Karakterizacija klorogenskih kiselina iz instant kava primjenom diferencijalne pulsne voltametrije

Jurić, Marijana

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:766064

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marijana Jurić

Karakterizacija klorogenskih kiselina iz *instant* kava primjenom diferencijalne pulsne voltametrije

DIPLOMSKI RAD

Osijek, lipanj 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 Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Instrumentalne metode II
Tema rada je prihvaćena na I. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 30. listopada 2018.
Mentor: dr. sc. *Ivana Tomac, znan. sur.*

Karakterizacija klorogenskih kiselina iz *instant* kava primjenom diferencijalne pulsne voltametrije

Marijana Jurić, 0113136200

Sažetak: Kava je jedan od omiljenih napitaka uz čaj i kakao te predstavlja jedan od izvora klorogenskih kiselina u svakodnevnoj prehrani. Klorogenske kiseline ubrajaju se u grupu hidroksicimetnih kiselina poznatih po svom zaštitnom utjecaju na zdravlje ljudi. Zadatak ovog diplomskog rada bio je primjena diferencijalne pulsne voltametrije na elektrokemijsko ponašanje klorogenskih kiselina u *instant* kavama (Jacobs Monarch, Nescaffé Gold, Jacobs Cronat Gold i Franck Classical). Ispitivanje elektrokemijskog ponašanja provedeno je u troelektrodnoj ćeliji s radnom elektrodom od staklastog ugljika, referentna elektroda srebro/srebro klorid i protuelektrodom žicom platine. Elektrokemijska mjerenja odvijala su se u fosfatnom puferu različitih pH vrijednosti. Na osnovi istraživanja elektrokemijskih svojstava klorogenske kiseline u usporedbi s kafeonskom kiselinom, a primjenom DPV 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.

Ključne riječi: *instant* kava, klorogenske kiseline, diferencijalna pulsna voltametrija, ukupni polifenoli, Folin-Ciocalteu metoda

Rad sadrži: 45 stranica
22 slika
3 tablica
0 priloga
53 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

1.	doc. dr. sc. *Valentina Bušić*	predsjednik
2.	dr. sc. *Ivana Tomac*	član-mentor
3.	prof. dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*	član
4.	doc. dr. sc. *Antun Jozinović*	zamjena člana

Datum obrane: 11. lipanj 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 Food Science and Nutrition

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Instrumental Analysis II
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 1 held on October 30, 2018.
Mentor: *Ivana Tomac*, PhD

Characterization of Chlorogenic Acids in Instant Coffee Using Differential Pulse Voltammetry

Marijana Jurić, 0113136200

Summary: Coffee is one of the favourite drinks together with tea and cocoa and is one of the chlorogenic acids sources in daily diet. Chlorogenic acids are part of the group of hydroxycinnamic acids known after their protective effect on human health. The aim of this work was the application of differential pulse voltammetry to the electrochemical behaviour of chlorogenic acids in instant coffee (Jacobs Monarch, Nescaffé Gold, Jacobs Cronat Gold and Franck Classical). Electrochemical behaviour was carried out in a three-electrode cell with a glassy carbon working electrode, reference electrode silver/silver chloride and platinum wire counter electrode. Electrochemical measurements were carried out in phosphate buffer of different pH values. Based on the investigation of the electrochemical properties of chlorogenic acids compared to caffeic acid, and with the application of DPV methods, it can be concluded that their electrochemical properties are significantly influenced by the chemical structure, the applied multiple polarization and the concentration of the analyte. The results of total chlorogenic acids content in the investigated coffee 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 the investigated coffee have a similar content of chlorogenic acids.

Key words: Instant coffee, chlorogenic acids, differential pulse voltammetry, total polyphenols, Folin-Ciocalteu method

Thesis contains:
45 pages
22 figures
3 tables
0 supplements
53 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Valentina Bušić*, PhD, assistant prof. — chair person
2. *Ivana Tomac*, PhD — supervisor
3. *Lidija Jakobek Barron*, PhD, prof. — member
4. *Antun Jozinović*, PhD, assistant prof. — stand-in

Defense date: June 11, 2019

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

Zahvaljujem se mentorici dr.sc. Ivani Tomac na stručnim savjetima i objašnjenjima, te na uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog rada.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene i bodrili me tijekom mog školovanja.

I najveću zahvalnost i zaslugu pripisujem svojim roditeljima, bratu i sestri koji su uvijek bili uz mene, pružali mi ogromnu podršku i bez kojih ne bih ovo postigla.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
2.1. KAVA 4
2.1.1. Drvo kave 4
2.1.2. Prerada zrna kave 5
2.1.3. *Instant* kava 7
2.2. Sastav *instant* kave 8
2.2.1. Klorogenske kiseline 9
2.2.2. Kemijske promjene u prženom zrnu kave 11
2.2.3. Utjecaj na zdravlje 11
2.3. Metode za određivanje fenolnih spojeva 13
2.3.1. Elektroanalitičke metode 13
2.3.2. Spektroskopske metode 14
3. EKSPERIMENTALNI DIO 16
3.1. ZADATAK RADA 17
3.2. MATERIJALI I METODE 17
3.2.1. Uzorci kava 17
3.2.2. Priprema otopina 18
4. REZULTATI 20
4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE 5 – *O* - KAFEOILKINA KISELINE PRIMJENOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE 21
4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE VODENIH EKSTRAKATA *INSTANT* KAVA PRIMJENOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE 23
4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA 27
4.4. STATISTIČKA USPOREDBA PODATAKA 28
5. RASPRAVA 29
5.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE 5-*O*-KAFEOILKINA KISELINE 30
5.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE UZORAKA *INSTANT* KAVA 30
5.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA 31
6. ZAKLJUČAK 33
7. LITERATURA 35

Popis oznaka, kratica i simbola

CGAs klorogenske kiseline (eng*. chlorogenic acids*)

CQAs kafeoil-kina kiseline (eng*. caffeoylquinic acids*)

diCQAs dikafeoil-kina kiseline (eng*. dicaffeoylquinic acids*)

DPV diferencijalna pulsna voltametrija (eng. *differential pulse voltammetry*)

E_p potencijal pika (eng. *peak potential*)

FQAs feruloil-kina kiseline (eng*. feruloylquinic acids*)

GAE galna kiselina (eng*. gallic acid*)

GCE elektroda od staklastog ugljika (eng. *glassy carbon electrode*)

I_p struja pika (eng. *peak current*)

LOD granica detekcije (eng. *limit of detection*)

LOQ granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*)

*p*COA *p*-kumarinska kiselina (eng*. p-coumaric acid*)

QA kina kiselina (eng. *quinic acid*)

1. UVOD

Kava je najčešće konzumirani napitak uz čaj i kakao. Zbog ugodnog mirisa, specifičnog okusa i stimulativnih učinaka, postala je ritualni napitak modernog čovjeka. Kava je zimzeleni grm iz porodice *Rubiaceae*, a *Coffea arabica* i *Coffea robusta* su od posebnog ekonomskog značaja. Noviji trend u industriji proizvodnje kave su *instant* kave koje se pripremaju na jednostavan i brz način, a obogaćene su različitim sastojcima i aromama.

Kava je predmet znanstvenih istraživanja zbog svog kemijskog sastava koji pozitivno utječe na zdravlje ljudi. Kava je jedan od izvora klorogenskih kiselina (CGAs) koje pozitivno utječu na zdravlje i imaju zaštitni utjecaj prema slobodnim radikalima. Klorogenske kiseline ubrajaju se u grupu hidroksicimetnih kiselina nastalih esterifikacijom kina kiseline (QA) i najčešće kafeinska (CFA), ferulične (FA) i *p*-kumarinske kiseline (*p*-COA). Prema sadržaju, najzastupljenije klorogenske kiseline u kavi su kafeoil-kina kiseline, a prevladavajuća kafeoil-kina kiselina je 5-*O*-kafeoil-kina kiselina (5-CQA).

Epidemiološke studije su pokazale da konzumacija kave, odnosno unos klorogenskih kiselina, ima pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi u vidu antimikrobnog, antikancerogenog i antiupalnog djelovanja. Instrumentalne metode koje se najčešće primjenjuju u svrhu ispitivanja utjecaja klorogenskih kiselina i kave na zdravlje ljudi su visokodjelotvorna tekućinska kromatografija, spektroskopija, voltametrija. Elektrokemijske tehnike kao što su ciklička (CV), pravokutnovalna (SWV) i diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) zbog svoje brzine, selektivnosti i osjetljivosti su sve više zastupljene u analizi organskih spojeva.

Stoga je zadatak ovog diplomskog rada bio primjena diferencijalne pulsne voltametrije za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina, 5-*O*-kafeoil-kina kiseline, u uzorcima *instant* kava iz lokalnih supermarketa i određivanje sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina primjenom diferencijalne pulsne voltametrije i spektroskopske tehnike za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteu metoda).

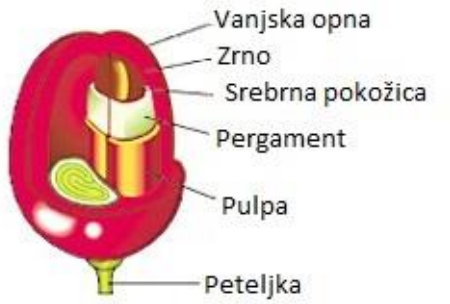
2. TEORIJSKI DIO

2.1. KAVA

2.1.1. Drvo kave

Kava se počela konzumirati još u kamenom dobu. Najstariji rukopisi koji spominju kulturu pijenja kave potječu iz 575. godine u Yemenu, dok su u 16. stoljeću u Perziji postupkom prženja dobivena prva pržena zrna kave. U Europu je kava donešena 1615. godine, prvenstveno u Nizozemsku, a potom u ostatak Europe (Neves, 1974).

Kava (*Coffea*) je tropska zimzelena drvolika biljka koja pripada porodici *Rubiaceae*. Grm kave ima tamnozeleno sjajno, kožnato, duguljasto lišće. Plodovi kave su bobičastog izgleda veličine trešnje i grupirane su u grozdove. Unutar bobice su smještene dvije svijetlo zelene sjemenke ili zrna, okrenuta pljosnatim stranama jedno prema drugome. Zrna obavija tanka, prozirna srebrna pokožica i pergament (**Slika 1**).



Slika 1 Građa ploda kave (Šimunac, 2004)

Berba kave se najčešće obavlja ručno ili pomoću strojeva na pristupačnim terenima. Branje traje oko tri mjeseca. Mladi plodovi kave su zelene boje, potom zrenjem poprimaju žutu boju, nakon čega počinju crvenjeti. Kada poprime tamno crvenu i grimiznu boju, spremni su za berbu (Šimunac, 2004).

U svijetu je identificirano oko 80 vrsta kave poput *Coffea arabica, Coffea canephora, Coffea liberica*, *Coffea stenophylla*, *Excelsa*. Samo su dvije ekonomski značajne, *C. arabica* i *C. canephora* ili robusta, a prikazane su na **Slici 2** (Farah, 2012).

Coffea arabica je najpoznatija kultivirana vrsta koja se najvećim dijelom uzgaja u Latinskoj Americi. Lišće joj je tamno zeleno i ovalno, a plodovi daju zrna sa sadržajem kafeina od 0,8 % do 1,7 %. Zrna kave su visoke kvalitete, ali sklona kvarenju. Druga komercijalno važna vrsta je *Coffea canephora*, poznatija kao robusta. Ima okrugle plodove s manje ovalnim zrnima lošije

kvalitete i oštrije izraženom aromom. Rodnija je i otpornija od arabice te su sjemenke manje. Jedna od glavnih prednosti robuste je veća otpornost na bolesti zrna i niže temperature. Uzgaja se u zapadnoj i srednjoj Africi, jugoistočnoj Aziji i Brazilu (Šimunac, 2004).



Slika 2 Izgled zrna *C. robuste* i *C. arabice* (Babić, 2013)

2.1.2. Prerada zrna kave

Prerada kave može biti suhim, mokrim ili kombiniranim postupkom. Suhi postupak prerade zrna kave upotrebljava se za robustu, tehnološki je jednostavniji od mokrog postupka koji se upotrebljava za preradu zrna arabice.

Kod suhog postupka bobice se raširе u tankom sloju na podlogu gdje ostaju 3 - 4 tjedna izložene suncu. S vremena na vrijeme, bobice se okreću da bi se spriječila fermentacija zbog mogućeg zadržavanja vlage ispod i između plodova. Mekani omotač zrna postupno se isušuje, gubi vlagu, postaje krut i lomljiv te se vrlo lako uklanja od zrna. Ova metoda se primjenjuje u područjima koja imaju više sunčanih razdoblja u godini, a zrna prerađena ovim postupkom su nešto slabije kvalitete (Šimunac, 2004).

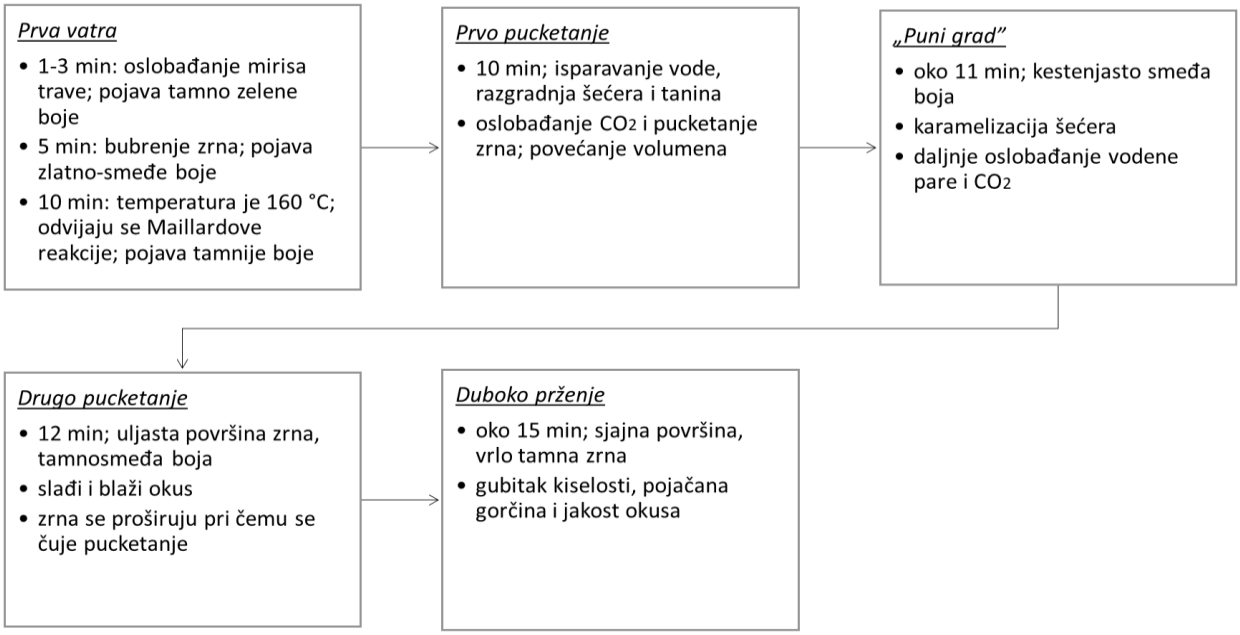
Mokri postupak uključuje uranjanje bobica u vodu. Kada bobice dovoljno omekšaju, pulpa se strojno uklanja od zrna. Potom se ta zrna namaču u vodi 12 do 36 sati. Zdrava zrna padaju na dno, a oštećena plutaju na površini i vrlo lako se odstranjuju. U vodi počinje proces fermentacije te se zrna izlažu toplom zraku u sušarama ili se suše prirodno na suncu (oko tri tjedna) (Šimunac, 2004). Tijekom fermentacije počinje nastanak hlapivih spojeva koji utječu na bogatu aromu kave (Gonzalez-Rios i sur. 2007a; 2007b).

Nakon odvajanja zrna od pulpe suhim ili mokrim postupkom, zrna su još uvijek prekrivena tankim slojem pergamenta. Zrna kave se izlože sunčevim zrakama tijekom 14 dana ili se otpremaju u komore i suše u struji toplog zraka. Suhi pergament se uklanja strojevima za ljuštenje, a potom se zrna poliraju te poprimaju privlačan sjajan, plavkasti izgled (Šimunac, 2004).

Prženje zrna kave je ključan korak u postupku proizvodnje prženih zrna kave, jer se razvijaju specifična organoleptička svojstva (boja, okus i aroma) koja utječu na kvalitetu kave (Hernández i sur., 2008; Franca i sur., 2005; Fujioka and Shibamoto, 2008). Postupak prženja zrna kave ovisi o temperaturi i vremenu te posljedično dovodi do promjena u kemijskoj strukturi i biološkoj aktivnosti zrna kave i napitka od kave što rezultira u transformaciji dijelova prirodno prisutnih polifenola u produkte Maillardove reakcije. Tijekom procesa prženja zrna dolazi do oksidacije sumpornih spojeva, termalne degradacije i hidrolize (Kumazawa i Masuda, 2003; Czerny i Grosch, 2000). Na **Slikama 3 i 4** su prikazani tradicionalan i industrijski postupak prženja zrna.

- Tradicionalna metoda prženja

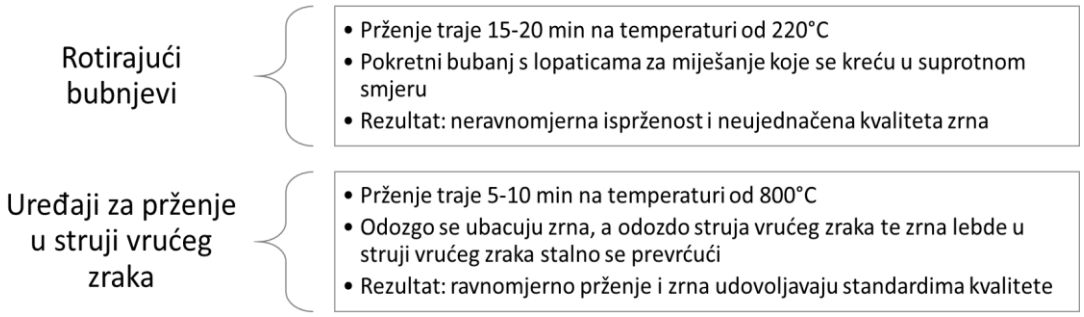
Kava se prži 10-15 minuta na temperaturi od 200 °C do 220 °C. Ova metoda se sastoji od 5 faza koje su prikazane na **Slici 3**.



Slika 3 Tradicionalna metoda prženja

- Industrijska metoda prženja

Industrijski način prženja se može obaviti u rotirajućim bubnjevima, koji se sve manje koriste ili u nepokretnom pržioniku u struji vrućeg zraka. Na **Slici 4** su prikazane najznačajnije razlike između ove dvije metode.



Slika 4 Industrijska metoda prženja

Nakon postupka prženja, zrna kave se trebaju brzo ohladiti kako bi se izbjegle egzotermne reakcije te spriječilo pretjerano prženje koje može narušiti kvalitetu proizvoda (Dutra i sur., 2001).

Nakon postupka prženja zrna, kava se treba u što kraćem roku upakirati kako bi očuvala karakterističnu aromu, okus, miris i kemijski sastav (Šimunac, 2004).

2.1.3. *Instant* kava

Instant kava predstavlja noviji trend u industriji proizvodnje kave. Zbog užurbanog načina života *instant* kava je našla veliku primjenu jer je priprava ove vrste napitka brza, a često je obogaćena različitim sastojcima i aromom. Prvu *instant* kavu proizveo je Satori Kato 1899. godine u Japanu. Proces proizvodnje *instant* kave je poboljšan 1940. godine kada su se pržena zrna primjenom metode dehidracije transformirala u tekući koncentrat, nakon čega se koncentrat reducirao u prah u struji vrućeg zraka (250 °C). Ovim procesom, uslijed isparavanja vode, gubili su se karakteristični aromatični spojevi kave (Šimunac, 2004).

Danas se *instant* kava proizvodi postupkom ekstrakcije iz mljevene kave u ekstraktorima pod atmosferskim tlakom pri temperaturi vode od 100 °C. Tijekom ovog postupka dolazi do gubitka pojedinih aromatičnih spojeva. Nakon ekstrakcije, evaporacija ili koncentriranje zamrzavanjem se koriste kako bi se povećala koncentracija topljivih tvari ekstrakta (EPA, 2010). Za proizvodnju *instant* kave koncentrirani ekstrakti se suše sušenjem raspršivanjem ili liofilizacijom.



a) b) c)

Slika 5 Granule kave dobivene a) sušenjem u fluidizirajućem sloju, b) sušenjem raspršivanjem i c) liofilizacijom (Babić, 2013)

U postupku liofilizacije, koncentrirani ekstrakt se smrzava na temperaturi od - 40 °C u struji hladnog zraka ili inertnog plina, a potom granulira (**Slika 5**). Tijekom ovog postupka dolazi do promjene arome kave zbog zagrijavanja i oksidacije jer se vlaga sublimira u vakuumskoj komori. Kod primjene sušenja raspršivanjem, koncentrirani ekstrakt se raspršiv u komori za sušenje iz koje je uklonjena voda zbog kontakta sa zrakom na temperaturi između 200 °C i 300 °C i visokim tlakom. Senzorske procjene različitih komercijalnih vrsta *instant* kava pokazale su da je kvaliteta povezana s vrstom zrna, vremenom skladištenja, procesom fermentacije, procesom prženja, ekstrakcijom i materijalom za pakiranje (Oliveira i sur., 2009).

Ovako proizvedena *instant* kava zadovoljavajuće je kvalitete, lako se otapa u vodi i zadržava više okusa. Za proizvodnju *instant* kave koriste se kvalitetna zrna robuste zbog jače arome. Tijekom proizvodnje *instant* kave, u zrnu se događaju različite kemijske promjene, pa tako sadržaj kafeina raste koji može biti i dvostruko veći nego u mljevenoj kavi te se povećava i udio minerala do 10 % (Šimunac, 2004).

2.2. Sastav *instant* kave

Sastav *instant* kava ovisi o kvaliteti zrna kave, postupku prženja zrna i metodi sušenja. *Instant* kava je higroskopna i nestabilna te se pakira pod tlakom ili u vakuumu u limenke, staklenke, fleksibilne materijale da bi se sačuvale karakteristične organoleptičke karakteristike.

Sadržaj kafeina u *instant* kavi (2,5–5,4 g/100 g) ovisi o mješavini i načinu ekstrakcije. Glavni cilj proizvođača je da proizvedu *instant* kavu koja će po kemijskom sastavu biti slična mljevenoj kavi. *Instant* kava bi trebala sadržavati (na 100 g) polisaharide (50-60 g), proteine (12,6-21 g), lipide (0,2-1,6 g), minerale (8,8-10 g) i oligosaharide (5,2-7,4 g) (Smith i sur., 1985). Sadržaj vlage bi trebao biti do 5 %, no u stvarnosti iznosi 2,7 % - 3,5 % (Alves i Bordin, 1998; Alves i sur., 2000).

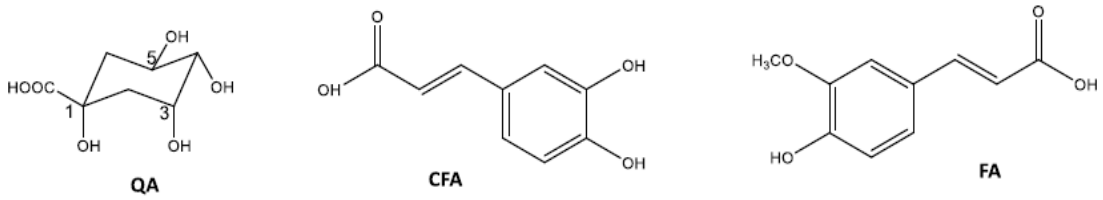
2.2.1. Klorogenske kiseline

Fenolni spojevi su sveprisutni sastojci viših biljaka koji su u širokom rasponu pronađeni u najčešće konzumiranim biljkama kao što su voće i povrće, žitarice i mahunarke te u napitcima biljnog podrijetla poput kave, čaja i vina (Cheynier, 2005; Manach i sur., 2004). Ovi sastojci su sekundarni metaboliti biljaka koji služe u obrani biljaka od ultraljubičastog zračenja ili napada patogena. Do sada je opisano nekoliko tisuća fenolnih spojeva u biljkama i mogu se podijeliti u nekoliko razreda s obzirom na njihovu kemijsku strukturu (kao što je vrsta i broj fenolnih prstenova), i u različite podrazrede prema specifičnim supstitucijama u osnovnoj strukturi, povezanosti s ugljikohidratima i polimeriziranim oblicima (Manach i sur., 2004). Većina ovih spojeva je pokazala potencijalni zaštitni utjecaj kod različitih degenerativnih bolesti (neurodegenerativne bolesti i dijabetes *mellitus*), raka i kardiovaskularnih bolesti (Scalbert i sur., 2005). S obzirom na strukturne karakteristike polifenola, razlikujemo dvije veće podskupine: fenolne kiseline (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina) i flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani i dr.).

U kavi, najzastupljenije hidroksicimetne kiseline su: kafeinska (3,4-dihidroksicimetna kiselina), ferulična (3-metoksi-4-hidroksicimetna kiselina) i *p*-kumarinska kiselina (4-hidroksicimetna kiselina) (Clifford, 2000). Drugi, manje zastupljeni derivati cimetne kiseline su: *m*-kumarinska kiselina, dimetoksicimetna kiselina, trihidroksicimetna kiselina i izoferulična kiselina (Kuhnert i sur., 2012).

Robiquet i Boutron 1837. godine prvi put spominju spoj klorogenska kiselina. Termin klorogenske kiseline (CGAs) je uveo Payen 1846. godine. Naposljetku, 1942. godine, Fischer i Danschat su pokazali da su CGAs kafeoil-kina kiselina esteri.

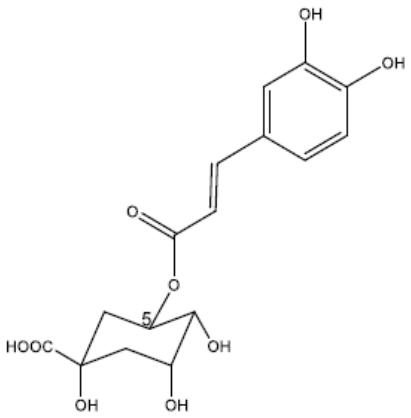
Klorogenske kiseline (CGAs) su skupina spojeva koja nastaje esterifikacijom (-)-kina kiseline s nekom od hidroksicimetnih kiselina (ferulična, kafeinska ili *p*-kumarinska), a prikazane su na **Slici 6** (Clifford, 1999; 2000). Koristeći IUPAC nomenklaturu, najzastupljenija klorogenska kiselina u biljnom materijalu je 5-*O*-kafeoil-kina kiselina (5-CQA) (Kuhnert i sur., 2012).



Slika 6 Kemijska struktura kina kiseline (QA), kafeinske kiseline (CFA) i ferulične kiseline (FA)

CGAs mogu biti podijeljene prema identitetu, broju i položaju pojedinih acilnih skupina (Clifford, 2000).

Klorogenske kiseline prisutne u visokim koncentracijama u zelenom zrnu kave (do 14 %) imaju značajan utjecaj u određivanju kvalitete kave i oblikovanju okusa kave (Carelli i sur., 1974; Farah, 2006). Ovi spojevi imaju nekoliko svojstava koji djeluju pozitivno na zdravlje, što je uglavnom objašnjeno njihovim snažnim antiradikalnim utjecajem. Osim toga, pokazali su hipoglikemijsko, antivirusno i hepatoprotektivno djelovanje (Basnet i sur., 1996; Trugo, 2001; Trute i sur., 1997).



Slika 7 Kemijska struktura 5-CQA

5-CQA ili [1,3,4,5-tetrahidroksicikloheksan karboksilna kiselina 3-(3,4-dihidroksicimetat)] sadrži u svojoj kemijskoj strukturi karboksilnu grupu na cikloheksanskom prstenu i dvije –OH skupine na kateholnom dijelu molekule (**Slika 7**). Na ta tri mjesta odvijaju se najvažnije kemijske reakcije 5-CQA s ostalim molekulama (Tomac, 2016).

Biljka proizvodi velike količine CGAs, od kojih su mnogi izomeri jedan drugog. Najveći izvor u smislu broja klorogenskih kiselina su plantaže kave, gdje je u zelenim zrnima kave dosad identificirano 70 različitih klorogenskih kiselina. Dodatnih 20 derivata je identificirano u lišću kave (Clifford i sur., 2008). Ukupno, zrno kave biosintetizira oko 10 % svoje suhe tvari kao klorogenske kiseline. Ukupna količina CGAs u zelenom zrnu kave ovisi o vrsti kave, stupnju sazrijevanja, poljoprivrednoj praksi, klimi i tlu (Farah i sur., 2005).

2.2.2. Kemijske promjene u prženom zrnu kave

Sastav zrna kave se uveliko mijenja tijekom postupka prženja, pojedini spojevi u potpunosti nestaju, a neki nastaju, uključujući bioaktivne spojeve i tvari visoke i srednje hlapljivosti, koji su od velike važnosti za aromu i okus kave kao napitka. Dio proteina se tijekom postupka prženja razgradi, a slobodne aminokiseline gotovo u potpunosti nestaju. Postupak prženja razgrađuje trigoneline, proizvodeći različite spojeve kao što su nikotinska kiselina i hlapljivi spojevi piroli i piridini (Flagment i sur., 1968; Trugo i Macrae, 1984). Polimerni, smeđi produkti Maillardove reakcije, poznatiji kao melanoidini su rezultat ciklizacije, dehidratizacije, izomerizacije i kondenzacije (Ludwig i sur., 2014). Sadržaj kafeina je nepromijenjen, iako može doći do malog gubitka zbog sublimacije (Farah, 2012).

Zbog termičke nestabilnosti, klorogenske kiseline podliježu različitim kemijskim reakcijama poput izomerizacije, epimerizacije, laktonizacije, hidrolize i nastanka molekula male molekularne mase (fenoli i kateholi). Ovisno o stupnju prženja, ukupni sadržaj klorogenskih kiselina će se smanjiti na manje od 1 % izvornog sadržaja. Sadržaj klorogenskih kiselina u komercijalnoj prženoj kavi se kreće od 0,5-6 g/100 g suhe tvari (Farah, 2012). Oko 10 % klorogenskih kiselina se ugradi u laktone tijekom postupka prženja koji doprinose gorčini kave, a utječu i na njezinu kvalitetu (Schrader i sur., 1996).

Raznovrsnost i koncentracija hlapljivih komponenata u prženoj kavi ovisi o sastavu nehlapljivih komponenata u sirovom zrnu i uvjetima prženja (Antonio i sur., 2011; Toci i Farah, 2008).

2.2.3. Utjecaj na zdravlje

Fenolnim spojevima pripisuju se mnoga terapijska djelovanja, kao što je antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno i antikancerogeno, a znatno utječu na boju i okus hrane. Antiradikalni učinci u kavi mogu se pripisati klorogenskim kiselinama. Zaštitna uloga

klorogenskih kiselina u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti “hvatanja” elektrona slobodnog radikala (Ferrali i sur., 1997).

Antiradikalni utjecaj većine polifenola ovisi o rasporedu i ukupnom broju hidroksilnih skupina (Burda i Oleszek, 2001; Cao i sur., 1997). S obzirom na položaj i broj hidroksilnih skupina u molekuli, postoji razlika u antiradikalnom učinku. Najbolje antiradikalno djelovanje ima kafeinska kiselina, potom ferulična kiselina i zatim *p*-kumarinska (Shahidi i Wanasundara, 1992).

Utvrđena je veza konzumacije kave i nižeg rizika kardiovaskularnih bolesti. Umjeren unos kave povezan je uz 30% manji rizik u odnosu na nekonzumente. S druge strane, visok unos kave, više od 600 mL (nefiltrirane, s uljnom frakcijom) dnevno nepoželjno utječe na kardiovaskularni sustav i konzumenti imaju tri puta veće šanse za razvoj akutnog koronarnog sindroma. Provedene studije su utvrdile manju osjetljivost LDL-ova na oksidaciju, niže razine ukupnog i LDL kolesterola te niži krvni tlak (Klapec i Strelec, 2018). Različite epidemiološke studije su utvrdile blagotvoran učinak kave na jetru (Ding, 2014) uz niži rizik masne jetre, fibroze i hepatocelularnog karcinoma kod uživatelja.

Nekoliko studija povezuje unos kave sa smanjenim rizikom pojave nekih vrsta raka. Utvrđena je čvrsta povezanost između konzumacije kave i smanjenog rizika raka endometrija i hepatocelularnog karcinoma. U slučaju redukcije rizika hepatocelularnog raka, rezultati istraživanja pokazali su da konzumacija jedne ili više šalica dnevno smanjuje mogućnost razvoja raka, ili smrti uzrokovane ovom vrstom raka, za oko 50 % (Inoue i sur., 2005; Kurozawa i sur., 2005).

Parkinsonova bolest je posljedica odumiranja dopaminergičkih neurona u dijelu mozga poznatijem kao *Substantia nigra* koji upravlja sustavima nagrade i kretanja. Rezultati dobiveni do sada u epidemiološkim istraživanjima ukazuju na povezanost između potrošnje kave i manjeg rizika od Parkinsonove bolesti. Međutim, mehanizmi koji su uključeni nisu u potpunosti shvaćeni i prerano je preporučiti povećanje konzumacije kave kako bi se spriječila Parkinsonova bolest (Ludwig i sur., 2014).

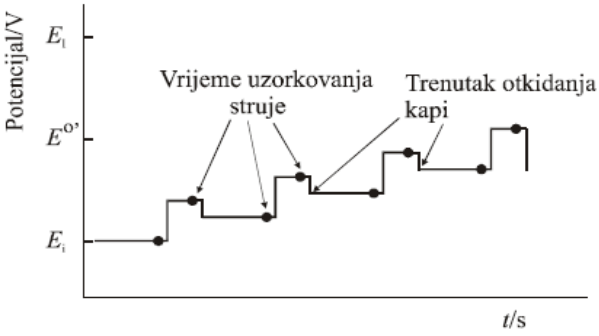
2.3. Metode za određivanje fenolnih spojeva

2.3.1. Elektroanalitičke metode

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju (Wang, 2000). Prema signalu pobude, dijele se na: potenciometriju, voltametriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenciometriju, kulometriju i konduktometriju.

Diferencijalna pulsna voltamerija

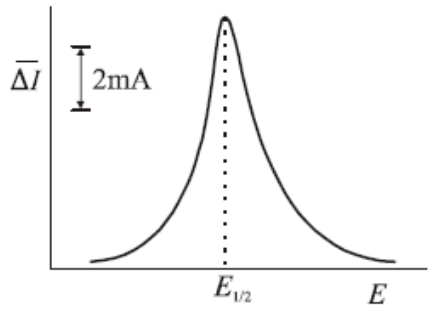
Diferencijalna pulsna voltametrija je voltametrijska tehnika kod koje mali pravokutni naponski impuls, amplitude od 10 do 100 mV, se superponira (pridružuje) na stepeničasto rastući napon pobude. Mjerenje se provodi tako da se potencijal radne elektrode tijekom mjerenja održava na osnovnom potencijalu (E_i). Pri tom osnovnom potencijalu struja ćelije (redukcije ili oksidacije) je neznatna. U određenom trenutku na osnovni napon (E_i) superponira se pravokutni naponski impuls kratkoga trajanja. Takvim pravokutnim impulsom izaziva se elektrodna reakcija redukcije odnosno oksidacije (Piljac, 2010).



Slika 8 Oblik signala pobude i vremena primjene naponskog impulsa te vremena uzorkovanja i mjerenja struje ćelije u diferencijalnoj pulsnoj voltametriji (Piljac, 2010)

Struja se uzorkuje i mjeri prije svakog slijednog naponskog impulsa i na kraju trajanja impulsa. Kao signal odziva zapisuje se razlika jakosti struja prije i nakon naponskog impulsa, i to kao funkcija potencijala elektrode, odnosno, amplitude stepeničasto rastućeg osnovnog signala pobude. Odakle i potječe naziv metode, jer se mjeri diferencija (razlika) u struji ćelije koja je uzrokovana naponskim impulsom. Oblik signala odziva, odnosno oblik promjene razlike struje

prije i nakon primjene naponskog impulsa u ovisnosti o potencijalu elektrode ima oblik pika (Piljac, 2010).



Slika 9 Diferencijalni pulsni voltamogram (Piljac, 2010)

2.3.2. Spektroskopske metode

Spektroskopska tehnika je optička metoda važna za instrumentalnu kemijsku analizu. Spektroskopija je grana znanosti koja se bavi svjetlošću, odnosno vidljivim zračenjem razlučenom u komponente, valne duljine, koje tvore spektar. Spektroskopske metode se dijele na apsorpcijska spektroskopija (ultraljubičasta i vidljiva (UV/Vis) i infracrvena (IR)), atomska spektroskopija, masena spektroskopija (MS), nuklearna magnetska rezonancija (NMR) i elektron spinska rezonancija.

Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

Spektrofotometrija je kvantitativno mjerenje refleksijskih ili transmisijskih svojstava nekog materijala s obzirom na valne duljine. Spektrofotometrija može mjeriti u vidljivoj svjetlosti, u ultraljubičastom području ili u infracrvenom području elektromagnetskog spektra. Ultraljubičasta i vidljiva (UV/Vis) spektroskopija zasnivaju se na osobini molekula da apsorbiraju elektromagnetsko zračenje ultraljubičastog (100-380 nm) i vidljivog (380-800 nm) dijela spektra (Penner, 2010).

Uređaj koji se koristi u spektrofotometriji je spektrofotometar. Spektrofotometar može mjeriti intenzitet različitih valnih duljina. Sastoji se od izvora svjetlosti, selektora valne duljine, monokromatora, spremnika za uzorke i detektora. Izvor svjetlosti emitira svjetlosnu zraku konstantne energije. Monokromator selektira jednu valnu duljinu i propušta je kroz uzorak koji se nalazi u kiveti. Mjerni postupak se sastoji od odabira valne duljine (mjerenje se uglavnom provodi u apsorpcijskom maksimumu) i nakon odabira, mjeri se nekoliko različitih koncentracija tvari, te se koncentracije prikažu u ovisnosti o apsorbanciji na odabranoj valnoj

duljini, što predstavlja kalibracijsku krivulju (Jakobek Barron, 2018). Ukoliko uzorak apsorbira svjetlost, intenzitet propuštenog zračenja se smanjuje. Za UV/Vis spektroskopiju koriste se kivete načinjene od kvarcnog stakla. Staklo se može koristiti za vidljivu, ali ne i za ultraljubičastu spektroskopiju jer apsorbira valne duljine ispod 300 nm (Penner, 2010).

Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija (UV-Vis) je pomoćna (a često i glavna) metoda za identifikaciju prirodnih komponenata kao što su: biljni pigmenti (karotenoidi), ukupni fenoli, flavonoidi, ukupni antocijani, monomerni antocijani i ukupna antioksidacijska aktivnost. Prednosti ove metode nad ostalim metodama su u izuzetno visokoj osjetljivosti i jednostavnom rukovanju instrumentom (Jia i sur., 1999; Jakobek Barron, 2018).

Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteu metoda)

Folin-Ciocalteu metoda najpopularnija je metoda za određivanje ukupnih polifenola. Metodu su izvorno razvili Folin i Ciocalteu 1927. godine. Ova tehnika mjeri promjenu boje iz žute, dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, u tamnoplavu u prisutnosti uzoraka. Mjeri se spektrofotometrom pri valnim duljinama 750-765 nm. Najčešći standard koji se koristi je galna kiselina i rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline po litri ili gramu uzorka. Jedan od nedostataka ove metode je taj što su moguće interferencije nekih drugih redukcijskih sredstava. Glavne prednosti metode su jednostavnost, preciznost, ponovljivost i jeftina je u odnosu na druge metode (Singleton i sur., 1999).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je bio:

- Primjena elektrokemijske tehnike diferencijalne pulsne voltametrije na:
    - identifikaciju klorogenskih kiselina, 5-*O*-kafeoil-kina kiseline, u uzorcima *instant* kava,
    - utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na uzorke *instan*t kava,
    - utjecaj fosfatnog pufera različitih pH vrijednosti na elektrokemijska svojstva *instant* kava,
    - kvantifikaciju sadržaja klorogenskih kiselina, odnosno 5-*O*-kafeoil-kina kiseline u *instant* uzorcima kava te

• odrediti koncentraciju ukupnih polifenola iz *instant* kava primjenom spektroskopske Folin-Ciocalteu metode i

• usporediti sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina primjenom spektrofotometrijske i elektrokemijske tehnike.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Uzorci kava

U ovom radu analizirane su četiri vrste instant kave: Jacobs Cronat Gold, Jacobs Monarch, Franck Classical i Nesscaffe Gold. Uzorci su kupljeni u lokalnim hrvatskim trgovinama. Za provođenje voltametrijske tehnike i spektrofotometrijske metode, izvagan je 1 g ± 0,01 g pojedinog uzorka.

Priprava vodenog ekstrakta instant kave

Uzorci vodenih ekstrakata *instant* kava pripremljeni su tako što je u 100 mL ultračiste vode zagrijane na temperaturu 80 °C, dodano 1 g kave. Dobiveni vodeni ekstrakt kave miješa se na magnetnoj miješalici u trajanju od 3 minute nakon čega se profiltrira preko grubog filter papira u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL te profiltrira kroz mikrofilter (PTFE filter). Ovako pripremljeni vodeni ekstrakt kava upotrebljava se za elektrokemijsku i spektrofotometrijsku analizu.

3.2.2. Priprema otopina

Priprema osnovnog elektrolita za mjerenje primjenom diferencijalne pulsne voltametrije

Otopina osnovnog elektrolita za elektrokemijsko mjerenje, fosfatnog pufera (PB), pripremljena je u koncentraciji od 0,1 mol L^{-1}, pH vrijendosti 7,0. Otopina PB pripremljena je od NaH_2SO_4 x $2H_2O$ i Na_2HPO_4 x $12H_2O$. Za pripremu otopine PB te vodenih ekstrakata *instant* kava korištena je ultračista voda (vodljivost vode < 0,1 µS 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, $c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol L^{-1} u metanolu HPLC čistoće i čuvana zaštićena od svjetla u hladnjaku na temperaturi 4 °C.

Elektrokemijska analiza

Voltametrijsko mjerenje provedeno je pomoću kompjutorski kontroliranog elektrokemijskog sustava µAutolab (Eco-Chemie, Utrecht, Nizozemska). Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi. Elektrokemijska karakterizacija provedena je u staklenoj stacionarnoj troelektrodnoj ćeliji gdje je radna elektroda bila od staklastog ugljika (GCE), referentna Ag/AgCl i žica platine kao protuelektroda. Uvjeti mjerenja standarda i uzoraka primjenom diferencijalne pulsne voltametrije prikazani su u **Tablici 1.**

Tablica 1 Eksperimentalni uvjeti diferencijalne pulsne voltametrije

Parametar	Iznos
Početni potencijal (mV)	-200
Konačni potencijal (mV)	1000
Brzina polarizacije (mV/s)	5
Korak potencijala (mV)	2
Amplituda pulsa (mV)	50

Ukupni sadržaj klorogenskih kiselina u kavi, dobivenih DPV 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.

Spektrofotometrijska analiza

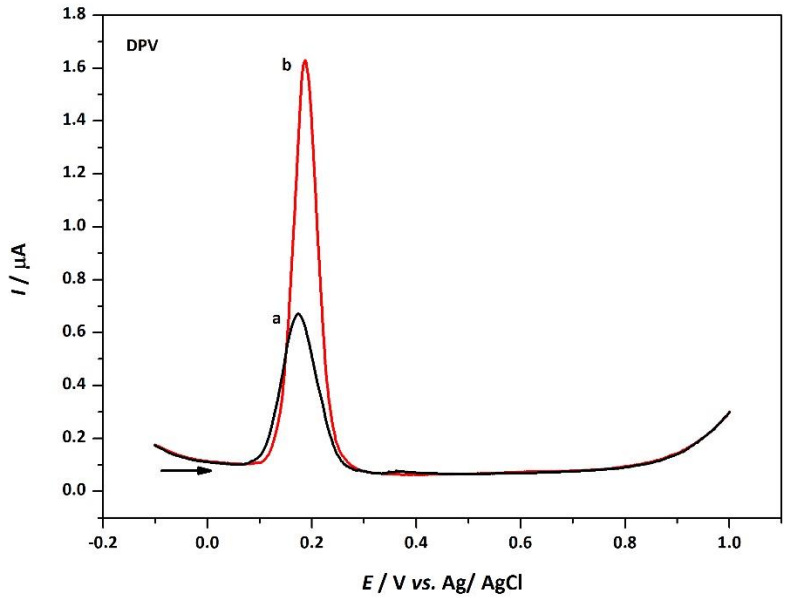
Spektrofotometrijska analiza provedena je na spektrofotometru UV 2005, Selecta, Španjolska primjenom Folin-Ciocalteu metode (Singleton i sur., 1999.; Waterhouse, 2001.). Pripremljenim

vodenim ekstraktima *instant* kava (20 µL) dodana je demineralizirana voda u količini od 1580 µL i 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa. U reakcijsku smjesu dodano je 300 µL otopine Na_2CO_3 u koncentraciji 200 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. Apsorbancije uzoraka *instant* kava mjerene su na valnoj duljini od 765 nm. Također su mjerene apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm za različite koncentracije galne kiseline i 5-CQA te su izrađeni baždarni pravci. Rezultati su izraženi u mg galne kiseline ekvivalent po 100 g kave odnosno mg 5-CQA ekvivalent po 100 g kave. Mjerenja su u svakom uzorku izvršena pet puta.

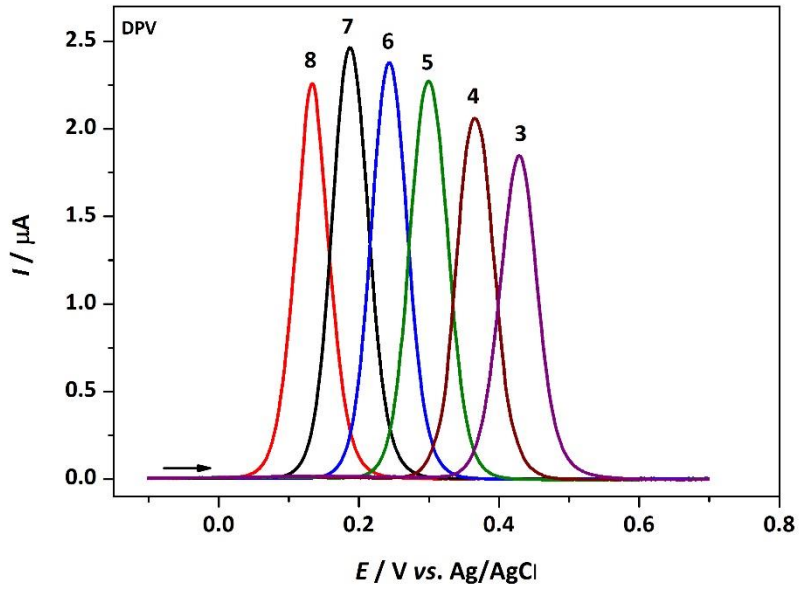
4. REZULTATI

4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE 5 – *O* – KAFEOIL-KINA KISELINE PRIMJENOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE

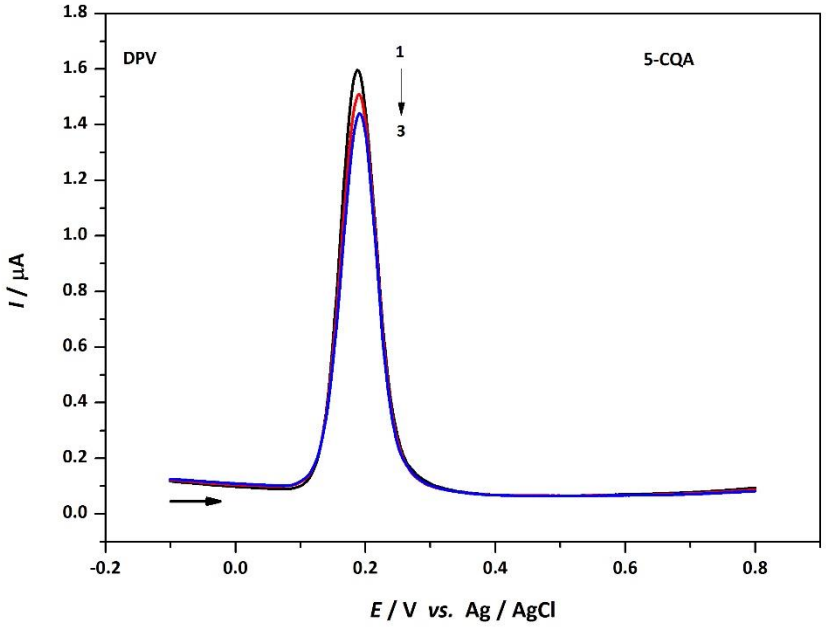
Ispitan je utjecaj kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije i koncentracije analita na elektrokemijsko ponašanje 5-*O*-kafeoil-kina kiseline primjenom diferencijalne pulsne voltametrije. Utjecaj primjenjenih eksperimentalnih uvjeta prikazan je na **Slikama 10-13.**



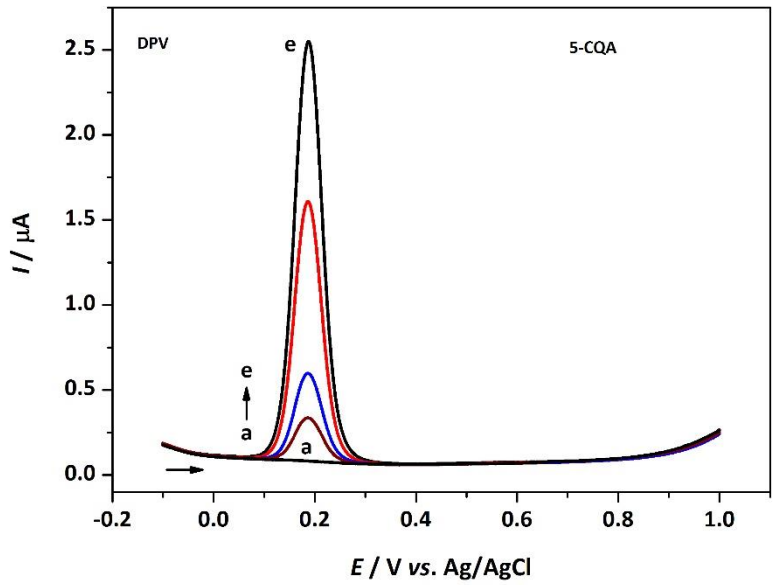
Slika 10 Utjecaj kemijske strukture a) CFA i b) 5-CQA, c = 5 x 10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PB pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1.**



Slika 11 Utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita 0,1 mol L^{-1} PB puferima pH 3 do pH 8 na otopinu 5-CQA, *c* = 1 x 10^{-4} mol L^{-1}. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.



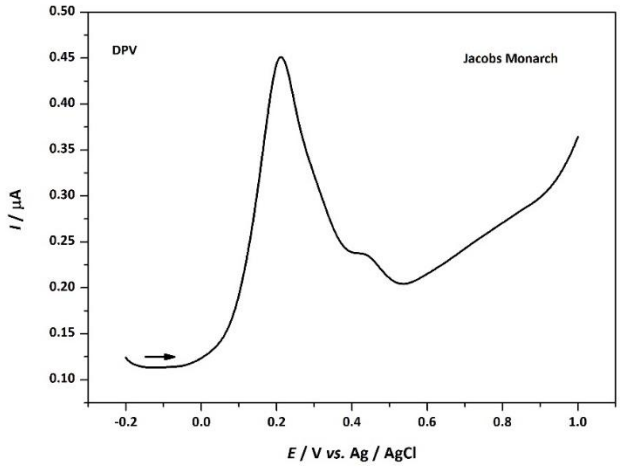
Slika 7 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na DP voltamograme otopine 5-CQA, *c* = 5 x 10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PB pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.



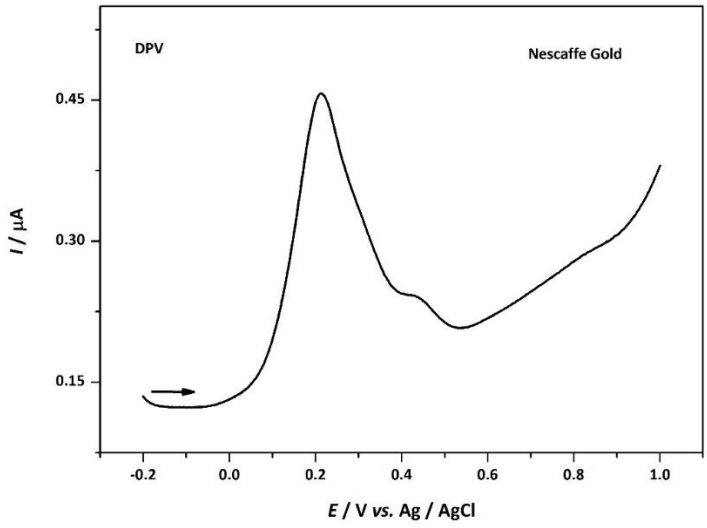
Slika 13 Utjecaj koncentracije otopine 5-CQA na DP voltamograme u 0,1 mol L^{-1} PB pH 7,0. DP voltamogrami otopine 5-CQA u rasponu koncentracija a) 0 µmol L^{-1}, b) 5 µmol L^{-1}, c) 10 µmol L^{-1}, d) 30 µmol L^{-1} i e) 50 µmol L^{-1}. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.

4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE VODENIH EKSTRAKATA *INSTANT* KAVA PRIMJENOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE

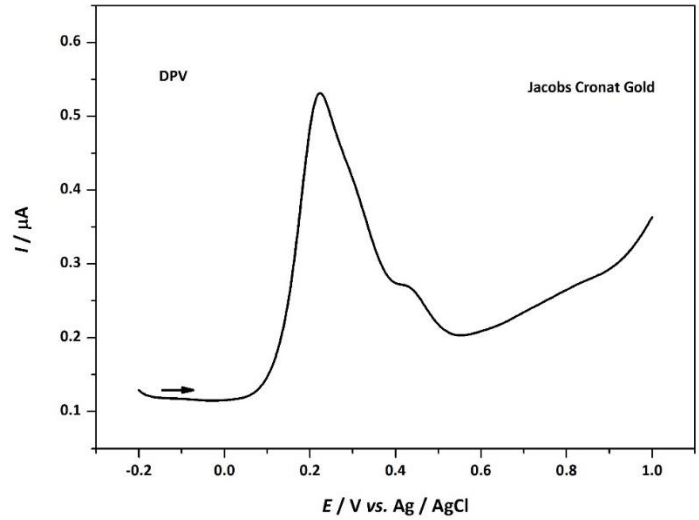
Na **Slikama od 14 do 17** prikazani su DP voltamogrami vodenih ekstrakata *instant* kava pripremljenih prema opisu priprave u poglavlju 3. u 0,1 mol L^{-1} PB pH 7,0. Ispitani vodeni ekstrakti *instant* kava razrijeđeni su u omjeru 1:50 (*DF*=50).



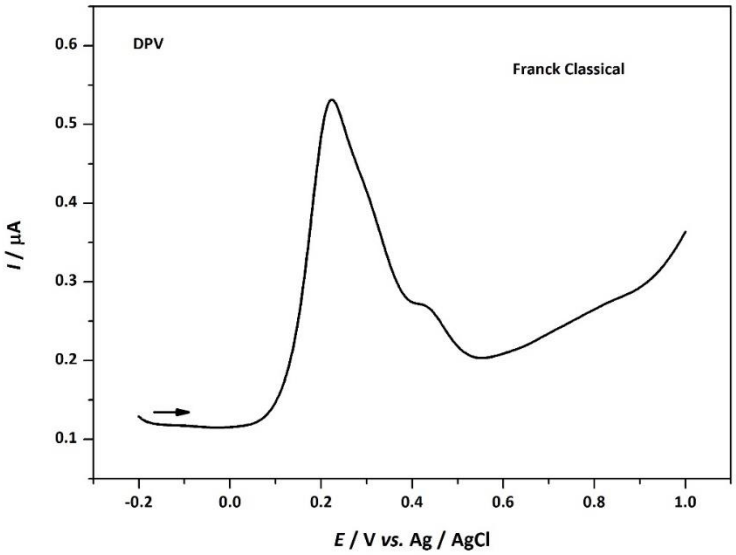
Slika 14 DP voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Monarch (*DF*=50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.



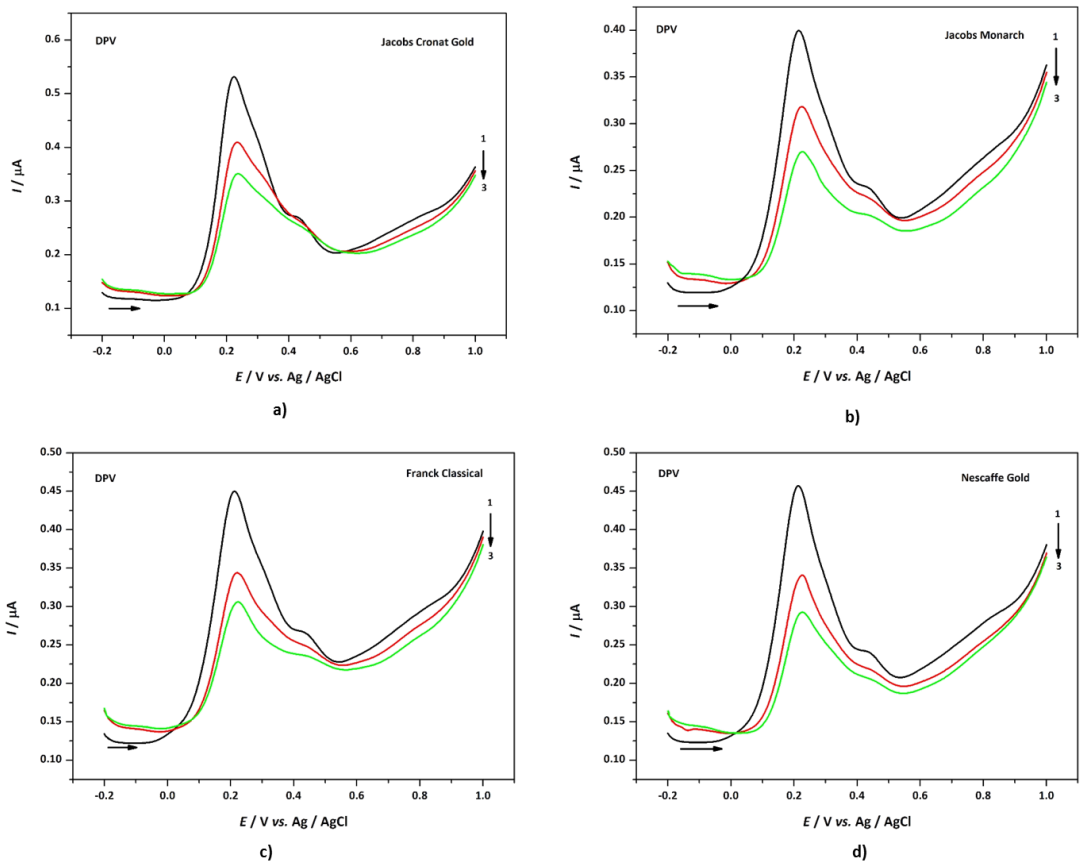
Slika 15 DP voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescaffe Gold (*DF*=50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.



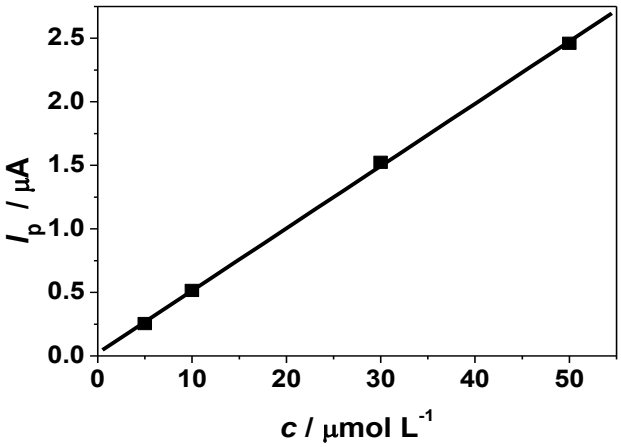
Slika 16 DP voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Cronat Gold (*DF*=50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.



Slika 17 DP voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Franck Classical (*DF*=50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.



Slika 18 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na DP voltamograme na vodene ekstrakte *instant* kava a) Jacobs Cronat Gold, b) Jacobs Monarch, c) Franck Classical i d) Nescaffe Gold (*DF*=50) u 0,1 mol L^{-1} PB pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 1**.



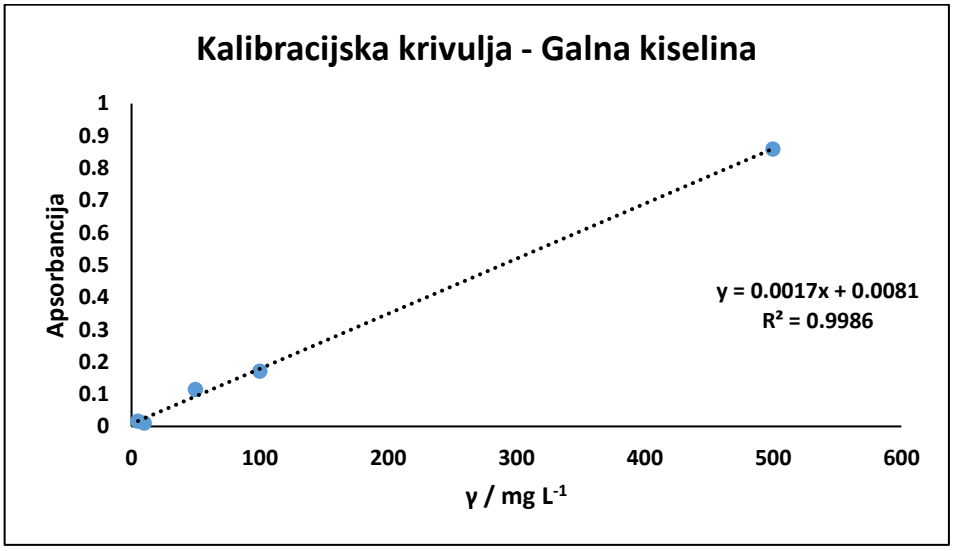
Slika 19 Ovisnost struje pika (I_p) o koncentraciji otopine 5-CQA

Tablica 2 Količina ukupnih klorogenskih kiselina u ispitanim *instant* kavama

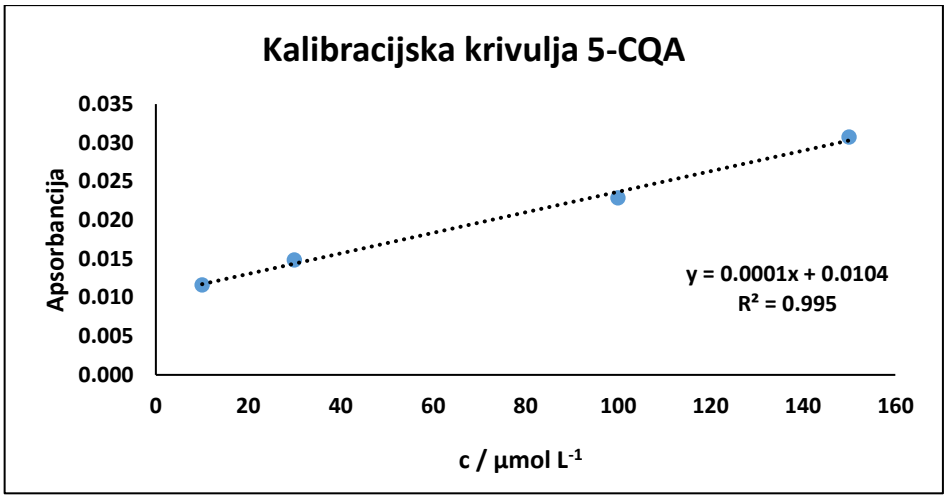
Uzorak *instant* kave	**Ukupne klorogenske kiseline (mg 5-CQAE/100g)**
Jacobs Monarch	1853,2
Nescaffe Gold	1803,9
Jacobs Cronat Gold	2199,7
Franck Classical	1848,5

4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA

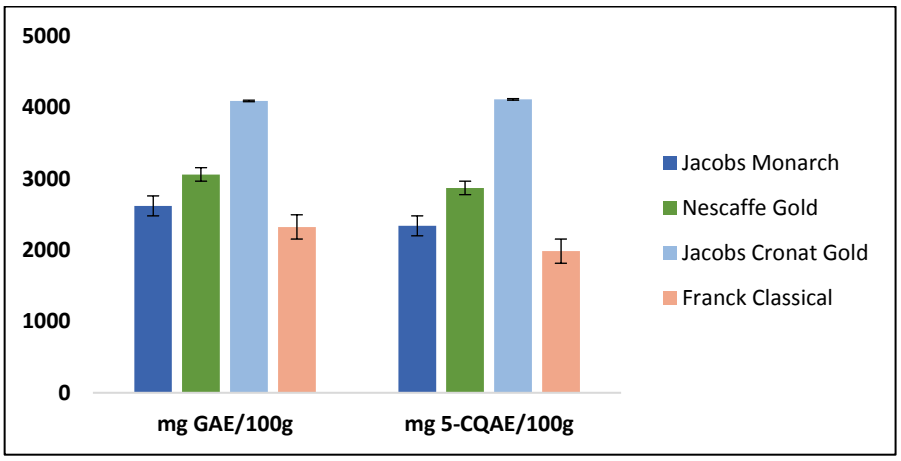
Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola provedeno je pomoću Folin-Ciocalteu metode. Rezultati sadržaja izraženi su preko mg galne kiseline ekvivalent po 100 g uzorka odnosno mg 5-CQA ekvivalent po 100 g uzorka pomoću baždarnih pravaca prikazanih na **Slici od 20 do 21**.



Slika 20 Ovisnost apsorbancije (*A*) o koncentraciji otopine galne kiseline



Slika 21 Ovisnost apsorbancije (*A*) o koncentraciji otopine 5-CQA



Slika 22 Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima instant kava primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode

4.4. STATISTIČKA USPOREDBA PODATAKA

Tablica 3 Slaganje rezultata dobivenih primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode i diferencijalne pulsne voltametrije

	UP mg GAE/ 100g	UP mg 5-CQAE / 100g	DPV mg 5-CQAE / 100g
UP mg GAE/ 100g	1.00	0.99	0.97
UP mg 5-CQAE / 100g	0.99	1.00	0.94
DPV mg 5-CQAE / 100g	0.97	0.94	1.00

5. RASPRAVA

5.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE 5-*O*-KAFEOILKINA KISELINE

Ispitan je utjecaj kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije i koncentracije analita na elektrokemijsko ponašanje 5-*O*-kafeoil-kina kiseline primjenom diferencijalne pulsne voltametrije.

Na **Slici 10** prikazani su DP voltamogrami CFA i 5-CQA te se uočava jedan jasno izraženi anodni (oksidacijski) pik na potencijalu od 175 mV za CFA i 187 mV za 5-CQA. Struja anodnog pika 5-CQA značajno je veća od struje pika CFA, vjerojatno zbog utjecaja elektronakceptorskih i elektrondonorskih skupina iz molekule 5-CQA. Nadalje, ispitan je utjecaj pH vrijednosti otopina pufera, u rasponu od pH 3 do pH 8 na elektrokemijsko ponašanje 5-CQA i prikazan na **Slici 11**. Uočava se porast struje pika od pH 3 do pH 7 pri čemu doseže maksimum pri pH 7. Daljnjim povećanjem pH vrijednosti struja pika opada te je pH 7 izabran kao radna pH vrijednost. Pri pH 7, 5-CQA anion doseže maksimalnu koncentraciju u otopini jer ovaj anion lakše oksidira nego neutralna molekula. Zatim je ispitan utjecaj višestruke uzastopne polarizacije otopine 5-CQA. Na **Slici 12** prikazan je DP voltamogram gdje se uočava pad struje pika tijekom druge i treće uzastopne polarizacije otopine 5-CQA te pomak potencijala prema većim vrijednostima. Strujni odziv oksidacijskog pika smanjuje se uzastopnom višestrukom polarizacijom, uslijed adsorpcije oksidacijskih produkata na površini elektrode te je difuzija molekula iz otopine otežana. Također je ispitan utjecaj koncentracije analita u rasponu od 5 do 50 µmol L^{-1} (**Slika 13**). Struja pika linearno raste kako se povećavaju koncentracije 5-CQA. Kalibracijski pravac u linearnom području metode prikazan je jednadžbom:

$$y = 0,022+0,05x$$

Osjetljivost metode izražena je preko granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ). Izračunate LOD i LOQ za korištenu DPV metodu iznose: LOD = 1,2 x 10^{-3} mol L^{-1} i LOQ = 4,1 x 10^{-3} mol L^{-1}.

5.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE UZORAKA *INSTANT* KAVA

Elektrokemijsko ponašanje klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima *instant* kava provedeno je primjenom diferencijalne pulsne voltametrije, a s ciljem karakterizacije klorogenskih kiselina u uzorcima *instant* kava.

Na **Slikama 14 - 17** prikazani su DP voltamogrami vodenih ekstrakata *instant* kava u 0,1 mol L^{-1} PB pH vrijednosti 7. Uzorci vodenih ekstrakata *instant* kava razrijeđeni su u PB puferu u

omjeru 1:50. Na svim DP voltamogramima vodenih ekstrakata *instant* kava uočavaju se dva anodna pika. Prvi anodni pik je jasno izražen i pojavljuje se u rasponu potencijala od 212 do 224 mV što odgovara rasponu potencijala od 5-CQA (**Slike 10-13**). Drugi anodni pik je slabo izražen i nalazi se u rasponu potencijala od 400 do 440 mV što vjerojatno odgovara feruloil-kina kiselinama.

Na **Slici 18** prikazani su višestruki uzastopni DP voltamogrami ispitanih vodenih ekstrakata *instant* kava. Na prikazanim DP voltamogramima uočava se pad strujnog odziva u drugoj i trećoj polarizaciji te blagi pomak potencijala prema pozitivnijim vrijednostima što upućuje na jednako elektrokemijsko ponašanje ispitanih vodenih ekstrakata kava kao i kod otopine 5-CQA. Odnosno strujni odzivi u drugoj i trećoj polarizaciji se smanjuju uslijed nastanka oksidacijskih produkata na površini radne elektrode.

Nadalje, izvršena je kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima *instant* kava primjenom diferencijalne pulsne voltametrije. Kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina izvršena je primjenom kalibracijskog pravca prikazanog na **Slici 19**. Ukupan sadržaj ispitanih vodenih ekstrakata *instant* kava prikazan je u **Tablici 2**, a izražen je kao mg 5-CQAE / 100g kave. Iz **Tablice 2** uočava se podjednak sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina u ispitanim uzorcima što je u skladu s literaturnim referencama (Yardim, 2012, Ziyatdinova i sur., 2013, Tomac i Šeruga, 2016).

5.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA

Primjenjena je spektrofotometrijska analiza za određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom u ispitanim uzorcima *instant* kava. Sadržaj ukupnih polifenola određen je prema kalibracijskom pravcu otopine galne kiseline (**Slika 20**) i otopine 5-CQA (**Slika 21**). Prema sadržaju u kavama, 5-CQA dominira te je zbog toga upotrebljena za kreiranje kalibracijskog pravca i određivanje sadržaja ukupnih polifenola. Na **Slici 22** prikazan je sadržaj ukupnih polifenola izražen preko sadržaja galne kiseline i 5-CQA. Dobiveni sadržaji ukupnih polifenola primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode u skladu su s literaturnim referencama (Kreicbergs i sur., 2011).

Dobiveni sadržaji ukupnih polifenola primjenom diferencijalne pulsne voltametrije i spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode izraženi su preko Pearsonovog koeficijenta korelacije na razini pogreške $p<0,05$ (**Tablica 3**). Iz **Tablice 3** uočava se izvrsno slaganje (0,94-

0,99) između rezultata sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina dobivenih primjenom obje metode.

6. ZAKLJUČAK

6. Zaključak

Na osnovi istraživanja ovog diplomskog rada izvedeni su sljedeći zaključci:

- Ispitivana elektrokemijska svojstva 5-CQA primjenom diferencijalne pulsne voltametrije pokazala su da primijenjeni eksperimentalni uvjeti : kemijska struktura, pH vrijednost osnovnog elektrolita, višestruka uzastopna polarizacija i koncentracija analita utječu na elektrokemijsko ponašanje 5-CQA.
- Usporedbom 5-CQA i CFA kao strukturne jedinice, uočava se pomak oksidacijskog potencijala prema pozitivnijim vrijednostima i porast strujnog odziva od CFA prema 5-CQA na DP voltamogramima, što je posljedica utjecaja esterifikacije.
- Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije radne elektrode vidljiv je u opadanju strujnog odziva i vrlo malom pomaku potencijala u drugoj i trećoj polarizaciji prema pozitivnijim vrijednostima, a zbog nastanka oksidacijskih produkata tijekom polarizacija na površini radne elektrode.
- Utjecaj promjene pH vrijednosti osnovnog elektrolita, 0,1 mol L^{-1} fosfatnog pufera, na DP voltamograme pokazuje porast strujnog odziva do pH 7, a daljnjim povećanjem pH vrijednosti strujni odziv opada.
- Utjecaj promjene koncentracije analita pokazao je linearnost metode u rasponu koncentracije od 5 do 50 μmol L^{-1} 5-CQA.
- Elektrokemijsko ponašanje *instant* kava ispitano je diferencijalnom pulsnom voltametrijom gdje se na svim DP voltamogramima jasno uočava dva strujna odziva koji odgovaraju smjesi CQAs i diCQAs te FQAs.
- Kvantifikacija sadržaja 5-CQA u *instant* kavama provedena je primjenom kalibracijskog pravca. Ispitane *instant* kave imaju sličan sadržaj 5-CQA.
- Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola u *instant* kavama provedeno je primjenom Folin-Ciocalteu metodom. Sadržaj ukupnih polifenola izražen prema sadržaju 5-CQA, u *instant* kavama je podjednak.
- Statistička obrada podataka dobivenih voltametrijskom i spektrofotometrijskom metodom uspoređen je primjenom linearne regresije i pokazao je izvrsno slaganje rezultata.

7. LITERATURA

Alves RMV, Bordin RM: Estimativa de vida de café solúvel por modelo matemático. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18:19–24, 1998.

Alves RMV, Milanez CR, Padula M: Embalagens alternativas para café solúvel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20:204–211, 2000.

Antonio AG, Iório NLP, Pierro VSS, Candreva MS, Farah A, dos Santos KRN, Maia LC: Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Archives of Oral Biology* 56(6):556–564, 2011.

Babić J: *Kava*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013. http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Tehnologija_ugljikohidrata_i_konditorskih_proizvoda/TEHNOL%20KONDIT%20I%20SROD%20PROIZV/ [18.3.2019.]

Basnet P, Matsushige K, Hase K, Kadota S, Namba T: Four di-0-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent Hepatoprotective activity in experimental liver Injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19:1479-1484, 1996.

Burda S, Oleszek W: Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2774-9, 2001.

Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine* 22:749-60, 1997.

Carelli MLC, Lopes CRO, Monaco LC: Chlorogenic acid content in species of Coffea and selections of Arabica. *Turrialba* 24:398-401, 1974.

Cheynier V: Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81:223S-229S, 2005.

Clifford MN: Chlorogenic acids and other cinnamates—Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(3):362–372, 1999.

Clifford MN: Chlorogenic acids and other cinnamates—Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7):1033–1043, 2000.

Clifford MN, Kirkpatrick J, Kuhnert N, Roozendaal H, Salgado PR: LC-MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chemistry* 106:379–385, 2008.

Czerny M, Grosch W: Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:868–872, 2000.

Ding WX: Drinking coffee burns hepatic fat by inducing lipophagy coupled with mitochondrial β-oxidation. *Hepatology* 59:1235-1238, 2014.

Dutra ER, Oliveira LS, Franca AS, Ferraz VP, Afonso RJC: A preliminary study on the feasibility of using the composition of coffee roasting exhaust gas for the determination of the degree of roast. *Journal of Food Engineering* 47:241–246, 2001.

EPA: United States Environmental Protection Agency: *Coffee Roasting*, 2010.

Farah A, De Paulis T, Trugo LC, Martin PR: Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones*. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1505-1513, 2005.

Farah A, Monteiro MC, Calado V, Franca A, Trugo LC: Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry* 98:373-380, 2006.

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

Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M: Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters* 416:123-9, 1997.

Franca AS, Mendonça JCF, Oliveira SD: Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *Food Science and Technology* 38:709–715, 2005.

Fujioka K, Shibamoto T: Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry* 106:217–221, 2008.

Gonzalez-Rios O, Suarez-Quiroza ML, Boulanger R, Barel M, Guyot B, Guiraud JP i ostali: Impact of "ecological" post-harvest processing on coffee aroma: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis* 20:289–296, 2007a.

Gonzalez-Rios O, Suarez-Quiroza ML, Boulanger R, Barel M, Guyot B, Guiraud JP i ostali: Impact of "ecological" post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis* 20:297–307, 2007b.

Inoue M, Yoshimi I, Sobue T, Tsugane S: Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: A prospective study in Japan. *Journal of the National Cancer Institute* 97:293–300, 2005.

Jakobek-Barron L: *Molekulska apsorpcijska spektroskopija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek,2017. http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Instrumentalne_metode_II/1%20dio%20predavanja/ [29.3.2019.]

Jia Z, Tangi M, Wu J: The determination of flavonoids contact in mulberry and scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64:555-559, 1999.

Klapec T, Strelec I: *Prehrambena biokemija.* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2018.

Kreicbergs V, Dimins F, Mikelsone V, Cinkmanis I: Biologically active compounds in roasted coffee. U *Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology* FOODBALT-2011: *Innovations for food science and production*, Jelgava, Latvia, 2011.

Kuhnert N, Karaköse H, Jaiswal R: Analysis of Chlorogenic Acids and Other Hydroxycinnamates in Food, Plants, and Pharmacokinetic Studies. U *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods,* str. 461-506. CRC Press, Boca Raton, 2012.

Kumazawa K, Masuda H: Investigation of the change in the flavor of a coffee drink during heat processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2674–2678, 2003.

Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, Sakata R, Fujita Y, Ichikawa S, Iwai N, Tamakoshi A: Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. *British Journal of Cancer* 93:607–610, 2005.

Ludwig IA, Clifford MN, Lean MEJ, Ashihara H, Crozier A: Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food & Function* 5(8): 1695-1717, 2014.

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

Neves C: A estória do café. *A estória do café*, str. 52. Instituto Brasileiro do Café, Assessoria de Relações Públicas, Rio de Janeiro, 1974.

Oliveira AL, Cabral FA, Eberlin MN, Cordello HMAB: Sensory evaluation of black instant coffee beverage with some volatile compounds present in aromatic oil from roasted coffee. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29:76–80, 2009.

Penner MH: Basic Principles of Spectroscopy. U: *Food analysis*, str. 375-385. Springer Science+Business Media, LLC, SAD, 2010.

Piljac I: Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. *Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,* Media Print, Zagreb, 2010.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M: Determination of chlorogenoc acid with lactones in roasted coffee. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:215S-217S, 2005.

Schrader K, Kiehne A, Engelhardt UH, Maier HG: Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:392±398, 1996.

Shahidi F, Wanasundara PKJ: Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32:67-103, 1992.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152–179, 1999.

Smith AW: Introduction. U *Coffee* str. 31-33. Elsevier Applied Science, London, 1985.

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

Toci A. T, Farah A: Volatile compounds as potential defective coffee seeds' markers. *Food Chemistry* 108:1133–1141, 2008.

Tomac I: Karakterizacija klorogenskih kiselina i analiza antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama kava primjenom elektrokemijskih metoda. *Doktorska disertacija.* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2016.

Trugo LC: Café: Composição química e potencial nutracêutico. Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas. Vol. II. U *Mercadante AZ et al (eds)*. Universidade de Campinas, Campinas, Sao Paolo, 2001.

Trugo LC, Macrae R: A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry* 15:219–227, 1984.

Trute A, Gross J, Mutschler E, Nahrstedt A: In Vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from Hedera helix. *Planta Medica* 63:125-9, 1997.

Wang J: *Analytical Electrochemistry*. Wiley-VCH, New York, 2000.

Waterhouse AL: Determination of Total Phenolics. U *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* I1.1.1-I1.1.8. John Wiley & Sons, New York, 2001.

Yardim Y: Electrochemical Behaviour of Chlorogenic acid at a Boron-Doped Diamond Electrode and Estimation of the Antioxidant Capacity in the Coffee Samples Based on Its Oxidation Peak. *Journal of Food Science* 77:C408-C413, 2012.

Ziyatdinova G, Aytuganova I, Nizamova A, Budnikov H: Differential Pulse Voltametric Assay of Coffee Antioxidant Capacity with MWNT-Modified Electrode. *Food Analytical Methods* 6:1629-1638, 2013.