

Karakterizacija klorogenskih kiselina iz mljevenih kava primjenom pravokutnovalne voltametrije

Lacković, Mario

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:109:110087>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Mario Lacković

**Karakterizacija klorogenskih kiselina iz mljevenih kava primjenom
pravokutnovalne voltametrije**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 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 mljevenih kava primjenom pravokutnovalne voltametrije

Mario Lacković, 0113138135

Sažetak: Kava je jedan od izvora polifenola, odnosno hidroksicimentnih kiselina. U hidroksicimne kiseline ubrajaju se kava kiselina, ferulična kiselina, klorogenske kiseline i druge. Klorogenske kiseline, prema svom sadržaju prevladavaju u kavi. Kava, prema epidemiološkim ispitivanjima ima antiupalni i antitumorski učinak, zatim sprječava nastanak kardiovaskularnih bolesti i upotrebljava se kod gubitka tjelesne mase. Pravokutnovalna voltametrijia ubraja se u analitičke, elektrokemijske metode. Prednost primjene ove metode je njezina preciznost, brzina i osjetljivost. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati elektrokemijsko ponašanje klorogenske kiseline u mljevenim kavama (Arabesca Minas, Barcaffa Classic, Franck Jubilarna Sensual i Gloria Minas) pomoću pravokutnovalne voltametrije. Ispitan je utjecaj promjene pH vrijednosti osnovnog elektrolita, kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije, frekvencije pobudnog signala te promjene koncentracije analita na elektrokemijsko ponašanje. Nadalje, provedena je kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina odnosno polifenola u uzorcima kava pomoću voltometrijske i spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode te su uspoređeni dobiveni rezultati. Sadržaj klorogenskih kiselina u svim mljevenim kavama je podjednak.

Ključne riječi: *Klorogenska kiselina, mljevena kava, pravokutnovalna voltametrijia, ukupni polifenoli*

Rad sadrži: 39 stranica
26 slika
3 tablice
0 priloga
33 literaturne reference

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. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i>	član
4. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i>	zamjena člana

Datum obrane: 24. rujan 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 Ground Coffee Using Square-wave Voltammetry

Mario Lacković, 0113138135

Summary: Coffee is one of the sources of polyphenols. Hydroxycinnamic acids include caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acids and others. Chlorogenic acids are predominant in coffee. Coffee, according to epidemiological studies, has an anti-inflammatory and antitumor effect, then prevents cardiovascular disease and is used in weight loss. Square-wave voltammetry is one of the electrochemical methods. The advantage of using this method is its precision, speed and sensitivity. The aim of this work was to investigate electrochemical properties of chlorogenic acid in ground coffees (*Arabesca Minas*, *Barcaffe Classic*, *Franck Jubilarna Sensual* and *Gloria Minas*) using square-wave voltammetry. The effect of changing the pH value of the main electrolyte, multiple polarization, changing excitation signal frequency, chemical structure and different analyte concentrations were examined regarding electrochemical behaviour. Furthermore, quantification of total polyphenols was carried out using electrochemical and spectrophotometric Folin-Ciocalteu method. Results obtained from both methods were compared and it can be concluded that all coffees have similar chlorogenic acids content.

Keywords: Chlorogenic acid, ground coffee, square-wave voltammetry, total polyphenols

Thesis contains: 39 pages
26 figures
3 tables
0 supplements
33 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, prof. | member |
| 4. <i>Antun Jozinović</i> , PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: September 24, 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 prof. dr. sc. Ivani Tomac na savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	POVIJEST KAVE	4
2.2.	VRSTE KAVA	4
2.3.	PRERADA KAVE	5
2.3.1.	Prije prženja	5
2.3.2.	Prženje kave	6
2.4.	KEMIJSKI SASTAV KAVE	8
2.4.1.	Klorogenske kiseline	9
2.4.2.	Kafein	10
2.4.3.	Kaveol i kafestol	10
2.5.	METODE ANALIZE KAVE	11
2.5.1.	Elektroanalitičke metode	11
2.5.2.	Spektrofotometrija	13
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	3
3.1.	ZADATAK RADA	16
3.2.	MATERIJALI I METODE	16
3.2.1.	Uzorci kave	16
3.2.2.	Priprema otopina i provedena mjerenja	16
4.	REZULTATI	16
4.1.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE 5-KAFEOLIKINA KISELINE	20
4.1.1.	Utjecaj kemijske strukture	20
4.1.2.	Utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita	20
4.1.3.	Uzastopna višestruka polarizacija	21
4.1.4.	Utjecaj koncentracije 5-CQA	21
4.1.5.	Utjecaj Frekvencije pobudnog signala	22
4.2.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE UZORAKA MLJEVENIH KAVA	23
4.2.1.	Kvantifikacija sadržaja 5-CQA u uzorcima mljevenih kava	27
4.3.	SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA	28
4.4.	STATISTIČKA USPOREDBA PODATAKA	29
5.	RASPRAVA	20
6.	ZAKLJUČCI	31
7.	LITERATURA	34

Popis oznaka, kratica i simbola

- 5-CQA 5-*O*-kafeoil-kina kiselina (eng. *5-O-caffeoylquinic acid*)
- DF faktor razrjeđenja (eng. *dilution factor*)
- E_p potencijal pika (eng. *peak potential*)
- 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*)
- SWV pravokutno-valna voltometrija (eng. *square wave voltammetry*)

1. UVOD

Prema Pravilniku o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina (NN RH 172/04) sirova kava je naziv za osušena zrna kultivara roda *Coffea*, dobivena odgovarajućim tehnološkim postupkom od ploda kave uz uklanjanje mezokarpa, endokarpa i tegumenta (srebrnaste opne) te se ovisno o botaničkoj vrsti razvrstava kao: Arabika i Robusta koje su dvije najzastupljenije te Liberika, Ekselsa i Arabasuta. Proizvodi od kave su pržena kava i ekstrakti kave. Ekstrakti kave su proizvodi dobiveni ekstrakcijom iz prženih zrna kave pri čemu se kao sredstvo za ekstrakciju koristi samo voda i sadrži samo topive i aromatske sastojke kave uz netopive komponente koje je tehnički nemoguće odstraniti.

Kava predstavlja značajan izvor antioksidanasa u ljudskoj prehrani. To je složeni sustav spojeva od kojih se najviše ističu kafein i klorogenske kiseline te diterpeni kaveol i kafestol iz nefiltriranih kava. Klorogenske kiseline predstavljaju polifenolne spojeve koji se smatraju najznačajnijim antioksidansima u kavi. Kava je napitak koju konzumira široka skupina ljudi zbog njezinih raznovrsnih svojstava, kao što su poboljšanje sportske izvedbe, bolje koncentracije, odgađanja umora ili zbog užitka te mnogih zdravstvenih tvrdnji koje se uz nju vežu. Sigurnom dnevnom dozom kave smatra se 300 mg na dan, što odgovara količini od dvije do tri šalice.

Mnoge instrumentalne metode analize klorogenskih kiselina iz kave su razvijene. Najčešće primijenjene metode su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, spektrofotometrijske metode i masena spektrometrija. Danas se sve više zbog svoje jednostavnosti, preciznosti i brze izvedbe primjenjuju elektrokemijske metode. Tako su najčešće primijenjene voltametrijske metode pravokutnovalna voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija i ciklička voltametrija.

Cilj ovog diplomskog rada je bila primjena pravokutnovalne voltametrije za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina, odnosno 5-*O*-kafeoil-kina kiseline, u uzorcima kava mljevene kave iz lokalnih supermarketa i određivanje sadržaja ukupnih polifenola primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POVIJEST KAVE

Postoji mnogo zapisa tko je i kada prvi otkrio kavu, no kao najpouzdaniji navodi se zapis iz Etiopije. U povijesti Etiopije spominje se čuvar koza Kaldi, koji je primijetio da njegove koze postaju iznimno energične, glasnije se glasaju i ne spavaju nakon što pojedu crvenkaste bobice s okolnih grmolikih stabala, nadalje redovnici su bobice bacili u plamen te se počeo širiti neodoljiv miris nakon čega su bobice vadili iz plamena i zalijevali vodom te dobili smečkasti napitak koji im je omogućio da lakše provode svoje duge naporne obrede (**Slika 1**). Nadalje, vjeruje se kako su već stoljećima ranije Etiopljani žvakali bobice kave i koristili ih kao stimulans, a bobice su mljeli i miješali ih sa pročišćenim maslacem zvanim *ghee* da bi spriječili gorčinu. Takva praksa konzumacije bobica kave najpopularnija je bila u regijama Kaffa i Sidamo te se održava još i danas. Napitak je dobio naziv upravo po regiji Kaffa u Etiopiji.



Slika 1 Kaldi i rasplesane koze – pronalazak kave (web 1)

Kava je stigla u Europu tek 1615. godine. Donijeli su je trgovci iz Venecije gdje je otvorena i prva kavana u Europi 1629. godine. Najstarija kavana u Europi koja kontinuirano radi i danas, također se nalazi u Italiji na Trgu Svetog Marka u Veneciji, a otvorena je 1720. godine. Do sredine 18. stoljeća konzumacija napitka kave se proširila po Europi (web 2).

2.2. VRSTE KAVA

Zrna kave su sjemenke iz bobica biljke roda *Coffea* iz obitelji *Rubicaceae*. Biljka uglavnom raste u područjima oko ekvatora u tropskim zonama i s vlažnom klimom. Identificirano je više od 80 vrsta drveća kave, ali samo dvije vrste su komercijalno značajne. To su *Coffea*

arabica ili Arabica koja zauzima oko 70% globalnog tržišta kave i *Coffea canephora* ili Robusta (**Slika 2**) koja zauzima otprilike 28% (Farah, 2012.). Robusta ima gorči okus, otprilike dva puta više kafeina koji dodatno doprinosi gorčini te je manje aromatična. Najbolje kave prave se od 100% Arabice koja ima veći sadržaj aromatičnih ulja koja su zaslužna za intenzivnu aromu i prihvatljiviji okus. No, proizvode se i miješane kave od Arabice i Robuste, pri čemu se miješaju u različitim omjerima, prerađuju pri različitim uvjetima kako bi se dobio što širi raspon aroma i okusa (Kreichbergs i sur., 2011.).



Slika 2 Izgled zrna arabica i robusta kave (web 3)

Treća vrsta po popularnosti i udjelu od 2% u globalnoj trgovini je *Coffea Liberica* čiji su plodovi znatno veći, drveće znatno više (do 20 metara), prilično je gorka te nakon prerade nema primamljiv miris, okus i aromu što je glavni razlog njezine nepopularnosti i smanjene uporabe. Uglavnom se konzumira samo u južnim i istočnim dijelovima Azije (web 4).

Proizvodnja i konzumacija kave se kontinuirano povećava što se pripisuje sve kvalitetnijim postupcima prerade kave koji omogućuju brzu pripremu i bolji okus kave (Farah, 2012.). Bae i suradnici (2014.) navode kako je danas kava postala najčešće konzumirani farmakološki aktivan napitak.

2.3. PRERADA KAVE

2.3.1. Prije prženja

Branje je prvi i jedan od važnijih koraka prerade kave. Nakon ubiranja koje može biti ručno ili strojno, različitim postupcima pročišćavanja uklanjaju se mehaničke nečistoće. Praksa pokazuje da se najviši prinos i kvaliteta dobiva ručnim branjem i sortiranjem koje može trajati mjesecima jer bobice ne dozrijevaju u isto vrijeme (Farah, 2012.). Zatim slijedi mokri ili

suhi postupak kojim se uklanjaju pulpe kako bi dobili sirovu kavu odnosno zelena zrna kave. Mokri postupak zahtijeva više resursa kao što su voda i električna energija te odgovarajuće zbrinjavanje pulpe i korištene vode. Mogući problem javlja se kod zbrinjavanja velike količine pulpe i otpadne vode koja se najčešće odlaže u obližnje vode što izaziva naglo cvjetanje algi, pomor riba te kontaminaciju pitke vode (Tucker, 2011.). Kod suhog postupka plodovi se suše na suncu ili u posebnim zračnim sušionicima do vlažnosti od 10 do 12%. Nakon sušenja pulpa se oljušti te ostaju zrna s tankom srebrnkastom pokožicom. Kod mokrog postupka koji uglavnom daje konačni proizvod više kvalitete, već prije uklanjanja pulpe vrši se selekcija plodova uz pomoć flotacije kako bi se odstranili plodovi neodgovarajuće kvalitete (Farah, 2012.). Naime prezrela i pokvarena zrna ostaju plutati dok nezrela padaju na dno, a ona odgovarajuće zrelosti ostaju između. Iz bazena bobice dolaze u pulper koji izdvaja zrno iz bobice, zrna se ponovno ispiru i odvajaju vodenim kanalima po veličini i težini te se odvođe u spremnike. Slijedi fermentacija prilikom čega nestaje i srebrnkasta pokožica te se povećava kiselost. Završetkom mokre prerade zrna se suše do vlažnosti od 10 do 12%. Osušena zrna ponovno se prije izvoza, skladištenja ili prženja sortiraju po boji i prisutnosti mogućih oštećenja te se takva zrna uklanjaju. Provedbom svih tih postupaka dobiva se zelena kava spremna za prženje (web 5).

2.3.2. Prženje kave

Prženje kave smatra se najvažnijim procesom prerade sirove kave. Tijekom prženja koje se odvija u temperaturnom rasponu od 200 do 300 °C događaju se mnoge kompleksne kemijske reakcije te nastaju spojevi koji daju prepoznatljiv okus i aromu prženoj kavi. Ovisno o intenzitetu prženja, zrnca poprimaju smečkastu do gotovo crnu boju (**Slika 3**) te povećavaju svoj volumen za 50 do 60%, a istovremeno gube do 20% mase na gubitak vode odnosno vlage. Zelena ne pržena zrnca sadrže otprilike 250 spojeva dok pržena zrnca sadrže do 800 spojeva koji utječu na okus kave. Promjenom parametara prženja moguće je iz istih zrnaca kave proizvesti finalni proizvod različitih karakteristika (Kreicbergs i sur., 2011.).

Prženje kave odvija se na način da su zrnca u direktnom kontaktu za vrućom podlogom ili vatrom te prženje kod kojeg nema direktnog kontakta s vrućom površinom već se prženje odvija konvekcijom uz pomoć vrućeg zraka ili smjese plinova. Pržilice koje koriste vrući zrak daju zrna jednolične boje, te pružaju lakšu kontrolu procesa. Na početku prženja kod temperature od 130 °C zrna počinju povećavati volumen i poprimati smečkastu boju

zahvaljujući karamelizaciji saharoze. Nakon inicijalne faze u kojoj se događa relativno malo promjena, kod 160 °C zrna su svijetlo smeđa i započinje formiranje arome. Nastajanje spojeva okusa i arome odvija se kod 200 °C Maillardovim i Streckerovim reakcijama. To su vrlo kompleksne reakcije u kojima sudjeluju uglavnom reducirajući šećeri i proteini te mnogi drugi visoko i nisko molekularni spojevi kao melanoidini zbog kojih zrnca mogu postati gotovo crna. Kontrolom prženja reakcije se zaustavljaju u željeno vrijeme i kod željene boje (Farah, 2012.). Sam proces prženja iako djeluje jednostavno, vrlo je delikatan te minimalne promjene parametara mogu rezultirati drugačijim proizvodom. Na primjer, Toci i suradnici (2009.) navode da ista zrnca kave, pržena do istog stupnja odnosno iste boje, ali u kraćem vremenskom periodu rezultiraju značajnom promjenom u mirisnom/aromatskom i pH profilu. Nakon prženja zrna se hlade vodom ili hladnim zrakom. Više se preferira zrak jer korištenjem vode povećava se rizik mikrobiološkog rasta, odnosno kvarenja zrna daljnjom manipulacijom (Farah, 2012.).



Slika 3 Kava različitog stupnja prženosti (web 6)

Nakon prženja koje se uglavnom odvija u zemljama uvoznicama kave kako bi kava što svježija stigla do krajnjih potrošača, obavlja se još i mljevenje pržene kave. Cilj mljevenja je povećati ukupnu površinu kave kako bi se u dodiru s otapalom odnosno s vodom kod kuhanja kave oslobodilo što više spojeva arome i okusa. Mljevena kava može se pakirati i stavljati na tržište ili se upotrebljava u procesu proizvodnje *instant* kave (**Slika 4**). *Instant* kave proizvode se uglavnom od Robuste ili smjese s većim udjelom Robuste nego Arabike. Razlog tome je veća koncentracija topljivih krutina u Robusti što daje veći prinos finalnog proizvoda (Farah, 2012.).



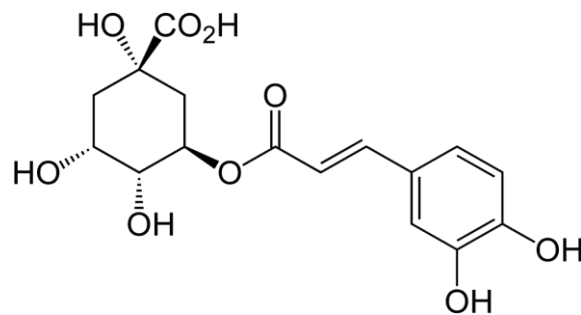
Slika 4 Instant kava (web 7)

2. 4. KEMIJSKI SASTAV KAVE

Na temelju istraživanja danas je dokazano da su mnoge bolesti odnosno stanična oštećenja povezana s velikom količinom slobodnih radikala. Ukoliko dođe do narušavanja ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidanasa odnosno kemijskih spojeva koji ih neutraliziraju i tako sprječavaju nastanak oštećenja, promijeni se redoks status organizma, odnosno ravnoteža između nastajanja i uklanjanja reaktivnih vrsta kisika (ROS). Dolazi do pretjeranog nakupljanja ROS-eva što izaziva oksidativni stres (Klapec i Strelec, 2018.). Stoga se na polju nutricionizma intenzivno provode istraživanja koja povezuju namirnice i njihove komponente s blagotvornim i preventivnim djelovanjem na organizam. Kava je jedan od najčešće konzumiranih napitaka i vrlo je interesantna za istraživanja zbog svog bogatog sastava, okusa i arome. Rezultati istraživanja pokazuju kako spojevi u kavi imaju mogućnost direktne neutralizacije slobodnih radikala te induciraju antioksidacijske enzime koji dodatno osnažuju obranu od slobodnih radikala (Hoelzl i sur., 2010.). Pellegrini i suradnici (2003.) na temelju *in vitro* testova zaključili su da kava ima pet puta jači antioksidacijski kapacitet od zelenog čaja i tri puta od crvenog vina. Kod mnogih pojedinaca kava značajnije doprinosi unosu antioksidanasa nego voće i povrće. Stoga bi unos kave mogao imati značajnu ulogu u sprječavanju bolesti čija patogeneza uključuje povećani oksidacijski stres (Hoelzl i sur., 2010). Najvažniji biokativni spojevi u kavi su: fenolni spojevi (klorogenske kiseline i derivati) metilksantini (kafein), diterpeni (kaveol i kafestol).

2.4.1. Klorogenske kiseline

Klorogenske kiseline (**Slika 5**) smatraju se najzastupljenijim polifenolom sirove kave. Iako se nalaze u mnogim biljkama, kava se smatra glavnim izvorom. Prosječna zelena kava Arabika sadrži od 4 do 8,4%, a Robusta od 7 do 14,4% klorogenskih kiselina prema suhoj tvari. Koncentracija klorogenske kiseline raste tijekom sazrijevanja zrna kave, no kad kava dostigne zrelost koncentracija opada, a posebno je niska kod prezrelih plodova. Ovi fenolni spojevi obuhvaćaju grupu molekula koje nastaju esterifikacijom kina kiseline s *trans* hidroksicimetnom kiselinom. Glavne grupe klorogenskih kiselina (CGA) obuhvaćaju kafeoilkinu kiselinu s tri izomera od kojih je najzastupljeniji 5-*O*-kafeoil-kina kiselina (5-CQA) koja čini preko 60% ukupnih klorogenskih kiselina



Slika 5 Strukturna formula klorogenske kiseline (web 8)

Tijekom prženja klorogenska kiselina sudjeluje u stvaranju boje, arome, mirisa i okusa. Zbog njezine termolabilnosti dio se pretvara u razne fenolne derivate, degradira u spojeve niske molekularne mase ili pak formira polimerne spojeve kao što su melanoidini. Iako se u komercijalnim kavama nalazi od 0,5 do 7% klorogenskih kiselina, postupkom prženja koncentracije se mogu smanjiti i do 95%. Procjenjuje se da umjerena do visoka konzumacija kave može osigurati od 0,5 do 2 grama klorogenskih kiselina dnevno (Farah i Donangelo, 2006.).

Ekstrakcija klorogenskih kiselina iz mljevene kave se najintenzivnije odvija pri 80 °C unutar prve dvije minute. Ekstrahira se 70 do 200 mg iz Arabike te 70 do 350 mg klorogenskih kiselina iz Robuste na 200 mL kave (Clifford, 2000.).

2.4.2. Kafein

Kreicberg i suradnici (2011.) smatraju da je kafein glavna komponenta kave koja djeluje na središnji živčani sustav te je zaslužan za tonički efekt kave. Glavni je alkaloid prisutan u zelenom zrnu kave. Smatra se najpoznatijom komponentom kave te općenito jednim od najčešće analiziranih psihoaktivnih spojeva (Jeszka-Skowron i sur., 2014.). Umjerena konzumacija kave te samim time i kafeina se povezuje s povećanom budnošću, lakšim učenjem i pamćenjem, boljom fizičkom izvedbom i osjećajem. Upravo su to karakteristike zbog kojih se pojedinac odlučuje na konzumiranje kave. Kod previsokog unosa kave moguća je pojava tahikardije i nesаницe u periodu djelovanja kafeina (2 do 6 sati) kod osjetljivijih pojedinaca.

Kafein je termostabilna komponenta te su promjene u koncentraciji kafeina u zrnu nakon prženja minimalne. Robusta u prosjeku sadrži 2,5 grama na 100 grama pržene kave, a Arabica do dva puta manje koncentracije 1,1 do 1,3 grama na 100 grama pržene kave. Koncentracije u samom napitku su različite i ovise o vrsti kave, a kreću se od 50 do preko 300 mg na 100 mL kave (Farah, 2012.). Kod proizvodnje dekafeinizirane kave odnosno kave bez kafeina, sadržaj kafeina ne bi trebao prelaziti 0,1% po kilogramu suhe mase.

2.4.3. Kaveol i kafestol

Kaveol i kafestol prema svojoj kemijskoj strukturi ubrajaju se u spojeve pentacikličkih diterpena topljivih u mastima te zajedno čine 20% lipidne frakcije kave. Arabika sadrži više kaveola i kafestola (0,9 g/100 g) dok Robusta sadrži upola manje kaveola i još manje kafestola (0,2 g/100 g). Unos ovih komponenata povezan je s višim razinama homocisteina i LDL-a što može indirektno povećati rizik od kardiovaskularnih bolesti. No značajne koncentracije ovih komponenata primarno se nalaze samo u nefiltriranim kavama, dok se kod filtriranih kava zbog slabije topljivosti u vodi uglavnom zadržavaju na filter papiru (Farah, 2012.). U nefiltriranim kavama koncentracije se kreću od 6 do 12 miligrama po šalici, dok su kod filtriranih razine niže od jednog miligrama. Iako povisuju razine LDL kolesterola, neka istraživanja im pripisuju antikarcinogena svojstva jer smanjuju negativno djelovanje karcinogena kao što su policiklički aromatski ugljikovodici te mikotoksini (Cavin i sur., 2002.).

2.5. METODE ANALIZE KAVE

2.5.1. Elektroanalitičke metode

Elektroanalitičke ili elektrokemijske metode predstavljaju skupinu analitičkih tehnika kojima se informacija o aktivitetu, koncentraciji ili neki drugi podatak određivane kemijske vrste odnosno atoma, molekule ili iona, dobiva na temelju međusobno razmjernih odnosno analognih električnih veličina uz pomoć električne struje, napona ili naboja (Piljac, 2010.). Predstavlja dio znanosti posvećen razumijevanju fizikalno-kemijskih pojava i procesa pretvorbe tvari vezanih za postojanje i djelovanje osnovne čestice elektriciteta odnosno slobodnih i pokretnih elektrona koji u zajedničkom gibanju predstavljaju električnu struju (Bockris i sur., 2000.).

Ključni element u kojem se provode elektrokemijska mjerenja naziva se elektrokemijska ćelija. Sastoji se od posude koja sadrži otopinu koja je najčešće ionski vodič te u otopinu uronjenih elektroda koje su zapravo elektronski vodiči. S obzirom na protok električne struje metode se dijele na one kod kojih kroz elektrokemijsku ćeliju teče i ne teče električna struja. Metode kod kojih nema protoka električne struje, električni napon koji nastaje između elektroda uspostavlja se spontano odvijanjem elektrokemijskih reakcija na elektrodama. Tako se na elektrodi uspostavlja ravnotežni elektrodni potencijal, a razlika tog potencijala odnosno napona na elektrodama pokazuje samo nakanu reakcije koja bi se odvijala kada bi zatvorili strujni krug.

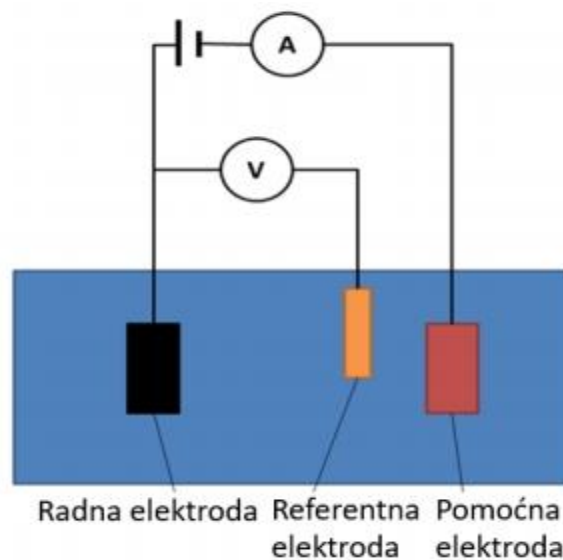
Elektrokemijske metode kod kojih postoji tok električne struje kroz elektrokemijsku ćeliju, a i vanjski električni krug zbog primjene napona iz vanjskog izvora, uzrokuje elektrokemijske reakcije na elektrodama odnosno reakcije oksidacije i redukcije. Mjerena fizikalna veličina je odziv sustava u ćeliji na vanjski signal pobude. Ako je signal pobude električni napon, kroz radnu će elektrodu teći električna struja, čija jakost ovisi o obliku naponskog signala pobude, vrsti primijenjene elektrode i koncentraciji elektroaktivnih čestica. Prema tome, rezultirajuća fizikalna veličina, odnosno signal odziva je električna struja. Može se mjeriti kao funkcija narinutog napona te se tada naziva voltometrijskim metodama (Piljac, 2010.).

Voltometrija

Pripada grupi elektroanalitičkih tehnika i sama predstavlja skupinu postupaka u kojima je signal pobude električni napon. Signal odziva članka je struja koja se mjeri kao odziv

narinutog napona, a oblik i vremenska ovisnost amplitude signala pobude mogu biti različiti (Piljac, 2010.). Voltametrijski instrument sastoji se od potenciostata, elektrokemijskog članka i računala. Elektrokemijski članak je nosač otopine analita s uronjenim elektrodama, dok potenciostat nameće potencijal i mjeri jakost struje.

Ćelija sadrži tri elektrode (**Slika 6**). To su radna elektroda čiji se potencijal mijenja s vremenom jer se na njenoj površini događa temeljna elektrokemijska reakcija, referentna elektroda (Ag/AgCl) koja ima konstantan potencijal i protuelektroda ili pomoćna elektroda od platine koja zatvara krug te vodi elektrone od izvora signala kroz otopinu do radne elektrode. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode odnosno kontrolira se signal pobude, a signal odziva odnosno struja između radne i protuelektrode.



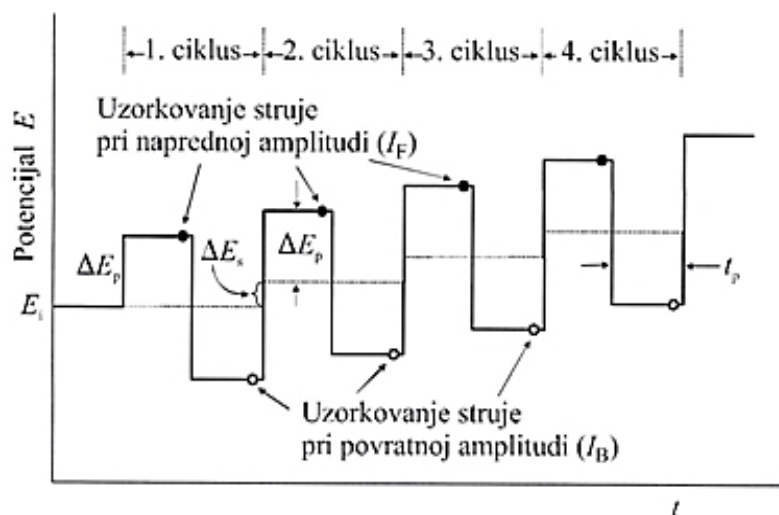
Slika 6 Prikaz elektrokemijske ćelije za voltametrijska mjerenja (Đaković, 2018.).

Elektroaktivne vrste iz otopine kreću se prema radnoj elektrodi na kojoj se odvija redoks reakcija. Rezultirajuća struja koja teče kroz elektrokemijsku ćeliju mjera je koncentracije uključenih elektroaktivnih vrsta. Struja koja nastaje na elektrodi proporcionalna je koncentraciji na površini, a ona je jednaka koncentraciji u uzorku.

Najčešće primjenjivane voltametrijske metode su diferencijalna pulsna, ciklička, pravokutnovalna i *stripping* voltametrija (Wang, 2000.; Piljac, 2010.; Jakobek Barron, 2017.).

Pravokutnovalna voltometrija

Jedna je od često primjenjivanih voltometrijskih metoda koja se odlikuje brzinom zbog upotrebe iznimno brzih promjena potencijala pa se voltamogram može snimiti za nekoliko sekundi. Signal pobude je stepeničasto rastući pravokutni val (**Slika 7**), a pobuda se sastoji od naizmjeničnih katodnih i anodnih pulseva relativno velike amplitude (obično 50 mV) koji se pojavljuju nekom frekvencijom. Odziv na signal pobude što je zapravo struja ćelije, mjeri se na kraju svakog pulsa odnosno na kraju oksidacijskog strujnog odziva i na kraju redukcijskog strujnog odziva ili struja se mjeri dvaput tijekom svakog ciklusa i to jednom na početku polaznog pulsa i na kraju pulsa suprotnog smjera. Kao rezultat prikazuje se razlika u struji između dva uzastopna pulsa: $\Delta I = I_f - I_b$. Ukupna struja pravokutnovalnog voltamograma može se razdvojiti i prikazati posebno kao struja katodnog (I_b) i struja anodnog pulsa (I_f) (Wang, 2000., Tomac, 2016.).



Slika 7 Oblik naponskog signala pobude u pravokutnovalnoj voltometriji (Piljac, 2010.).

2.5.2. Spektrofotometrija

Spektroskopija predstavlja dio znanosti koji se bavi interakcijama materije i svjetla, odnosno elektromagnetskog zračenja. Spektrofotometrija se temelji na apsorpciji UV i/ili Vis zračenja u organskim molekulama, pri čemu dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno energijsko stanje odnosno dolazi do promjene raspodjele elektronske gustoće unutar molekule. Tehnika se može primijeniti za kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Princip je da svjetlost prolazi kroz uzorak u kiveti i paralelno kroz referentnu kivetu. Zrake kroz uzorak i referentne kivete dolaze do detektora koji uspoređuje njihove intenzitete. Logaritam omjera intenziteta ulazne i izlazne zrake daje vrijednost koja se zove apsorbancija, označava se

slovom (A) i predstavlja mjeru koja govori koliko je svjetla apsorbirano u uzorku na određenoj valnoj duljini. Spektrofotometar mjeri neapsorbirano ili propušteno zračenje a količina apsorbiranog zračenja može se izraziti na više načina. Transmitancija je omjer intenziteta transmitiranog svjetla i intenziteta upadnog svjetla. Što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje to je veća apsorpcija isto tako što molekula učinkovitije apsorbira svjetlo na određenoj valnoj duljini, to je veća apsorpcija. Zato je kod određivanja koncentracije važno znati na kojoj valnoj duljini naš uzorak maksimalno apsorbira zračenje. Iz izmjerene apsorpcije računa se koncentracija tvari u uzorku i to pomoću kalibracijske krivulje odnosno linearnog odnosa apsorpcije i koncentracije koja se izrađuje pomoću koncentracijskog niza poznatih otopina (Pavia i sur., 2001.; Jakobek Barron, 2017.).

Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određuju se spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom. Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona fenolne grupe oksidiraju, a anioni reduciraju dajući plavo obojenje. Nerudicirani reagens je žute boje. Intenzitet obojenja mjeri se apsorpcijom na 765 nanometara u odnosu na slijepu probu. Koncentracija uzorka računa se na temelju dobivenih rezultata mjerenja i kalibracijske krivulje dobivene mjerenjem otopine standarda poznate koncentracije (web 9).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- primijeniti pravokutnovalnu voltametriju na elektrokemijsko ponašanje 5-CQA
- ispitati utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, pH vrijednosti osnovnog elektrolita, frekvencije pobudnog signala na elektrokemijsko ponašanje mljevenih kava i
- odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u mljevenoj kavi primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu metode te
- statistički usporediti sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina primjenom elektrokemijske i spektrofotometrijske tehnike

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1 Uzorci kave

Analizirane su četiri vrste mljevenih kava. Arabesca Minas, Barcaffè Classic, Franck Jubilarna Sensual i Gloria Minas. Svi uzorci kupljeni su u lokalnim trgovinama. Za potrebe voltametrijske i spektrofotometrijske analize izvagan je $1 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ svakog uzorka

Uzorci vodenih ekstrakata mljevenih kava pripremljeni su tako što 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 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 i provedena mjerenja

Otopina 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 od $4 \text{ }^\circ\text{C}$

Osnovni elektrolit za mjerenje primjenom pravokutnovalne voltametrije

Otopina osnovnog elektrolita za elektrokemijsko mjerenje, fosfatnog pufera (PB), pripremljena je u koncentraciji od $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH vrijednosti 7,0. Za pripremu otopine PB te vodenih ekstrakata mljevenih kava korištena je ultračista voda (vodljivost vode $< 0,1 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$)

dobivena pomoću uređaja za pročišćavanje vode Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka).

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 mljevenih 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 Na₂CO₃ u koncentraciji 200 g L⁻¹. Uzorci su promiješani na vortexu (Grant Bio, Cambridgeshire, Engleska) te su stavljeni u inkubator (Mettler GmbH, Njemačka) na 40 °C kroz 30 min. Slijepa proba je pripremljena na isti način kao i uzorci samo što je umjesto vodenog ekstrakta kave sadržavala destiliranu vodu. Apsorbancije uzoraka mljevenih kava mjerene su na valnoj duljini od 765 nm. Također su mjerene apsorbcije 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 takvom uzorku izvršena pet puta.

Elektrokemijska analiza (pravokutnovalna voltometrija)

Voltometrijsko 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 voltetrije prikazani su **Tablicom 1**. Ukupni sadržaj klorogenskih kiselina u kavi, dobivenih pravokutnovalnom voltetrijom, izračunat je pomoću kalibracijske krivulje standarda 5-CQA, a izražen je kao mg 5-CQA ekvivalenata po 100 g kave (mg 5-CQA / 100g kave).

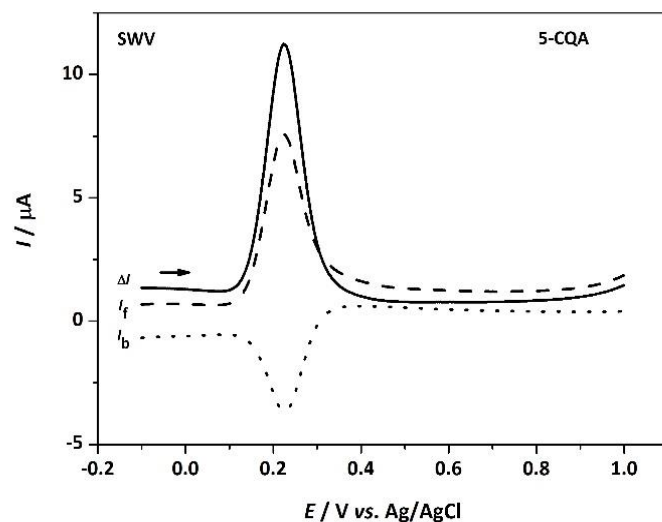
Tablica 1 Uvjeti mjerenja standarda i uzoraka

Uvjet	Iznos
Početni potencijal	-0,1 V
Konačni potencijal	1,0 V
Korak potencijala, ΔE	2 mV
Amplituda	50 mV
Frekvencija, f	50 Hz

4. REZULTATI

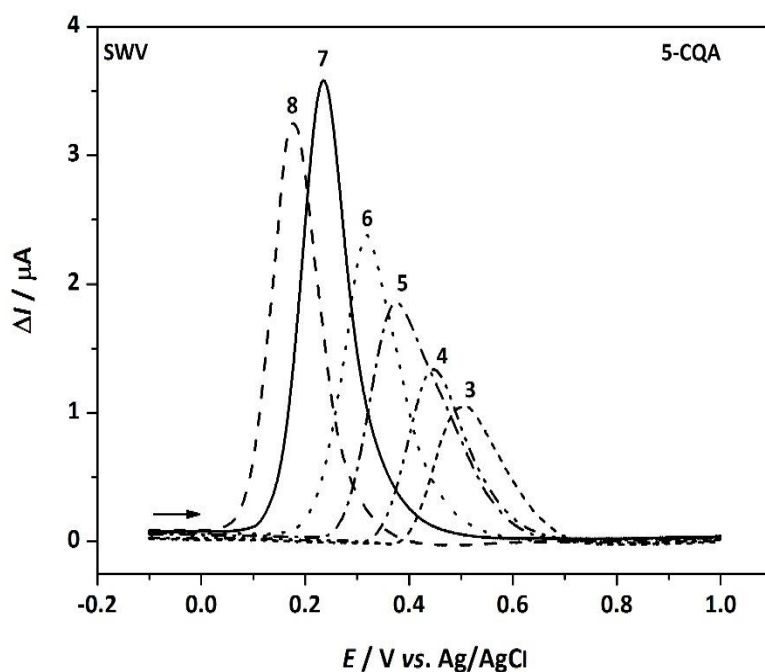
4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE 5-KAFEOLKINA KISELINE

4.1.1. Utjecaj kemijske strukture



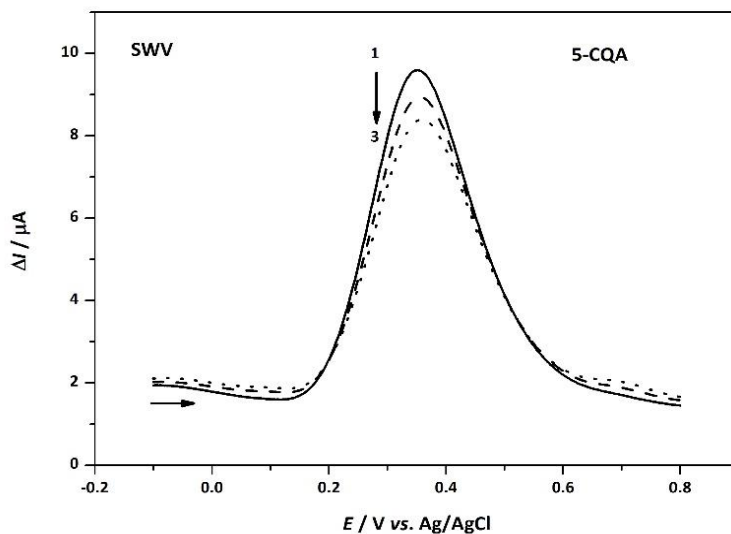
Slika 8 Pravokutnovalni voltamogram otopine 5-CQA u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**

4.1.2. Utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita



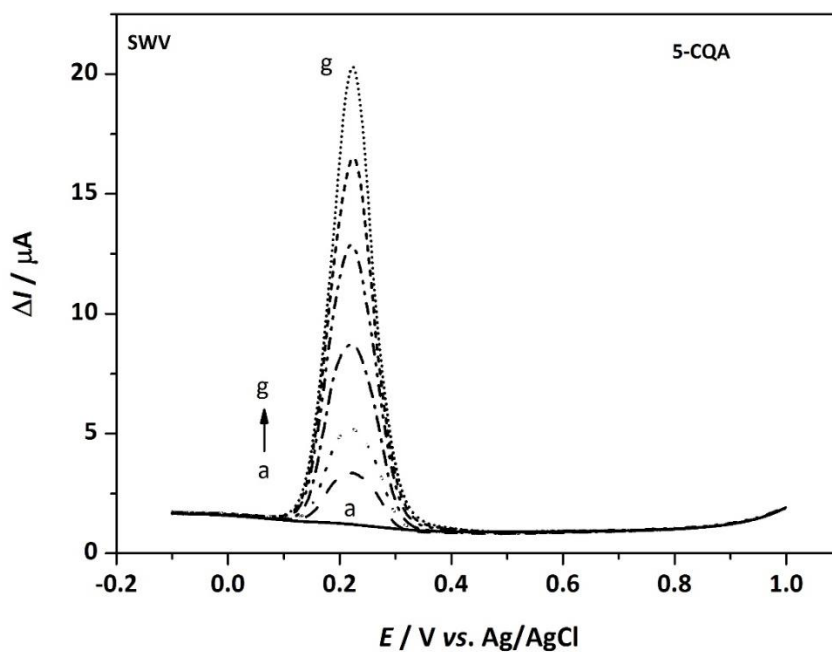
Slika 9 Pravokutnovalni voltamogrami otopine 5-CQA u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS puferu pH 3-8. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**.

4.1.3. Uzastopna višestruka polarizacija



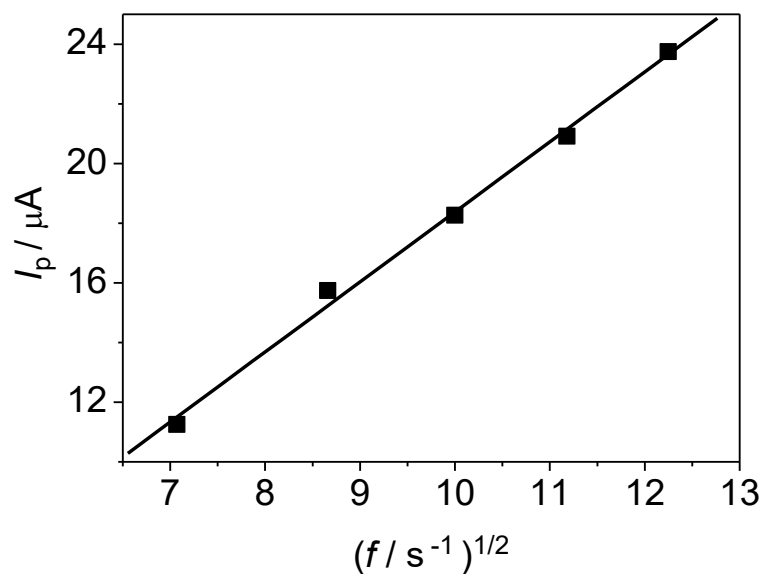
Slika 10 Uzastopni pravokutnovalni voltamogrami otopine 5-CQA u 0,1 mol L⁻¹ PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**.

4.1.4. Utjecaj koncentracije 5-CQA

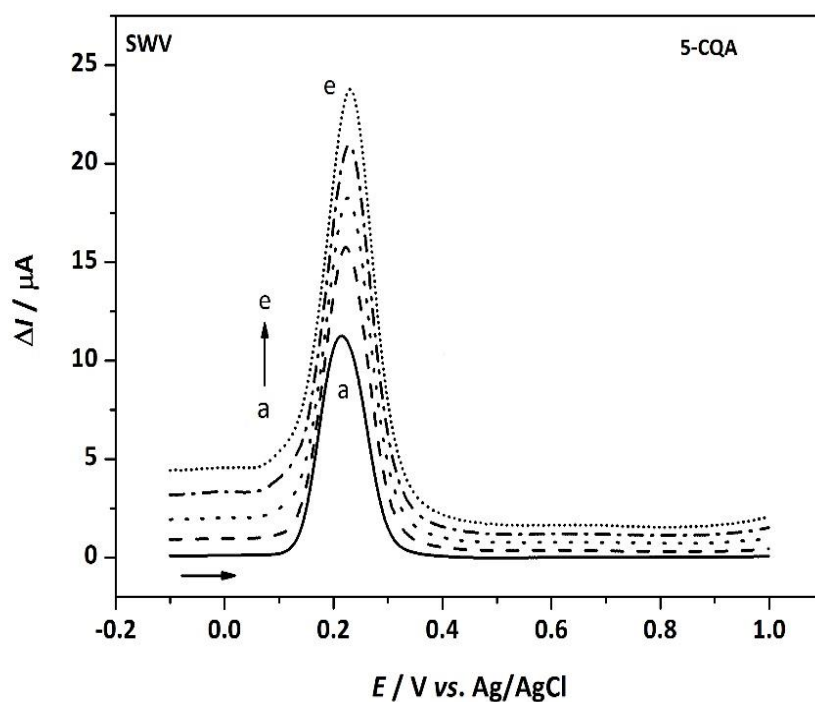


Slika 11 Koncentracijski profil otopine 5-CQA a) 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, b) 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, c) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, d) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e) 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, f) 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i g) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.1.5. Utjecaj Frekvencije pobudnog signala

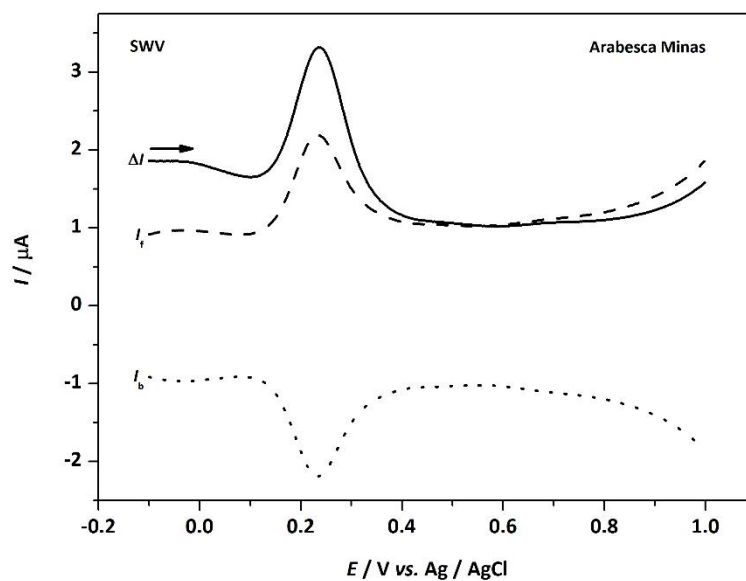


Slika 12 Ovisnost ukupne struje pika o drugom korijenu frekvencije pobudnog signala

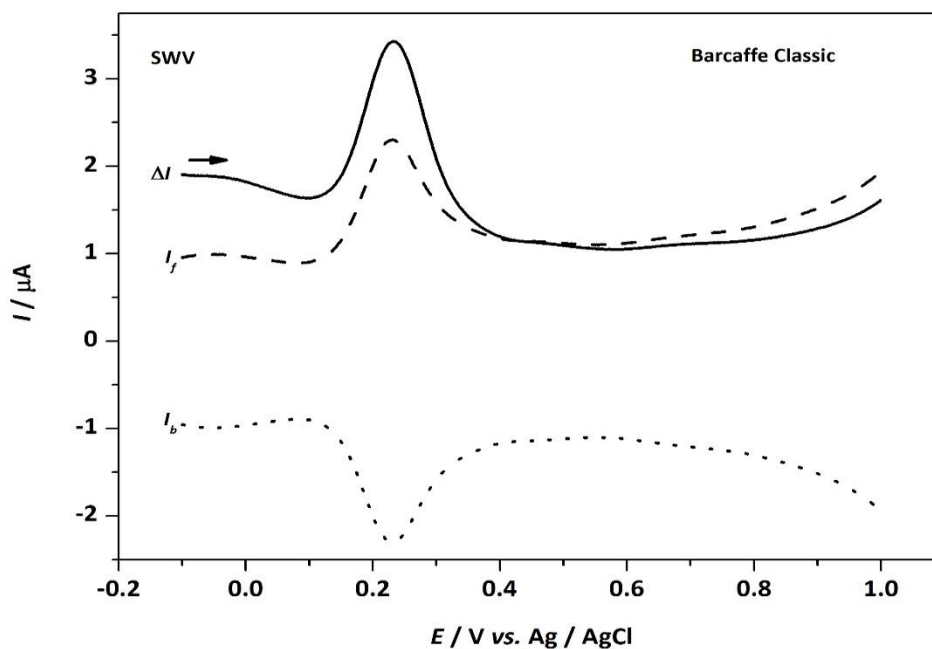


Slika 13 Pravokutnovalni voltamogram otopine 5-CQA u 0,1 mol L⁻¹ PBS puferu pH 7,0. Frekvencija pobudnog signala a) 25 Hz, b) 50 Hz, c) 100 Hz, d) 125 Hz i e) 150 Hz. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**.

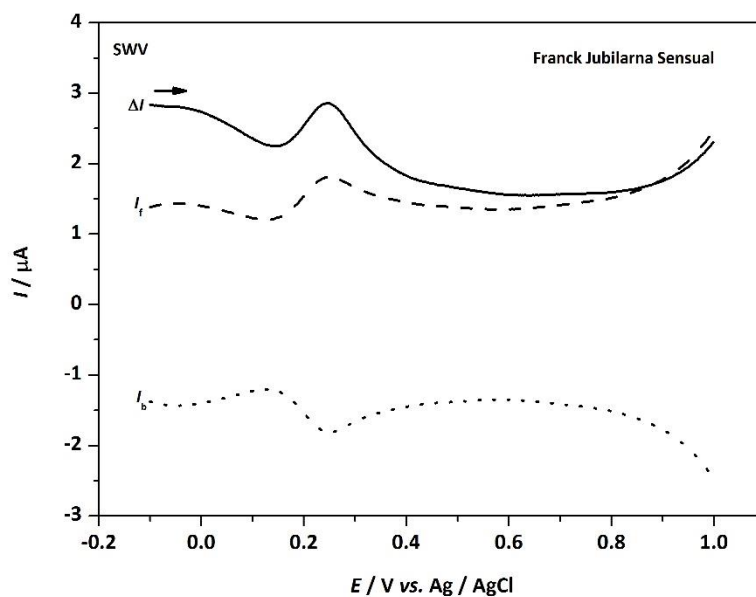
4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE UZORAKA MLJEVENIH KAVA



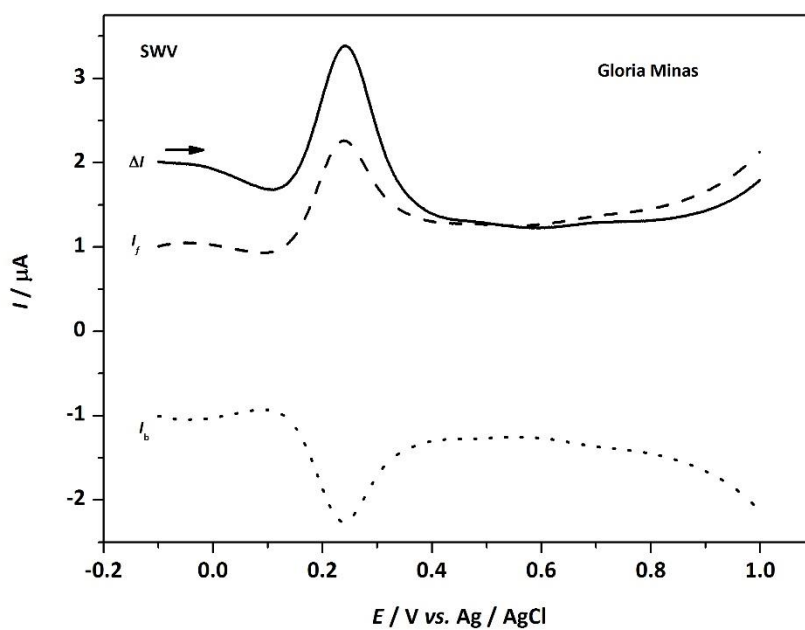
Slika 14 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Arabesca Minas (DF=50) u 0.1 mol L⁻¹ PBS puferu pH 7.0. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**



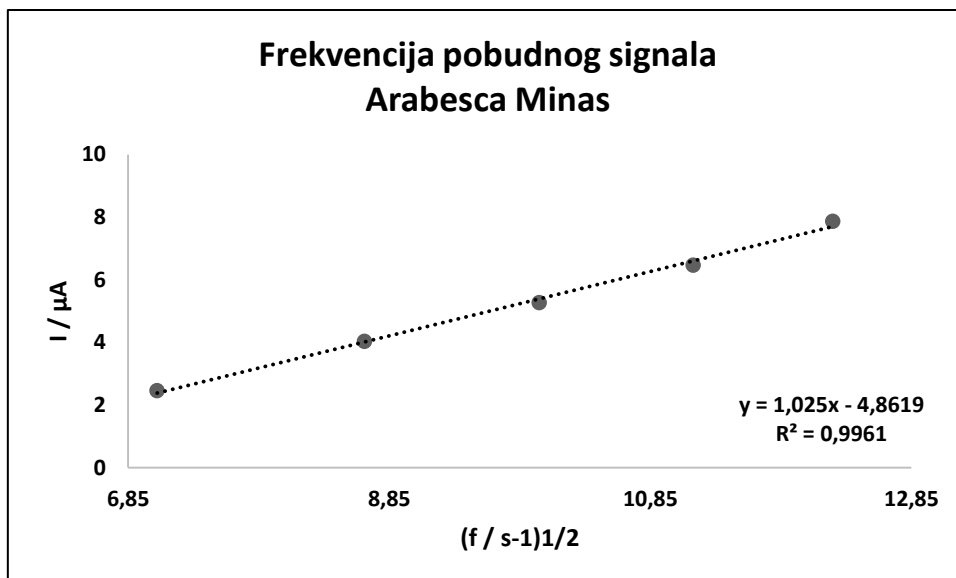
Slika 15 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Barcaffè Classic (DF=50) u 0.1 mol L⁻¹ PBS puferu pH 7.0. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**



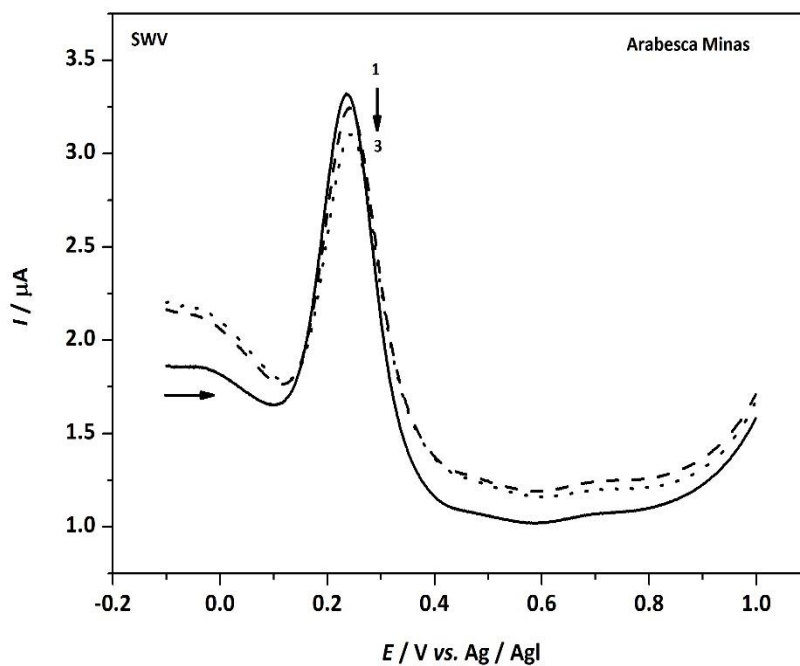
Slika 16 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Franck Jubilarna Sensual (DF=50) u 0.1 mol L⁻¹ PBS puferu pH 7.0. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**



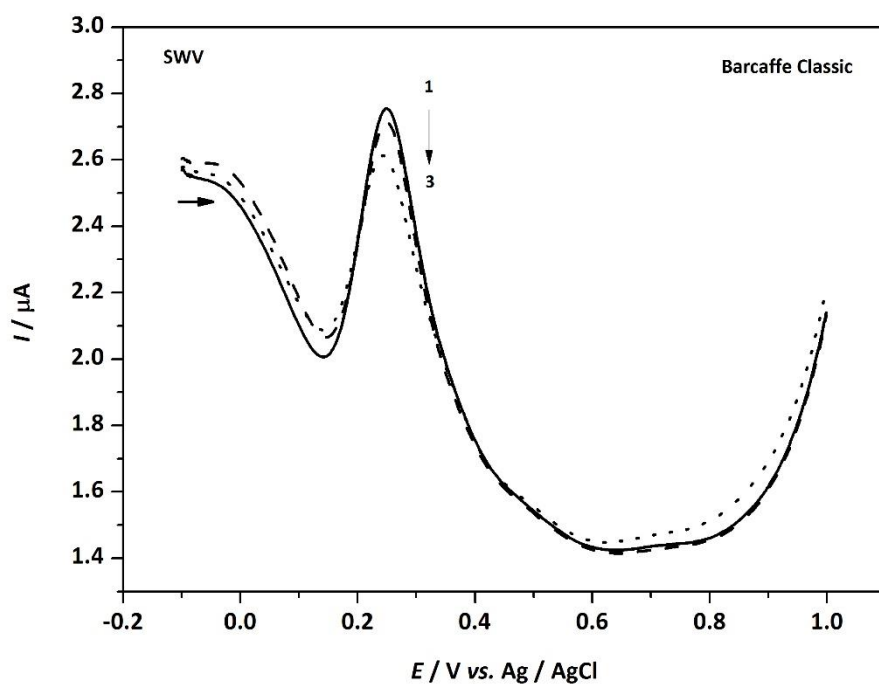
Slika 17 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Gloria Minas (DF=50) u 0.1 mol L⁻¹ PBS puferu pH 7.0. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**



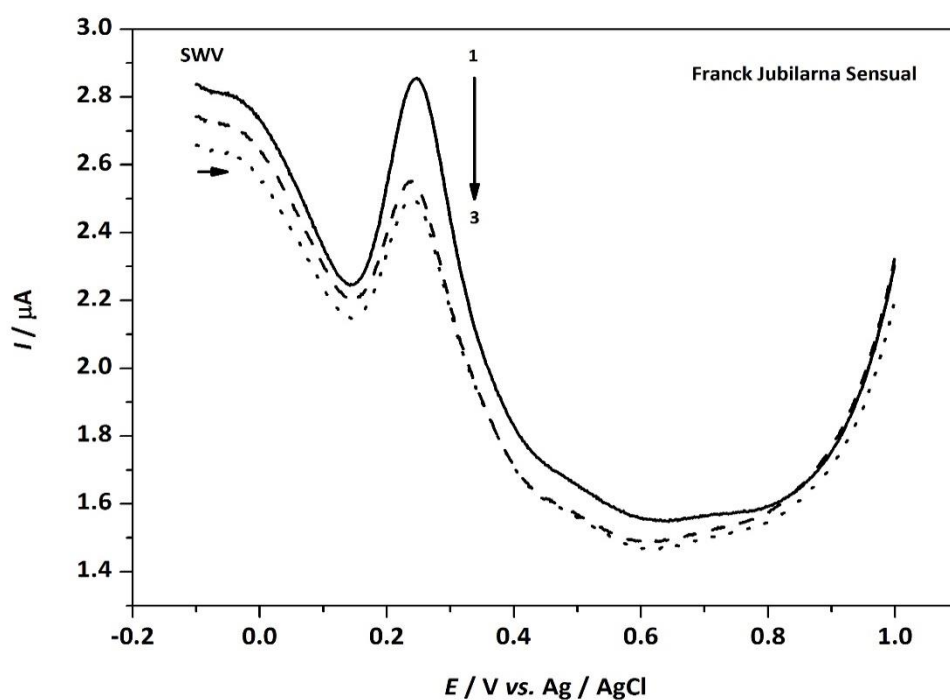
Slika 18 Frekvencija pobudnog signala mljevene kave Arabesca Minas. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**



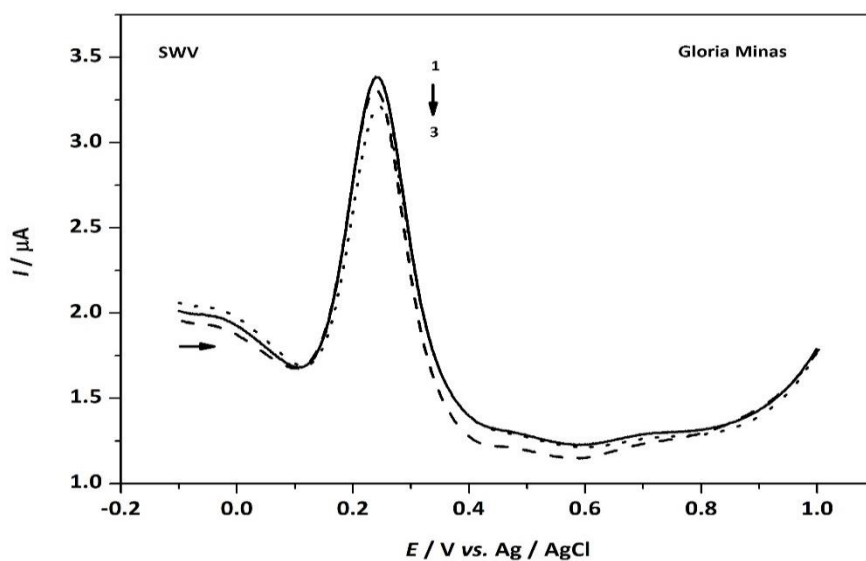
Slika 19 Višestruka uzastopna polarizacija mljevene kave Arabesca Minas. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**



Slika 20 Višestruka uzastopna polarizacija mljevene kave Barcaffe Classic. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**

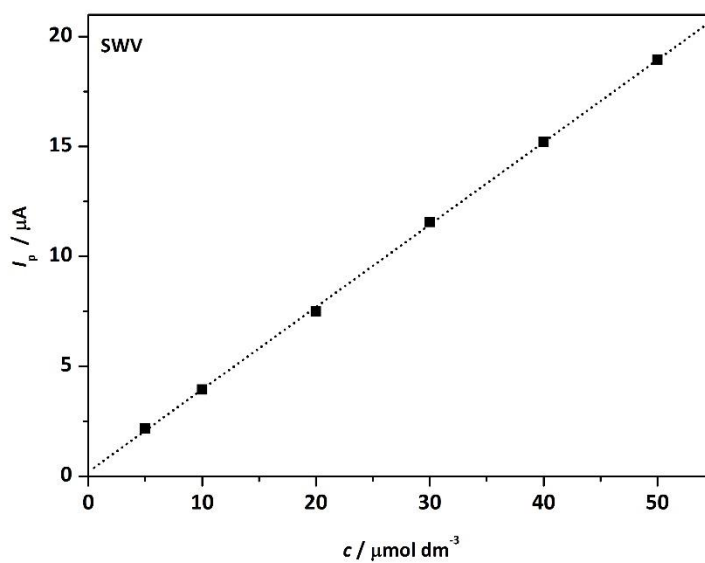


Slika 21 Višestruka uzastopna polarizacija mljevene kave Franck Jubilarna Sensual. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**



Slika 22 Višestruka uzastopna polarizacija mljevene kave Gloria Minas. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 1**

4.2.1. Kvantifikacija sadržaja 5-CQA u uzorcima mljevenih kava

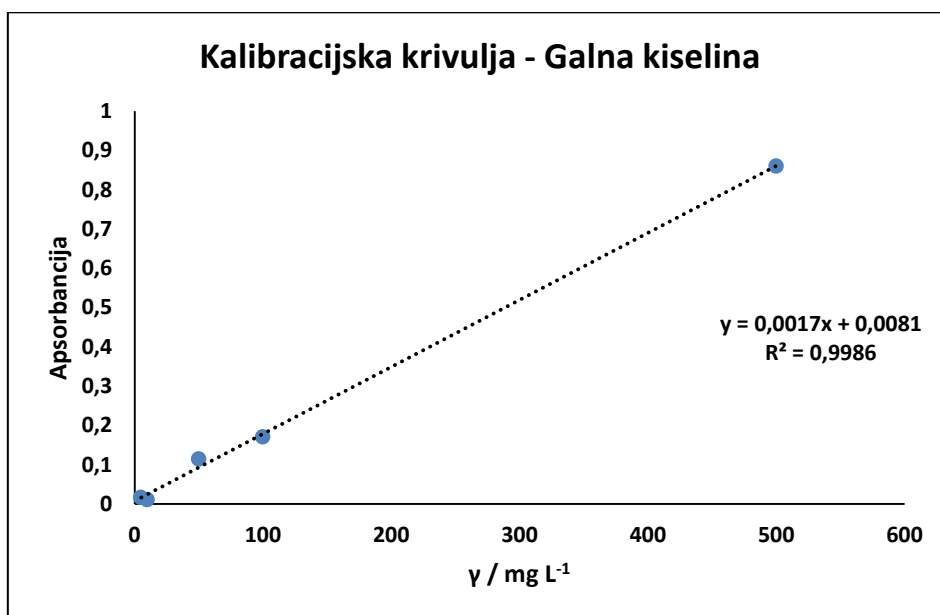


Slika 23 Ovisnost struje pika (I_p) o koncentraciji otopine 5-CQA

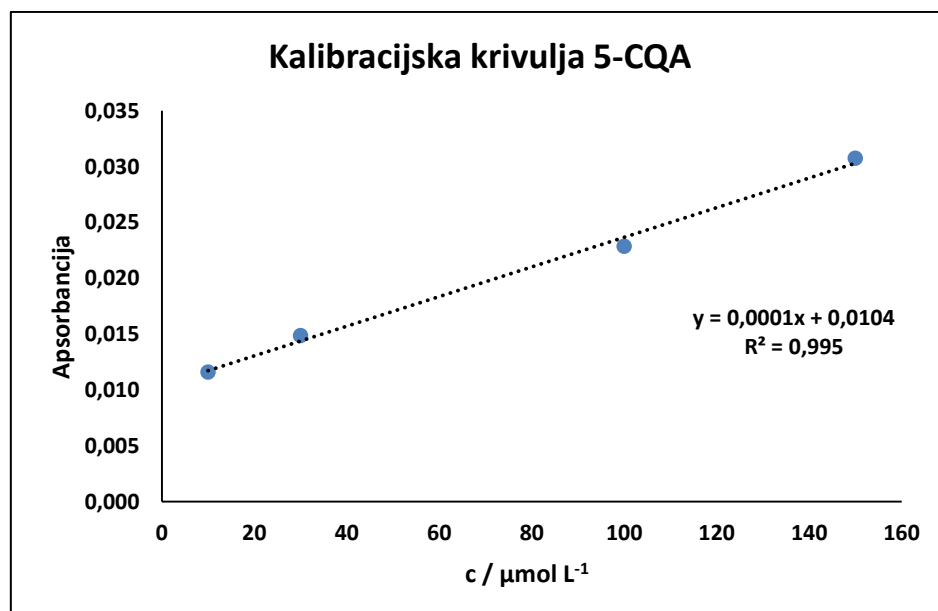
Tablica 2 Količina ukupnih klorogenskih kiselina u ispitanim mljevenim kavama

Uzorak mljevene kave	Ukupne klorogenske kiseline (mg 5-CQAE/100g)
Arabesca Minas	2947
Barcaffè Classic	3048
Franck Jubilarna Sensual	2508
Gloria Minas	3009

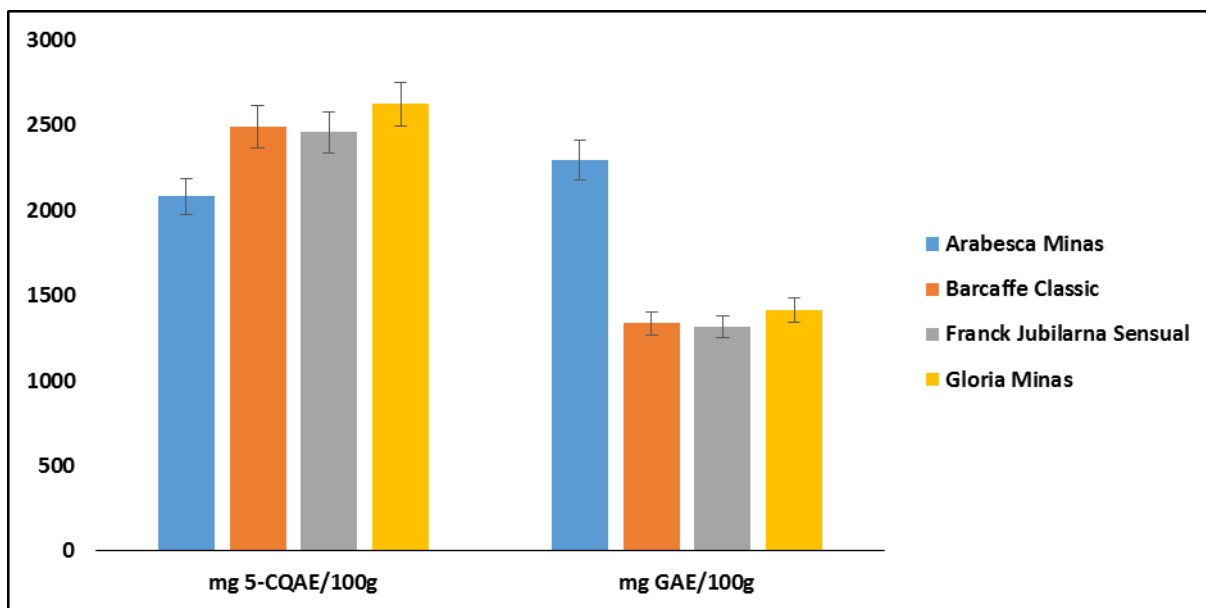
4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA



Slika 24 Ovisnost apsorbancije (A) o koncentraciji otopine galne kiselini



Slika 25 Ovisnost apsorbancije (A) o koncentraciji otopine 5-CQA



Slika 26 Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima mljevenih kava izraženih preko 1) mg 5-CQAE / 100g i 2) mg GAE / 100g

4.4. STATISTIČKA USPOREDBA PODATAKA

Tablica 3 Slaganje rezultata dobivenih primjenom spektrofotometrijske Folin Cioucalteu metode i pravokutnovalne voltametrije

	UP mg GAE/ 100g	UP mg 5-CQAE / 100g	SWV mg 5-CQAE / 100g
UP mg GAE/ 100g	1.000	-0,918	0,004
UP mg 5-CQAE / 100g	-0,918	1.000	0,236
SWV mg 5-CQAE / 100g	0,004	0,236	1.000

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu ispitano je elektrokemijsko ponašanje 5-CQA primjenom pravokutnovalne voltametrije, a ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, utjecaj frekvencije osnovnog elektrolita i utjecaj promjene koncentracije analita

Na **Slici 8** prikazan je SW voltamogram 5-CQA na kojem se uočava jedan jasno izraženi oksidacijski pik na potencijalu od 0,223 V i jedan jasno izraženi redukcijski pik na potencijalu od 0,225 V. Prisustvo oksidacijskog i redukcijskog pika na skoro istim potencijalima govore da se na površini radne elektrode (GCE) odvija reverzibilna redoks elektrokemijska reakcija (Mirčeski i sur., 2007.).

Ispitan utjecaj promjene pH vrijednosti u rasponu od pH 3 do pH 8. Iz **Slike 9** uočava se porast strujnog odziva od pH 3 do pH 7 kada u pH 7 strujni odziv ima maksimalnu vrijednost te se daljnjim povećanjem pH vrijednosti strujni odziv smanjuje što je u skladu s literaturnim referencama (Šeruga i Tomac, 2014.; Santos i sur., 2011.). Zbog najvećeg strujnog odziva u pH 7, ova pH vrijednost izabrana je za daljnja elektrokemijska istraživanja elektrokemijskog ponašanja 5- CQA i uzoraka mljevenih kava.

Nadalje, ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije 5-CQA u otopini PB te se uočava opadanje strujnog odziva u 2. i 3. polarizaciji i pomak potencijala prema pozitivnijim vrijednostima (**Slika 10**) što ukazuje da se na površini radne elektrode nalaze oksidacijski produkti te je otežana difuzija analita iz otopine prema površini radne elektrode.

Također je ispitan utjecaj promjene koncentracije 5-CQA u rasponu od 5 do 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na elektrokemijsko ponašanje 5-CQA te se uočava linearni porast strujnog odziva povećanjem koncentracije analita (**Slika 11**).

Na **Slici 12** i **Slici 13** prikazan je utjecaj frekvencije pobudnog signala na oksidaciju 5-CQA na površini radne elektrode. Uočava se porast strujnog odziva s porastom frekvencije pobudnog signala od 25 do 150 Hz te se uočava linearna ovisnost u jednakom rasponu frekvencija.

Ispitana su elektrokemijska svojstva uzoraka mljevenih kava Arabesca Minas, Barcaffè Classic, Franck Jubilarna Sensual i Gloria Minas ($DF = 50$). Na **Slikama** od **14** do **17** prikazani su SW voltamogrami ispitanih uzoraka kava te se uočava jedan jasno izraženi oksidacijski pik i jedan jasno izraženi redukcijski pik na potencijalu oko potencijala 5-CQA te se pripadnost strujnog odziva može pripisati prisutnosti 5-CQA u otopini kava.

Nadalje, ispitan je utjecaj promjene frekvencije pobudnog signala na oksidaciju uzoraka mljevenih kava u području od 25 do 150 Hz te se uočava linearna ovisnost (**Slika 18**) i jednako elektrokemijsko ponašanje kao i kod 5-CQA.

Na **Slikama** od **19** do **22** prikazan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije ispitanih uzoraka mljevenih kava te na svim SW voltamogramima mljevenih kava uočava jednako elektrokemijsko ponašanje kao i kod 5-CQA odnosno opadanje strujnog odziva u 2. i 3. polarizaciji uslijed adsorpcije oksidacijskih produkata na površini radne elektrode i otežane difuzije analita iz otopine prema radnoj GC elektrodi.

S ciljem kvantificiranja sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina odnosno ukupnih polifenola kreiran je baždarni pravac prikazan na **Slici 23**. Jednadžba pravca glasi:

$$I_p/\mu A=0,20326+0,37483 \times 2$$

Te je je osjetljivost metode određene granicom detekcije (*LOD*) koja iznosi $7,7 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ i granicom kvantifikacije (*LOQ*) koja iznosi $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina izražen je kao mg 5-CQA ekvivalenta po 100 g kave te je prikazan u **Tablici 2**. Uočava se sličan sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina u svim ispitanim mljevenim kavama što odgovara literaturnim referencama (Šeruga i Tomac, 2014.; Kilmartin i Hsu, 2003.).

Primijenjena je spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u uzorcima mljevenih kava. Baždarni pravac kreiran je pomoću različitih koncentracija galne kiseline (**Slika 24**) kao uobičajenog standarda za ovu metodu i pomoću različitih koncentracija 5-CQA kao dominantne klorogenske kiseline u uzorcima kava (**Slika 25**).

Sadržaj ukupnih polifenola izraženih preko galne kiseline odnosno preko 5-CQA ekvivalenata prikazani su na **Slici 26** te se uočava podjednaki sadržaj u ispitanim mljevenim kavama te je sadržaj sličan sadržaju ukupnih klorogenskih kiselina dobiven primjenom pravokutnovalne voltametrije te statistička obrada pokazuje slaganje rezultata.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi istraživanja ovog diplomskog rada izvedeni su slijedeći zaključci:

- Ispitana elektrokemijska svojstva 5-CQA primjenom pravokutnovalne voltametrije pokazala su da primijenjeni eksperimentalni uvjeti kao što su kemijska struktura, pH vrijednost osnovnog elektrolita, višestruka uzastopna polarizacija, frekvencije pobudnog signala i koncentracija analita utječu na elektrokemijsko ponašanje 5-CQA.
- 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 SW voltamogramu pokazuje porast strujnog odziva do pH 7, daljnjim povećanjem pH vrijednosti strujni odziv opada.
- Ukupni strujni odziv pika na SW voltamogramu otopine 5-CQA je linearna funkcija drugog korijena iz frekvencije pobudnog signala. Potencijal pika se pomiče prema pozitivnijim vrijednostima s porastom frekvencije pobudnog signala. Prema SWV kriterijima reverzibilnosti procesa, ovisnost potencijala pika i strujnog odziva o frekvenciji pobudnog signala ukazuje da se u otopini 5-CQA na površini GC elektrode odvija reverzibilan, difuzijskih kontroliran proces.
- Utjecaj promjene koncentracije analita pokazao je linearnost metode u rasponu koncentracije od 5 do 50 μmol L⁻¹ 5-CQA.
- Elektrokemijsko ponašanje mljevenih kava ispitano je pravokutnovalnom voltametrijom gdje se na svim SW voltamogramima jasno uočava jedan strujni odziv te se može zaključiti velika sličnost sa SW voltamogramom 5-CQA.
- Kvantifikacija sadržaja 5-CQA u mljevenim kavama provedena je primjenom kalibracijskog pravca ($LOD = 7,7 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ i $LOQ = ,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹). Ispitane mljevene kave imaju sličan sadržaj 5-CQA.
- Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola u mljevenim kavama provedeno je primjenom Folin-Ciocalteu metodom. Sadržaj ukupnih polifenola izražen prema sadržaju 5-CQA i galne kiseline te je sadržaj u ispitanim mljevenim kavama podjednak.

- Statistička obrada podataka dobivenih voltametrijskom i spektrofotometrijskom metodom pokazali su slaganje dobivenih rezultata te su se obje metode pokazale pogodne za kvantifikaciju sadržaja klorogenskih kiselina u mljevenim kavama.

7. LITERATURA

- Bae JH, Park JH, Im SS, Song DK: Coffee and health. U *Department of Physiology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea: Integrative Medicine Research* str. 189-191, 2014.
- Bockris JOM, Reddy AKN, Gamboa-Aldeco M: Modern Electrochemist 2A, Fundamentals of Electrodeics, 2nd Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000
- Cavin C, Holzhaeuser D, Scharf G, Constable A, Huber WW, Schilter B: Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem Toxicol* 2002 Aug;40(8):1155-63.
- 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.
- Đaković A: Voltometrijsko određivanje nikla u tlu elektrodom od staklastog ugljika modificiranom slojem žive. Kemijsko-tehnološki fakultet Split, Split, 2018.
- Farah A, Donangelo CM: Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(1): 23-26, 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.
- Hoelzl C, Knasmüller S, Wagner KH, Elbling L, Huber W, Kager N, Ferk F, Ehrlich V, Nersesyan A, Neubauer O, Desmarchelier A, Marin-Kuan M, Delatour T, Verguet C, Bezençon C, Besson A, Grathwohl D, Simic T, Kundi M, Schilter B, Cavin C: Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. U *Molecular Nutrition Food Research* 54:1722-1733, 2010.
- Jakobek Barron L: Nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne metode II. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2017.
- Jeszka-Skowron M, Zgola-Grzeskowlak A, Grzeskowlak T: Analytical methods applied for characterizoation and the determination of bioactive compounds in coffee. U *European Food Researchand Technology* 240: 19-31, 2015.
- Kilmartin PA, Hsu CF: Characterisation of polyphenols in green, oolong and black teas and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 82:501-512, 2003.

- Klapec T, Strelec I: *Prehrambena biokemija, Oksidativni stres i starenje*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2018.
- Kreicbergs V, Dimins F, Mikelsons 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.
- Mirčeski V, Komorsky-Lovrić Š, Lovrić M: *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007.
- Pavia D L, Lampman G M, Kriz G S: „*Introduction to Spectroscopy*“, Third Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, Australia, 2001.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Brighenti F: Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. U *The Journal of Nutrition* 133, 2812–2819, 2003.
- Piljac I: Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. *Prehrambena-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu*, Media Print, Zagreb, 2010.
- Pravilniku o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina, Narodne novine Republike Hrvatske, 172, 2004.
- Santos WJR, Santhiago M, Yoshida IVP: Novel electrochemical sensor for the selective recognition of chlorogenic acid. *Analytica Chimica Acta*, 695:44-50, 2011.
- Šeruga M, Tomac I: Electrochemical Behaviour of Some Chlorogenic Acids and Their Characterization in Coffee by Square-Wave Voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, 9, 6134 – 6154, 2014.
- Toci AT, Silva CM, Fernandes F, Farah A: Effect of the fluid speed changes on the chemical composition of coffee samples roasted in an industrial semi-fluidized bed roaster. *Proc. 23rd Int. Conf. Coffee Sci. ASIC*, 500–503. 2009. Trieste, Italy.
- Tomac I: Karakterizacija klorogenskih kiselina i analiza antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama kava primjenom elektrokemijskih metoda. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2016.
- Tucker C M: *Coffee culture : Local Experiences, Global Connections*. Routledge, New York, 2011.

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

Web1: <http://coffeenu.com/wp-content/uploads/2017/06/coffee-legend.jpg> (18.04.2019.).

Web2: <https://chairry.net/en/2015/04/03/europes-oldest-coffee-houses/> (18.04.2019.).

Web3: <http://arabicarobustacoffeesupplier.com/wp-content/uploads/2018/06/arabica-vs-robusta.jpg> (20.04.2019.).

Web4: <https://making-nice-coffee.com/liberica-coffee/> (20.04.2019.).

Web5: <https://www.franck.eu/hr/ugostitelji/tajne-barista/price-barista/od-plantaze-do-salice-kav/> (22.04.2019.).

Web6: <https://associatedcoffee.com/wp-content/uploads/2016/04/How-Coffee-Changes-During-The-Roasting-Process-Associated-Services-fm.png> (23.04.2019.).

Web7: <https://vrteje8p14-flywheel.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2014/07/Instant-Coffee-vs-Brewed-Coffee-Appliances-Repair.jpg> (23.04.2019.).

Web8: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/57/Chlorogenic-acid-2D.svg/1200px-Chlorogenic-acid-2D.svg.png> (11.05.2019.).

Web9: <https://www.scribd.com/doc/289088682/ODREDJIVANJE-UKUPNIH-FENOLA> (26.05.2019.).