalu/struji. Elektroliza se prekida nakon određenog vremena te nakon kratkog mirovanja elektrolita provodi se drugi stupanj mjerenja koji uključuje otapanje depozita s površine radne elektrode primjenom konstantne struje otapala (*stripping*-otapanje depozita s površine elektrode). Otapanjem depozita mjeri se promjena potencijala radne elektrode u ovisnosti o vremenu otapanja. Dobiveni dijagram (potencijal-vrijeme,  $E-t$ ) ima karakteristike  $S$ -oblika, sličan krivulji redoks titracije. Zbog boljeg prikaza i mogućnosti analize, originalni  $E-t$  dijagram se transformira u oblik  $E-dt/dE$  ili  $dt/dE-E$  dijagrama jer oni pokazuju pik na vrijednosti potencijala pri kojoj dolazi do otapanja deponirane tvari s površine radne elektrode. Površina ispod pika (visina pika) proporcionalni su koncentraciji određene elektroaktivne tvari, a to predstavlja osnovu za kvantitativno određivanje nekog analita. FTSCP se koristi za određivanje različitih elektroaktivnih tvari, osobito za određivanje metala (metalnih iona), a tek unazad par godina primijenjena je na određivanje organskih tvari (Beinrohr, 2011.; Šeruga, 2011.).



Slika 6 Uređaj Eca Flow za provođenje FTSCP

### 2.3.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji se s obzirom na kemijsku strukturu dijele na flavonoide, fenolne kiseline, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004). Njihova količina u uzorcima ili model otopinama može se odrediti spektroskopskim metodama. Spektroskopske metode se često koriste za određivanje polifenolnih spojeva jer su brze, jednostavne, precizne, ponovljive i ekonomične. Nedostatak ovih metoda je što se sa njima određuje količina cijele skupine polifenola u uzorcima, a ne količina pojedinih polifenola. Kvantitativni podaci dobivaju se upotrebom kalibracijske krivulje standarda polifenola te se količina polifenola (skupine polifenola) izražava kao ekvivalentna količina tog standarda. U spektroskopske metode se ubrajaju Folin-Ciocalteu metoda za ukupne polifenole, metoda s kompleksacijom flavonoid – aluminijev klorid za ukupne flavonoide te pH-diferencijalna metoda za ukupne antocijanine (Hesse i sur., 2008.).



**Slika 7** Uređaj spektrofotometar

#### **Folin-Ciocalteu metoda**

Folin-Ciocalteu metoda je najčešća metoda za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u različitim uzorcima, primjerice u kavama. Reakcijom polifenola i Folin-Ciocalteuovogreagensa, kojeg čini smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, u blago alkalnim uvjetima dolazi do stvaranja relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa koji se mjeri spektrofotometrijski pri 765 nm. Ukupna količina polifenola izražava se u ekvivalentima galne kiseline, a rezultat se izražava kao mg GAE/L (Waterhouse, 2001.).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- Primjena elektrokemijske tehnike protočne *stripping* kronopotencijometrije na:
  - identifikaciju klorogenskih kiselina, 5-*O*-kafeoil-kina kiseline, u uzorcima *instant* i mljevenih kava,
  - utjecaj fosfatnog pufera različitih pH vrijednosti na elektrokemijska svojstva *instant* i mljevenih kava,
  - utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na uzorke *instant* i mljevenih kava,
  - kvantifikaciju sadržaja klorogenskih kiselina, odnosno 5-*O*-kafeoilkina kiseline u *instant* i mljevenim uzorcima kava te
- odrediti koncentraciju ukupnih polifenola iz *instant* i mljevenih kava primjenom spektroskopske Folin-Ciocalteu metode i
- usporediti sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina primjenom ovih dviju metoda.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. KEMIKALIJE

U ovom ispitivanju upotrijebile su se sljedeće kemikalije:

- 5-CQA (klorogenska kiselina) ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ),
- galna kiselina ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ),
- otopina fosfatnog pufera ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  u rasponu od pH 7 do 9),
- Folin – Ciocalteu reagens,
- natrijev – karbonat,
- ultračista voda i
- metanol (HPLC čistoće).

#### 3.2.2. UZORCI

U ovom radu ispitano je osam uzoraka kava dostupnih na hrvatskom tržištu (**Tablica 1**).

**Tablica 1** Uzorci *instant* i mljevenih kava ispitanih u ovom istraživanju

<b>Mljevena kava</b>	<b>Instant kava</b>
Barcaffe Classic	Jacobs Monarch
Franck Jubilarna Sensual	Nescafé Gold
Arabesca Minas	Jacobs Cronat Gold
Gloria Minas	Franck Classic

### 3.2.3. PRIPREMA OTOPINA STANDARDA I VODENOG EKSTRAKTA UZORAKA KAVA

#### **Priprema osnovnog elektrolita za mjerenje primjenom protočne *stripping* kronopotencimetrije**

Otopina osnovnog elektrolita za elektrokemijsko mjerenje, fosfatnog pufera (PBS), pripremljena je u koncentraciji  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH=7). Otopine PBS pripremljenaje od  $\text{NaH}_2\text{SO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ . Za pripremu otopine PBS te vodenih ekstrakata kava korištena je ultračista voda (vodljivost vode  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) dobivena pomoću uređaja za pročišćavanje vode Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka).

#### **Priprema otopine 5-CQA**

Pripremljena je otopina klorogenske kiseline 5-CQA koncentracije,  $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  u metanolu HPLC čistoće i čuvana zaštićena od svjetla u hladnjaku na temperaturi  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **Priprema vodenih ekstrakata uzoraka kava**

Uzorci vodenih ekstrakata *instant* i mljevenih kava pripremani su na način da je u 100 mL ultračiste vode zagrijane na temperaturu  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , dodano 1 g kave. Dobiveni vodeni ekstrakt kave miješa se na magnetnoj miješalici u trajanju od 3 minute te se u daljnjem postupku profiltrira preko grubog filter-papira u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL. Nakon što se vodeni ekstrakt kave ohladi na sobnu temperaturu, profiltrira se kroz mikrofilter (PTFE filter) te je spreman za elektrokemijsku analizu.

### 3.2.4. PRIMJENA PROTOČNE *STRIPPING* KRONOPOTENCIOMETRIJE NA ELEKTROKEMIJSKU KARAKTERIZACIJU KLOOROGENSKIH KISELINA I UZORAKA KAVA

Protočna *stripping* kronopotenciometrijska analiza klorogenskih kiselina provedena je na EcaFlow 150 instrumentu (Istran Ltd., Bratislava, Slovačka) s protočnom EcaFlow ćelijom E104 i radnom mikroporoznom elektrodom od usitnjenog staklastog ugljika E53, referentnom elektrodom Ag/AgCl (zasićena otopina KCl) i platinom kao pomoćnom elektrodom. Za mjerenje i prikupljanje podataka korištena je Eca Flow 2.3. programska podrška. U **Tablici 2** su prikazani eksperimentalni uvjeti protočne *stripping* kronopotenciometrijske analize.

**Tablica 2** Eksperimentalni uvjeti protočne *stripping* kronopotenciometrijske analize

Uvjet	Iznos
Potencijal akumulacije	0 mV
Početni potencijal	0 mV
Konačni potencijal	800 mV
Struja otapanja	100 $\mu$ A
Vrijeme kondicioniranja	6 s
Trajanje mjerenja	300 s
Regeneracijski potencijal	0 mV
Vrijeme regeneracije	6 s
Volumen uzorka	3 mL
Volumen ispiranja	0 mL
Volumen mjerenja pozadine	3 mL
Protok	6mL/min

Ukupni sadržaj klorogenskih kiselina u kavi, dobivenih FTSCP metodom, izračunat je pomoću kalibracijske krivulje standarda 5-CQA, a izražen je kao mg 5-CQA ekvivalenata po 100 g kave (mg 5-CQAE / 100 g kave). Mjerenja su u svakom uzorku izvršena tri puta.



---

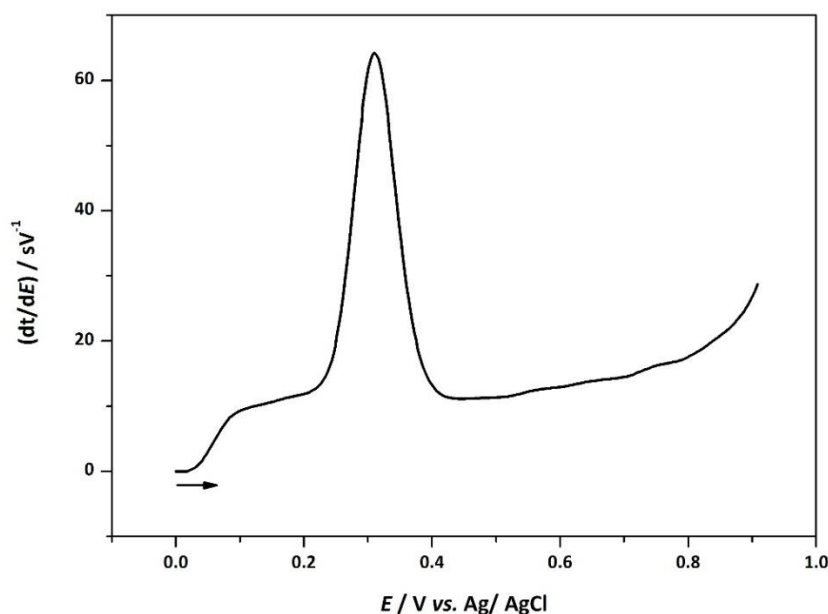
### 3.2.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA SPEKTROFOTOMETRIJSKA FOLIN-CIOCALTEU METODOM

Ukupni polifenoli u vodenim ekstraktima *instant* i mljevenih kava određeni su primjenom Folin-Ciocalteu metode (Singleton i sur., 1999.; Waterhouse, 2001.). Pripremljenim vodenim ekstraktima *instant* i mljevenih kava (20  $\mu\text{L}$ ) dodana je demineralizirana voda u količini od 1580  $\mu\text{L}$  i 100  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Nadalje, u reakcijsku smjesu dodano je 300  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u koncentraciji 200  $\text{g L}^{-1}$ . Uzorci su promiješani na vortexu (Grant Bio, Cambridgeshire, Engleska) te su stavljeni u inkubator (Memmert GmbH, Njemačka) na 40 °C kroz 30 min. Slijepa proba je pripremljena na gore opisani način, a umjesto vodenog ekstrakta kave sadržavala je destiliranu vodu. Apsorbancija ( $A$ ) je mjerena na uređaju spektrofotometru (UV 2005, Selecta, Španjolska) pri valnoj duljini od 765 nm prema slijepoj probi. Rezultati su izraženi u mg galne kiseline po 100 g kave i mg 5-CQA ekvivalenta po 100 g kave. Mjerenja su u svakom uzorku izvršena pet puta.

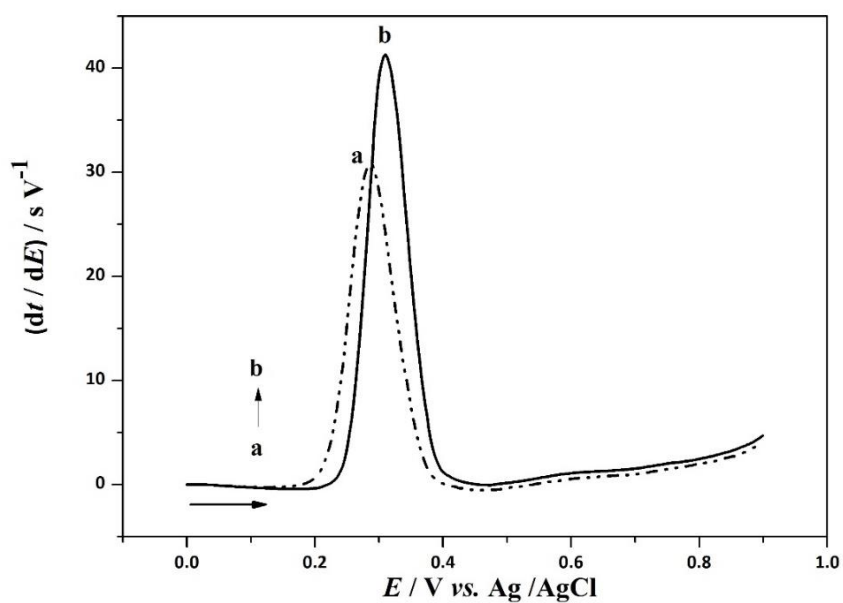
## **4. REZULTATI**

#### 4.1. ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA KLOGROGENSKIH KISELINA PRIMJENOM PROTOČNE *STRIPPING* KRONOPOTENCIOMETRIJE

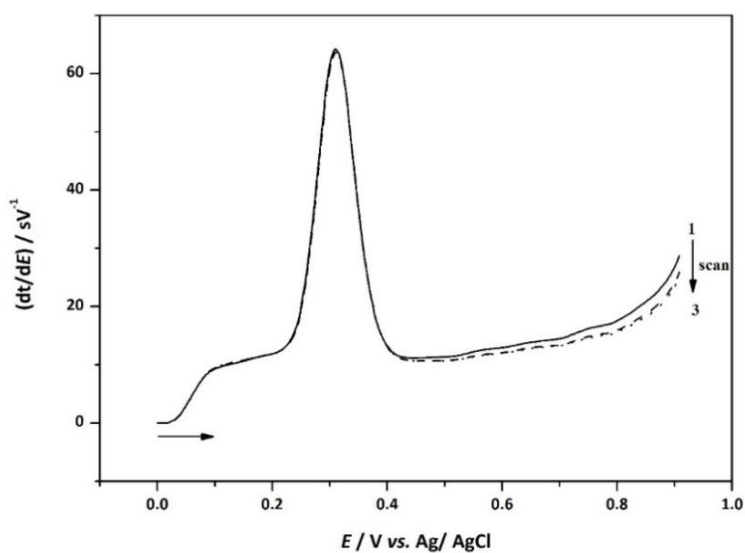
Primijenjena je elektrokemijska tehnika protočne *stripping* kronopotenciometrije na identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina odnosno 5-*O*-kafeoil-kina kiselina (5-CQA). Identifikacija i kvantifikacija provedena je u 0,1 mol L<sup>-1</sup> fosfatnom puferu pH vrijednosti 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima navedenim u poglavlju 3. Materijali i metode ovog rada, a prikazana je na **Slici 8**. Utjecaj kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije i koncentracije na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma ispitanih 5-CQA i CFA prikazani su na **Slikama 9-11**. Na osnovi FTSCP mjerenja koncentracija 5-CQA u rasponu od 5 do 100 μmol L<sup>-1</sup> kreiran je kalibracijski pravac pomoću kojeg je izvršena kvantifikacija sadržaja CGAs u ispitivanim uzorcima kava (**Slika 12**).



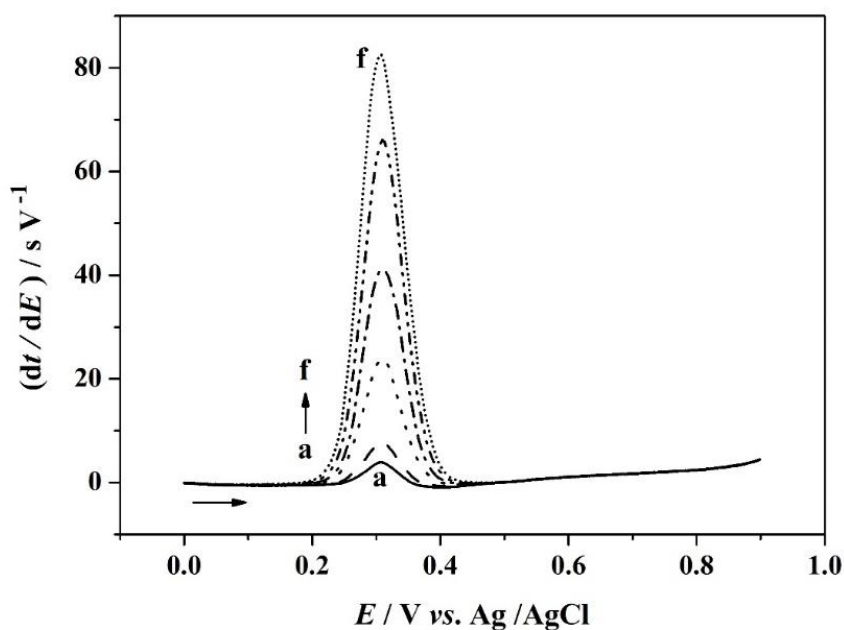
**Slika 8** FTS kronopotenciogram otopine 5-CQA,  $c = 5 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> u 0,1 mol L<sup>-1</sup> PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 2** (Eksperimentalni dio)



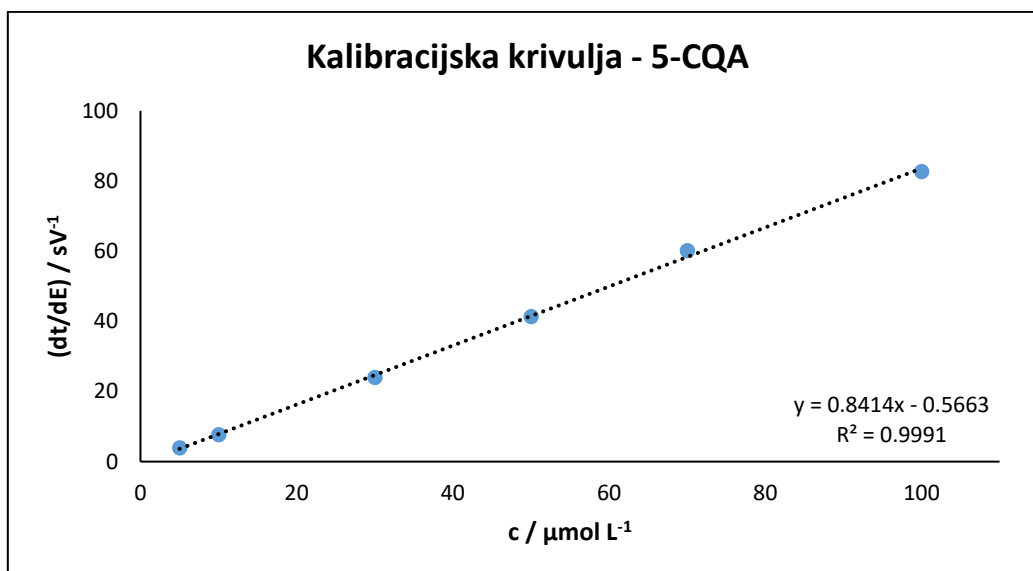
**Slika 9** Utjecaj kemijske strukture na FTS kronopotenciograme otopina: (a) CFA; (b) 5-CQA;  $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 2**  
(Eksperimentalni dio)



**Slika 10** Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na FTS kronopotenciograme otopine 5-CQA,  $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 2**  
(Eksperimentalni dio)



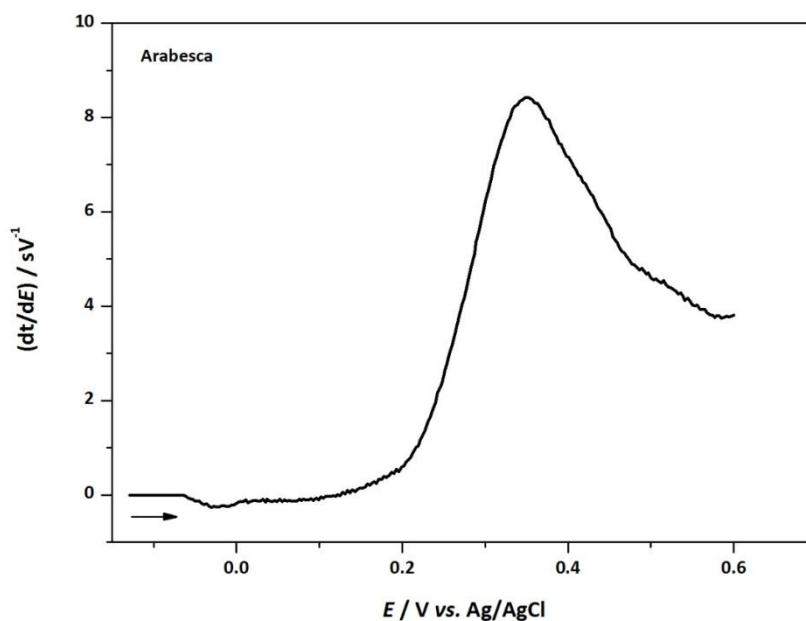
**Slika 11** Utjecaj koncentracije otopine 5-CQA na FTS kronopotenciograme (korekcija bazne linije) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti u **Tablici 2** (Eksperimentalni dio) FTS kronopotenciogram 5-CQA u rasponu koncentracija,  $c =$  a)  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , b)  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , c)  $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , d)  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , e)  $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  i f)  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$



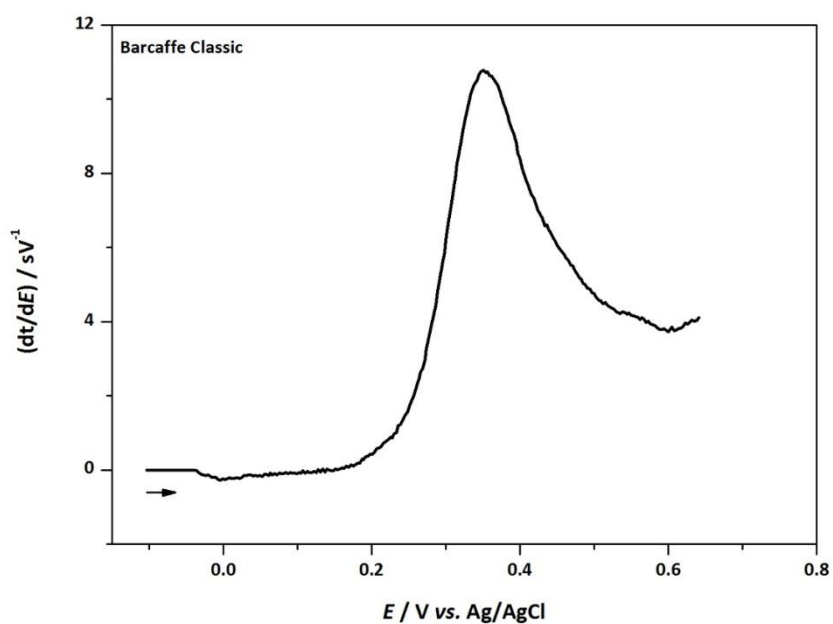
**Slika 12** Kalibracijska krivulja otopine 5-CQA za kvantifikaciju sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina protočnom *stripping* kronopotencijometrijom

## 4.2. ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA VODENIH EKSTRAKATA KAVA PRIMJENOM PROTOČNE STRIPPING KRONOPOTENCIOMETRIJE

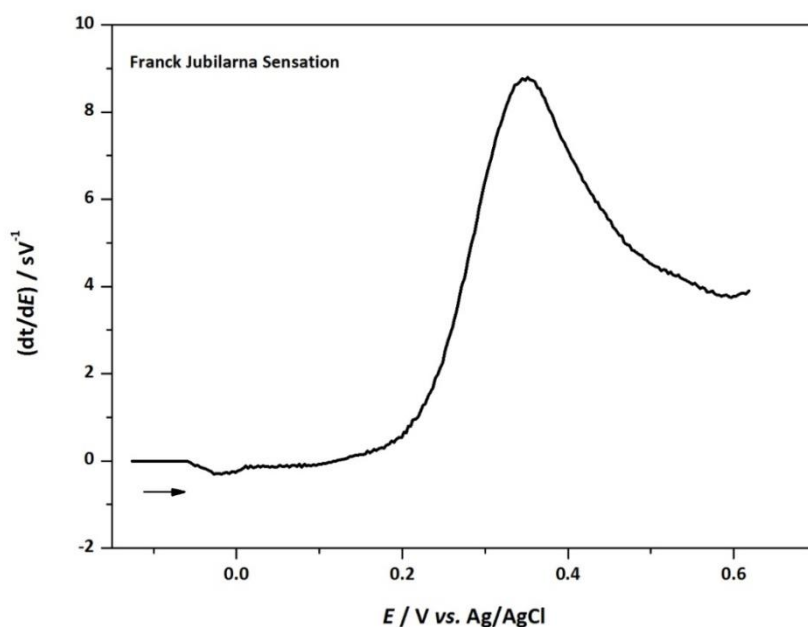
Na Slikama od 13 do 20 prikazani su FTS kronopotenciogrami vodenih ekstrakata kava pripremljenih prema opisu u poglavlju 3. Materijali i metode u 0,1 mol L<sup>-1</sup> fosfatnom puferu pH 7,0. Ispitani uzorci mljevenih i *instant* kava razrijeđeni su u omjeru 1:50 (*DF*=50).



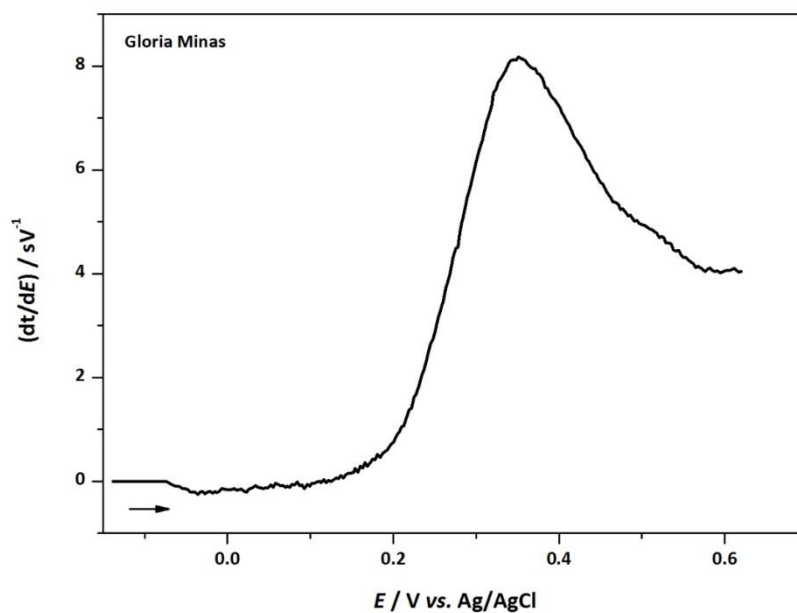
**Slika 13** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta mljevene kave Arabesca, (*DF*=50) u 0,1 mol L<sup>-1</sup> PBS puferu pH 7,0



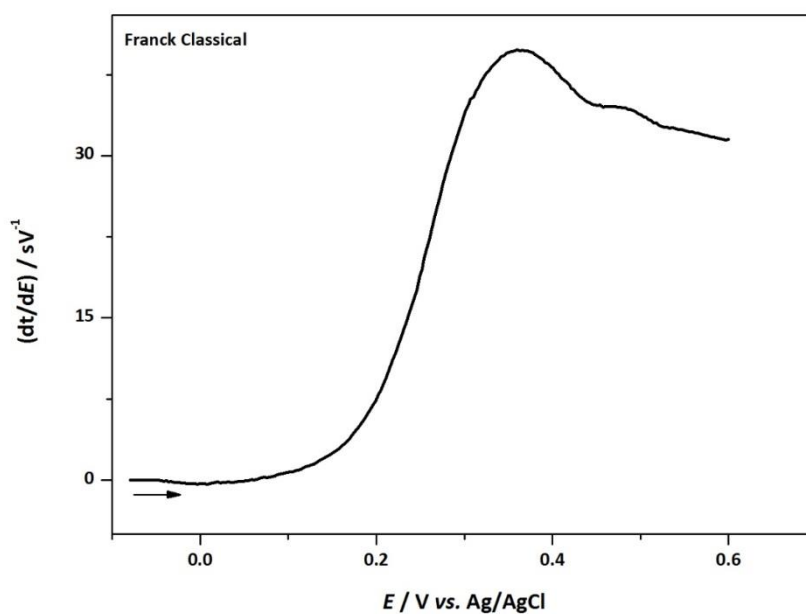
**Slika 14** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta mljevene kave Barcaffe Classic, (DF=50) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS puferu pH 7,0



**Slika 15** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta mljevene kave Franck Jubilarna Sensation, (DF=50) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS puferu pH 7,0

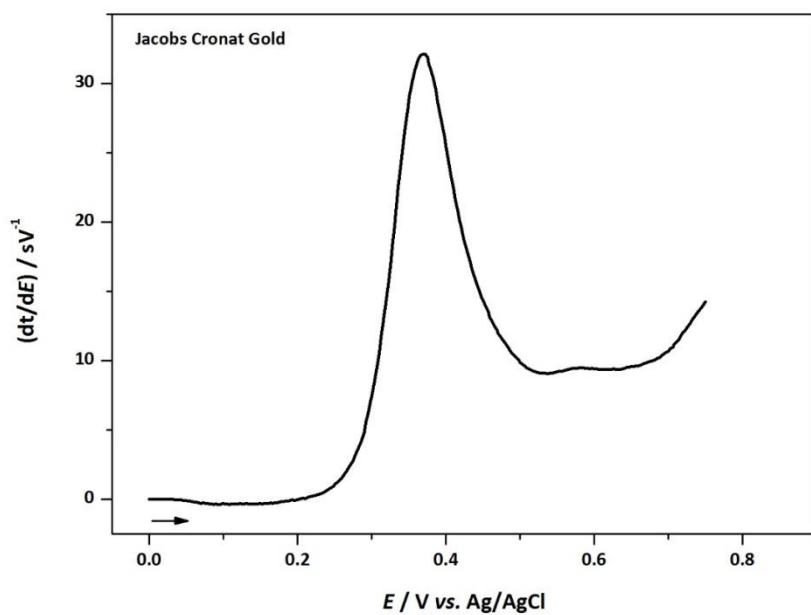


**Slika 16** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta mljevene kave Gloria Minas, (DF=50) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS puferu pH 7,0

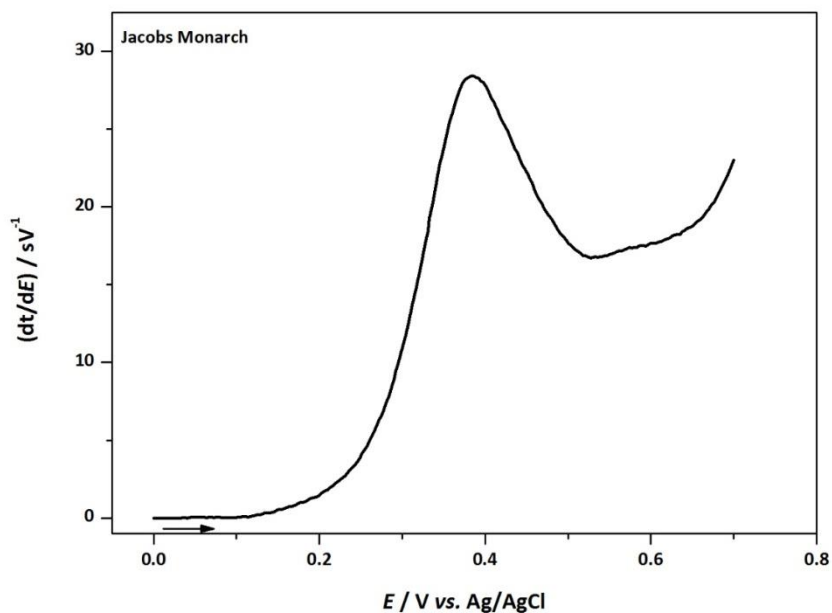


**Slika 17** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Franck Classical, (DF = 50) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS puferu pH 7,0

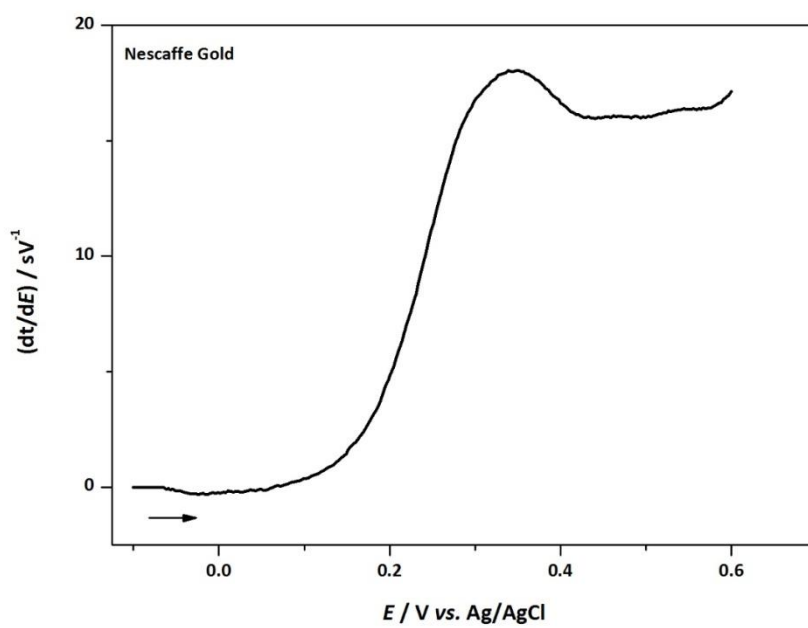




**Slika 18** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Cronat Gold, (DF=50) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS puferu pH 7,0



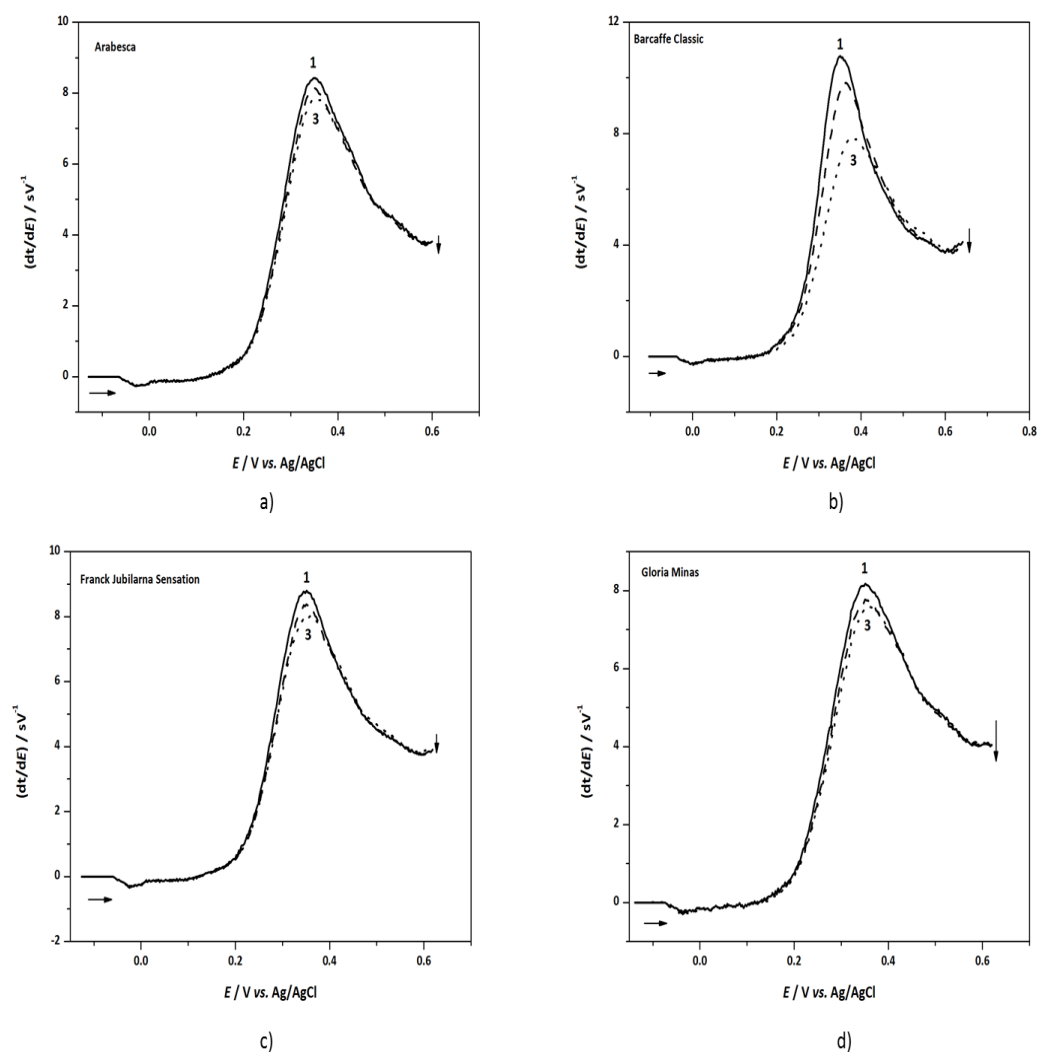
**Slika 19** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Monarch, (DF=50) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS puferu pH 7,0



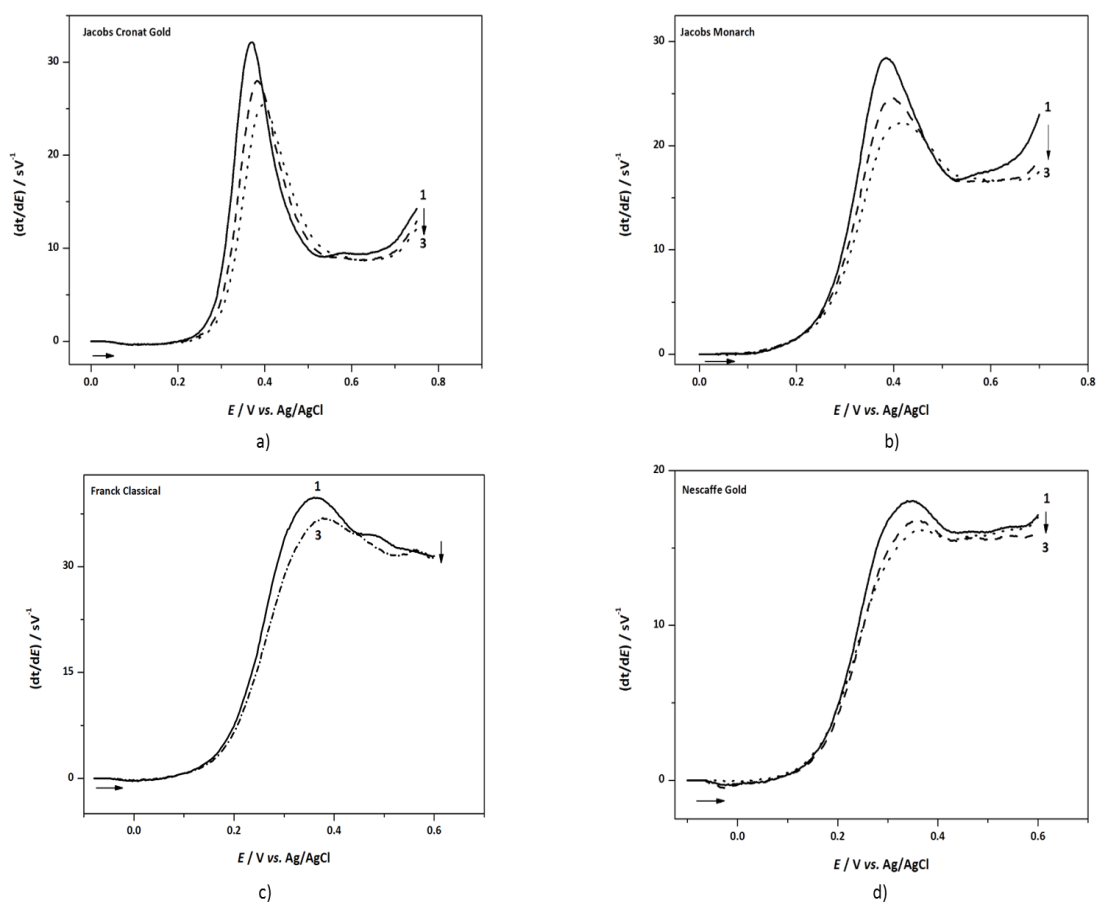
**Slika 20** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafe Gold, (DF=50) u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS puferu pH 7,0

### 4.2.1. Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na karakterizaciju vodenih uzoraka kava

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na ispitane vodene ekstrakte mljevenih i *instant* kava u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnom puferu pH 7,0 prikazan je na **Slikama 21 i 22**.



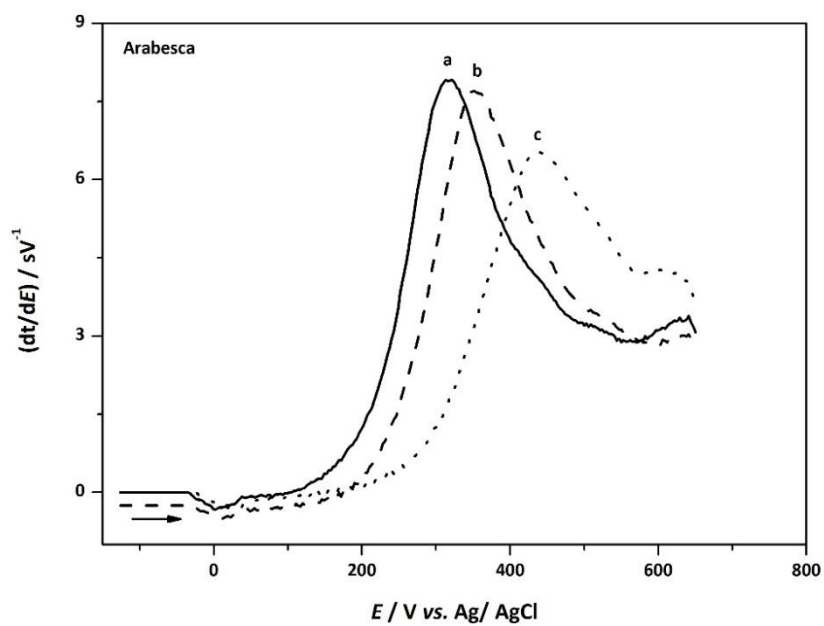
**Slika 21** Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na FTS kronopotenciograme mljevene kave, (a) Arabesca, (b) Barcaffè Classic, (c) Franck Jubilarna Sensation i (d) Gloria Minas, (DF = 50), (DF = 50), u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 2** (Eksperimentalni dio).



**Slika 22** Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na FTS kronopotenciograme mljevene kave, (a) Jacobs Cronat Gold, (b) Jacobs Monarch, (c) Franck Classical i (d) Nescafe Gold, (DF=50), u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 2** (Eksperimentalni dio).

#### 4.2.2. Utjecaj promjene pH vrijednosti osnovnog elektrolita na karakterizaciju vodenih uzoraka kava

Utjecaj pH vrijednosti pufera osnovnog elektrolita na vodene ekstrakte kava, prikazan je na Slici 23.



**Slika 23** FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta mljevene kave Arabesca, (DF=50) u 0,1 mol L<sup>-1</sup> PBS puferu (a) pH 7,0, (b) pH 8,0 i (c) pH 9 pri uvjetima prikazanim u **Tablici 2**.

### 4.2.3. Kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim uzorcima kava

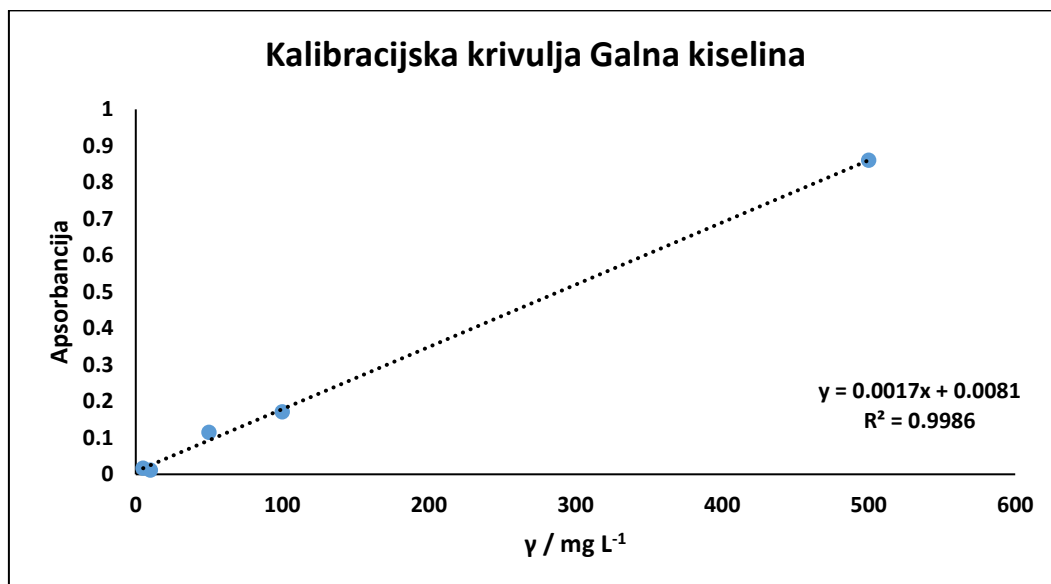
Kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u ispitanim vodenim ekstraktima kava određena je primjenom jednadžbe dobivene iz kalibracijskog pravca prikazanog na **Slici 12**. Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina (mg 5-CQA ekvivalenta u 100g kave) u ispitanim uzorcima kava prikazan je u **Tablici 3**.

**Tablica 3** Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina u ispitanim vodenim ekstraktima kava, određen protočnom *stripping* kronopotencijometrijom (FTSCP)

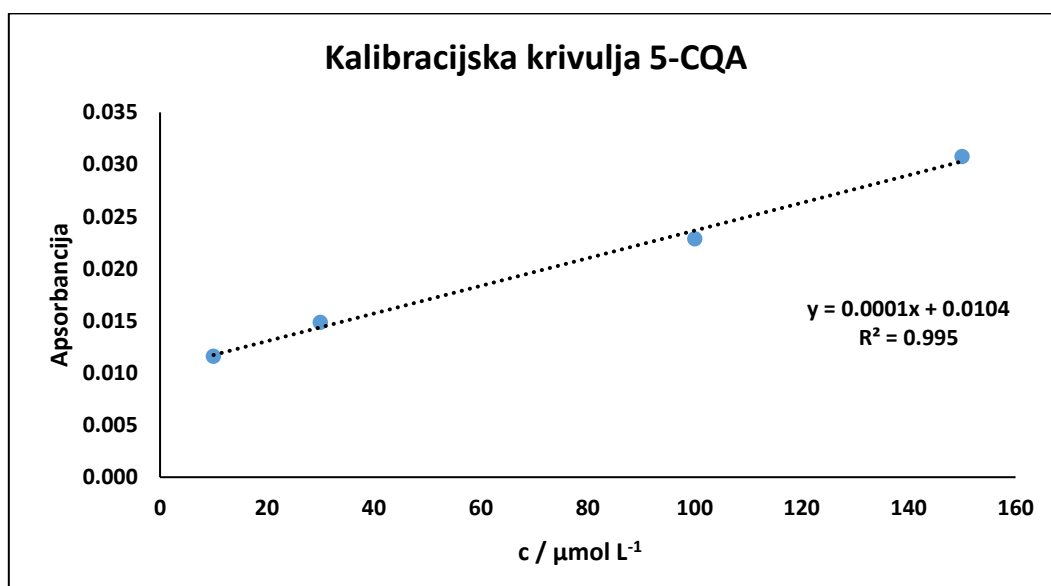
Uzorak	mg 5-CQAE/100g
<b>Mljevena kava</b>	
Arabesca	2656
Barcaffe Classic	3394
Franck Jubilarna Sensation	2656
Gloria Minas	2363
<b>Instant kava</b>	
Franck Classical	3414
Jacobs Cronat Gold	3887
Jacobs Monarch	3444
Nescaffe Gold	3915

- rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri međusobno neovisna mjerenja ( $n=3$ )

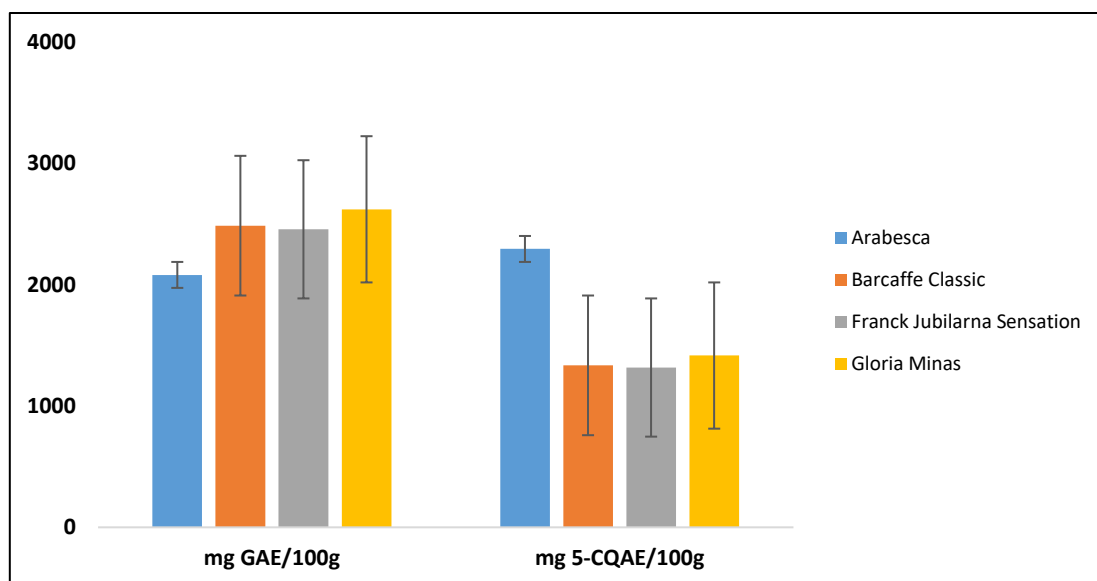
### 4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA U KAVAMA PRIMJENOM SPEKTROFOTOMETRIJSKE FOLIN-CIOUCALTEU METODE



Slika 24 Kalibracijska krivulja galne kiseline za određivanje sadržaja ukupnih polifenola

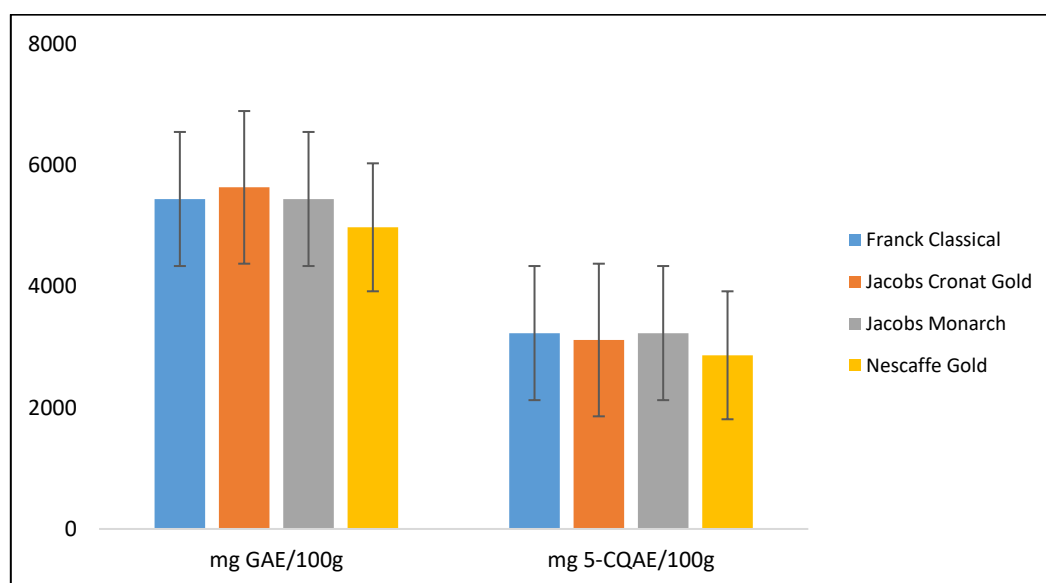


Slika 25 Kalibracijska krivulja 5-CQA za određivanje sadržaja ukupnih polifenola



- rezultati predstavljaju srednju vrijednost pet međusobno neovisnih mjerenja ( $n=5$ )

**Slika 26** Sadržaj ukupnih polifenola u vodenim uzorcima mljevenih kava primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode



- rezultati predstavljaju srednju vrijednost pet međusobno neovisnih mjerenja ( $n=5$ )

**Slika 27** Sadržaj ukupnih polifenola u vodenim uzorcima *instant* kava primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode



---

#### 4.4. KORELACIJE SADRŽAJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVAMA

**Tablica 4** Statistički podaci obrade rezultata sadržaja klorogenskih kiselina (Pearsonov koeficijent)

	FC mg GAE/100g	FTSCP	FC mg 5-CQAE/100g
FC mg GAE/100g	1,00	0,79	0,89
FTSCP	0,79	1,00	0,69
FC mg 5-CQAE/100g	0,89	0,69	1,00

---

## **5. RASPRAVA**

Ispitana su elektrokemijska svojstva 5-CQA primjenom protočne *stripping* kronopotencimetrije. 5-CQA je odabrana kao standard u ovom istraživanju jer je prema sadržaju značajno prisutna u kavi. Na **Slikama 8-11** prikazani su FTS kronopotenciogrami 5-CQA u 0,1 mol L<sup>-1</sup> fosfatnom puferu pH 7,0. Ispitan je utjecaj kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije i koncentracije na elektrokemijska svojstva 5-CQA. Utjecaj kemijske strukture 5-CQA i CFA na izgled FTS kronopotenciograma i na elektrokemijska svojstva prikazan je na **Slici 8 i 9**. Na **Slici 8 i 9** jasno se uočava jedan anodni oksidacijski pik u otopini 5-CQA na potencijalu od 0,310 V, dok se na **Slici 9** jasno uočava jedan anodni oksidacijski pik u otopini CFA na potencijalu od 0,287 V. Na **Slici 9** uočava se pomak potencijala anodnog oksidacijskog pika prema pozitivnijim vrijednostima i porast struje anodnog oksidacijskog pika od CFA prema 5-CQA, što ukazuje na razliku u elektrokemijskim svojstvima 5-CQA i CFA. Također, ova razlika ovisi i o razlici u njihovoj kemijskoj strukturi što je vidljivo iz **Slike 1**. Utjecaj kemijske strukture može se objasniti primjenom Raman spektroskopije (Mishra i sur., 2013.). Mishra i sur. (2013.) pokazali su da se područje visoke gustoće elektrona u molekuli 5-CQA pomiče s kateholne strukture prema esterskoj skupini (snažan elektron akceptorski utjecaj) te se smanjuje gustoća elektrona na kateholnoj strukturnoj jedinici što otežava prijenos elektrona s –OH skupine na kateholnoj jedinici, a rezultira porastom oksidacijskog potencijala 5-CQA u odnosu na CFA.

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije prikazan je na **Slici 10** te se uočava tijekom druge i treće uzastopne polarizacije radne elektrode opadanje anodnog oksidacijskog strujnog odziva (struja oksidacijskog pika se smanjuje). Uzrok opadanja struje oksidacijskog pika na površini radne elektrode od usitnjenog staklastog ugljika vjerojatno je nastanak adsorpcijskog sloja oksidacijskog produkta te je uslijed druge i treće uzastopne polarizacije otežana difuzija molekula iz otopine na površinu radne elektrode što rezultira smanjenjem oksidacijskog strujnog odziva i pomicanje potencijala oksidacijskog pika prema pozitivnijim vrijednostima.

Utjecaj koncentracije 5-CQA na FTS kronopotenciogramu u 0,1 mol L<sup>-1</sup> PBS pH 7,0 prikazan je na **Slici 11**. Ispitano je područje koncentracije 5-CQA od 5 do 100 μmol L<sup>-1</sup> te je ujedno u navedenom području koncentracija prisutna linearna ovisnost oksidacijske struje pika o koncentraciji. Pri koncentraciji višoj od 100 μmol L<sup>-1</sup> opada oksidacijski strujni odziv i funkcija nije više linearna, uslijed adsorpcije oksidacijskih produkata na površini radne elektrode.

---

Kalibracijski pravac (**Slika 12**) za računanje sadržaja CGAs u ispitanim vodenim ekstraktima kavama prikazan je **jednadžbom 1**:

$$dt/dE = 0,8414x - 0,5663$$

gdje  $x$  predstavlja množinsku koncentraciju u  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9991$ ). Osjetljivost metode izražena je preko granice detekcije ( $LOD$ ) koja iznosi  $2,56 \mu\text{mol L}^{-1}$  i granice kvantifikacije ( $LOQ$ ) koja iznosi  $8,54 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Na **Slikama** od **13** do **20** prikazani su FTS kronopotenciogrami osam ispitanih vodenih ekstrakata mljevenih i *instant* kava. Vodeni ekstrakti kava razrijeđeni su u omjeru 1:50 u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,0. Na FTS kronopotenciogramima svih ispitanih vodenih ekstrakata kava uočava se jedan jasno izraženi anodni oksidacijski pik na potencijalu  $E_p$  oko  $0,351 \text{ V}$  ovisno o vrsti kave. Prema potencijalu 5-CQA može se zaključiti da anodni oksidacijski pik vodenih ekstrakata kava odgovara prisustvu 5-CQA u kavama.

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije ispitanih vodenih ekstrakata kava u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,0, na FTS kronopotenciogramu kave prikazan je na **Slikama 21** i **22**. Iz navedenih slika jasno se uočava jednak utjecaj višestruke uzastopne polarizacije kao i kod otopine 5-CQA, odnosno pad oksidacijskog strujnog odziva ispitanih vodenih ekstrakata kava i pomak oksidacijskog potencijala prema pozitivnijim vrijednostima u drugoj i trećoj uzastopnoj polarizaciji vodenih ekstrakata kava.

Utjecaj pH vrijednosti otopine osnovnog elektrolita,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS, na FTS kronopotenciogramu vodenog ekstrakta kave prikazan je na **Slici 23** te se uočava najviši oksidacijski strujni odziv za pH 7,0 dok pri višim pH vrijednostima (8-9) oksidacijski strujni odziv opada. Prema Maegawa i sur. (2007.), molekula 5-CQA ima tri moguća mjesta za disocijaciju (karboksilna skupina na cikloheksanskom prstenu kina kiseline i dvije  $-\text{OH}$  skupine u kateholnoj sktrukturi 5-CQA). Prema Janeiro i Brett (2004.) u pH 7 nastaje anion  $5\text{-CQA}^-$  disocijacijom karboksilne skupine na cikloheksanskom prstenu kina kiseline u strukturi 5-CQA molekule. Stoga je odabrana pH vrijednost, pH 7,0, osnovnog elektrolita za elektrokemijsku karakterizaciju 5-CQA u vodenim ekstraktima kava. Dobivena maksimalna vrijednost oksidacijskog strujnog odziva vodenih ekstrakata kava u skladu je s literaturom (Santos i sur., 2011.)

---

Kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima ispitanih kava provedena je primjenom kalibracijskog pravca (**Jednadžba 1**) te su rezultati prikazani u **Tablici 3**. Iz **Tablice 3** uočava se da je sadržaj CGAs prisutan u vodenim ekstraktima *instant* i mljevenih kava sličan što je u skladu s literaturnim navodima (Tomac i sur., 2017.).

Određen je sadržaj ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima kava primjenom spektroskopske Folin-Ciocalteu metode. Sadržaj ukupnih polifenola određen je prema kalibracijskom pravcu galne kiseline (**Slika 24**) i kalibracijskom pravcu 5-CQA (**Slika 25**) koja, prema sadržaju, dominira u uzorcima kava, a izražen je kao mg GAE 100 g<sup>-1</sup> i kao mg 5-CQAE 100 g<sup>-1</sup>. Na **Slikama 26 i 27** prikazani su sadržaji ukupnih polifenola dobiveni Folin-Ciocalteu metodom te se uočava da je sadržaj ukupnih polifenola sličan u vodenim ekstraktima *instant* i mljevenih kava, što je u skladu s literaturnim podacima (Kreicbergs i sur., 2011.).

Korelacije sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina dobiven primjenom elektrokemijske protočne *stripping* kronopotencimetrije i sadržaj ukupnih polifenola dobiven primjenom spektroskopske Folin-Ciocalteu metode su izražene preko Pearsonovog koeficijenta korelacije na razini pogreške  $p < 0,05$  (**Tablica 4**). Iz **Tablice 4** se uočava dobro do vrlo dobro slaganje (0,69-0,89) između rezultata sadržaja ukupnih CGAs dobivenih elektrokemijskom spektrofotometrijskom metodom.

## **6. ZAKLJUČAK**

---

Na osnovi rezultata ovog diplomskog rada mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Na osnovi istraživanja elektrokemijskih svojstava klorogenske kiseline (5-CQA) i kafeinske kiseline, kao strukturne jedinice CQAs, primjenom FTSCP metode, može se zaključiti da na njihova elektrokemijska svojstva značajno utječu različiti primijenjeni eksperimentalni uvjeti (kemijska struktura, višestruka uzastopna polarizacija i koncentracije analita).
- Utjecaj kemijske strukture ispitivane 5-CQA očituje se u pomaku oksidacijskog potencijala na FTS kronopotenciogramu prema pozitivnijim vrijednostima i porastu struje oksidacijskog pika u usporedbi s CFA što je posljedica esterifikacije odnosno utjecaja esterske grupe prisutne u kemijskoj strukturi 5-CQA u odnosu na kemijsku strukturu CFA.
- Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije radne elektrode u otopini 5-CQA, očituje se u opadanju oksidacijskog strujnog odziva i malom pomaku oksidacijskog potencijala prema pozitivnijim vrijednostima što je vjerojatno posljedica adsorpcije oksidacijskih produkata nastalih tijekom polarizacije na površini radne elektrode.
- FTS kronopotenciogram i otopine 5-CQA pokazali su linearnu ovisnost struje pika  $I_p$  o koncentraciji otopine 5-CQA u području koncentracije od 5 do 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .
- Metodom protočne *stripping* kronopotencimetrije ispitana su elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava te se na FTS kronopotenciogramima uočava prisustvo jednog anodnog oksidacijskog pika.
- Metodom FTSCP kvantificiran je sadržaj ukupnih CGAs korištenjem kalibracijske krivulje otopine 5-CQA na temelju strujnog odziva oksidacijskog pika ( $LOD = 2,56 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $LOQ = 8,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ).
- Prema sadržaju ukupnih CGAs obje vrste ispitanih kava imaju sličan sadržaj ukupnih CGAs, dok su *instant* kave ipak nešto bogatije od mljevenih kava što je vjerojatno posljedica razlike u kemijskom sastavu jer predstavljaju mješavinu različitih vrsta kava.
- Sadržaj ukupnih polifenola određen pomoću spektroskopske Folin-Ciocalteu metode pokazao slične sadržaje CGAs u obje vrste kave slično kao i elektrokemijska tehnika.

- Pearsonov koeficijent pokazuje dobro do vrlo dobro slaganje rezultata sadržaja ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima kava primjenom FTSCP i spektrofotometrijske metode.



## **7. LITERATURA**

---

Beinrohr E: Flow-Through Chronopotentiometry. *Waste Water – Evaluation and Management*. Intech, Croatia, China, 71-92, 2011.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P: Coffee, Tea, Cocoa. *Food Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Hong Kong, London, Milan, Paris, Tokyo, 939-951, 2004.

Clifford MN, Willson KC: *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Croom Helm, Avi, London, Sydney, Westport, Connecticut, 1985.

Duarte GS, Pereira AA, Farah A: Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chemistry*, 118:851-855, 2010.

Farah A: Coffee Constituents. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. IFT Press, A John Wiley and Sons, Ltd., 21-58, 2012.

Farah A, Duarte G: Bioavailability and Metabolism of Chlorogenic Acids from Coffee. *Coffein Health and Disease Prevention*, 87:789-801, 2015.

Gil ES, Couto RO: Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23:542-558, 2013.

Gil ES, Enache TA, Brett AMO: Redox Behaviour of Verbascoside and Rosmarinic Acid. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 16:92-97, 2013.

Hesse M, Meier H, Zeeh B: *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. Thieme, 2008.

Janeiro P, Oliveira Brett: Catechinel ectrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 518:109-115, 2004.

Kreicbergs V, Dimins F, Mikelsone V, Cinkmanis I: Biologically active compounds in roasted coffee. *Foodbalt*, 2011.

Maegawa Y, Sugino K, Sakurai H: Identification of free radical species derived from caffeic acid and related polyphenols. *Free Radical Research*, 41:110-119, 2007.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727-747, 2004.

---

Mishra S, Tandon P, Eravuchira PJ, El-Abassy RM, Materny A: Vibrational spectroscopy and density functional theory analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 104:358-367, 2013.

Namazian M, Zare HR: Electrochemistry of chlorogenic acid: experimental and theoretical studies. *Electrochimica Acta*, 50:4350-4355, 2005.

Santos WJR, Santhiago M, Yoshida IVP: Novel electrochemical sensor for the selective recognition of chlorogenic acid. *Analytica Chimica Acta*, 695:44-50, 2011.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM: *Methods in Enzymology*: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Elsevier*, 299:152-178, 1999.

Šeruga M: *Instrumentalne metode analize*. Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2011.

Šimunac D: *Knjiga o kavi*. Grafem, Zagreb, 2004.

Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F: Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013:1-11, 2013.

Tomac I, Šeruga M, Beinrohr E: Characterization of Chlorogenic Acids in Coffee by Flow-Through Chronopotentiometry. *FoodChem*, 10:3924-3933, 2017.

Waterhouse AL: Determination of Total Phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, I1.1.1-I1.1.8, Wrolstad, R.E., Wiley, 2001.

(<http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/folin-ciocalteau-micro-method-for-total-phenol-in-wine>)

Web 1: <https://clivecoffee.com/blogs/learn/how-coffee-extraction-works> (20.12.2018.)

Vinholes J, Silva BM, Silva LR: Hydroxycinnamic acids (HCAS): Structure, biological properties and health effects. *Research Gate*, 2015.