Karakterizacija klorogenskih kiselina i analiza antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama kave primjenom elektrokemijskih metoda

Tomac, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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:109:938176

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Tomac

KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA I ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U RAZLIČITIM VRSTAMA KAVE PRIMJENOM ELEKTROKEMIJSKIH METODA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, lipanj 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 547.56 : 543.5 : 663.93 (043)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na XI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. rujna 2012. godine.
Voditelj: prof. dr. sc. *Marijan Šeruga*

KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA I ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U RAZLIČITIM VRSTAMA KAVA PRIMJENOM ELEKTROKEMIJSKIH METODA

Ivana Tomac, 38/04

Sažetak:

U ovoj disertaciji provedena je karakterizacija klorogenskih kiselina (CGAs) i analiza antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama kave (zelenim i prženim zrnima kave *C. arabica* i *C. robusta*, mljevenim kavama Franck Guatemala i Flatcher Olympia te instant kavama Nescafé Classic, Nescafé Espresso, Jacobs Monarch i Jacobs Intense). Prije karakterizacije CGAs, istražena su elektrokemijska svojstva kafeoilkina kiselina (CQAs), dikafeoilkina kiselina (diCQAs) i feruloilkina kiselina (FQAs) primjenom pravokutnovalne voltametrije (SWV), diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) i protočne *stripping* kronopotenciometrije (FTSCP). Elektrokemijska mjerenja CGAs utvrdila su da se na površini radne elektrode odvijaju različite elektrokemijske reakcije različitim oksidacijskim mehanizmima, ovisno o kemijskoj strukturi CGAs. Karakterizacija CGAs provedena je primjenom metoda SWV, DPV, FTSCP i HPLC. Identifikacija i kvantifikacija CGAs u kavama pokazala je da najveći sadržaj ukupnih CGAs imaju zelena zrna kava. Antioksidacijska aktivnost CQAs i diCQAs istraživana je primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora, dok je antioksidacijska aktivnost kave istraživana i primjenom DPPH i ABTS metode. Analiza antioksidacijske aktivnosti CQAs i diCQAs primjenom DNA biosenzora pokazala je ovisnost o kemijskoj strukturi ispitivanih klorogenskih kiselina. DNA biosenzor, ABTS i DPPH metode pokazale su da najveću antioksidacijsku aktivnost imaju uzorci zelenog zrna kave, zbog najvećeg sadržaja ukupnih CGAs. Istraživanjima je utvrđeno da postoji vrlo dobra do izvrsna korelacija između antioksidacijske aktivnosti kava i sadržaja ukupnih CGAs.

Ključne riječi: Karakterizacija klorogenskih kiselina, kave, elektrokemijske metode (SWV, DPV, FTSCP), antioksidacijska aktivnost, DNA biosenzor
Rad sadrži: 230 stranica
187 slika
24 tablica
172 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. *Drago Šubarić*	predsjednik
2.	prof. dr. sc. *Marijan Šeruga*	član-mentor
3.	prof. dr. sc. *Igor Jerković*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Lidija Jakobek*	zamjena člana

Datum obrane: 17. lipanj 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

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

UDC: 547.56 : 543.5 : 663.93 (043)

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. XI. held on Septembre 28, 2012.
Mentor: *prof. dr. sc. Marijan Šeruga*

CHARACTERIZATION OF CHLOROGENIC ACIDS AND ANALYSIS OF ANTIOXIDATION ACTIVITY IN DIFFERENT COFFEE VARIETIES USING ELECTROCHEMICAL METHODS

Ivana Tomac, 38/04

Summary:

In this study, the characterization of chlorogenic acid (CGAs) and the analysis of antioxidant activity in different brands of coffee (green and roasted beans *C. arabica* and *C. robusta*, ground coffee Franck Guatemala and Flatcher Olympia, and instant coffee Nescafé Classic, Nescafé Espresso, Jacobs Monarch and Jacobs Intense) were investigated. Before the characterization, the electrochemical properties of the caffeoylquinic acids (CQAs), dicaffeoylquinic acids (diCQAs) and feruloylquinic acids (FQAs) were analysed by the square-wave voltammetry (SWV), differential pulse voltammetry (DPV) and flow through stripping chronopotentiometry (FTSCP). The electrochemical measurements of the CGAs have shown that on the surface of the working electrode, the different electrochemical reactions *via* different mechanisms of oxidation proceeded, in connection with the chemical structure of CGAs. Characterization of CGAs was performed by SWV, DPV, FTSCP and HPLC methods. The identification and quantification of the CGAs in different brands of coffee were performed by the SWV, DPV, FTSCP and HPLC methods. The results have shown that the highest CGAs total content exists in the green coffee beans. The antioxidant activity CQAs and diCQAs were analysed by DNA-biosensor while the antioxidant activity of coffee was analysed also by DPPH and ABTS methods. Antioxidant analysis of CQAs and diCQAs using DNA-biosensors has shown the dependence on the chemical structure of investigated CGAs. The methods of DNA-biosensor, ABTS and DPPH have shown the highest antioxidant activity in the green coffee beans due to the highest content of the total CGAs. Very good to the excellent correlation between the antioxidant activity of coffee and the CGAs total content was observed in this study.

Key words: Characterization of chlorogenic acids, coffee, electrochemical methods (SWV, DPV, FTSCP), antioxidant activity, DNA biosenzor
Thesis contains: 230 pages
187 figures
24 tables
172 references
Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Drago Šubarić,* full professor — chair person
2. *Marijan Šeruga,* full professor — supervisor
3. *Igor Jerković,* full professor — member
4. *Lidija Jakobek*, PhD, associate professor — stand-in

Defense date: June 17, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Marijanu Šerugi koji me je uveo u svijet elektrokemije, na savjetima i strpljenju tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem svim kolegama na podršci i savjetima.

Seki i roditeljima zahvaljujem na ljubavi, razumijevanju i bezuvjetnoj potpori.

Posebno zahvaljujem svom suprugu Zvonimiru na neizmjernoj ljubavi, razumijevanju, strpljenju i pomoći tijekom izrade ove disertacije te svojoj djeci Jani i Eviti na mnoštvu zagrljaja, osmjeha i poljubaca. Hvala vam.

Ivana

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 4

2.1. KAVA 5

2.1.1. Povijest kave 6

2.1.2. Prerada sirovog zrna kave 6

2.1.3. Prženje kave 8

2.1.4. Vrste napitaka kave 11

2.1.5. Kemijski sastav kave 13

2.1.6. Biološki učinci kave 16

2.2. KLOROGENSKE KISELINE 16

2.2.1. Kemijska struktura klorogenskih kiselina 17

2.2.2 Promjene kemijskog sastava klorogenskih kiselina tijekom procesa prženja 20

2.2.3. Elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina 22

2.2.4. Fizikalno–kemijska svojstva klorogenskih kiselina 23

2.2.5. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost klorogenskih kiselina 23

2.3. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVI 25

2.3.1. HPLC metoda karakterizacije klorogenskih kiselina u kavi 26

2.3.2. Elektrokemijske metode karakterizacije klorogenskih kiselina u kavi 27

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KAVA 33

2.4.1. Spektrofotometrijske metode analize antioksidacijske aktivnosti kava 34

2.4.2. Elektrokemijske metode analize antioksidacijske aktivnosti kava 36

3. EKSPERIMENTALNI DIO 42

3.1. ZADATAK 43

3.2. MATERIJALI I METODE 44

3.2.1. Uzorci kave 44

3.2.2. Kemikalije i ostali materijal 44

3.2.3. Priprema otopina klorogenskih kiselina 45

3.2.4. Elektrokemijska analiza klorogenskih kiselina i kava 46

3.2.5. HPLC-UV/Vis analiza uzoraka kave i klorogenskih kiselina 49

3.2.6. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava i klorogenskih kiselina 50

3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava 55

3.3. VALIDACIJA INSTRUMENTALNIH ANALITIČKIH METODA 56

3.4. OBRADA I PRIKAZ REZULTATA 58

4. REZULTATI 49

4.1. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVI HPLC METODOM 61

4.1.1. Kromatogrami model otopina klorogenskih kiselina 61
4.1.2. Kromatogrami vodenih ekstrakata kava 63
4.1.3. Identifikacija klorogenskih kiselina HPLC metodom 68
4.1.4. UV/Vis spektri otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata uzoraka kava 74
4.1.5. Kvantifikacija sadržaja klorogenskih kiselina u uzorcima kava primjenom HPLC metode 78
4.2. ELEKTROKEMIJSKA SVOJSTVA KLOROGENSKIH KISELINA 81
4.2.1. Elektrokemijska priprema GC elektrode 81
4.2.2. Pravokutnovalna voltametrija (SWV) klorogenskih kiselina 82
4.2.3. Diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) klorogenskih kiselina 96
4.2.4. Protočna *stripping* kronopotenciometrija (FTSCP) klorogenskih kiselina 102
4.3. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PRAVOKUTNOVALNE VOLTAMETRIJE 114
4.3.1. Pravokutnovalna voltametrija vodenih ekstrakata kava 114
4.3.2. Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom pravokutnovalne voltametrije 120
4.3.3. Kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom pravokutnovalne voltametrije 121
4.4. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE 122
4.4.1. Diferencijalna pulsna voltametrija vodenih ekstrakata kava 122
4.4.2. Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom diferencijalne pulsne voltametrije 128
4.4.3. Kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom diferencijalne pulsne voltametrije 130
4.5. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PROTOČNE *STRIPPING* KRONOPOTENCIOMETRIJE 131
4.5.1. Protočna *stripping* kronopotenciometrija vodenih ekstrakata kava 131
4.5.2. Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije 137
4.5.3. Kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije 138
4.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST OTOPINA KLOROGENSKIH KISELINA I VODENIH EKSTRAKATA KAVA 140
4.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava 140
4.6.2. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava 141
4.7. KORELACIJE SADRŽAJA UKUPNIH KLOROGENSKIH KISELINA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VODENIH EKSTRAKATA KAVA 152
4.7.1. Korelacije sadržaja klorogenskih kiselina mjerenih elektrokemijskim metodama i HPLC metodom 154
4.7.2. Korelacije rezultata mjerenja antioksidacijske aktivnosti 156
4.7.3. Korelacija između sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava i antioksidacijske aktivnosti kava 157
5. RASPRAVA 160

5.1. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVI HPLC METODOM 161
5.1.1. Kromatogrami model otopina klorogenskih kiselina 161
5.1.2. Kromatogrami vodenih ekstrakata kava 161
5.1.3. Identifikacija klorogenskih kiselina HPLC metodom 162
5.1.4. UV/Vis spektri model otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata uzoraka kava 163
5.1.5. Kvantifikacija sadržaja klorogenskih kiselina u uzorcima kava primjenom HPLC metode 164
5.2. ELEKTROKEMIJSKA SVOJSTVA KLOROGENSKIH KISELINA 166
5.2.1. Elektrokemijska svojstva kafeoilkina kiselina 166
5.2.2. Elektrokemijska svojstva dikafeoilkina kiselina 176
5.2.3. Elektrokemijska svojstva feruloilkina kiselina 179
5.3. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PRAVOKUTNOVALNE VOLTAMETRIJE 185
5.4. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE 188
5.5. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PROTOČNE STRIPPING KRONOPOTENCIOMETRIJE 190
5.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST OTOPINA KLOROGENSKIH KISELINA I VODENIH EKSTRAKATA KAVA 192
5.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava 192
5.6.2. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava 195
5.7. KORELACIJE SADRŽAJA UKUPNIH KLOROGENSKIH KISELINA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VODENIH EKSTRAKATA KAVA 204
5.7.1. Korelacije sadržaja klorogenskih kiselina mjerenih elektrokemijskim metodama i HPLC metodom 205
5.7.2. Korelacije rezultata mjerenja antioksidacijske aktivnosti 205
5.7.3. Korelacije između sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava i antioksidacijske aktivnosti kava 206
6. ZAKLJUČCI 208
7. LITERATURA 216

Popis oznaka, kratica i simbola

ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
b	nagib kalibracijskog pravca
CFA	kafeinska kiselina (engl. *caffeic acid*)
CGAs	klorogenske kiseline (engl. *chlorogenic acids*)
CQAs	kafeoilkina kiseline (engl. *caffeoylquinic acids*)
CV	ciklička voltametrija (engl. *cyclic voltammetry*)
DF	faktor razrjeđenja (engl. d*ilution factor*)
diCQAs	dikafeoilkina kiseline (engl. *dicaffeoylquinic acids*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPV	diferencijalna pulsna voltametrija (engl. *differential pulse voltammetry*)
E_p	potencijal pika (engl. *peak potential*)
f	pravokutnovalna frekvencija
FA	ferulična kiselina (engl. *ferulic acid*)
FQAs	feruloilkina kiseline (engl. *feruloylquinic acids*)
FTSCP	protočna *stripping* kronopotenctiometrija (engl. *flow-through stripping chronopotentiometry*)
GCE	elektroda od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon electrode*)
I_b	povratna struja (engl. *backward current*)
I_f	početna struja (engl. *forward current*)
I_p	struja pika (engl. *peak current*)
LOD	granica detekcije (engl. *limit of detection*)
LOQ	granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*)
LC-MS	vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*)
QA	kina kiselina (engl. *quinic acid*)
r	koeficijent korelacije

RP-HPLC	reverzno-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*)
s_a	standardna devijacija y-odsječka kalibracijskog pravca
SPCe	ugljikova ''*screen-printed*'' elektroda
SWCNT	ugljikova elektroda na koju je nanesen sloj karboksiliranih jednostjenčanih ugljikovih nanočestica (engl. *Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes)*
SWV	pravokutnovalna voltametrija (engl. *square-wave voltammetry*)
$W_{1/2}$	širina na polovici visine strujnog pika
ΔE	korak potencijala (engl. *step potential*)
ΔI	ukupna struja pika

1. UVOD

Klorogenske kiseline (engl. *chlorogenic acids*, CGAs) predstavljaju grupu polifenolnih spojeva koji nastaju kao mono-, di-, tri- i/ili miješani esteri nekih hidroksicimetnih kiselina (kafeinske, ferulične i *p*-kumarinske kiseline) esterifikacijom s (-)-kina kiselinom (engl. *quinic acid,* QA). Klorogenske kiseline široko su rasprostranjene u različitim biljkama, namirnicama biljnog podrijetla te u napitcima pripremljenim od biljnog materijala (npr. kavi, čajevima).

Kava predstavlja najznačajniji nutritivni izvor klorogenskih kiselina. Najzastupljenije klorogenske kiseline u kavi su kafeoilkina kiseline (CQAs), a prevladavajuća CQAs u kavi je 5-*O*-kafeoilkina kiselina (5-CQA). U kavi nalazimo i značajnu količinu dikafeoilkina kiselina (diCQAs). Od ostalih klorogenskih kiselina u kavi su prisutne male količine estera (-)-kina kiseline i ferulične kiseline tj. feruloilkina kiseline, FQAs (npr. 5-*O*-feruloilkina kiselina, 5-FQA). Sadržaj ostalih izomera klorogenskih kiselina u kavi je vrlo mali ili je prisutan u tragovima.

Brojna istraživanja ukazuju da klorogenske kiseline posjeduju značajnu biološku i farmakološku aktivnost, djelujući kao antioksidansi te kao antitumorni, antiupalni i antibakterijski čimbenici. Također, epidemiološka istraživanja ukazuju da umjereno konzumiranje kave pokazuje različite povoljne efekte na zdravlje ljudi (npr. smanjuje rizik od nastanka Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, dijabetesa tipa 2, nekih vrsta tumora, itd.). Za takve povoljne učinke kave najvećim dijelom odgovornim se smatraju klorogenske kiseline.

Karakterizacija (identifikacija i kvantifikacija) klorogenskih kiselina u kavi provedena je različitim instrumentalnim tehnikama, a najčešće primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u kombinaciji s različitim detektorima (UV/Vis, PDA, MS, EC). Posebno značajan napredak u analizi CGAs u kavi, učinjen je uvođenjem spektrometrije masa (MS), tj. vezanog sustava HPLC-MS^n kao metode za analizu kave, što je omogućilo identifikaciju velikog broja novih do tada nepoznatih izomera CGAs u kavi.

U posljednje vrijeme različite elektrokemijske metode (prije svega voltametrijske metode) nalaze sve širu primjenu u karakterizaciji elektroaktivnih spojeva (naročito polifenolnih antioksidansa) u različitim namirnicama. Istraživanja koja se odnose na primjenu elektrokemijskih metoda za karakterizaciju klorogenskih kiselina u kavi, relativno su malobrojna, a identifikacija pojedinih grupa izomera CGAs nije provedena potpuno ispravno. Stoga je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije razviti jednu ili više elektrokemijskih metoda za karakterizaciju klorogenskih kiselina u različitim uzorcima kave.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je biološka aktivnost klorogenskih kiselina povezana s njihovim elektrokemijskim svojstvima. Stoga bi poznavanje elektrokemijskih svojstava klorogenskih kiselina značajno doprinijelo boljem razumijevanju oksidacijskog mehanizma i antioksidacijske aktivnosti klorogenskih kiselina i njihovog složenog antioksidacijskog djelovanja u kavi.

Elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina do sada su malo istraživana i prema literaturnim podacima samo za 5-CQA, dok elektrokemijska svojstva ostalih klorogenskih kiselina nisu do sada istraživana. Stoga je istraživanje elektrokemijskih svojstava dominantnih klorogenskih kiselina prisutnih u kavi, postavljeno kao jedan od ciljeva ove disertacije. U tu svrhu koristit će se više elektrokemijskih metoda i to: ciklička voltametrija (CV), diferencijalna pulsna voltametrija (DPV), pravokutnovalna voltametrija (SWV) te *stripping* kronopotenciometrija u protočnim uvjetima (FTSCP). Navedene tehnike (DPV, SWV, FTSCP) koristit će se i kao metode za karakterizaciju klorogenskih kiselina u različitim uzorcima kave, a dobiveni rezultati usporedit će se s rezultatima dobivenim HPLC analizom kave.

Drugi je cilj doktorske disertacije razviti selektivnu, osjetljivu i preciznu elektrokemijsku metodu za određivanje antioksidacijske aktivnosti (AA), kako klorogenskih kiselina tako i uzoraka kave. Do sada korištene standardne metode, kao npr. ABTS, DPPH i slične metode, daju često rezultate koji se ne mogu međusobno uspoređivati jer različiti autori modificiraju originalne metode što dovodi do određene konfuzije u interpretaciji rezultata. Stoga će se ispitati mogućnost primjene elektrokemijskog DNA biosenzora za određivanje AA u uzorcima kave i otopinama klorogenskih kiselina. Bit će pripremljena posebna vrsta biosenzora korištenjem tzv. „*Screen Printed Electrodes*“ (SPEs), što predstavlja značajnu novost u istraživanjima antioksidacijske aktivnosti, a naročito u analizi AA uzoraka kave. Rezultati dobiveni primjenom DNA biosenzora usporedit će se s rezultatima dobivenim standardnim spektrofotometrijskim metodama određivanja antioksidacijske aktivnosti (ABTS, DPPH).

Primjena elektrokemijskih metoda za karakterizaciju klorogenskih kiselina u različitim uzorcima kava, kao i za određivanje njihove antioksidacijske aktivnosti, dat će nove podatke o sadržaju i vrsti klorogenskih kiselina prisutnih u kavi te o njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti. To će znatno doprinijeti boljem poznavanju i razumijevanju složenih i nedovoljno poznatih mehanizama različitih elektrokemijskih i antioksidacijskih reakcija koje se odvijaju u otopinama klorogenskih kiselina i u složenom kemijskom sustavu kao što je kava kao napitak.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KAVA

Biljka kave je zimzeleni grm ili malo stablo koje pripada porodici *Rubiaceae*. Botanička klasifikacija kave prikazana je u **Tablici 1**.

Tablica 1 Botanička klasifikacija kave (Clifford i Willson, 1985.)

Kategorija		Latinski naziv kategorije
carstvo	regnum	*Plantae*
podcarstvo	subregnum	*Tracheobionta*
odjeljak	phylum	*Spermatophyta*
pododjeljak	subphylum	*Magnoliophyta*
razred	classis	*Magnoliopsida*
podrazred	subclassis	*Asteridae*
red	ordo	*Rubiales*
porodica	familiae	*Rubiaceae*
rod	genus	*Coffea*
podrod	subgenus	*Eucoffea*
vrsta	species	*Coffea arabica L.*
		Coffea canephora (robusta)

Generički naziv *Coffea* odnosi se na oko sedamdeset vrsta kava, a samo su dvije vrste kave , *C. arabica* i *C. robusta,* ekonomski značajne (podrod *Eucoffea*).

Ovisno o vrsti kave, grm ili drvo naraste od 3 do 12 m visine, a siječe se na visinu do 2 – 2,5 m zbog lakše berbe. Tropski zimzeleni grm kave ima čvrste, tamnozelene duguljaste listove i kremasto-bijele cvjetove čiji miris podsjeća na miris cvijeta jasmina, iz kojih se razvija čvrsti bobičasti plod promjera 1,5 cm. Bobica ploda kave ima zelenu vanjsku opnu koja sazrijevanjem postaje tamnocrvena ili tamnoljubičasta, a sastoji se od dvije eliptične hemisfere sa spljoštenim stranama zrna. Grm kave uzgaja se u vlažnom, toplom ekvatorskom pojasu od 600 do 1200 m nadmorske visine, na temperaturi od 15°C do 25°C pri umjerenoj vlazi zraka. Nakon tri do četiri godine starosti, grm ulazi u fazu plodnosti i može rađati plod do četrdeset godina starosti. Najbolja rodnost biljke je između 10. i 15. godine starosti. Jedan grm kave može dati oko 2,7 kg ploda bobica što odgovara 0,9 – 1,1 kg sirovog zelenog zrna (Belitz i sur., 2004.).

2.1.1. Povijest kave

Jedna od najpoznatijih legendi o otkriću kave govori o afričkom pastiru Kaldiju koji je vodio svoje koze na ispašu na obronke iznad Crvenog mora. Tijekom ispaše koze su brstile male grmove s bobicama. Nakon konzumiranja bobica koze su postale živahnije i uzbuđenije. Pastir Kaldi, nakon što je primijetio neuobičajeno ponašanje svojih koza, ubrao je nekoliko bobica i odnio ih monahu u obližnji manastir. Monah je ispržio i samljeo bobice te popio napitak pripremljen od njih i primijetio bolju usredotočenost i budnost tijekom dugih noćnih molitvi. Legenda kaže da je tako nastala prva šalica kave (Clifford i Willson, 1985.).

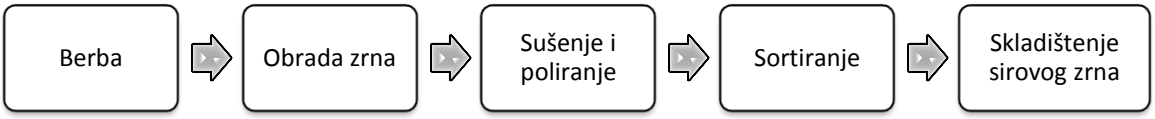
U prošlosti su sirova zrna nakon branja morala biti zagrijana ili blanširana s ciljem zaustavljanja klijanja. Strancima je bio zabranjen pristup plantažama kave. No jedna od priča kaže da je indijski hodočasnik Baba Budan uspio prokrijumčariti sedam sirovih zrna kave, s mogućnošću daljnjeg klijanja, iz Meke u Misore oko 600 godine poslije Krista. Među stranim putnicima i hodočasnicima ubrzo se proširila priča o jakom crnom napitku. Prvu biljku kave, donesenu na europski kontinent, ukrao je jedan nizozemski trgovac 1616. godine. Iz Europe kava se dalje nastavila širiti u istočnu Indiju gdje nastaju nove plantaže kave.

C. arabica potječe iz Etiopije, a otkrivena je 850. godine poslije Krista. Uzgojena je u arapskoj koloniji Harar, odakle se dalje širi u Meku iz koje ju hodočasnici prenose na druge dijelove islamskog svijeta. *C. robusta* je poslije otkrivena u Africi, a veliki značaj je dobila zbog svoje velike otpornosti na bolesti. Nakon II. svjetskog rata, zbog nestašice, zamijenila je sve kave s područja Južne Amerike.

Prve kavane otvorene su u Beču, zatim u Londonu u 17. stoljeću i bile su, a i danas jesu centar socijalnog i društvenog života. Prve kavane u Hrvatskoj otvorene su u Zagrebu 1748. godine, a otvorili su ih Leopold Dun i Valentius Horra. Danas u Hrvatskoj broj kavana svakodnevno raste (Clifford i Willson, 1985.; Šimunac, 2014.; Belitz i sur., 2004.).

2.1.2. Prerada sirovog zrna kave

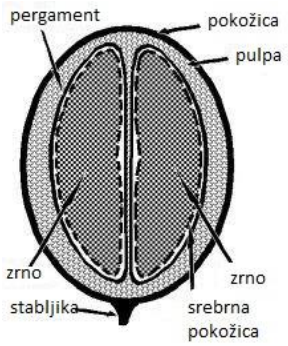
Postupak obrade biljke kave prikazan je na **Slici 1**.



Slika 1 Primarna obrada kave

Berba je najzahtjevniji postupak u ciklusu proizvodnje kave. Kava se bere u različito doba godine, ovisno o proizvodnim regijama. Na sjevernoj hemisferi berba započinje u rujnu i traje do prosinca, dok južno od ekvatora berba započinje najčešće u travnju ili svibnju i traje do srpnja ili kolovoza. Može se odvijati ručno tako da se ručno bere svaka zrela bobica ili bobica koja je otpala na tlo ili mehanički pomoću posebnih strojeva za berbu. Ručna berba ima prednost nad mehaničkom jer se beru samo zdrave zrele bobice, dok kod mehaničke berbe prisutne su različite primjese (kamenčići, grančice, listovi, nezrele bobice, trule bobice), što utječe na kvalitetu krajnjeg produkta kave (napitak).

Nakon berbe bobica kave slijedi obrada zrna. Iz mekanih plodova se odvaja središnji dio koji čine dva zrna kave. Prikaz bobice kave prikazan je na **Slici 2**.



Slika 2 Dijelovi bobice kave

Odvajanje zrna kave iz bobice kave, odvija se suhim, mokrim i kombiniranim postupkom.

Suhi postupak odvajanja bobice kave

Suhi postupak odvajanja bobice kave, jednostavan je i jeftin postupak. Bobice kave se suše na sunčanim površinama u tankom sloju na podlozi, kroz određeno vremensko razdoblje (4 tjedna). Da bi se izbjegla fermentacija, bobice se povremeno preokreću. Zbog izloženosti suncu, pokožica bobice kave se suši i lako odvaja od zrna. Nakon sušenja plod se čisti, uklanja mu se pokožica i pulpa dok srebrna pokožica ostaje. Suhim postupkom odvajanja bobice kave dobiju se dovoljno suha zelena zrna (prirodna zrna) koja su pogodna za čuvanje i pakiranje u vreće za transport. Nedostatak ovog postupka je moguća prisutnost nedovoljno osušenih plodova što može dovesti do razvoja plijesni te moguća prisutnost presušenih plodova koji će se oštetiti tijekom ljuštenja (Farah, 2012.; Clifford i Willson, 1985.; Duarte i sur., 2010.; http://www.ico.org/projects/Good-Hygiene-

Practices/cnt/cnt_en/sec_3/docs_3.3/fermentation.pdf;).

Mokri postupak uklanjanja bobice kave

Mokri je postupak uklanjanja bobice kave moderniji postupak u usporedbi sa suhim postupkom, a dobije se zrno veće kvalitete. Nakon berbe bobice se uranjaju u vodu da bi omekšale. Pulpa se uklanja pomoću uređaja s podesivim oštricama. Zrna prolaze postupak drobljenja i ispiranja vodom u kanalima. Fermentacijom se uklanja zaostala pulpa i mukozni sloj djelovanjem pektolitičkih enzima. Tijekom fermentacije mijenja se pH od 6,8 do pH 4,2. Zrna zadržavaju pergament ovojnicu, ispiru se, poliraju i suše u struji toplog zraka ili na sunčanim površinama. Ovim postupkom se dobiju zrna do 11 % vlažnosti. Mokri postupak uklanjanja bobice kave primjenjuje se u Kolumbiji, Aziji i središnjoj Americi.

Kombinirani postupak uklanjanja bobice

Kod kombiniranog postupak uklanjanja bobice kave, za razliku od suhog i mokrog postupka uklanjanjanja bobice, drobljenje i uklanjanje dijelova bobice se odvija bez pranja. Zrna se suše s ostatcima usploda te se dobije kava punije arome i slađeg okusa.

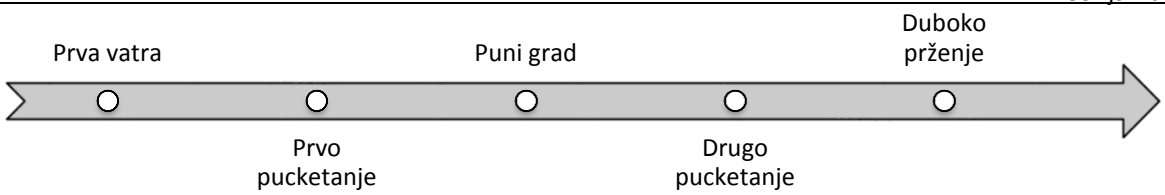
Nakon postupka uklanjanja bobice kave, dobiju se zelena zrna koja se mehanički, ručno i elektronski sortiraju te se uklanjaju oštećena zrna. Nakon postupka sortiranja i uklanjanja nečistoća, zelena zrna se skladište i transportiraju na željenu lokaciju (Belitz i sur., 2004.; Farah, 2012.; Clifford i Willson, 1985.; Duarte i sur., 2010.).

2.1.3. Prženje kave

Prženje kave je osjetljiv i zahtjevan proces. Pri prženju kave odvijaju se različite fizikalno-kemijske promjene zelenog zrna (promjena volumena zrna, smanjenje udjela vlage, razvoj karakterističnog mirisa i arome, boje, značajna promjena kemijskog sastava). Okus i kvalitetu kave određuje vrsta zrna, a stupanj prženja uvjetuje jakost kave. Tako, zrna kava, koja su pržena na višoj temperaturi, sadrže manje kofeina od kave koja je pržena pri nižoj temperaturi (srednji stupanj prženja), što ujedno utječe na stupanj gorčine napitka.

2.1.3.1. Tradicionalna metoda prženja kave

Postupak prženja kave tradicionalnom metodom, odvija se vremenski od 10 do 15 minuta na temperaturi 200 – 220 °C. Na **Slici 3** prikazan je tijek prženja zrna tradicionalnom metodom prženja kave.



Slika 3 Tradicionalna metoda prženja kave

Prva vatra

U pržionik se ubaci određena količina zelenih zrna. Početne promjene na zelenom zrnu kave započinju na temperaturi iznad 50 °C kada se proteini denaturiraju i voda počinje isparavati. U prve tri minute zrna počinju mirisati na travu, poprimajući tamnozelenu boju. U petoj minuti prženja, zrna bubre, blijede, zatim ponovo tamne u smeđožutu boju. Reakcije posmeđivanja zrna (Maillardove reakcije) započinju na temperaturi iznad 100 °C zbog procesa pirolize organskih sastojaka (bjelančevina i šećera). Zrna postaju zlatnosmeđe boje. Na temperaturi oko 150 °C (egzotermna piroliza) dolazi do daljnjeg isparavanja vode, CO_2 i CO što rezultira povećanjem volumena zrna i razvoja svjetlosmeđe boje. Na temperaturi između 180 °C i 200 °C te entalpiji 230 do 375 J/g, dolazi do nastanka plavkastog dima i otpuštanje arome kave, a zrna poprimaju smeđe obojenje (Clifford i Willson, 1985.). Daljnjim prženjem (t>230°C) razvija se crna boja zrna. Na kraju karamelizacijom se postiže potpuno prženje, tijekom koje pržena zrna postižu vlažnost od 1,5 % do 3,5 %.

Prvo pucketanje

Vlaga iz zrna ispari nakon desete minute prženja, a šećeri i taninske tvari nestaju. Oslobađa se CO_2 koji uzrokuje pucketanje. Zrna udvostruče volumen, nabubre i prsnu. Ekspanzija zrna uzrokuje izglađivanje površine i ujednačavanje boje, dok postotak ulja raste s 12 % na 16 %. Ako se prženje zaustavi u ovom koraku procesa, okus kave postaje kiseo, a jačina napitka slaba.

***Puni grad* ("*full city*")**

Oko jedanaeste minute pucketanje se smanjuje, a boja zrna postaje kestenjastosmeđa.

Drugo pucketanje

Nakon dvanaeste minute, boja i aroma zrna se mijenjaju. Kava apsorbira toplinu te se zbog toga zrna u ovom koraku šire i ponovo se čuje pucketanje. Prirodna ulja izlaze na površinu. Okus zrna postaje slađi i blaži. Zrna poprimaju tamnosmeđu boju, a površina im postaje uljasta.

Pržionik nakon petnaeste minute posipa zadimljenu kavu na podložak kroz koji struji zrak da bi se zrna ohladila. Zrna su vrlo tamna, sjajne površine. Dugotrajnim prženjem može doći do zapaljenja zrna, povećanja jakosti i gorčine te gubitka kiselosti.

2.1.3.2. Industrijsko prženje kave

Industrijsko prženje odvija se na rotirajućim grijanim plinskim pržionicima ili u nepokretnim pržionicima u vremenskom razdoblju od 15 do 20 min na temperaturi do 220 °C. Tijekom prženja, toplina se prenosi na dva načina: direktnim kontaktom zrna sa stijenkom uređaja za prženje i konvekcijski u struji vrućeg zraka. Direktni kontakt prijenosa topline dugotrajniji je i toplina se ne raspoređuje jednako te se iz tog razloga danas manje koristi, za razliku od konvekcijskog prijenosa topline koji je vremenski brži (6 – 15 min). Danas je sve više zastupljen kratkotrajni proces prženja u trajanju od 2 do 5 min. Isparavanje vode odvija se ispuhivanjem što daje veći volumen zrnu od uobičajenog procesa prženja. Pržena zrna se odmah hlade nakon procesa prženja ili se poprskaju vodom da bi se zaustavilo daljnje prženje. Proces prženja kompjutorski je kontroliran (Šimunac, 2014.).

Novija metoda prženja zrna metoda je visoke dobiti ili "*flash*" metoda koja se odvija na vrlo visokoj temperaturi od 800 °C kroz 90 sekundi.

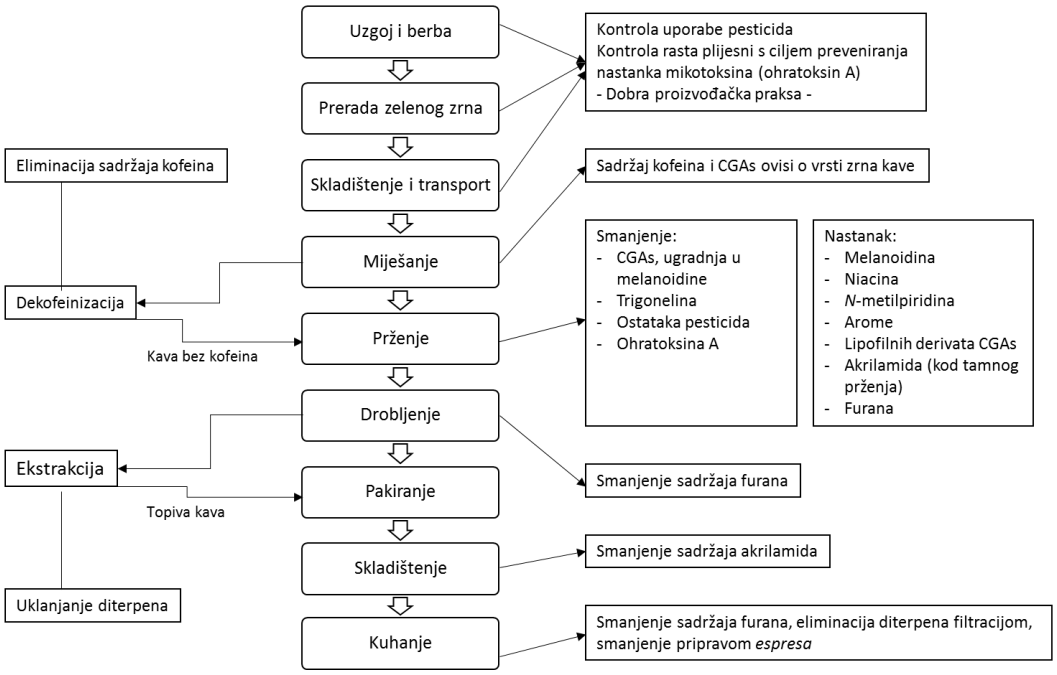
Stupanj prženja ovisi od države do države. U SAD-u i centralnoj Europi zrna se prže do svjetlosmeđe boje na 200 – 220 °C kroz 3 – 10 minuta i do gubitka mase od 14 do 17 %. U Francuskoj, Italiji i u Jugoistočnoj Europi zrna se prže do tamnosmeđe boje na 230 °C i gubitka mase od 20 % te se tako pržena zrna koriste za espreso kavu (Belitz i sur., 2004.; Clifford i Willson, 1985.). Na **Slici 4** prikazan je izgled zrna nakon određenih stupnjeva prženja.



Slika 4 Stupnjevi prženja zelenog zrna kave (1-cimetni, 2-lagani, 3-srednji ili "*city*", 4-"*full city*", 5-tamni, 6-francuski, 7-talijanski) (http://gourmetfarms.com.ph/the-dark-side-of-the-roast/)

Cjelokupni tehnološki proces prerade zrna kave ima utjecaj na pojedine bioaktivne komponente kave, koje su prirodno prisutne u kavi, a nastaju zrenjem kave ili kao novonastale tijekom prerade zrna kave (prženje). Pregled pojedinih bioaktivnih komponenti zrna kave, koje

su prirodno prisutne ili novonastale tijekom procesiranja kave, a kritične točke procesa prerade zrna kave prikazan je na **Slici 5**.



Slika 5 Utjecaj prerade kave na bioaktivne komponente kave (Hatzold, 2012.)

2.1.4. Vrste napitaka kave

Komercijalno dostupne kave su mješavina različitih vrsta kave, čije se karakteristike međusobno upotpunjavaju, a pržene su zasebno.

Mljevena kava

Mljevena kava se dobiva iz prženog zrna kave, koja se može čuvati od 1 do 3 godine u limenkama, plastičnim ili platnenim vrećama, no aroma se zadržava samo 8-10 tjedana. Aroma prženja se smanjuje čuvanjem i nastaje ustajao, užežen okus i aroma. Mljevena kava pakirana u odsustvu kisika (vakuum pakiranje) ostaje svježa 6 – 8 mjeseci, no nakon otvaranja, svježina se zadržava 1 – 2 tjedna (**Slika 6**).



Slika 6 Pakiranja mljevene kave

Instant kava

Instant kava ili topljiva kava nastaje ekstrakcijom iz pržene kave. Prvi proces proizvodnje *instant* kave razvio je Morgenthaler u Švicarskoj 1938. godine. Mljevena kava se ekstrahira pod tlakom u ekstraktorima. Temperatura vode je do 200 °C, a temperatura ekstrakta 40-80 °C. Zatim se otpari u vakuum evaporatorima. Gubi se određeni postotak arome.

Danas se primjenjuju postupci sušenja raspršivanjem i proces liofilizacije. Liofilizacijom se tekući ekstrakt zamrzne na temperaturu do -40 °C u struji hladnog zraka ili inertnog plina, zatim se granulira na veličinu čestica od 2-3 mm i suši u vakuumu. Dobiveni je proizvod (prah) higroskopan i nestabilan, stoga se pakira u limenke, staklenke, aluminijske folije (**Slika 7**). Za proizvodnju *instant* kave upotrebljava se *C. robusta* ili mješavina kava.



Slika 7 Pakiranje instant kava

Kava bez kofeina (bezkofeinska kava)

Kofein je stimulans centralnog živčanog sustava i kao takav utječe na budnost i jaču koncentraciju. Kava bez kofeina prvi put se počela proizvoditi 1908. godine u Njemačkoj, procesom koji je razvio Roselius. Zeleno zrno kave se tretira pregrijanom parom pri visokom tlaku, zatim se ekstrahira s organskim otapalima (diklorometan, esteri octene kiseline) uz konstantno miješanje, pri čemu se uklanja kofein te slijedi uklanjanje otapala. Zrna vlažnosti 40% suše se u vakuumu ili u struji vrućeg zraka. Ovaj proces se još uvijek koristi u Europi. U SAD-u se sve topive komponente u vodi i kofein ekstrahiraju iz zelenog zrna. Vodenom ekstraktu se zatim uklanja kofein pomoću organskog otapala i suši.

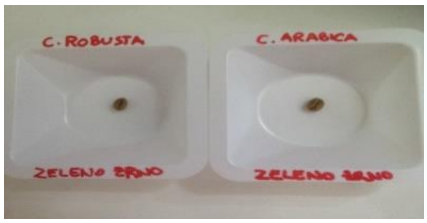
Današnji moderni proces obuhvaća ekstrakciju pomoću superkritičnog CO_2 pri temperaturi od 70 do 90 °C i tlaku od 100 do 200 bara na zrna obrađena vodenom parom. Ovakav proces je fiziološki siguran i lak, a produkt je bez ostatka otapala (Belitz i sur., 2004.).

Kavovine

Na tržištu su prisutne zamjene za kavu. Najčešće se koriste pržena cikorija i prženi ječam. Zamjene za kavu ili kavovine ne dosežu okus i aromu prave kave.

2.1.5. Kemijski sastav kave

Zrno kave ima bogati kemijski sastav koji se razlikuje za određenu vrstu zelenog zrna. Procesiranjem zelenog zrna, kemijski sastav zrna se uvelike mijenja jer dolazi do nastanka novih spojeva nastalih kombinacijom već prisutnih spojeva (npr. laktoni koji nisu prisutni u zelenom zrnu, dok u prženom zrnu su novonastali spojevi), a sadržaj pojedinih komponenti se smanjuje (npr. sadržaj klorogenskih kiselina). Izgled zelenog i prženog zrna kave razlikuje se od vrste do vrste, kao i njihov kemijski sastav. Na **Slici 8** prikazan je izgled zelenog zrna *C. arabice* i *C. robuste*, dok u **Tablici 2** prikazan je sadržaj pojedinih kemijskih sastojaka zelenog zrna *C. arabice* i *C. robuste* koja sadrže od 7 do 14 % vode.



Slika 8 Izgled zelenog zrna *C. arabice* i *C. robuste*

Tablica 2 Kemijski sastav zelenog zrna *C. arabice* i *C. robuste* (Farah, 2012.)

Grupa spojeva	Koncentracija (g/100g)	
	C. arabica	*C. robusta*
Ugljikohidrati/ vlakna		
Saharoza	6,0-9,0	0,9-4,0
Polisaharidi	34-44	48-55
Pektin	2.0	
Kiseline i esteri		
Klorogenske kiseline	4,1-7,9	6,1-11,3
Kina kiselina	0.4	
Lipidi		
Diterpeni	0,5-1,2	0,2-0,8
Ulje	15-17,0	7,0-10,0
N-spojevi		
Slobodne aminokiseline	0,5	0,8-1,0
Proteini	10,0-11,0	11,0-15,0
Kofein	0,9-1,3	1,5-2,5
Trigonelin	0,6-2,0	0,6-0,7

U **Tablici 3** prikazan je sadržaj pojedinih kemijskih sastojaka prženih zrna kave. Sadržaj pojedinih komponenti sastava prženog zrna, uvelike ovisi o stupnju prženja zelenog zrna i vrsti zelenog zrna. Na **Slici 9** prikazan je izgled prženih zrna *C. arabice* i *C. robuste*.



Slika 9 Izgled prženog zrna *C. arabice* i *C. robuste*

Tablica 3 Kemijski sastav srednje prženog zrna *C. arabice* i *C. robuste* (Farah, 2012.)

Grupa spojeva	Koncentracija (g/100g)	
	C. arabica	*C. robusta*
Ugljikohidrati/ vlakna		
Saharoza	4,2	1,6
Polisaharidi	31-33	37
Pektin	2,0	
Kiseline i esteri		
Klorogenske kiseline	1,9-2,5	3,3-3,8
Kina kiselina	0,8	1,0
Lipidi		
Diterpeni	0,9	0,2
Ulje	17,0	11,0
N-spojevi		
Proteini	7,5-10,0	
Kofein	1,1-1,3	2,4-2,5
Trigonelin	1,2-0,2	0,7-0,3
Nikotinska kiselina	0,016-0,026	0,014-0,025
Melanoidini	25	

Tijekom prženja zrna proteini i ugljikohidrati zelenog zrna podliježu promjenama. Sadržaj arginina, asparaginske kiseline, cisteina, histidina, lizina, serina, treonina i metionina opada prženjem zrna, dok se sadržaj alanina, glutaminske kiseline i leucina povećava. Slobodne aminokiseline su prisutne u prženom zrnu u tragovima. Ugljikohidrati se tijekom prženja zrna razlažu na topive. Saharoza koja je prisutna u zelenoj kavi, raspada se te je u prženoj prisutna u vrlo maloj količini od 0,4 do 2,8 %, a monosaharidi su prisutni u tragovima.

Proces prženja neznatno utječe na lipide prisutne u zrnu. Linolna kiselina i palmitinska kiselina u većini su prisutne u zrnu. U sirovom zrnu prisutni su diterpeni (kafestol, kahveol) koji se procesom prženja degradiraju. 16-*O*-metilkafestol nalazi se samo u *C. robusti* (0,6-1,8 g/kg suhe tvari) i pogodan je kao indikator za prisustvo *C. robuste* u *instant* kavama.

Među hlapljivim kiselinama zastupljene su mravlja i octena kiselina, a među nehlapljivim mliječna, vinska, limunska i pirogrožđana kiselina. Klorogenske kiseline najviše su prisutne u zelenom zrnu kave. Njihov sadržaj uvelike opada prženjem.

Kofein je jedan od najzastupljenijih dušičnih spojeva prisutnih u kavi (*C. arabica* 0,9-1,4 %, *C. robusta* 1,5-2,6 %). Stimulira centralni živčani sustav, povisuje krvni tlak. Prženjem se vrlo malo smanjuje sadržaj kofeina u zrnu.

Trigonelin je prisutan u zelenom zrnu kave do 0,6 % te se tijekom prženja kave i 50 % razgradi. Produkti razgradnje trigonelina su nikotinska kiselina i piridin.

Do danas je identificirano oko 850 hlapljivih spojeva od kojih 40 pridonosi aromi. Aroma kave odnosi se na slatko-karamelnu aromu, zemljanu aromu, sumporno-prženu aromu i dimno-fenolnu aromu. Svježa aroma kave je kratkotrajna.

U pepelu zrna kave najviše su zastupljeni metali kalij, zatim kalcij i magnezij. Od aniona najzastupljeniji su fosfatni i sulfatni anioni.

Melanoidini nastaju Maillardovom reakcijom ili karamelizacijom tijekom prženja zelenog zrna kave, tako da se u njihovu strukturu veže jedan dio prirodno prisutnih klorogenskih kiselina (Belitz i sur., 2004.; Clifford i Willson, 1985.).

Kemijski sastav šalice kave u količini od 100 mL prikazan je u **Tablici 4**. Sastav ovisi o stupnju prženja zrna, metodi priprave napitka te dodacima u samom napitku kave (npr. mlijeko).

Tablica 4 Prosječni kemijski sastav šalice kave od srednje prženog zrna (Farah, 2012.)

Spoj	Količina (mg / 100mL)
Kofein	50-380
Klorogenske kiseline	35-500
Trigonelin	40-50
Proteini	100
Lipidi	0,8
Minerali	250-700
Melanoidini	500-1500

2.1.6. Biološki učinci kave

Do danas su provedena brojna kemijska, nutricionistička, medicinska i epidemiološka istraživanja o biološkim učincima kave. Ispitivanja ljekovitih svojstava i povoljnog biološkog utjecaja napitka od kave na ljudski organizam, odnose se najviše na antiupalni, antitumorni i antibakterijski efekt (Clifford i Willson 1985.; Dorea i da Costa, 2005.; Higdon i Frei, 2006.; Crozier i sur., 2012.; Ludwig i sur., 2014.). Konzumiranje napitka od kave povezuje se sa smanjenim rizikom od nastanka Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, kardiovaskularnih bolesti (antitrombonski efekt), bolesti jetre, dijabetesa tipa 2 (usporava otpuštanje glukoze u krvotok nakon jela) i različitih vrsta raka (Johnston i sur., 2003.). Kava povoljno utječe na kognitivne sposobnosti i na raspoloženje. Napitak od kave Dorea i da Costa (2005.) smatraju funkcionalnom hranom, zbog pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje. Danas se veliki značaj daje napitku od zelenog zrna kave zbog velikog sadržaja klorogenskih kiselina koje pozitivno utječu na smanjenje tjelesne mase (Igho i sur., 2011.), no za ovu tvrdnju potrebna su još dodatna istraživanja.

Danas je znanstvenicima od velikog interesa istraživanje utjecaja kave tijekom trudnoće i dojenja, utjecaj akrilamida i furana iz kave na ljudski organizam, kao i utjecaj na povišeni sadržaj želučane kiseline.

Na osnovi provedenih brojnih istraživanja, smatra se da je za sve pozitivne biološke utjecaje napitka od kave na ljudski organizam, najviše odgovorna prisutnost brojnih polifenolnih spojeva. Klorogenske kiseline prisutne su u značajnoj količini u kavi, a pokazale su snažni antioksidacijski učinak, jer štite stanice od oksidativnog stresa. Klorogenske kiseline iz kave imaju ulogu hvatača slobodnih radikala u ljudskom organizmu štiteći ga tako od niza nepoželjnih utjecaja na ljudsko zdravlje (Fukushima i sur., 2009.; Farah, 2012.).

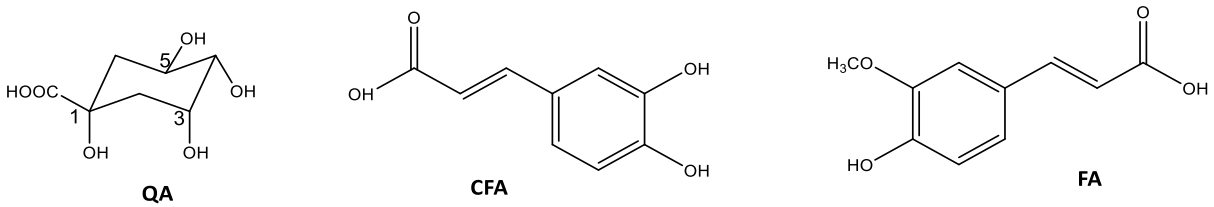
2.2. KLOROGENSKE KISELINE

Klorogenske kiseline (eng. *Chlorogenic acids*, CGAs) su esteri hidroksicimetnih kiselina. Robiquet i Bourton (1837.) prvi put spominju klorogenske kiseline. Payen 1846. godine prvi put spominje termin klorogenske kiseline, a 1942. godine Fischer i Dangschat predstavljaju klorogenske kiseline kao kafeoilestere kina kiseline. Danas se termin klorogenske kiseline (CGAs), prema IUPAC nomenklaturi, odnosi na sve spojeve koji nastaju esterifikacijom (-)- kina

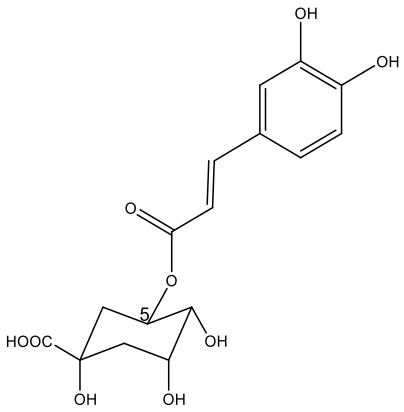
kiseline (QA) s nekom od hidroksicimetnih kiselina (najčešće kafeinskom, feruličnom i *p*-kumarinskom kiselinom).

2.2.1. Kemijska struktura klorogenskih kiselina

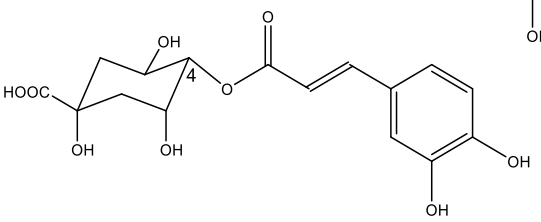
Klorogenske kiseline (CGAs) predstavljaju grupu polifenolnih spojeva koji nastaju kao monoesteri, diesteri i/ ili triesteri nekih hidroksicimetnih kiselina: npr. kafeinske, ferulične i *p*-kumarinske kiseline esterifikacijom s kina kiselinom. Strukturne jedinice klorogenskih kiselina prisutnih u kavi, prikazane su na **Slici 10**, a kemijske strukture klorogenskih kiselina (CQAs, diCQAs i FQAs) na **Slici 11**. Najzastupljenija klorogenska kiselina u biljnom materijalu je 5-*O*-kafeoilkina kiselina (5-CQA).



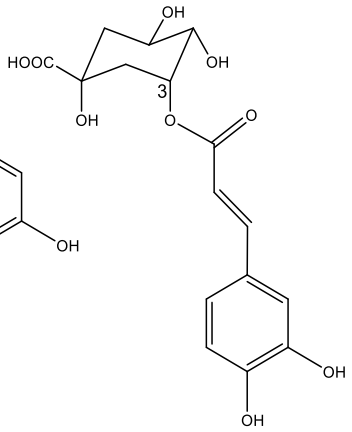
Slika 10 Strukturne jedinice CQAs, diCQAs i FQAs



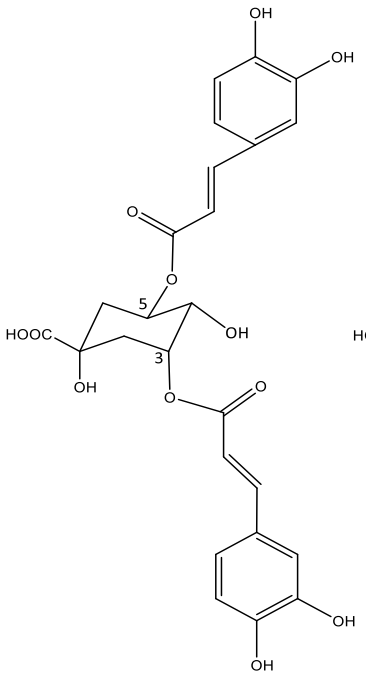
5-*O*-kafeoilkina kiselina



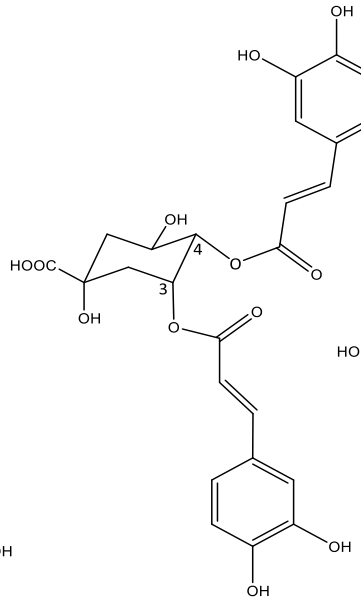
4-*O*-kafeoilkina kiselina



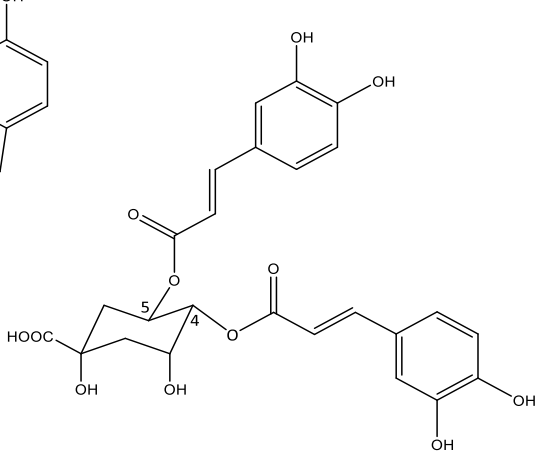
3-*O*-kafeoilkina kiselina



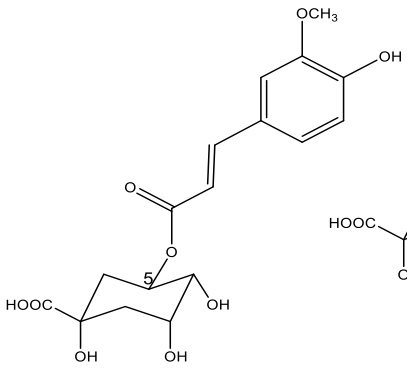
3,5-di-*O*-kafeoilkina kiselina



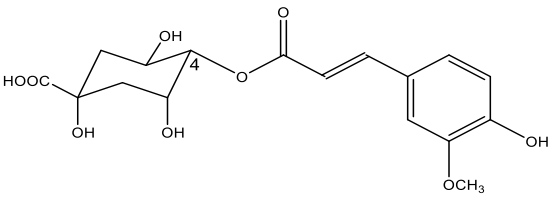
3,4-di-*O*-kafeoilkina kiselina



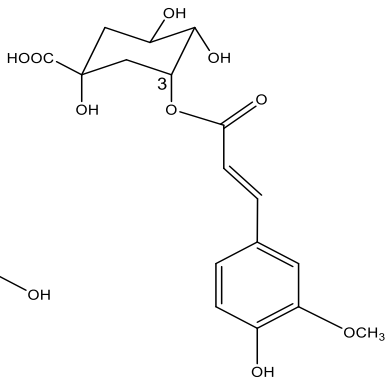
4,5-di-*O*-kafeoilkina kiselina



5-*O*-feruloilkina kiselina



4-*O*-feruloilkina kiselina



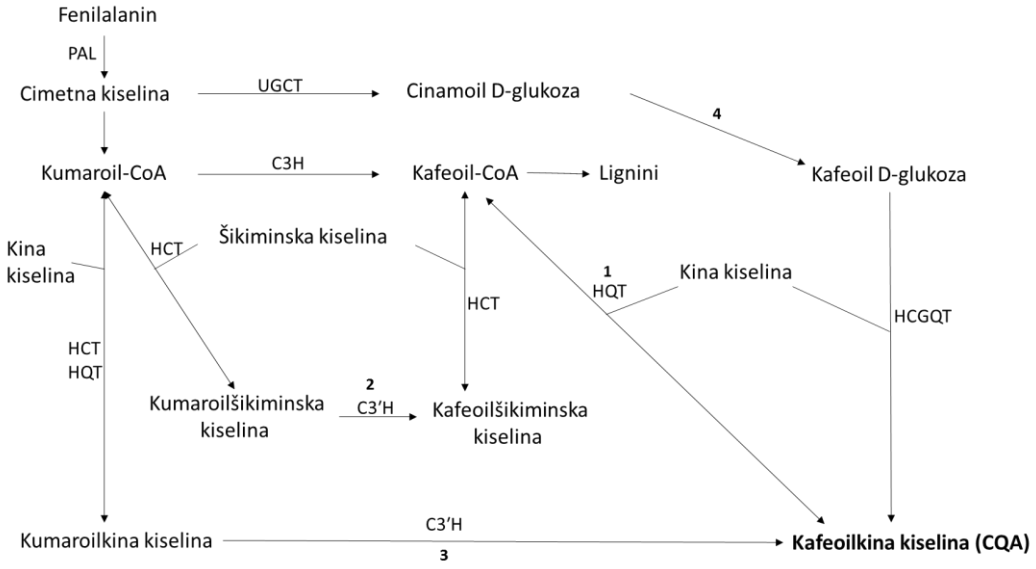
3-*O*-feruloilkina kiselina

Slika 11 Kemijska struktura dominantnih CQAs, diCQAs i FQAs u kavi (IUPAC nomenklatura) (Jaiswal i Kuhnert, 2010.)

CGAs mogu se podijeliti u više podskupina prema vrsti i broju esterskih skupina: monoesteri (npr. kafeoilkina kiseline, CQAs), diesteri (npr. dikafeoilkina kiseline, diCQAs), miješani diesteri (npr. kafeoilferuloilkina kiseline, C, FQAs).

CGAs sadrže u svojoj kemijskoj strukturi jednu ili dvije kateholne skupine s dvije –OH skupine u *o*-položaju. Esterska skupina –COOR ima jaki elektron akceptorski efekt na kemijsku strukturu CQAs, koja prevladava nad elektron donorskim efektom dvostruke veze. Eravuchira i suradnici (2012.) su pomoću Raman spektroskopije upravo to dokazali. Kod diestera CGAs (diCQAs) prisutna su u kemijskoj strukturi dva kafeinska dijela i dvije esterske skupine. Kod diCQAs elektron akceptorski efekt dvije esterske skupine jače je izražen od elektron donorskog efekta. 5-CQA ili [1,3,4,5-tetrahidroksi cikloheksan karboksilna kiselina 3(3,4-dihidroksicimetat)] sadrži u svojoj kemijskoj strukturi karboksilnu grupu na cikloheksanskom prstenu i dvije –OH skupine na kateholnom dijelu molekule. Upravo se na ta tri mjesta odvijaju najznačajnije kemijske reakcije 5-CQA s ostalim molekulama.

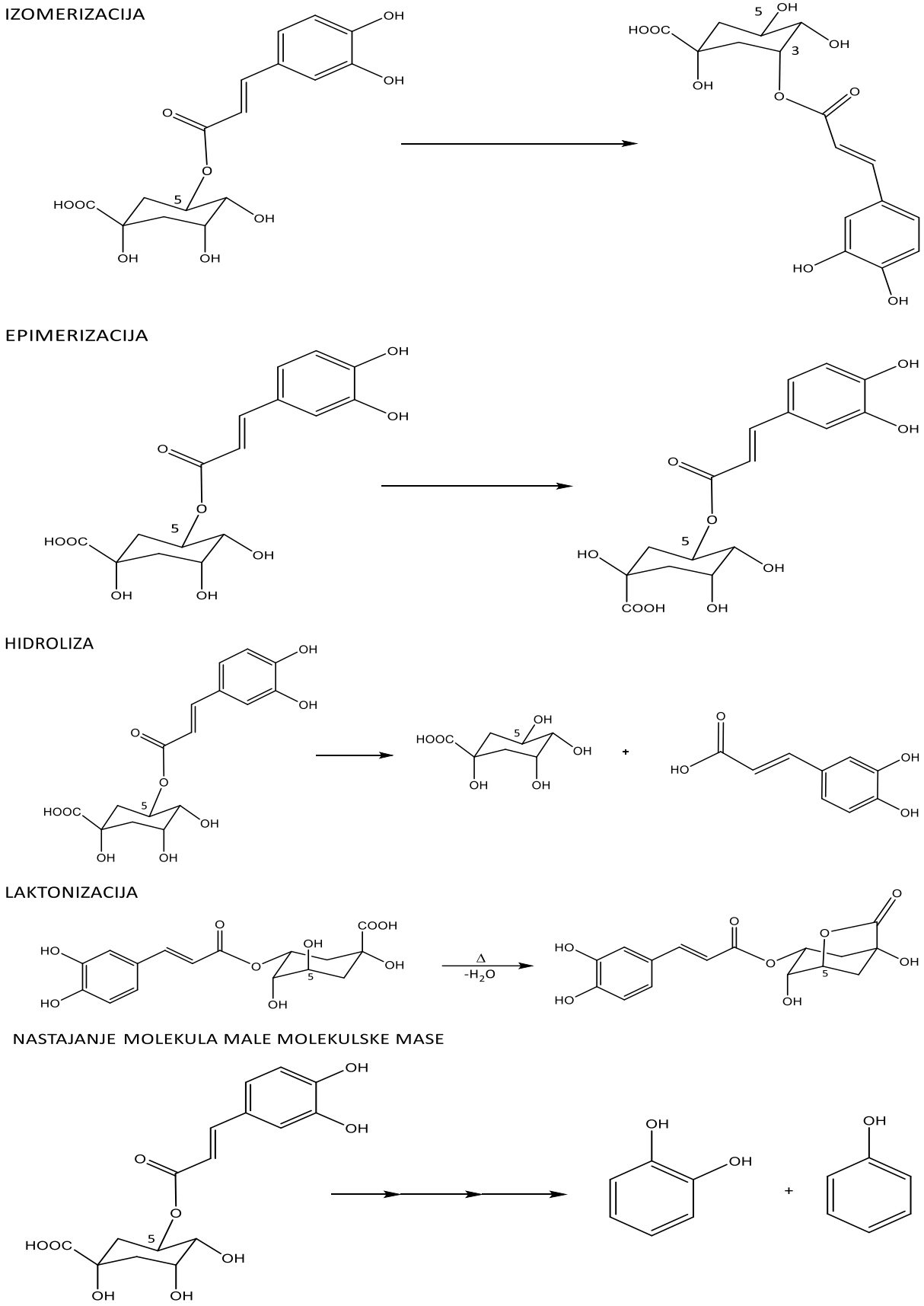
Na **Slici 12** prikazana je shema biosinteze kafeoilkina kiselina (CQAs) u nekim biljnim materijalima (rajčica, duhan, krumpir i drvo kave), a predložili su ju Mahesh i suradnici (2007.). Biosinteza CQA iz *Solanaceae* (rajčica, duhan, krumpir) i biljke kave, početno se mislilo da se odvija preko transesterifikacije kafeoil-CoA i QA pomoću hidroksicinamoil-kinat transferaze (HQT)(**1**). Drugi način provođenja biosinteze CQAs u biljkama uključuje 3'-hidroksilaciju *p*-kumaroilkina kiseline. Ovaj način biosinteze CQAs može se primijeniti kod biljaka koje akumuliraju CQA kao što je kava te se može koristiti za sintezu diCQAs iz zrna kave (**3**). Način označen na **Slici 12** kao broj **2** odnosi se na reakciju hidroksilacije *p*-kumaroilšikiminata u kafeoilšikiminsku kiselinu, koja se zatim konvertira u kafeoil-CoA. Kritična točka biosinteze je 3-hidroksilacija fenolnog prstena, koja je katalizirana esterom *p*-kumaroil-3'-hidroksilazom (C3'H). Način biosinteze označen brojem **4** na **Slici 12** uključuje intermedijer kafeoilglukozid. Biosinteza CQA u listu kave može se odvijati preko sinteze *p*-kumaroilkina kiseline.



Slika 12 Shema biosinteza kafeoilkina kiseline (CQA) u biljkama (Mahesh i sur., 2007.)

2.2.2 Promjene kemijskog sastava klorogenskih kiselina tijekom procesa prženja

Promjene kemijskog sastava CGAs tijekom procesa prženja, prikazane su na primjeru 5-CQA. Proces prženja zrna kave uvelike mijenja organoleptička svojstva kave te utječe na niz kemijskih reakcija koje su prikazane na **Slici 13**. Kemijske reakcije koje se odvijaju na CGAs, 5-CQA, tijekom prženja zelenog zrna reakcije su izomerizacije, epimerizacije, laktonizacije, hidrolize, i nastanka molekula male molekularne mase (fenoli i kateholi) i ugradnja u novonastale spojeve melanoidina, koji se odnose na razvoj boje i arome. Tijekom procesa prženja oko 10% CGAs ugradi se u laktone klorogenskih kiselina (CGLs). Najznačajniji laktoni nastali prženjem zrna kave su 1,5-γ-laktoni. Upravo ti laktoni, uz sadržaj kofeina, utječu na gorčinu napitka kave i na njezinu kvalitetu (Farah, 2012.).



Slika 13 Kemijske reakcije koje se odvijaju na 5-CQA tijekom procesa prženja kave (Farah, 2012.)

2.2.3. Elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina

Elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina, kao najvažnijih polifenolnih spojeva prisutnih u kavi, malo su istraživana i to prema literaturnim podacima samo za 3-CQA (vjerojatno prema staroj IUPAC nomenklaturi, dok se prema novoj IUPAC nomenklaturi termin klorogenska kiselina odnosi na 5-CQA) i to u radovima Namazian i Zare, 2005.; Petrucci i sur., 2007.; Moccelini i sur., 2008.; Santos i sur., 2011.; Yardim, 2012.; Yardim i sur., 2013.; Ziyatdinova i sur., 2013. Rezultati dobiveni u navedenim istraživanjima ne objašnjavaju u potpunosti elektrokemijsko ponašanje i svojstva klorogenskih kiselina (5-CQA). Za sve ostale klorogenske kiseline (3-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA), do danas, nije pronađen ni jedan literaturni podatak o njihovim elektrokemijskim svojstvima.

Elektrokemijske metode omogućuju visoku osjetljivost i nizak limit detekcije u poveznici s relativno jeftinim instrumentima. Ove metode temeljene na redoks reakcijama daju važne informacije o mehanizmu reakcije, kinetici i izmjeni elektrona te o procesu prijenosa iona (Teixeira i sur, 2013.).

Namazian i Zare (2005.), Yardim (2012.), Ziyatdinova i sur. (2013.) i Yardim i sur.(2013.) zaključili su na temelju svojih istraživanja da je elektrokemijska oksidacija CGAs vjerojatno reverzibilni proces. Iz literaturnih podataka dobro je poznato da kateholna skupina elektrokemijski oksidira u *ortho*-kinonsku strukturu izmjenom dva elektrona i dva protona tijekom anodne polarizacije (Janeiro i Brett, 2004.). Tijekom katodne polarizacije *ortho*-kinonska struktura se elektrokemijski reducira (reverzibilan proces) preko dva elektron-dva proton mehanizma, natrag u kateholnu strukturu. Ovaj mehanizam je potvrdio i Yardim (2012.), Ziyatdinova i sur. (2013.) i Yardim i sur. (2013.). Sličan oksidacijski mehanizam (5-CQA) odvija se i na molekuli kafeinske kiseline (Trabelsi i sur., 2004.; Lee i sur., 2013.).

Disocijacija molekule CGAs moguća je na više pozicija, tako na primjer prema Maegawa i suradnicima (2007.) pK_a za 5-CQA iznose: pK_1 = 3,50, pK_2 = 8,42 i pK_3 = 11,0, a na osnovi pK_a i distribucijskog dijagrama, pri pH vrijednosti 7,0 koncentracija aniona 5-CQA$^-$ je maksimalna te je i oksidacijski strujni odziv maksimalan na voltamogramima. Kemijska struktura CGAs uvelike utječe na elektrokemijska svojstva CGAs. diCQAs imaju veći oksidacijski potencijal i viši oksidacijski strujni odziv od CQAs. Mehanizam oksidacije sličan je kao i kod ružmarinske

kiseline koja također u svojoj kemijskoj strukturi sadrži dvije kateholne skupine (Namazian i Zare, 2005.; Gil i sur., 2013).

Do sada su istraživana elektrokemijska svojstva 5-CQA primjenom cikličke voltametrije (Namazian i Zare, 2005.; Zare i sur., 2011.), diferencijalne pulsne voltametrije s primjenom elektrokemijskog biosenzora na Au elektrodi (Santos i sur., 2011.; Ziyatdinova i sur., 2013.; Yardim i sur., 2013.).

Upravo zbog nedostataka literaturnih podataka i nejasnoće istraživanja CGAs, istraživanje u ovoj disertaciji pridonijet će boljem razumijevanju elektrokemijskih svojstava CGAs.

2.2.4. Fizikalno–kemijska svojstva klorogenskih kiselina

Fizikalno-kemijska svojstva CGA do danas nisu detaljno istraživana. Sve su kemikalije navedene u **Tablici 5** u obliku praha i topljive su u metanolu.

Tablica 5 Neka od fizikalno-kemijskih svojstava CGA (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9799386#section=Chemical-and-Physical-Properties)

Spoj/ Fizikalno kemijsko svojstvo	5-CQA	4-CQA	3-CQA	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA	5-FQA	3-FQA	4-FQA
Mr	354,31			516,45			368,33		
Molekulska formula	$C_{16}H_{18}O_9$			$C_{25}H_{24}O_{12}$			$C_{17}H_{20}O_9$		
Broj donorskih H-veza	6			7		Nema literaturnih podataka	5		
Broj akceptorskih H-veza	9			12			9		
Točka taljenja	210 °C	182-184 °C	210 °C	234-238 °C	170-172°C	140 °C	Nema literaturnih podataka		

Belay i Golap (2009.) koristili su UV/Vis spektre zelenih i prženih zrna kave za karakterizaciju klorogenskih kiselina u kavi. Ova metoda je jeftina, brza i jednostavna, no ograničenih mogućnosti pri analizi spektra zrna kave, kako navode autori, zbog preklapanja UV/Vis spektra CGAs i kofeina u području valnih duljina (λ) 200-500 nm. Uklanjanjem kofeina iz zrna kave spektri se razdvoje te se uočavaju dva apsorbancijska pika, od kojih drugi prema autorima, pripada UV/Vis spektru 3-CQA pri λ=324 nm, što potvrđuju i Farah i sur. (2005.).

2.2.5. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost klorogenskih kiselina

Slobodni radikali su nestabilne, vrlo reaktivne molekule koje posjeduju nespareni elektron u vanjskoj valentnoj ljusci. U reakciju stupaju tako da ''napadaju'' susjedne molekule uzimajući od njih elektron koji im je potreban da bi postigli stabilnost ili doniraju elektron te se zbog toga

mogu ponašati kao oksidansi ili reducensi. Napadnuta molekula tako gubi elektron i sama postaje slobodnim radikalom i započinje niz lančanih reakcija u kojima nastaju neželjeni, biološki štetni spojevi.

Antioksidans je svaka kemijska vrsta sposobna da u maloj koncentraciji inhibira ili odgodi neželjene oksidacijske procese u biološkom sustavu. Antioksidacijsko djelovanje očituje se u hvatanju viška slobodnih radikala u odnosu na njihovu normalnu koncentraciju, pri čemu antioksidansi doniraju svoj slobodni elektron te stabiliziraju slobodne radikale u stabilne molekule ili inhibiraju daljnji nastanak slobodnih radikala. Stoga je djelovanje antioksidansa vrlo značajno za ljudski organizam jer sprječava ili usporava nastanak nekih bolesti (dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti, Parkinsonova i Alzheimerova bolest).

Reakcijom polifenolnih spojeva i slobodnih radikala nastaje manje reaktivan fenoksi radikal koji se stabilizira delokalizacijom elektrona ili stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza. Sposobnost polifenolnog spoja da otpusti elektron ili vodikov atom, ovisi o njegovom oksidacijskom potencijalu. Što je oksidacijski potencijal niži, to je jača antioksidacijska aktivnost u odnosu na polifenolne spojeve koji oksidiraju pri pozitivnijim oksidacijskim potencijalima. Antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva ovisi o njihovoj kemijskog strukturi, odnosno o rasporedu funkcionalnih skupina unutar molekule.

CQAs, diCQAs, CFA, FQAs i FA pripadaju hidroksicimetnim kiselinama, a razlika u njihovoj kemijskoj strukturi prikazana je na **Slikama 10** i **11** određuje i njihovu antioksidacijsku aktivnost. Kafeinska i ferulična kiselina te njihovi esteri, potencijalni su antioksidansi koji vežu slobodne radikale donirajući vodikov atom ili elektron iz svoje kemijske strukture te tako delokaliziraju tj. stabiliziraju nastali fenoksi radikal. Broj i položaj hidroksilnih grupa na aromatskom prstenu molekula, određuje njihovu antioksidacijsku aktivnost. Na **Slikama 10** i **11** prikazane su kemijske strukture CQAs, diCQAs, CFA, FQAs i FA iz kojih se uočava sličnost, ali i razlika kemijske strukture spojeva ispitanih u ovoj disertaciji te se može očekivati razlika u njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti. S obzirom na kemijsku strukturu, pojedini dijelovi strukture ovih molekula (hidroksilne skupine, metoksi skupine i etilenski bočni lanac na aromatskom prstenu) različito utječu na antioksidacijsku aktivnost spojeva.

Dakle antioksidans je bilo koja tvar koja može zaštititi ili odgoditi oksidaciju makromolekula ili autooksidaciju. Do danas je jedina metoda koja direktno mjeri hvatanje slobodnih radikala,

elektron *spin* rezonantna spektroskopija (EPR). No najčešće su korištene one metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti, koje ju mjere indirektno.

Mehanizam antioksidacijske/ antiradikalne aktivnosti klorogenskih kiselina, nije do danas u potpunosti objašnjen. Literaturni podaci određivanja antioksidacijske aktivnosti CGAs spektrofotometrijskim i elektrokemijskim metodama, oskudni su (Brezova i sur., 2009.; Šimkova i sur., 2009.; Yang i sur., 2008; Vijayalakshmi i sur., 2010.; Wang i sur., 2010.).

Danas sve veći značaj dobivaju elektrokemijske metode određivanja antioksidacijske aktivnosti, a posebno primjena elektrokemijskog DNA biosenzora. Ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, pravokutnovalna voltametrija, kronoamperometrije, koriste se kao metode za praćenje oštećenja DNA sloja na senzoru. Nanošenjem nanonačestica (npr. SWCNT, MWCNT) na površinu radne elektrode postiže se značajno bolja osjetljivost odziva radne elektrode (Drummond i sur., 2003.; Labuda i sur. 2010.). Nanošenjem DNA molekule na površinu radne elektrode i tretiranjem DNA biosenzora otopinom za stvaranje slobodnih radikala (Cu^{2+} i H_2O_2) djelomično se ošteti nanesena molekula DNA te nastaje oksidirajući produkt 8-hidroksi-2′-deoksigvanozin. Klorogenske kiseline u reakciji s novonastalim oksidirajućim produktom regeneriraju određeni postotak oštećene DNA molekule, što se smatra antioksidacijskim učinkom CGAs. Ovaj princip mjerenja antioksidacijske aktivnosti pomoću DNA biosenzora primijenili su u svojim istraživanjima Yang i suradnici (2008.), Wang i suradnici (2010.), Labuda i sur. (2003.), Ferancova i sur. (2004.), Ziyatdinova i sur. (2008.), Galandova i sur. (2009.), Labuda i sur. (2010.), Šimkova i sur. (2009.), Šimkova i Labuda (2011.), Ziyatdinova i Labuda (2011.), Ziyatdinova i Labuda (2012.) i Hlavata i sur. (2014). Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva pomoću DNA biosenzora i nanosa nanočestica, rezultiralo je jednostavnom, brzom i selektivnom usporednom metodom najčešće korištenih spektrofotometrijskih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti (DPPH, ABTS, FRAP metodama). Također još jedna od prednosti primjene elektrokemijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti je niska cijena elektrokemijske opreme.

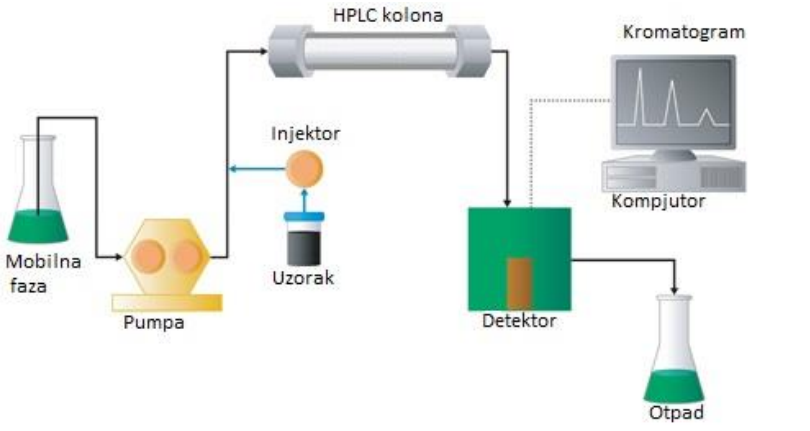
2.3. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVI

U literaturnim podacima karakterizacija klorogenskih kiselina u kavi provedena je primjenom različitih instrumentalnih metoda analize, uključujući kromatografske, spektroskopske i

elektrokemijske metode. Kuhnert i suradnici (2012.) u knjizi "*Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*" su posvetili cijelo jedno poglavlje knjige pregledu metoda za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina u kavi, a Jeszka-Skowron i suradnici (2015.) u preglednom radu.

2.3.1. HPLC metoda karakterizacije klorogenskih kiselina u kavi

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) pripada u separacijske metode. HPLC danas predstavlja jednu od najčešće korištenih analitičkih metoda za određivanje različitih analita. Ova metoda omogućuje separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju različitih spojeva prisutnih u bilo kojem uzorku koji se može otopiti u nekom otapalu, čak i u vrlo malim koncentracijama. HPLC nalazi primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kemijskoj i ostalim industrijama. HPLC kao uređaj sastoji se od gradijentne pumpe, detektora (UV/Vis, PDA, MS, fluorescentni, elektrokemijski), HPLC kolone, injektora i kompjutora kao što je prikazano na **Slici 14**. U ovoj disertaciji korištena je reverzno-fazna HPLC metoda (RP-HPLC).



Slika 14 Shema sustava za HPLC metodu (Arsenault i McDonald, 2007.)

HPLC metoda najčešće je korištena metoda za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina u kavi. Ekstrakcija klorogenskih kiselina iz kave provedena je u objavljenoj literaturi pomoću različitih otapala: 40% metanola, metanola i Na_2SO_3 i destilirane vode temperature od 90 do 100 °C i drugih otapala (Trugo i Macrae, 1984.; Schrader i sur., 1996.; Ky i sur., 1997.; Kilmartin i Hsu, 2003.; Farah i sur., 2005.; Farah i sur., 2006. A; Farah i sur., 2006. B; Duarte i sur., 2010.; Duarte i Farah, 2011.; Hečimović i sur., 2011.; Monteiro i Farah, 2012.; Niseteo i sur., 2012.). Od detektora najčešće su korišteni UV/Vis i PDA detektori (Trugo i Macrae, 1984.; Farah i sur., 2005.; Farah i sur., 2006. A; Farah i Donangelo, 2006.;

Perrone i sur., 2008.; Duarte i Farah, 2011.; Perrone i sur., 2012.). Kao mobilne faze upotrebljavane su 2 mM fosforna kiselina i metanol, 0,3% mravlja kiselina i metanol, 0,2 % octena kiselina i metanol i 10 mM trinatrij citrat i metanol, a zbog bolje separacije spojeva klorogenskih kiselina pH mobilnih faza obično je oko pH 2,5.

Zbog bolje detekcije niza izomera klorogenskih kiselina prisutnih u kavi, grupa prof. Kuhnerta i suradnika uvela je primjenu vezanog sustava (LC-MS^n) pomoću kojeg su uspjeli identificirati oko 70 izomera klorogenskih kiselina u zelenim zrnima kave *C. arabica* i *C. robusta.* (Clifford i sur., 2003.; Clifford i sur., 2006.; Jaiswal i sur., 2010.; Jaiswal i Kuhnert, 2010.; Matei i sur., 2012.). Uslijed nastanka niza novih spojeva (laktona, različitih derivata klorogenskih kiselina, melanoidina) tijekom procesa prženja kave LC-MS^n razvijane su i dalje s ciljem bolje selektivnosti. Tako su, Perrone i suradnici (2008.) prvi put identificirali prisustvo *p*-kumaroilkina laktona, feruloilkina laktona, diferuloilkina kiselina i di–*p*–kumaroilkina kiseline pomoću LC-MS metode. Jaiswal i suradnici (2014.) separirali su i identificirali laktone CGAs i cinamoilšikiminat estere iz prženog zrna kave pomoću LC-MS^n tehnike. Metoda LC-MS^n i dalje se razvija u cilju identifikacije novih izomera CGAs u kavi.

2.3.2. Elektrokemijske metode karakterizacije klorogenskih kiselina u kavi

Za karakterizaciju klorogenskih kiselina u kavi korištene su različite elektroanalitičke metode. Najčešće je korištena pravokutnovalna voltametrija (SWV) uz primjenu različitih biosenzora (Carvalho i sur., 2008.; Moccelini i sur., 2008.; Fernandes i sur., 2009.).

Prema Thevenotu i suradnicima (1999.) općenito se termin biosenzor odnosi na kemijski senzor u koji je inkorporiran biokemijski mehanizam. Elektrokemijski biosenzor sastoji se od biološkog dijela koji selektivno prepoznaje tvar i elektrokemijskog pretvornika koji pretvara utjecaj elektrokemijskog međudjelovanja mjerne tvari i elektrode u analitički iskoristiv signal. Stoga elektrokemijski biosenzor predstavlja mjernu elektrodu presvučenu biološki aktivnim materijalom (enzim, biološka kemikalija, tkivo i sl.).

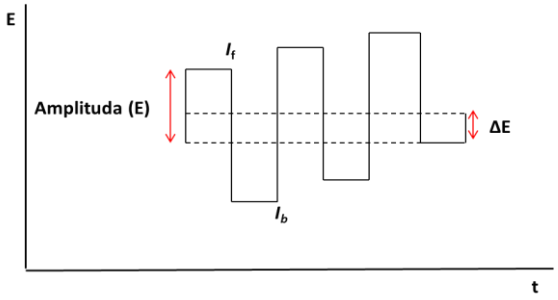
Elektrokemijske metode koje su do sada primijenjene za karakterizaciju CGAs u kavi (uglavnom SWV) pokazale su se kao vrlo dobre, ali identifikacija oksidacijskog pika pa ni karakterizacija nije provedena ispravno. Autori navode da su za kvantifikaciju sadržaja CGAs u kavi koristili maksimalni oksidacijski strujni odziv klorogenske kiseline (vjerojatno 5-CQA) na voltamogramima (Carvalho i sur., 2008.; Moccelini i sur., 2008.; Fernandes i sur., 2009.; Santos

i sur., 2011., Yardim, 2012., Ziyatdinova i sur., 2013.). Međutim zbog kompleksnosti kemijskog sastava kave, odnosno zbog prisustva više različitih izomera klorogenskih kiselina u kavama, karakterizacija klorogenskih kiselina u gore navedenim radovima nije provedena ispravno. Autori zapravo spominju samo klorogensku kiselinu (5-CQA), kao da uzorci kave sadrže samu tu kiselinu, a ne smjesu različitih klorogenskih kiselina (CQAs, diCQAs, FQAs). Upravo zbog prisustva različitih izomera CGAs koji su prisutni u kavi, taj opaženi maksimalni strujni odziv koji autori navode u svojim istraživanjima, ne odnosi se samo na jedan izomer CGAs (5-CQA), nego na smjesu izomera CGAs (CQAs i diCQAs).

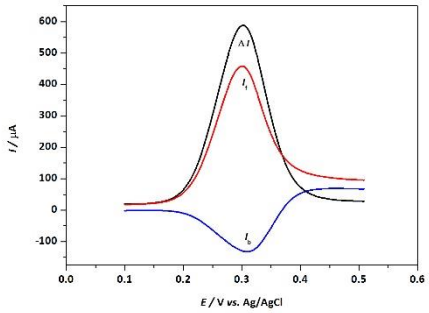
2.3.2.1. Pravokutnovalna voltametrija

Pravokutnovalna voltametrija (engl. *Square-Wave voltammetry*, SWV) pulsna je voltametrijska metoda. Pobuda se sastoji od naizmjeničnih katodnih i anodnih pulseva velike amplitude, koji se pojavljuju nekom određenom frekvencijom *f* pri čemu se ostvaruje velika brzina snimanja voltamograma. Odziv na signal pobude (struja ćelije) mjeri se na kraju svakog pulsa (na kraju oksidacijskog strujnog odziva i na kraju redukcijskog strujnog odziva), a kao rezultat prikazuje se razlika u struji između dva uzastopna pulsa: $\Delta I = I_f - I_b$. Ukupna struja pravokutnovalnog voltamograma (ΔI) nastala je u funkciji pripadajućeg stepeničastog rastućeg potencijala te se može razdvojiti i prikazati kao struja katodnog (I_b), odnosno anodnog pulsa (I_f). SWV metoda je pogodna za ispitivanje mehanizama i kinetike elektrokemijskih reakcija, ali i za karakterizaciju elektroaktivnih tvari (Brett i Oliveira–Brett, 1994.; Compton i Banks, 2007.; Komorsky-Lovrić i Lovrić, 2007.; Novak, 2010.; Šeruga, 2011.).

Princip SWV prikazan je na **Slikama 15** i **16**.



Slika 15 Princip SWV (Compton i Banks, 2007.; Šeruga, 2011.).



Slika 16 Prikaz ukupne struje (Δ*I*), struje anodnog (I_f) i katodnog pika (I_b) (Compton i Banks, 2007.; Šeruga, 2011.).

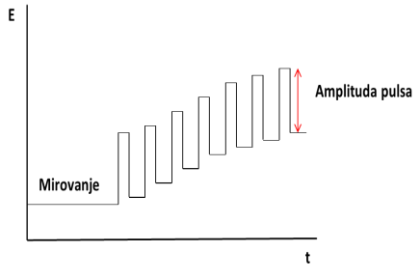
Za karakterizaciju klorogenskih kiselina u kavi, Yardim (2012.) i Yardim i suradnici (2013.) primijenili su pravokutnovalnu voltametriju na BDD elektrodi (eng. *boron-doped diamond electrode*) i adsorpcijsku *stripping* pravokutnovalnu voltametriju (AdTSSW). Yardim (2012.) koristio je Britton-Robinsonov pufer pH 3 te je predložio AdTSSW metodu kao selektivnu i brzu metodu za praćenje polifenolnih spojeva u uzorcima kave.

Fernandes i suradnici (2009.) primijenili su SWV metodu za elektrokemijsko određivanje klorogenskih kiselina u nekoliko uzoraka kave koristeći biosenzor koji sadrži nanočestice iridija i enzim polifenol oksidazu imobilizirane na radnu elektrodu od grafita. Mjerenja su provedena u PBS puferu pH 6,0. Ovako konstruiran biosenzor ima povećanu osjetljivost u određivanju CGAs (zapravo klorogenske kiseline 5-CQA) u kavama, uslijed katalitičkog djelovanja i nanočestica iridija i enzima polifenol oksidaze na oksidaciju kateholne skupine u *ortho*-kinon strukturu.

Carvalho i suradnici (2008.) i Moccelini i suradnici (2008.) također su primijenili određene modifikacije radne elektrode biosenzora sa svrhom njezine bolje osjetljivosti. Moccelini i suradnici (2008.) upotrijebili su dva biosenzora na bazi radne elektrode od ugljikove paste (CPE). U jednom slučaju na površinu radne CPE imobiliziran je hitozan i enzim peroksidaza, a u drugom slučaju mikročestice silicija i enzim peroksidaza. Oba ovako modificirana biosenzora pokazala su vrlo dobru selektivnost u određivanju klorogenskih kiselina (zapravo klorogenske kiseline, 5-CQA) u kavi. Carvalho i suradnici (2008.) primijenili su modificirani senzor na bazi grafitnog praha u koji je umješan tetranuklearni Cu(II) kompleks. Ovako pripremljen modificirani senzor korišten je za određivanje klorogenske kiseline u četiri uzorka kave, koristeći SWV kao metodu mjerenja. Dobiveni rezultati bili su u vrlo dobroj korelaciji s rezultatima dobivenim kapilarnom elektroforezom.

2.3.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Kod diferencijalne pulsne voltametrije (engl. *Differential Pulse Voltammetry*, DPV) osnovni je signal pobude linearno rastući potencijal na koji se superponiraju (pridružuju) mali kvadratični naponski impulsi iznosa od 10-100 mV u vremenskom trajanju od 5-100 ms. Iznosi naponskih impulsa konstantni su, a linearno rastući potencijal raste s vremenom što je prikazano na **Slici 17**. Odziv na signal pobude (struja ćelije) mjeri se neposredno prije nego se primijeni slijedeći puls i na kraju pulsa, a razlika vrijednosti struja prikazuje se kao funkcija potencijala. Oblik odziva (diferencijalni pulsni voltamogram) karakteriziran je pojavom jednog ili više strujnih pikova. Ova metoda daje informacije o elektrokemijskim svojstvima elektroaktivnih tvari i često se koristi za njihovu karakterizaciju (Šeruga, 2011.).



Slika 17 Princip DPV (Scholz, 2010.; Šeruga, 2011.)

Elektrokemijsko određivanje CGAs u kavi metodom DPV do sada je prema dostupnim literaturnim podacima provedeno samo u radovima Ziyatdinova i suradnici (2013.) i Santos i suradnici (2011). Ziyatdinova i suradnici (2013.) koristili su za DPV mjerenja modificiranu MWNT-GC radnu elektrodu. Modifikacija radne GC elektrode pomoću višestjenčanih ugljikovih nanočestica (MWCNT) znatno je povećala osjetljivost GC elektrode u odnosu na GC elektrodu bez sloja nanočestica.

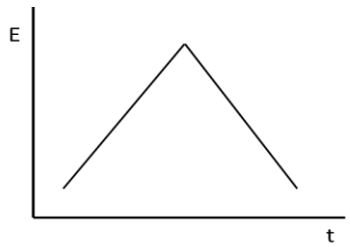
Santos i suradnici (2011.) koristili su elektrokemijski biosenzor (MIS–*moleculary imprintes siloxane film* na površini Au elektrode, MIS/Au senzor) provodeći DPV mjerenja određivanje sadržaja CGAs u kavi, zelenom, crnom i mate čaju. MIS/AU elektrokemijski senzor pokazao je visoku selektivnost, osjetljivost i brzinu mjerenja u određivanju sadržaja CGAs u realnim uzorcima.

2.3.2.3. Ciklička voltametrija

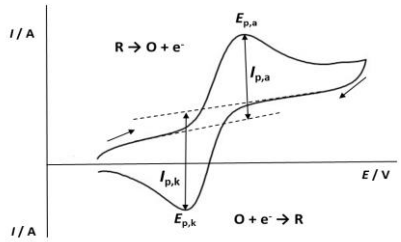
Ciklička voltametrija (engl. *Cyclic Voltammetry*, CV) voltametrijska je metoda kod koje je signal pobude linearno rastući potencijal, a signal odziva struja što je prikazano na **Slici 18**. Potencijal radne elektrode se kontinuirano mijenja tijekom polarizacije određenom brzinom polarizacije u određenom području potencijala. Ako otopina sadrži neku elektroaktivnu tvar čiji se oksidirajući oblik (O) može reducirati u reducirajući oblik (R) i obratno, tijekom polarizacije odvija se redoks reakcija:

$$O + z\, e^- \leftrightarrow R$$

Pri potencijalu radne elektrode, koji je znatno pozitivniji od formalnog elektrodnog potencijala redoks sustava ispitivane elektroaktivne tvari u otopini kroz ćeliju prolazi vrlo mala struja i brzina elektrokemijske redukcije O u R vrlo je mala. Negativiranjem potencijala radne elektrode (katodna polarizacija) raste brzina elektrokemijske redukcije tvari O u R i počinje teći mjerljiva struja što se na voltamogramu vidi kao uzlazni dio strujne krivulje odziva (ciklički voltamogram), prikazano je na **Slici 19**. Maksimalna struja pika izravno je proporcionalna koncentraciji elektroaktivne tvari u otopini i brzini polarizacije. Kada potencijal radne elektrode postigne dovoljno negativnu vrijednost, dolazi do trenutačne i potpune redukcije elektroaktivne tvari O, pristigle na površinu radne elektrode procesom difuzije iz otopine. Koncentracija reduktanta (O) na površini radne elektrode praktički je nula. Kod cikličke voltametrije nakon određene granice polarizacije, signal pobude mijenja smjer i započinje obrnuti elektrokemijski proces (anodna polarizacija) tj. proces oksidacije tvari R u tvar O. (Šeruga, 2011., Piljac, 1995.).



Slika 18 Signal pobude CV (Piljac, 1995.; Šeruga, 2011.)



Slika 19 Izgled cikličkog voltamograma (Piljac, 1995.)

Ciklička voltametrija našla je primjenu u različitim područjima istraživanja. Rijetko se kao tehnika koristi za kvantifikaciju dok se uvelike upotrebljava za proučavanje oksidacije i redukcije elektrodnog procesa, prirode intermedijera i stabilnosti produkata reakcije.

Kilmartin i Hsu (2003.) primijenili su cikličku voltametriju za karakterizaciju polifenola na čajeve i kavi na GC elektrodi u PBS puferu pH 7,0. Autori u ovom radu pokazali su samo mogućnost primjene cikličke voltametrije za karakterizaciju klorogenskih kiselina u uzorcima kava ne ulazeći u detalje validacije metode i kvantifikacije sadržaja 5-CQA.

2.3.2.4. Protočna *stripping* kronopotenciometrijska analiza

Protočna *stripping* kronopotenciometrijska analiza (engl. *Flow Through Stripping Chronopotentiometry*, FTSCP) elektroanalitička je metoda koja se sastoji od dva koraka. U prvom koraku mjerenja, elektroaktivna tvar se elektrokemijski deponira (predkoncentrira) iz otopine na radnu elektrodu na odgovarajućem depozicijskom potencijalu/struji. Nakon određenog vremena depozicija se prekida i nakon kratkog perioda mirovanja elektrolita, u drugom koraku mjerenja, provodi se otapanje depozita s površine radne elektrode primjenom konstantne struje otapanja (*stripping* – otapanje depozita s površine elektrode), galvanostatski. Tijekom otapanja depozita mjeri se promjena potencijala radne elektrode u ovisnosti o vremenu otapanja. Dobiveni potencijal-vrijeme (*E*-*t*) dijagram ima karakterističan *S*-oblik sličan krivulji redoks titracije. *E*-*t* dijagram se transformira u oblik *E*-*dt*/*dE* ili *dt*/*dE*-*E* dijagram zbog boljeg prikaza i bolje mogućnosti analize jer se prikazuje pik na vrijednosti potencijala, pri kojoj dolazi do otapanja (*stripping*) deponirane tvari s površine radne elektrode. Površina ispod pika, odnosno visina pika, proporcionalni su koncentraciji određene elektroaktivne tvari što predstavlja osnovu za kvantitativno određivanje neke elektroaktivne tvari (metali) (Beinrohr, 2011.; Šeruga, 2011.). Do danas u literaturi ne postoje podaci o primjeni ove metode u kvantifikaciji CGAs u kavi.

Na **Slici 20** prikazan je izgled mjerne ćelije i izgled mikroporozne elektrode kao radne elektrode pomoću kojih su provedena mjerenja FTSCP metodom.



Slika 20 FTSCP ćelija i mikroporozna elektroda.

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KAVA

Zelena i pržena zrna kave imaju kompleksan kemijski sastav uslijed prisustva raznih biološki aktivnih spojeva što se uočava iz **Tablica 2 i 3.** Upravo kemijski sastav zrna utječe na antioksidacijsku aktivnost, posebno klorogenske kiseline koje su u značajnoj količini prisutne u zelenom, ali i prženom zrnu kave. Na antioksidacijsku aktivnost kave utječe i proces berbe bobica kave, skladištenje, proces prženja zelenih zrna i ostale tehnološke operacije. Profil antioksidacijske aktivnosti znatno se mijenja tijekom procesa prženja zelenog zrna kave uslijed degradacije i transformacije prirodno prisutnih antioksidacijskih spojeva u zelenom zrnu kave. Tako npr. degradacijom klorogenskih kiselina uslijed gubitka molekule vode iz QA, nastaje intramolekularna esterska veza unutar molekula CGAs tj. nastaju laktoni klorogenskih kiselina, CGLs (Farah i sur. 2005.). Također nizom složenih reakcija između reducirajućih šećera i amino kiselina prisutnih u zelenom zrnu kave, na visokim temperaturama nastaje cijeli niz novih spojeva (produkti Maillardove reakcije), a kao krajnji produkti nastaju melanoidini (Moreira i sur., 2015.). Novonastali spojevi (prije svega laktoni i melanoidini) osim što su odgovorni za aromu, okus i boju kave, znatno utječu i na antiokidacijsku aktivnost kave kao napitka (Borrelli i sur., 2002.; Delgado-Andrade i sur., 2005.; Bekedam i sur., 2008.;Votavova i sur., 2009.; Vignoli i sur., 2011.; Liu i Kitts, 2011.; Somporn i sur., 2011.; Perrone i sur., 2012.; Komes i Bušić, 2014.; Vignoli i sur., 2014.).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti realnih uzoraka, kave, primjenjuju se različite metode zbog točnije interpretacije dobivenih vrijednosti i potvrde antioksidacijske aktivnosti.

Realni uzorci su kompleksni sustavi za analizu i ne tako jednostavni za određivanje njihove antioksidacijske aktivnosti kao čisti spojevi, antioksidansi. Unatoč značajnom utjecaju spojeva nositelja antioksidacijske aktivnosti iz kave na ljudsko zdrave, još nije razvijena standardizirana metoda određivanja iste. Danas veliki značaj u određivanju antioksidacijske aktivnosti dobivaju jednostavne i jeftine elektrokemijske metode te modifikacija površine radne elektrode primjenom različitih biosenzora uz standardne spektrofotometrijske metode.

2.4.1. Spektrofotometrijske metode analize antioksidacijske aktivnosti kava

Spektrofotometrijske metode najčešće su primjenjivane metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti realnih uzoraka. Literaturni pregled primjene pojedinih spektroskopskih metoda na antioksidacijsku aktivnost kava, prikazan je u **Tablici 6**.

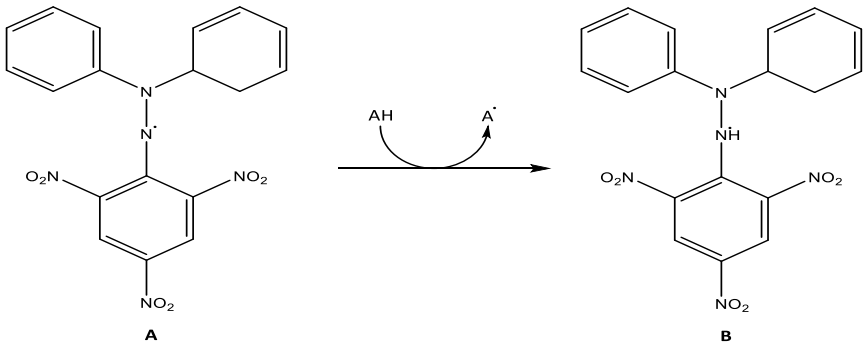
Iz **Tablice 6** uočava se da su u literaturi najzastupljenije indirektne metode DPPH i ABTS te direktna FRAP metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti kava, dok su od spektrofotometrijskih metoda najmanje primjenjivane ORAC i EPR metode.

Tablica 6 Literaturni pregled primjene pojedinih spektrofotometrijskih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti kava

Autori	Spektrofotometrijska metoda					
	DPPH	ABTS	FRAP	ORAC	HPLC-ABTS	EPR
Oliveira-Neto i sur., 2016.	x					
Erdem i sur., 2015.	x		x			
Anissi i sur., 2014.	x					
Garcia-Lomillo i Gonzales-Sanjose, 2014.	x	x	x			
Liang i Kitts, 2014.	x	x	x	x		x
Opitz i sur., 2014.		x		x		
Van der Werf i sur., 2014.					x	
Bravo i sur., 2013.	x	x				
Yashin i sur., 2013.		x	x	x		
Ziyatdinova i sur., 2013.			x			
Niseteo i sur., 2012.		x	x			
Perez-Hernandez i sur., 2012.	x	x				
Perrone i sur., 2012.		x	x			
Seawan i sur., 2012.	x		x			
Liu i Kitts, 2011.		x	x	x		
Somporn i sur., 2011.	x					
Vignoli i sur., 2011.	x	x	x			
Brezova i sur., 2009.						x
Dudonne i sur., 2009.	x	x	x	x		
Fukushima i sur., 2009.	x					
Sacchetti i sur., 2009.		x				
Votavova i sur., 2009.	x					
Naidu i sur., 2008.	x		x			
Parras i sur., 2007.		x				
Cämmerer i sur., 2006.		x				x
Delgado-Andrade i sur., 2005.	x	x	x			
Sanchez-Gonzales i sur., 2005.		x	x			
Borrelli i sur., 2002.	x	x				

DPPH metoda

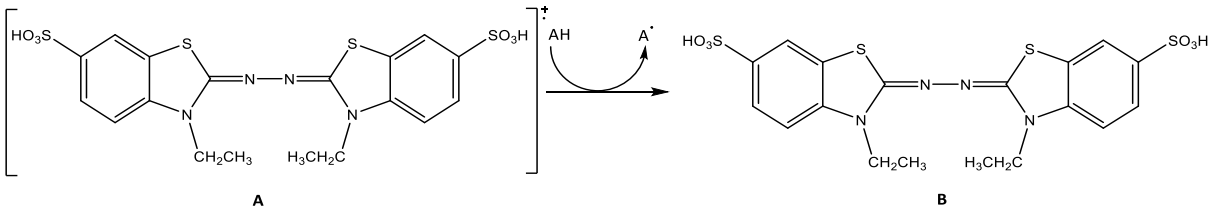
Ovom metodom se prati redukcija DPPH• radikala koji je tamnoljubičasto obojen (**A**) i ima maksimalnu apsorbanciju pri valnoj duljini od 517 nm. DPPH• radikal se za vrijeme reakcije sa antioksidansom oboji u bljedožuto (**B**) te mu se iznos apsorbancije smanjuje zbog smanjenja koncentracije DPPH• radikala. Stoga, hvatanje DPPH• radikala (smanjenje koncentracije) prati smanjenje iznosa apsorbancije na valnoj duljini od 517 nm (**Slika 21**) (Brand-Williams i sur., 1995.; Bondet i sur, 1997.; Sharma i Bhat, 2009.).



Slika 21 Reakcija antioksidansa i DPPH• radikala (Garcia-Lomillo i Gonzales-Sanjose, 2014.)

ABTS metoda

ABTS metoda temelji se na reakciji stabilnog plavozelenog ABTS•+ radikal kationa (**A**) s nekim antioksidansom pri čemu ABTS•+ radikal kationa prelazi u bezbojan oblik (**B**) (**Slika 22**). ABTS•+ radikal kation stvara se kemijskom, elektrokemijskom ili enzimskom oksidacijom ABTS-a, nekoliko sati prije analize. U otopinu ABTS•+ radikal kationa dodaje se antioksidans i prati se smanjenje iznosa apsorbancije ABTS•+ kation radikala i uspoređuje sa smanjenjem iznosa apsorbancije uzrokovanog dodatkom poznatih količina Troloxa. Zbog brze reaktivnosti ABTS•+ radikal kationa, reakcija ABTS•+ radikal kationa s antioksidansom, prati se kroz jednu ili pet minuta. Aktivnost hvatanja ABTS•+ radikal kationa ovom metodom izražava se kao TEAC ili TE vrijednost (Rice-Evans i sur., 1996.; Re i sur., 1999.).



Slika 22 Reakcija antioksidansa i ABTS•+ radikala (Garcia-Lomillo i Gonzales-Sanjose, 2014.)

U **Tablici 7** prikazana je antioksidacijske aktivnosti ABTS, DPPH i FRAP metodama za neke vrste kava. Uočava se razlika u dobivenim rezultatima određivanja antioksidacijske aktivnosti, a uslijed primjene različitog sintetskog radikala i razlike u reakciji istih s realnim uzorcima.

Tablica 7 Antioksidacijska aktivnost napitka kave određena spektrofotometrijskim metodama (Komes i Belščak-Cvitanović, 2014.)

Kava	ABTS	DPPH	FRAP
	µmolTE ml^{-1}		µmolFe(II) ml^{-1}
Filter kava	5 – 50	do 60	36 - 120
Espresso kava	6 - 130	do 20	27 - 122
Instant kava	41 - 50	-	105 - 245
Mljevena kava	37 - 54	-	82 - 88
Mocca	8 - 13	-	561 – 1319*

* µg Trolox / porciji

2.4.2. Elektrokemijske metode analize antioksidacijske aktivnosti kava

Danas uz primjenu standardnih spektrofotometrijskih metoda, elektrokemijske metode, prije svega voltametrijske metode, nalaze značajnu primjenu u određivanju antioksidacijske aktivnosti realnih uzoraka kao što su kava, čaj, kakao, vino, pivo. Veliki interes za određivanje antioksidacijske aktivnosti kava elektrokemijskim metodama, prisutan je zbog velike osjetljivosti, brzine i jednostavnosti elektrokemijskih metoda koje ne zahtijevaju značajnu pripravu uzoraka prije analize te relativno niske cijene elektrokemijskih uređaja. Mjerni signal neovisan je o bistroći ili mutnoći ispitivanog uzorka. Vjerojatno najveća prednost elektrokemijskih metoda je elektroaktivnost gotovo svih vrsta antioksidansa, koja uključuje i prijenos elektrona prisutnih u reakciji između antioksidansa i slobodnih radikala, što omogućuje analizu antioksidacijske aktivnosti kompleksnih sustava (Cruz i sur., 2015.; Pisoschi i sur., 2015.).

Prema literaturnim podacima zastupljenosti elektrokemijskih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti uzorka kava, do danas je relativno malobrojna u odnosu na spektrofotometrijske metode (DPPH i ABTS). Tako su, Milardović i suradnici (2005.) primijenili biamperometrijsku metodu koristeći DPPH radikal za određivanje antioksidacijske aktivnosti više antiokidansa i nekoliko realnih uzoraka, između ostalih i jednog uzorka mljevene kave. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izražene su kao Trolox ekvivalenti (amperometrijski i spektroskopski). Iveković i sur. (2005.) razvili su protočnu elektrokemijsku metodu (FIA) za

određivanje antioksidacijske aktivnosti pomoću ABTS radikal kationa i primijenili su je na više antioksidansa i po jedan uzorak instant kave, crnog vina, crnog čaja i nekih biljnih čajeva. Mjerenja su pokazala dobru povezanost rezultata dobivenih FIA i ABTS metodom. Yardim (2012.) i Oliveira-Neto i sur. (2016.) odredili su ukupne polifenole u uzorcima kava. Oliveira-Neto i sur. (2016.) odredili su antioksidacijsku aktivnost više uzoraka kava preko elektrokemijskog indeksa (EI) koji odgovara sumi omjera struja i potencijala anodnih pikova opaženih na DP voltamogramima kava. Ova metoda izražavanja antioksidacijske aktivnosti nije uobičajena i predstavlja određenu kontraverznu metodu. Dobivene EI vrijednosti usporedili su s vrijednostima dobivenim standardnom spektrofotometrijskom DPPH metodom, izraženom preko EC_{50} vrijednosti.

2.4.2.1. Analiza antioksidacijske aktivnosti kava primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora

Elektrokemijski DNA biosenzor definira se kao uređaj koji integrira DNA kao biološki aktivnu komponentu i neku od elektroda (npr. GCE, grafitnu elektrodu, CPE, platinu itd.) kao fizikalno-kemijski (elektrokemijski) pretvarač (engl. *transducer*) signala. DNA se nalazi u bliskom kontaktnu s pretvaračem signala tj. na neki od načina je imobilizirana na površinu pretvarača, što omogućuje da pretvarač pretvori uočenu bilo koju promjenu DNA (npr. oštećenje njene strukture) u odgovarajući signal, uglavnom u električni signal. Promjene u strukturi DNA (npr. oštećenja) analiziraju se nekom od elektrokemijskih tehnika (CV, SWV, DPV). To je osnovni princip funkcioniranja elektrokemijskog DNA biosenzora (Drummond i sur., 2003; Labuda i sur., 2010.; Šimkova i Labuda, 2011.).

Postoje dvije osnovne tehnike detekcija promjena elektrokemijske i/ili površinske aktivnosti DNA na površini DNA biosenzora. Jedna od njih je direktna tehnika, engl. „*label-free techniques*“ koja se osniva na elektrokemijskoj i površinskoj aktivnosti DNA (Labuda i sur., 2010.). Kada je DNA u interakciji s nekom od elektroda, obično je snažno adsorbirana na površini elektrode. Adsorbirani DNK podliježe reakcijama izmjene naboja, stvarajući električne signale koji daju informacije o njenoj koncentraciji, promjenama u strukturi i ostalim promjenama DNA (npr. reakcijama oksidacije). Tako npr. gvanin (kao strukturna jedinica DNA) podliježe procesu oksidacije. Brett i sur. (2002.) istraživali su elektrokemijsku oksidaciju gvanina na GCE u acetatnom puferu pH 4,5 primjenom DPV metode. Rezultati ukazuju da se oksidacija gvanina odvija u dva stupnja. U prvom stupnju odvija se ireverzibilna $2e^{-}$-$2H^{+}$

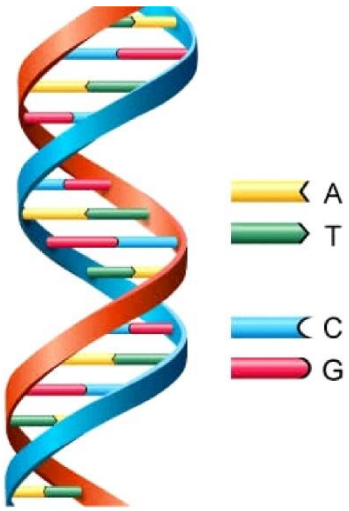
oksidacija u 8-oksogvanin pri potencijalu 0,8 V vs. Ag/AgCl, iza koje slijedi reverzibilna jednoelektronska oksidacija gvanin-dimera na potencijalu 0,95 V. 8-oksogvanin formiran na površini GCE dalje se oksidira reverzibilnim $2e^{-}$-$2H^{+}$ procesom na potencijalu 0.55 V tijekom višestruke uzastopne polarizacije. I ostale nukleobaze (adenin, citozin i timin podliježu procesu elektrokemijske oksidacije/redukcije na nekoj od elektroda (npr. GCE, Brett i sur. 2004.). Druga alternativna tehnika koristi tzv. DNA redoks indikatore kako bi detektirala prisutnost imobiliziranog DNKna površini elektrode, kao i oštećenja njene strukture u interakciji s drugim tvarima (npr. slobodnim radikalima). Kao što je prije rečeno, oksidacija i redukcija DNA najčešće je elektrokemijski ireverzibilni proces koji se odvija na visoko pozitivnim, odnosno visoko negativnim vrijednostima potencijala. S ciljem povećanja osjetljivosti ovih mjerenja koriste se DNA redoks markeri čije se reverzibilne redoks-reakcije odvijaju pri manje ekstremnim vrijednostima potencijala.

U tu svrhu koriste se različiti redoks markeri. Tako se Rh i Ru kompleksi koriste kao redoks indikatori koji pomažu transport elektrona sa npr. gvanina iz udaljenih dijelova molekule DNA na elektrodu. Redoks indikatori obično pokazuju svoj reverzibni elektrokemijski odziv na potencijalima dovoljno udaljenim od potencijala nukleobaza, što omogućuje da ne dolazi do preklapanja njihovih oksidacijskih/redukcijskih pikova s onima od DNA. Neki od redoks indikatora reagiraju s DNA putem elektrostatskih sila, dok su drugi prisutni u otopini elektrolita kao slobodni ioni. Kationski indikatori kao npr. metalni kompleksni kationi $[Co(phen)_3]^{3+}$ i $[Co(bpy)_3]^{3+}$ mogu biti privučeni na površinu elektrode negativnim nabojem okosnice DNA, dok anionski indikatori kao npr. $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ mogu biti odbijeni uslijed negativnog naboja DNA. Kao posljedica ovih elektrostatskih odbojnih sila voltametrijski strujni odziv redoks-indikatora manji je, a razlika potencijala anodnog i katodnog pika manja nego ona opažena na „čistoj“ elektrodi tj. elektrodi bez sloja DNA (Labuda i sur., 2010.). Anionski redoks-indikator $[Fe(CN)_6]^{3-/4}$ korišten je u ovoj disertaciji.

Da bi se povećala osjetljivost i selektivnost DNA biosenzora često se koriste nanočestice kao npr. SWCNT i MWCNT, koje se nanose na površinu elektrode kako bi povećale radnu površinu elektrode i proces izmjene elektrona zbog svojih vrlo dobrih elektronskih i električkih svojstava. Također se koriste i razne protektivne membrane (npr. nafion i kitozan) kako bi zaštitile površinu DNA biosenzora od neželjenih oštećenja i interakcija, a time utječu indirektno i na osjetljivost i trajnost DNA biosenzora (Labuda i sur., 2010). Unaprjeđenja i

razvoj novih DNA biosenzora u stalnom je napretku, što onda znatno proširuje i područje njihove primjene.

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) osnovna je komponenta DNA biosenzora. Ona posjeduje specifičnu strukturu i svojstva. DNA ima ulogu pohrane i ekspresije genetske informacije i predstavlja molekulu koja prenosi gensko nasljeđe. Struktura DNA molekule linearni je polimer sastavljen od monomernih jedinica (nukleotida). Nukleotidi su biomolekule izgrađene od šećera deoksiriboze, fosfatnih skupina i purinskih (adenin, gvanin) i pirimidinskih (timin, citozin, uracil) dušičnih baza. Početak lanca DNA molekule sadrži 5'-hidroksilnu skupinu deoksiriboze esterificiranu s fosfatom. Kraj lanaca je slobodna 3'-hidroksilirana skupina deoksiriboze. Na **Slici 23** prikazan je izgled strukture dvolančane DNA (dsDNA).



Slika 23 Izgled dvostruke uzvojnice DNA

Dvolančana DNA molekula (dsDNA) izgrađena je od dva nukleotidna lanca međusobno omotana oko zajedničke osi u pravilnu spiralnu strukturu. Kostur lanca čine šećeri deoksiriboze međusobno povezani fosfodiesterskom vezom, a smješteni su na vanjskoj strani uzvojnice. Iz **Slike 23** uočava se da su purinske i pirimidinske baze smještene u unutrašnjosti uzvojnice povezane međusobno vodikovim vezama. Nekovalentne molekulske interakcije stabiliziraju dvostruku uzvojnicu DNA te vodikove veze između komplementarnih baza, hidrofobne interakcije, između susjednih parova baza i Van der Waalsove sile između susjednih parova baza. Fosfodiesterske veze nose negativni naboj molekule DNA te da bi se stabilizirala molekula DNA vežu se npr. magnezijevi ioni, poliamini, histoni kao nositelji pozitivnog naboja. Djelovanjem jakih kiselina i lužina, visoke temperature i specifičnih enzima, može doći do razaranja dvostruke uzvojnice DNA jer kidaju vodikove veze između komplementarnih baza

(Berg i sur., 2013.). Djelovanjem slobodnih radikala, reaktivnih kisikovih specija (ROS) također može doći do oštećenja strukture DNA. Dodatak antioksidansa u smjesu koja proizvodi slobodne radikale, dovodi do smanjenja stupnja oštećenja DNA, što je osnova mjerenja antioksidacijske aktivnosti metodom DNA biosenzora.

U istraživanjima antioksidacijske aktivnosti metodom DNA biosenzora korištene su različite elektrode, različiti DNA redoks-sustavi, različiti slobodni radikali, različite elektrokemijske metode za praćenje promjena, različiti antioksidansi i realni sustavi. Tako su Labuda i sur. (2003.) ispitivali antioksidacijski i prooksidacijski utjecaj nekih flavonoida (kvercetin, rutin, katehin i epigalokatehin) primjenom DNA biosenzora. Pokazalo se da antioksidacijska aktivnost flavonoida raste do određene koncentracije, nakon čega oni počinju djelovati kao prooksidansi. Slično ponašanje opaženo je i u radu Ferencova i sur. (2004.) i Šimkova i Labuda (2011.). Iz ovih rezultata može se zaključiti da antioksidansi svojim pozitivnim djelovanjem umanjuju oštećenja u molekuli DNA.

Ispitivanja antioksidacijske aktivnosti realnih sustava primjenom DNA biosenzora provedena su u uzorcima zelenog i crnog čaja te ekstrakta ginka (Šimkova i sur., 2009.), uzorcima voćnih sokova (Ziyatdinova i Labuda, 2012.), uzorcima piva, crnog čaja i kave (Hlavata i sur., 2014.) te uzorcima bijelih vina (Svitkova i sur., 2015.). Istraživanja su pokazala da antioksidansi iz navedenih prehrambenih proizvoda djeluju pozitivno tj. smanjuju stupanj oštećenja DNA koji je nastao djelovanjem slobodnih radikala.

Jedini rad u kojem je ispitivan antioksidacijski utjecaj kave na stupanj oštećenja DNA uslijed djelovanja $OH^{\bullet}$ slobodnih radikala je od Hlavata i sur. (2014.). Autori su odredili antioksidacijsku aktivnost jednog uzorka vodenog ekstrakta kave pomoću DNA biosenzora na radnoj elektrodi od staklastog ugljika na koju su nanešeni Nafion odnosno hitosan kao zaštitne membrane, koristeći cikličku voltametriju i elektrokemijsku impedancijsku spektroskopiju kao metode za praćenje elektrokemijskih parametara redoks sustava $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Rezultati su pokazali da je antioksidacijski efekt vodenog ekstrakta kave usporediv s onim dobivenim u ekstraktu crnog čaja i ovisi o vrsti primijenjene elektrode i naravno, značajno opada s vremenom inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala.

Svi gore navedeni autori u svojim su radovima pokazali da su elektrokemijske metode određivanja antioksidacijske aktivnosti, a naročito metoda elektrokemijskog DNA biosenzora, vrlo dobra alternativa standardnim spektrofotometrijskim metodama (npr. ABTS-u i DPPH-u).

Zbog praktički nepostojanja literaturnih podataka o antioksidacijskoj aktivnosti uzoraka kave mjerenoj primjenom DNA biosenzora (samo rad Hlavata i sur., 2014.), u ovoj disertaciji kao jedan od ciljeva bio je prikaz razvoja i primjena metode elektrokemijskog DNA biosenzora kao selektivne, osjetljive i pouzdane metode za elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti različitih vrsta kava.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

● Provesti detaljna istraživanja elektrokemijskih svojstava devet klorogenskih kiselina (5-CQA, 4-CQA, 3-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 5-FQA, 4-FQA, 3-FQA) koje prevladavaju sadržajem u kavama, primjenom nekoliko elektrokemijskih metoda i to: pravokutnovalne voltametrije (SWV), diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) i protočne *stripping* kronopotenciometrije (FTSCP). Ispitati utjecaj kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije, pH otopine osnovnog elektrolita, frekvencije pobudnog signala, efektivne brzine polarizacije, koncentracije klorogenskih kiselina te metode polarizacije, na elektrokemijsko ponašanje (elektrokemijska svojstva) ispitivanih klorogenskih kiselina.

● Na temelju dobivenih rezultata istraživanja elektrokemijskih svojstava navedenih klorogenskih kiselina, razviti i validirati pravokutnovalnu voltametriju (SWV), diferencijalnu pulsnu voltametriju (DPV) i protočnu *stripping* kronopotenciometriju (FTSCP) kao metode za brzu, pouzdanu, osjetljivu i selektivnu karakterizaciju (identifikaciju i kvantifikaciju) klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima različitih vrsta kava.

● Provesti karakterizaciju ispitivanih uzoraka kave HPLC metodom primjenom UV/Vis i PDA detektora te usporediti rezultate HPLC analize s rezultatima dobivenim primjenom elektrokemijskih metoda.

● Razviti brzu, selektivnu, osjetljivu i preciznu elektrokemijsku metodu za određivanje antioksidacijske aktivnosti (AA) primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora. DNA biosenzor (DNA/SWCNT-COOH/SPCE) pripremiti na posebnoj vrsti elektroda, tzv. „*Screen Printed Electrodes*“ (SPEs), napravljenim od ugljikovih nanocjevčica (CNT).

● Razvijenu i validiranu metodu DNA biosenzora primijeniti za određivanje antioksidacijske aktivnosti ispitivanih uzoraka kava i klorogenskih kiselina. Elektrokemijske parametre potrebne za određivanje antioksidacijske aktivnosti, pratiti primjenom cikličke voltametrije (CV).

● Odrediti antioksidacijsku aktivnost uzoraka kava i klorogenskih kiselina primjenom standardnih spektrofotometrijskih metoda (ABTS, DPPH) te rezultate usporediti s rezultatima dobivenim primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Uzorci kave

U ovoj disertaciji analizirano je deset različitih uzoraka kave. Uzorci zelenih zrna kave, prženih zrna kave, *instant* kava i mljevenih kava analizirani u ovoj disertaciji, navedeni su u **Tablici 8**. Uzorci kava su komercijalno dostupni na hrvatskom tržištu. Uzorci *instant* kava i mljevenih kava kupljeni su u lokalnim hrvatskim trgovinama, dok su uzorci zelenih i prženih zrna kave nabavljeni od tvrtke Anamarija Company d.o.o., Zagreb.

Tablica 8 Ispitivani uzorci kave

Zelena i pržena zrna kave	*Instant* kave	Mljevene kave
Coffea arabica, cv. Rio Minas, Brazil	Nescafé Classic	Franck Guatemala, 100% Arabica
Coffea robusta, cv. Cherry, Indija	Nescafé Espresso	Flatscher Olympia, 100% Arabica
	Jacobs Monarch	
	Jacobs Intense	

3.2.2. Kemikalije i ostali materijal

Kafeoilkina kiseline (CQAs) HPLC čistoće (≥98 %): 3–CQA (neoklorogenska kiselina), 4–CQA (kriptoklorogenska kiselina), i 5–CQA (klorogenska kiselina) te kafeinska kiselina (CFA), ferulična kiselina (FA), DPPH$^{\bullet}$ radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal), ABTS (2,2'–azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) i dsDNA, niske molekularne mase, od sperme lososa (31149) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Metanol (HPLC čistoće) nabavljen je od tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka), *ortho*-fosforna kiselina (HPLC čistoće) nabavljena je od tvrtke Fluka (Buchs, Švicarska). Dikafeoilkina kiseline (diCQAs): 3,4–diCQA (izoklorogenska kiselina B), 4,5–diCQA (izoklorogenska kiselina C) i 3,5–diCQA (izoklorogenska kiselina A), sve HPLC čistoće (>98 %), nabavljeni su od tvrtke Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. Chengdu Sichuan, Kina. Feruloilkina kiseline (FQAs): 3-FQA, 4-FQA i 5-FQA donirane su u svrhu izrade ove disertacije od strane dr. sc. Irene Dokli i dr. sc. Zdenka Hameršaka, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, gdje su sintetizirane i karakterizirane primjenom H^1 i ^{13}C NMR spektroskopije te HRMS (MALDI) spektrometrije, a identifikacija i čistoća FQAs (98 %) potvrđena je i HPLC analizom (Dokli i sur.,

2013.). Sve ostale kemikalije korištene u ovoj disertaciji, nabavljene su od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska).

Otopina fosfatnog pufera (PBS) koncentracije 0,1 mol L različitih pH vrijednosti korištena je kao osnovni elektrolit u svim elektrokemijskim mjerenjima. Otopine PBS pufera pripremljene su od natrijevog dihidrogenfosfata i dinatrijevog hidrogenfosfata, kupljenih od tvrtke Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska). Za pripremu otopina PBS pufera te vodenih ekstrakata kava korištena je ultračista voda (vodljivost vode < 0,1 μS cm^{-1}), dobivena pomoću uređaja za pročišćavanje vode Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka).

Sva elektrokemijska mjerenja provedena su na radnoj elektrodi od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon electrode*, GCE) promjera 3 mm, model MF-2012, kompanije Bioanalytical Systems, USA. Za poliranje GC elektrode korišten je prah aluminijevog oksida finoće 0,05 μm (Micropolish II) od tvrtke Buehler, USA.

3.2.3. Priprema otopina klorogenskih kiselina

Pripremljene su osnovne otopine svake od navedenih klorogenskih kiselina koncentracije, c = $1 \cdot 10^{-2}$ mol L^{-1} u metanolu HPLC čistoće i čuvane zaštićene od svjetla u hladnjaku na temperaturi 4 °C. Za mjerenja pravokutnovalne (SWV) i diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) osnovne otopine klorogenskih kiselina direktno su dodavane u elektrokemijsku ćeliju u otopinu 0,1 mol L^{-1} PBS, da bi se postigla željena radna koncentracija pojedine klorogenske kiseline. Kod mjerenja u protočnim uvjetima FTSCP metodom, željene radne koncentracije otopina klorogenskih kiselina, pripremljene su razrjeđivanjem osnovne otopine klorogenskih kiselina s otopinom 0,1 mol L^{-1} PBS te je nakon toga slijedilo mjerenje FTSCP metodom. Za analizu antioksidacijske aktivnosti pomoću DNA biosenzora, radna koncentracija otopina klorogenskih kiselina iznosila je $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1}, a pripremljena je direktnim razrjeđivanjem određenog volumena osnovne otopine klorogenskih kiselina u otopinu za stvaranje slobodnih radikala $OH^{\bullet}$. Za HPLC mjerenja otopine radnih koncentracija, pripremljene su razrjeđivanjem osnovne otopine klorogenskih kiselina s metanolom HPLC čistoće.

3.2.4. Priprema vodenih ekstrakata kava

Uzorci vodenih ekstrakata zelenih i prženih zrna kave, instant kava i mljevenih kava pripremani su prema proceduri koju su predložili Kilmartin i Hsu (2003.) te Delgado-Andrade i sur. (2005.). U 100 mL ultračiste Millipore vode zagrijane na temperaturu 80°C, dodana je masa od 1 g

uzorka kave. Ekstrakt kave miješan je 3 minute na magnetskoj miješalici, profiltriran korištenjem grubog filter-papira i neposredno prije analize, kada se uzorak kave ohladio na sobnu temperaturu, profiltriran kroz PTFE filter veličine pora 0,45 µm (VariSep PTFE, 0,45 µm, 25 mm, Varian). Na ovaj način pripremani su svi uzorci kave za elektrokemijska mjerenja, kromatografska mjerenja i određivanje antioksidacijske aktivnosti (metodama ABTS, DPPH i DNA biosenzora).

3.2.4. Elektrokemijska analiza klorogenskih kiselina i kava

Voltametrijska analiza klorogenskih kiselina i kava

Voltametrijska mjerenja (SWV i DPV) provedena su na uređaju potenciostat/galvanostat µAutolab uz primjenu GPES (*General Purpose Electrochemical System*) programske podrške, verzija 4.9.005. (Eco Chemie B. V., Utrecht, Nizozemska), koji je služio za provođenje mjerenja te prikupljanje i analizu elektrokemijskih podataka. Elektrokemijska mjerenja provedena su u staklenoj stacionarnoj elektrokemijskoj ćeliji tro-elektrodnog tipa (Methrohm, Švicarska) volumena 100 mL, na radnoj elektrodi od staklastog ugljika (GCE), uz primjenu Ag/AgCl (KCl, c= 3 mol L^{-1}) kao referentne elektrode i platinske elektrode kao pomoćne elektrode. Obje ove elektrode (referentna i pomoćna elektroda) nabavljene su od tvrtke Metrohm, Švicarska. Potencijal radne GCE elektrode izražen je u mjerenjima i na dijagramima u odnosu na referentnu elektrodu Ag/AgCl (KCl, c= 3 mol L^{-1}).

Prije provođenja voltametrijskih mjerenja, radna elektroda od staklastog ugljika polirana je prahom aluminijevog oksida (promjer čestica 0,05 µm) uz dodatak ultračiste vode (engl. *slurry*) te potom isprana ultračistom Milipore vodom te je što je prije moguće uronjena u stacionarnu elektrokemijsku ćeliju u otopinu osnovnog elektrolita (PBS pufera), kako bi se izbjeglo dodatno onečišćenje površine radne elektrode. Neposredno prije SWV i DPV mjerenja površina radne GCE elektrode dodatno je elektrokemijski polirana (čišćena) primjenom cikličke voltametrije (CV) uzastopnom polarizacijom (više polarizacijskih ciklusa do uspostave stacionarnog stanja) u rasponu potencijala od -0,2 V do 1,0 V, brzinom polarizacije od 50 mV s^{-1}. Ovakav način pripreme GCE pokazao se bitan jer daje veoma reproducibilne rezultate elektrokemijskih mjerenja.

Elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava ispitana su voltametrijskim tehnikama: diferencijalnom pulsnom voltametrijom (DPV) i

pravokutnovalnom voltametrijom (SWV). Ispitan je utjecaj sljedećih eksperimentalnih uvjeta na elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina i kava:

a) Utjecaj pH otopine osnovnog elektrolita, fosfatni pufer (PBS), c=0,1 mol L^{-1}, u rasponu od pH 2 do pH 8,
b) Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, tj. efekta „adsorpcije“,
c) Utjecaj frekvencija pobudnog signala kod SWV: 25, 50, 75, 100, 125 i 150 Hz,
d) Utjecaj koncentracija ispitivanih klorogenskih kiselina u rasponu koncentracija od $5 \cdot 10^{-6}$ do $1 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} ,
e) Utjecaj kemijske strukture klorogenskih kiselina i
f) Utjecaj vrste kave.

Sva voltametrijska mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi ±25°C (298 K) te su ponavljana pet puta, a u nekim slučajevima i više puta.

Karakterizacija klorogenskih kiselina provedena je u vodenim ekstraktima kava, koji su za potrebe mjerenja razrjeđivani otopinom osnovnog elektrolita 0,1 mol L^{-1} tj. otopinom fosfatnog pufera (PBS) pH 7,0; 100 puta (*DF*=100) za zelena zrna kave i 50 puta (*DF*=50) za pržena zrna kave, *instant* kave i mljevene kave. Voltamogrami su snimljeni prema eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablicama** od **9** do **11**. U **Tablici 9** prikazani su eksperimentalni uvjeti cikličke voltametrije (CV) po kojima je provedena stabilizacija radne elektrode prije svakog SWV i DPV mjerenja.

Tablica 9 Eksperimentalni uvjeti CV

Uvjet	Iznos
Početni potencijal	-0,2 V
Konačni potencijal	1,0 V
Korak potencijala, ΔE	2 mV
Brzina polarizacije	50 mV/s

Tablica 10 Eksperimentalni uvjeti DPV

Uvjet	Iznos
Početni potencijal	-0,2 V
Konačni potencijal	1 V
Brzina polarizacije	5 mV/s
Korak potencijala, ΔE	2 mV
Amplituda pulsa	50 mV

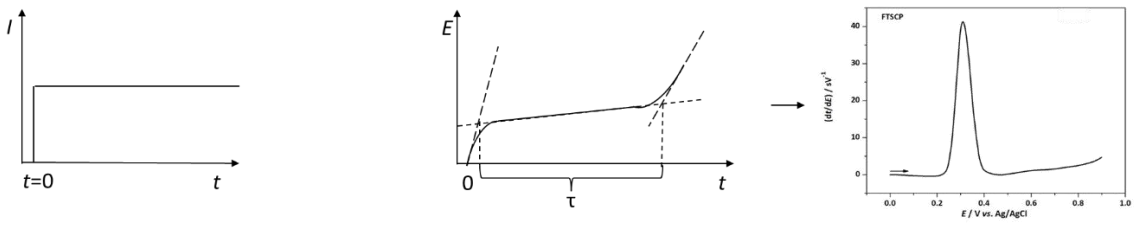
Tablica 11 Eksperimentalni uvjeti SWV

Uvjet	Iznos
Početni potencijal	-0,1 V
Konačni potencijal	1,0 V
Korak potencijala, *ΔE*	2 mV
Amplituda	50 mV
Frekvencija, *f*	25-150Hz

Identifikacija i kvantifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava provedena je diferencijalnom pulsnom voltametrijom (DPV), pravokutnovalnom voltametrijom (SWV) i protočnom *stripping* kronopotenciometrijom (FTSCP). Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava izražen je u mg 5-CQA ekvivalenta po 100 g kave (mg 5-CQAE / 100 g kave), jer je 5-CQA korištena kao standard za izražavanje količine CGAs. Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-total) u uzorcima kava izračunat je na osnovi elektrokemijskih parametara (iznosa struje anodnog pika) pojedinog uzorka kave, koristeći kalibracijsku krivulju za 5-CQA i provođenjem najmanje pet ponavljanja voltametrijskih mjerenja (SWV i DPV) za svaki pojedinačni uzorak kave.

Protočna *stripping* kronopotenciometrijska analiza klorogenskih kiselina i kava

Za elektrokemijsko mjerenje protočnom *stripping* kronopotenciometrijskom analizom korišten je instrument EcaFlow 150 (Istran Ltd., Bratislava, Slovačka) s protočnom EcaFlow ćelijom E104 i radnom mikroporoznom elektrodom od staklastog ugljika E54, referentnom elektrodom Ag/AgCl (zasićena otopina KCl) i platinskom pomoćnom elektrodom. Za mjerenje i prikupljanje podataka korištena je programska podrška Eca Flow 2.3. (Istran Ltd., Bratislava, Slovačka), a signal pobude i odziv na signal pobude ove metode prikazan je na **Slici 24**.



Slika 24 Signal pobude i odziv na signal pobude protočne *stripping* kronopotenciometrije (Beinrohr, 2011.)

Eksperimentalni uvjeti protočne *stripping* kronopotenciometrijske analize prikazani su u **Tablici 12**.

Tablica 12 Eksperimentalni uvjeti protočne *stripping* kronopotenciometrijske analize

Uvjet	Iznos
Potencijal akumulacije	0 mV
Početni potencijal	0 mV
Konačni potencijal	900 mV
Struja otapanja	100 µA
Vrijeme kondicioniranja	5 s
Trajanje mjerenja	300 s
Regeneracijski potencijal	0 mV
Vrijeme regeneracije	5 s
Volumen uzorka	3 mL
Volumen ispiranja	0 mL
Volumen mjerenja pozadine	3 mL
Protok	3 mL/min

Za izračunavanje sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u kavi, dobivenih FTSCP metodom, korištena je kalibracijsku krivulja standarda 5-CQA, a sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina u kavama (CGAs-*total*), izražen je kao mg 5-CQA ekvivalenata po 100 g kave (mg 5-CQAE / 100 g kave).

3.2.5. HPLC-UV/Vis analiza uzoraka kave i klorogenskih kiselina

Identifikacija i kvantifikacija klorogenskih kiselina sadržanih u ispitivanim uzorcima kave HPLC metodom, provedena je na uređaju Varian, USA, koji se sastoji od ProStar 230 pumpe, ProStar 310 UV/Vis detektora i ProStar 330 PDA detektora. Separacija klorogenskih kiselina iz uzoraka kave provedena je na koloni OmniSpher C18 (unutrašnjeg promjera 250 x 4,6 mm, promjera čestica 5 µm, Varian, USA), zaštićenoj pretkolonom (ChromSep 1 cm x 3 mm, Varian, USA). Podaci su snimani i obrađivani pomoću programske podrške Star Chromatography Workstation (verzija 5.52). Klorogenske kiseline su razdvojene reverzno-faznom HPLC metodom, pomoću dviju mobilnih faza: 0,1% fosforne kiseline (A) i 100% metanola (B). Eksperimentalni uvjeti analize HPLC metodom za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina u uzorcima kava prikazani su u **Tablici 13**. Period re-ekvilibracije između pojedinih mjerenja uzorka kave je bio 10 min, a spektar je sniman u rasponu valnih duljina od 200 do

600 nm. Klorogenske kiseline identificirane su i kvantificirane na valnoj duljini od 320 nm, jer je na toj valnoj duljini uočen maksimum apsorbancije. Identifikacija pojedinačnih klorogenskih kiselina provedena je na osnovu spektra, retencijskih vremena, dodavanja pojedinačnih standarda u uzorke kave (engl. *spiking*) i na osnovu dostupnih literaturnih podataka sličnih HPLC analiza kave. Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-*total*) dobiven je kao zbroj sadržaja pojedinačnih klorogenskih kiselina identificiranih HPLC analizom. Vrijednosti CGAs-*total* predstavljaju srednju vrijednost triju neovisnih mjerenja provedenih na istom uzorku kave.

Tablica 13 Eksperimentalni uvjeti HPLC metode za analizu klorogenskih kiselina

Uvjet	Iznos		
Mobilne faze	A=0.1% H_3PO_4 B=100% metanol		
Uvjeti	0 min	95% A	5% B
	30 min	20% A	80% B
	33 min	20% A	80% B
	35 min	95% A	5% B
Protok	0,8 mL/min		
Temperatura	20°C		
Volumen injektiranja	10 µL		

3.2.6. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava i klorogenskih kiselina

Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava provedena je korištenjem DNA/SWCNT-COOH/SPCE biosenzora (elektrokemijskog DNA biosenzora) primjenom cikličke voltametrije (CV) kao elektrokemijske metode kojom su praćene promjene elektrokemijskih parametara redoks sustava $[Fe(CN_6)]^{3-}$ /$[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 prije i tijekom inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala. Praćeno je dakle oštećenje sloja DNA molekula na površini radne elektroda nastalo djelovanjem $OH^{\bullet}$ radikala, kao i antioksidacijski utjecaj klorogenskih kiselina odnosno vodenih ekstrakata kava na stupanj oštećenja DNA molekula.

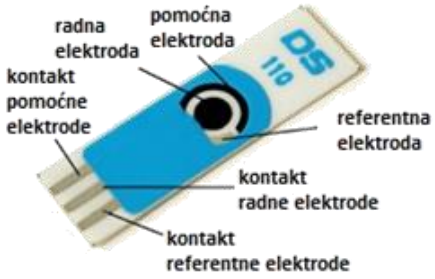
Kemikalije i otopine

Za pripremu DNA biosenzora korišten je dvolančana DNA (engl. *double-stranded* DNA, dsDNA). Za mjerenja pripremljena je otopina dsDNA koncentracije 1 mg/mL u 0,1 mol L^{-1} fosfatnom puferu (PBS) pH 7,0 (koji dodatno sadrži 0,1 mol L^{-1} NaCl radi održavanja konstantne ionske

jakosti u otopini na vrijednosti *I*=0,1). Ovako pripremljena otopina dsDNA čuvana je u hladnjaku na -4 °C. Otopina 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 (0,1 mol L^{-1} NaCl) pripremljena je od $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ i $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ te NaCl u Mili-Q vodi. Kao redoks sustav služio je $[Fe(CN)_6)]^{3-}$ /$[Fe(CN)_6)]^{4-}$, c=1·10^{-3} mol L^{-1}, pripremljen od $K_3[Fe(CN)_6)]$ i $K_4[Fe(CN)_6)]$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 (0,1 mol L^{-1} NaCl). Za dobivanje (stvaranje) slobodnih hidroksil radikala ($OH^{\bullet}$) korištena je smjesa otopine vodikovog peroksida (H_2O_2), c= 2,5 10^{-4} mol L^{-1} i otopine $CuSO_4$, c=5·10^{-6} mol L^{-1}, sve pripremljeno u PBS pH 7,0. Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) stvoreni reakcijom između H_2O_2 i Cu^{2+} iona poslužili su za izazivanje oštećenja strukture DNA na površini radne elektrode. Otopine klorogenskih kiselina i uzoraka vodenih ekstrakata kava za antioksidacijska mjerenja, pripremljene su na isti način kao i za elektrokemijska mjerenja.

Elektrode i instrument

Za elektrokemijska mjerenja antioksidacijske aktivnosti otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava korištena je komercijalna ''*Screen Printed*'' ugljikova elektroda na koju je nanesen sloj karboksiliranih jednostjenčanih ugljikovih nanočestica (engl. *Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNT elektroda*), komercijalne oznake DS-110SWCNT. Ova elektroda zapravo predstavlja tro-elektrodni sustav u kojem kao radna elektroda služi sustav SWCNT-COOH/ugljik, pomoćna elektroda je sloj ugljika, a kao referenta elektroda i električni kontakt za sve tri elektrode služi sloj srebra (**Slika 25**). Ova elektroda nabavljena je od tvrtke DropSens, Španjolska.



Slika 25 110SWCNT DropSens elektroda

Ciklička voltametrija korištena je kao metoda praćenja elektrokemijskih promjena u redoks sustavu $[Fe(CN)_6)]^{3-}$/$[Fe(CN)_6)]^{4-}$ tijekom oštećenja i regeneracije sloja DNA na površini SWCNT elektrode. Mjerenja su provedena na instrumentu potenciostatu/galvanostatu Autolab

PGSTAT-100 uz korištenje programske podrške GPES verzija 4.9.005 (Eco Chemie BV. Nizozemska). Mjerenja su provedena u stacionarnoj elektrokemijskoj ćeliji volumena 25 mL.

Eksperimentalni uvjeti cikličke voltametrije primijenjeni za elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina CGAs i vodenih ekstrakata kava pomoću DNA biosenzora prikazani su u **Tablici 14.**

Tablica 14 Eksperimentalni uvjeti CV za određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina CGAs i vodenih ekstrakata kava

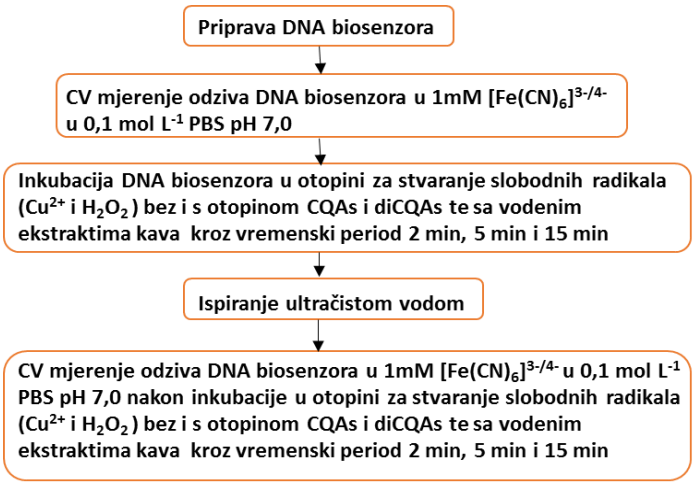
Uvjeti	DNA/SWCNT	DNA/SWCNT/Fe
		DNA/SWCNT/Fe/otopine CGAs tj. vodeni ekstrakti kava
Standby potencijal	-1 V	-1 V
Početni potencijal	0V	-0,5 V
Konačni potencijal	1,4 V	0,7 V
Korak potencijala	0,005 V	0,005 V
Brzina polarizacije	0,1 V s^{-1}	0,05 V s^{-1}

Priprema DNA biosenzora

Na SWCNT-COOH/SPC elektrodu naneseno je 50µL otopine dsDNA koncentracije 1 mg/mL i ostavljeno 1h na sobnoj temperaturi. Na DNA/SWCNT-COOH/SPC elektrodi prije mjerenja vodenih uzoraka kava ili otopina klorogenskih kiselina provedena je ciklička voltametrija prema eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14,** ali bez uranjanja u redoks sustav $[Fe(CN)_6)]^{3-}/[Fe(CN)_6)]^{4-}$. Svrha ovog postupka je aktivacija elektrode za daljnja mjerenja.

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti otopina CGAs i vodenih ekstrakata kava

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti otopina CGAs i vodenih ekstrakata kava primjenom DNA biosenzora pomoću CV, prikazan je na **Slici 26**.



Slika 26 Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću DNA biosenzora za vodene ekstrakte kava i otopine klorogenskih kiselina

Ovako pripremljen DNA biosenzor ispran je Mili-Q vodom te je uronjen u otopinu $[Fe(CN)_6)]^{3-}$ /$[Fe(CN)_6)]^{4-}$ redoks-sustava i provedena je ciklička voltametrija prema eksperimentalnim uvjetima u **Tablici 14**. Tako je dobiven početni odziv DNA biosenzora u otopini redoks sustava $[Fe(CN)_6)]^{3-}$/$[Fe(CN)_6)]^{4-}$.

Inkubacija DNA biosenzora u otopini za stvaranje OH· radikala

U otopinu za stvaranje $OH^{\bullet}$ radikala dodane su otopine CQAs i diCQAs koncentracije $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1}, odnosno vodeni ekstrakti kava (zelena zrna DF=100, pržena zrna, mljevene kave i *instant* kave DF=50) te se u ovako pripravljenu otopinu uroni DNA biosenzor u vremenskom trajanju od 2 min, 5 min i 15 min uz konstantno miješanje na magnetnoj miješalici. Postupak cikličke voltametrije ponavlja se nakon svake inkubacije DNA biosenzora u otopini koja proizvodi slobodne $OH^{\bullet}$ radikale (smjesa H_2O_2 i Cu^{2+}) bez antioksidanasa, s otopinom klorogenskih kiselina ili s vodenim ekstraktima kava i to nakon vremenskog perioda inkubacije od 2 min, 5 min i 15 min. (**Tablica 14)**. Ovim postupkom dobiveni su odzivi DNA biosenzora nakon inkubacije u otopini za stvaranje $OH^{\bullet}$ radikala u vremenskim intervalima 2 min, 5 min i 15 min.

Obrada elektrokemijskih parametara cikličke voltametrije

Na osnovi elektrokemijskih parametara dobivenih cikličkom voltametrijom, a u svrhu procjene oštećenja DNA strukture nastale djelovanjem $OH^{\bullet}$ radikala i antioksidacijskog učinka klorogenskih kiselina ili uzoraka kava na oštećeni DNA, provedena je analiza i obrada

eksperimentalnih podataka cikličkih voltamograma na način kako su to u svojim radovima primijenili Šimkova i suradnici (2009.), Ziyatdinova i Labuda (2011.) te Hlavata i sur. (2014.).

Udio preživjele DNA (engl. *survived DNA*) izražen u postotcima (%), nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (Cu^{2+} i H_2O_2), bez i s otopinama CQAs i diCQAs te s vodenim ekstraktima kava, izražen je kao normalizirani (relativni) odziv DNA biosenzora koji je izračunat prema **Jednadžbi (1)**

$$\Delta I_{rel}(\%) = \frac{I_{\text{surv DNA}} - I_{\text{SWCNT}}}{I_{\text{DNA}} - I_{\text{SWCNT}}} \cdot 100 \qquad (1)$$

$\boldsymbol{I_{SWCNT}}$, predstavlja struju anodnog pika u redoks sustavu $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ izmjerenu na SWCNT elektrodi bez sloja DNA; $\boldsymbol{I_{DNA}}$, je struja anodnog pika izmjerena u redoks-sustavu $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ na DNA/SWCNT elektrodi; $\boldsymbol{I_{surv\ DNA}}$, predstavlja struju anodnog pika izmjerenu u redoks-sustavu $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ na DNA/SWCNT elektrodi nakon perioda inkubacije od 2 min, 5 min i 15 minuta u otopini koja sadrži smjesu H_2O_2+ Cu^{2+} tj. otopinu koja stvara slobodne hidroksil radikale, bez i s otopinama CQAs i diCQAs te s vodenim ekstraktima kava. Za mjerenja antioksidacijske aktivnosti klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava dodana je u otopinu za stvaranje slobodnih radikala $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} pojedine klorogenske kiseline, odnosno vodeni ekstrakti kava određenog razrjeđenja.

Iz promjena vrijednosti struja anodnog pika $\boldsymbol{\Delta I}$ u redoks-sustavu $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ moguće je pratiti stupanj oštećenja sloja DNA na površini SWCNT elektrode uslijed djelovanja slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala, kao i antioksidacijski efekt dodanih otopina CGAs ili ekstrakata kava (koje ''hvataju'' $OH^{\bullet}$ radikale i smanjuju time njihovu koncentraciju u sustavu). Dodatak CGAs ili ekstrakata kava u sustav pokazuje antioksidacijski efekt i povećava postotak neoštećene odnosno preživjele DNA na površini SWCNT elektrode. Pomoću **Jednadžbe 1** izračuna se postotak (%) neoštećene (preživjele) DNA nakon inkubacije u otopini koja stvara $OH^{\bullet}$ radikale, tijekom vremenskog perioda od ukupno 15 min. Za obradu dobivenih cikličkih voltamograma redoks-sustava $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 korišten je maksimum anodne struje za pojedine cikličke voltamograme te je očitana numerička vrijednost struja anodnog pika uvrštena u **Jednadžbu 1**. Rezultati elektrokemijskog određivanja antioksidacijske aktivnosti otopina CQAs i diCQAs te vodenih ekstrakata kava, izraženi su kao % neoštećene (preživjele) DNA.

3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava

Antioksidacijska aktivnost uzoraka kava i klorogenskih kiselina mjerena je dvjema spektrofotometrijskim metodama, DPPH i ABTS metodama, pri sobnoj temperaturi u polarnom otapalu (metanol) prema proceduri predloženoj u sljedećim literaturnim navodima: Yashin i sur. (2013.), Re i sur. (1999.), Brand-Williams i sur. (1995.), Bondet i sur., (1997.) i Sharma i Bhat (2009.) i Opitz i sur. (2014.). Mjerenja apsorbancije potrebna za analizu antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH i ABTS metoda, provedena su na UV/Vis spektrofotometru (Selecta UV 2005, Barcelona, Španjolska). Za svaki uzorak ekstrakta kave ili otopine klorogenske kiseline provedena su najmanje tri mjerenja.

DPPH metoda

DPPH metoda temelji se na redukciji slobodnih DPPH radikala nekim antioksidansom koji služi kao donor vodika ili elektrona. Redukcija $DPPH^{\bullet}$ radikala u molekulu DPPH dovodi do promjene boje otopine od izrazito ljubičaste do žute, što se detektira (prati) spektrofotometrijski smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini λ =517 nm. Do smanjenja apsorbancije tijekom vremena reakcije, dolazi zbog smanjenja količine $DPPH^{\bullet}$ radikala uslijed reakcije s antioksidansima (Brand-Williams i sur., 1995.; Bondet i sur., 1997.; Milardović i sur., 2005.; Sharma i Bhat, 2009.).

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, proveden je tako da je u kivetu od 3 mL (dužine 1 cm) otpipetirano 20 µL vodenih ekstrakata zelenog zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* (DF = 100) odnosno 10 µL vodenih ekstrakata prženih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta*, *instant* kava i mljevenih kava (DF = 50), pripremljenih prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.3; zatim dodano 2680 µL 100% metanola i 300 µL otopine 1 mmol L^{-1} $DPPH^{\bullet}$ radikala, dobro promućkano i ostavljeno 30 min na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjerena je apsorbancija pri λ = 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka otpipetirana je jednaka količina metanola. Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava dobivena je primjenom kalibracijske krivulje (ovisnost koncentracije o apsorbanciji) otopine Trolox odnosno 5-CQA te je izražena kao Trolox ekvivalent odnosno 5-CQA ekvivalent, a % inhibicije $DPPH^{\bullet}$ radikala izračunat je primjenom **Jednadžbe (2)**:

$$\%\ inhibicije = \frac{A_{DPPH} - A_{uzorka}}{A_{DPPH}} \cdot 100 \quad (2)$$

ABTS metoda

Mehanizam ABTS metode sličan je mehanizmu DPPH metode, ali se u ovoj metodi kao radikal koristi plavo-zeleno obojeni ABTS radikal kation ($ABTS^{\bullet+}$) koji nastaje kemijskom oksidacijom otopine ABTS-a s otopinom kalijevog peroksodisulfata. Dodatak antioksidansa izaziva gubitak boje, a ta se promjena tj. smanjenje apsorbancije uslijed smanjenja koncentracije $ABTS^{\bullet+}$ radikal kation ($ABTS^{\bullet+}$) detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini λ = 734 nm (Rice-Evans i sur., 1996.; Re i sur., 1999.).

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom proveden je tako da je u kivetu od 3 mL (dužine 1 cm) otpipetirano 40 µL vodenih ekstrakata zelenog zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* (DF = 100) odnosno 80 µL vodenih ekstrakata prženih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* (DF = 50), 20 µL vodenih ekstrakata *instant* kava (DF = 50) i 80 µL vodenih ekstrakata mljevenih kava (DF = 50) pripremljenih prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.3.; zatim je dodano 2000 µL 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,4 i 500 µL otopine $ABTS^{\bullet+}$ radikal kationa (0,8 mmol L^{-1} $ABTS^{\bullet+}$ pripremljenog u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,4 i 65 mmol L^{-1} amonijevog peroksodisulfata), dobro je promućkano te je mjerena apsorbancija pri λ = 734 nm nakon 1 min i 5 minte sve do 70 min. Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava izračunata je primjenom kalibracijske krivulje (ovisnost koncentracije o apsorbanciji) otopine Trolox, odnosno 5-CQA te je izražena kao Trolox ekvivalent odnosno 5-CQA ekvivalent, a % inhibicije ABTS radikal kationa izračunat je primjenom **Jednadžbe (3)**:

$$\%\ inhibicije = \frac{A_{ABTS} - A_{uzorka}}{A_{ABTS}} \cdot 100 \quad (3)$$

3.3. VALIDACIJA INSTRUMENTALNIH ANALITIČKIH METODA

Instrumentalne analitičke metode (HPLC, DPV, SWV, FTSCP) korištene u ovoj disertaciji validirane su da bi se mogle primijeniti za karakterizaciju klorogenskih kiselina u kavi. Parametri vrednovanja (validacije) instrumentalnih analitičkih metoda, provedeni u ovoj disertaciji bili su: granica detekcije metode, *LOD*; granica kvantifikacije metode, *LOQ*; preciznost metode; točnost metode i linearnost metode.

Granica detekcije metode (*LOD*) predstavlja najmanju količinu analita u uzorku, koja se još može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati, određenom instrumentalnom analitičkom metodom. Može se odrediti na različite načine, a u ovom radu određena je na temelju nagiba kalibracijskog pravca (*b*) i standardne devijacije *y*-odsječka kalibracijskog pravca (s_a) prema **jednadžbi (4)**:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_a}{b} \tag{4}$$

Granica kvantifikacije (*LOQ*) metode predstavlja najmanju količina analita u uzorku, koja se još može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. U ovoj disertaciji određena je prema **jednadžbi (5)**:

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_a}{b} \tag{5}$$

Preciznost metode predstavlja slaganje između mjernih rezultata niza ponovljenih mjerenja izvedenih na jednak način u istom homogenom uzorku. U ovoj disertaciji izvedena je preko parametra ponovljivosti (repetibilnosti), gdje je uzorak kave analiziran tri do šest puta u jednom danu, ovisno o instrumentalnoj analitičkoj metodi, a preciznost je izražena kao standardno odstupanje (standardna devijacija) prema **jednadžbi (6)**:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1}} \tag{6}$$

gdje je: s – standardno odstupanje (devijacija)

x_i – numerička vrijednost i-tog mjerenja

$\bar{x}$ - srednja vrijednost mjernih podataka

n – broj provedenih mjerenja

Točnost metode mjeri slaganje između rezultata mjerenja i neke prihvaćene referentne vrijednosti. Svaka metoda, odnosno mjerenje, uključuje stoga određenu pogrešku koja se izražava na različite načine: kao apsolutna pogreška, relativna pogreška ili pak kao iskorištenje (*engl. recovery*). Metoda za određivanje iskorištenja, korištena u ovoj disertaciji, metoda je

standardnog dodavanja, kod koje se u realni uzorak dodaje točno poznata količina standarda i izračuna se % porasta signala uslijed dodatka standarda u realni uzorak.

Iskorištenje (recovery) se izračuna prema **jednadžbi (7)**:

$$Iskorištenje(\%) = \frac{100(x_2 - x_1)}{x_{ADD}} \quad (7)$$

gdje je: x_1 – izmjerena vrijednost realnog uzorka

x_2 – izmjerena vrijednost realnog uzroka u koji je dodana točno poznata količina standarda

x_{ADD} – poznata količina standarda dodana u realni uzorak

Linearnost metode predstavlja područje koncentracije u kojem između koncentracije analita i mjernog signala (npr. struje, apsorbancije) postoji linearni odziv te se analit može unutar tog područja koncentracije kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. U ovoj disertaciji dinamičko (linearno) područje određeno je za svaku od korištenih eksperimentalnih metoda.

Rezultati svih elektrokemijskih mjerenja (SWV, DPV, FTSCP) te kromatografskih mjerenja (HPLC) statistički su obrađeni te su za svaku od primijenjenih metoda izračunati gore navedeni kriteriji potrebni za validaciju svake od navedenih metoda. Validirane metode korištene su za mjerenja i za kvantifikaciju rezultata. Izračunavanje validacijskih kriterija provedeno je na način kako je to prikazano u literaturnim navodima (Šeruga, 2011.; Shrivastava i Gupta, 2011.).

3.4. OBRADA I PRIKAZ REZULTATA

Rezultati elektrokemijskih mjerenja diferencijalne pulsne voltametrije i pravokutnovalne voltametrije, obrađeni su primjenom dvije programske podrške ECDSOFT (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska) i GPES verzija 4.9 (Eco Chemie, Nizozemska).

Rezultati dobiveni elektrokemijskom metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije, obrađeni su programskom podrškom EcaFlow verzija 2.3 (Istran Ltd., Bratislava, Slovačka) i programom OriginPro 8 (OriginLab Ltd., Northampton, SAD).

Rezultati dobiveni HPLC metodom obrađeni su programskom podrškom Star Chromatography Workstation verzija 5.5. (Varian, SAD) i Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation, SAD).

Obrada rezultata spektroskopskog određivanja antioksidacijske aktivnosti provedena je primjenom Microsoft Excell 2016 (Microsoft Corporation, SAD).

Programskom podrškom *Statistica* 12 (Statsoft, Inc., SAD) obrađene su korelacije između svih rezultata dobivenih u ovoj disertaciji.

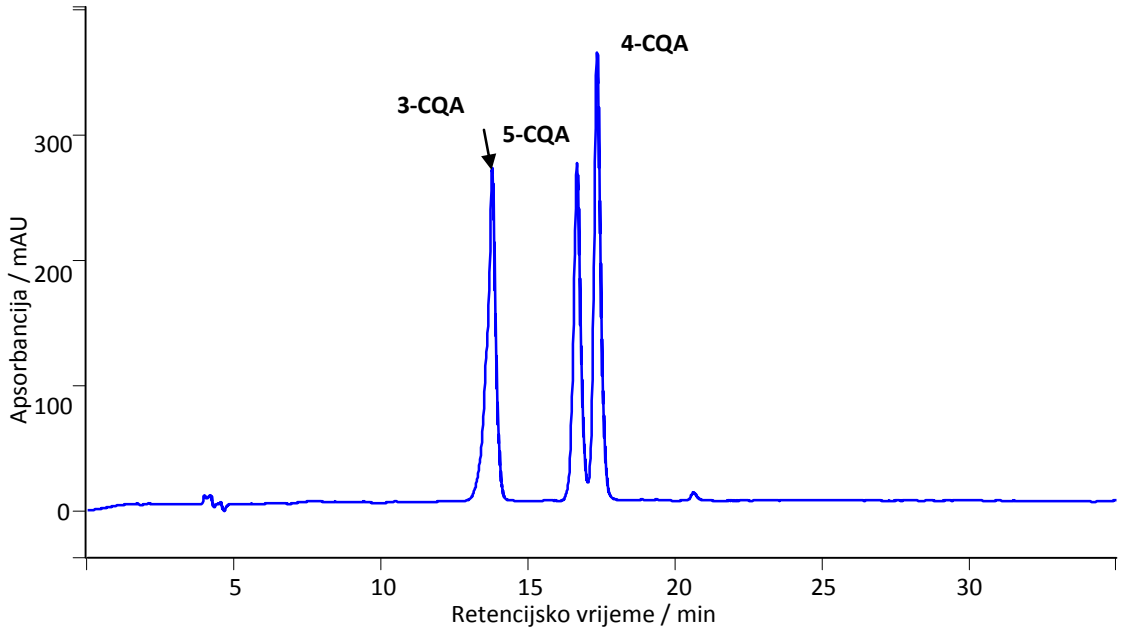
Svi dijagrami prikazani u ovoj disertaciji, crtani su u programskoj podršci OriginPro 8. (OriginLab Ltd., Northampton, SAD), a kemijske strukture crtane su pomoću programa ChemDraw Std 15.0 (Perkin Elmer Inc., SAD). Tekst disertacije pisan je u Microsoft Word 2016 programu Microsoft Corporation, SAD.

4. REZULTATI

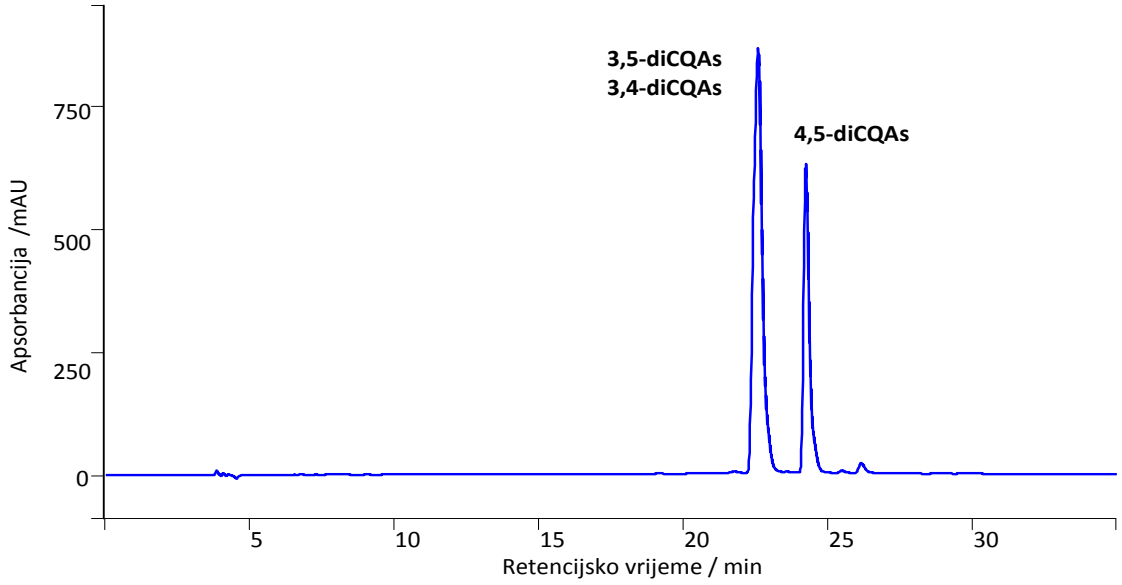
4.1. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVI HPLC METODOM

4.1.1. Kromatogrami model otopina klorogenskih kiselina

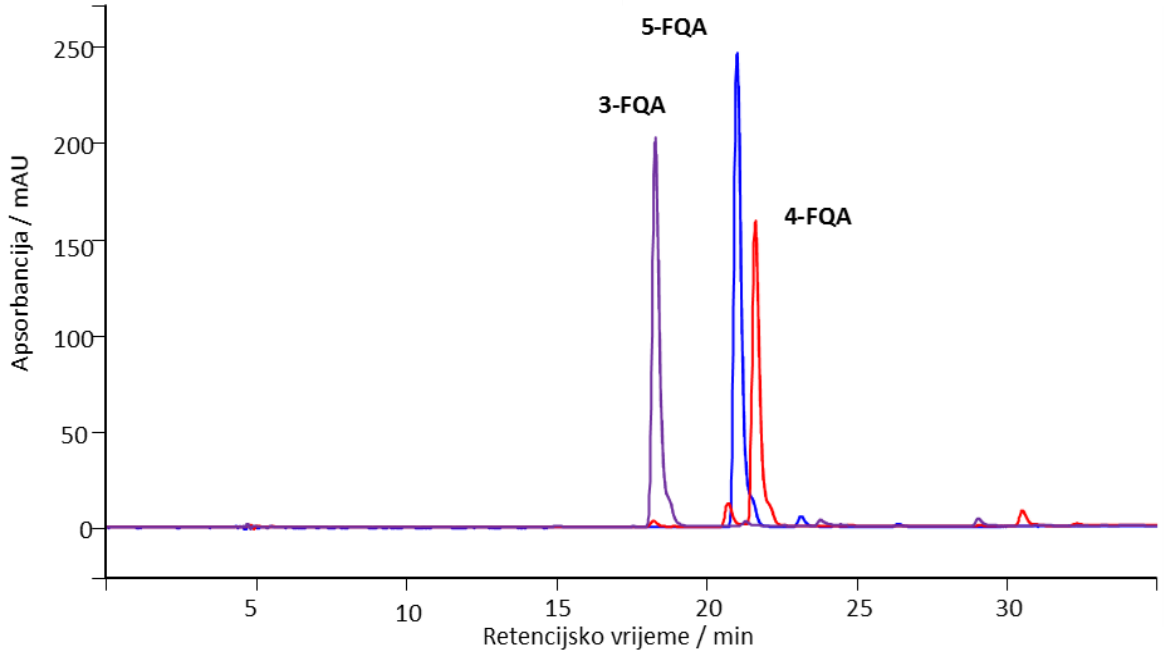
Na **Slikama 27-30** prikazani su kromatogrami model otopina klorogenskih kiselina masene koncentracije γ=75 mg L^{-1} dobiveni reverzno-faznom HPLC metodom, uz primjenu 0.1% fosforne kiseline i 100% metanola kao mobilnih faza, snimljeni na valnoj duljini λ= 320 nm.



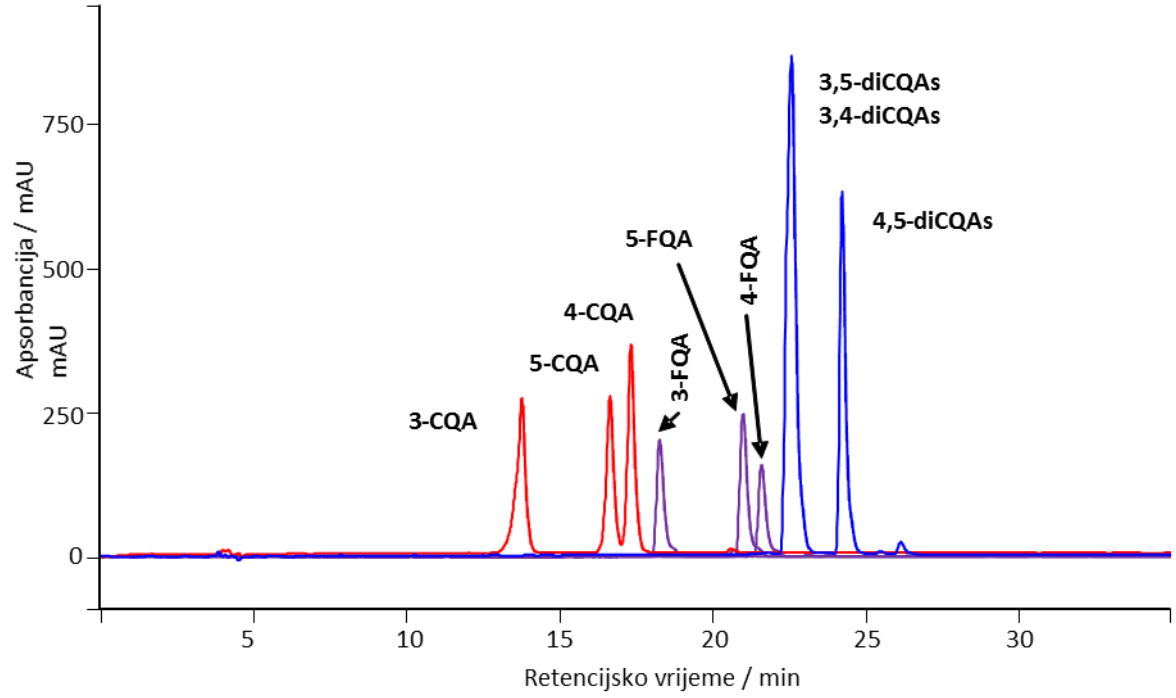
Slika 27 Kromatogram model otopine CQAs (γ = 75 mg L^{-1}) snimljen na 320 nm.



Slika 28 Kromatogram model otopine diCQAs (γ = 75 mg L^{-1}) snimljen na 320 nm.



Slika 29 Kromatogram model otopine FQAs (γ = 75 mg L^{-1}) snimljen na 320 nm.



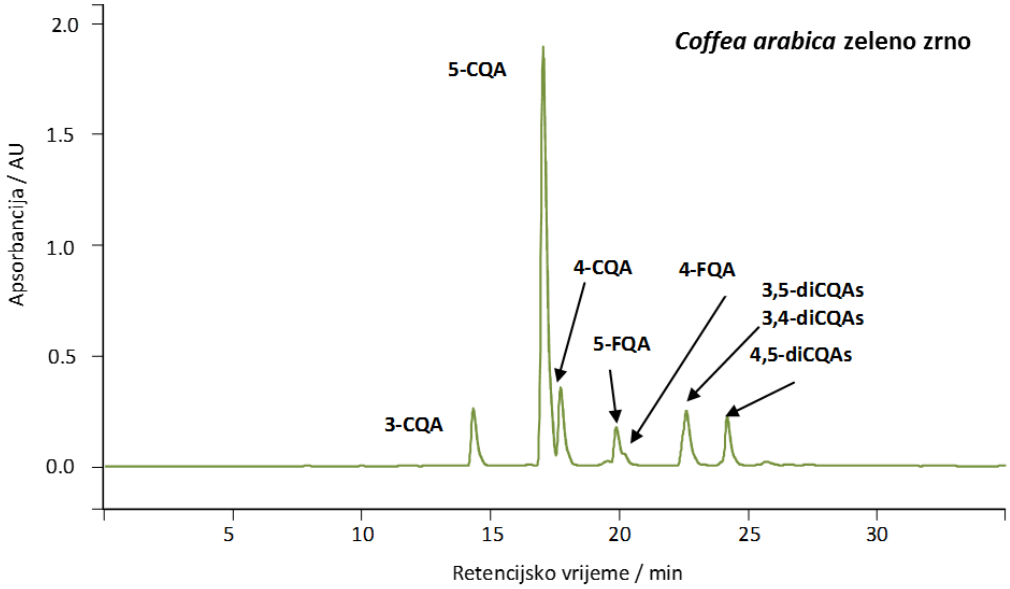
Slika 30 Kromatogram model otopine klorogenskih kiselina (γ= 75 mg L^{-1}) snimljen na 320 nm.

Tablica 15 Retencijska vremena otopina klorogenskih kiselina

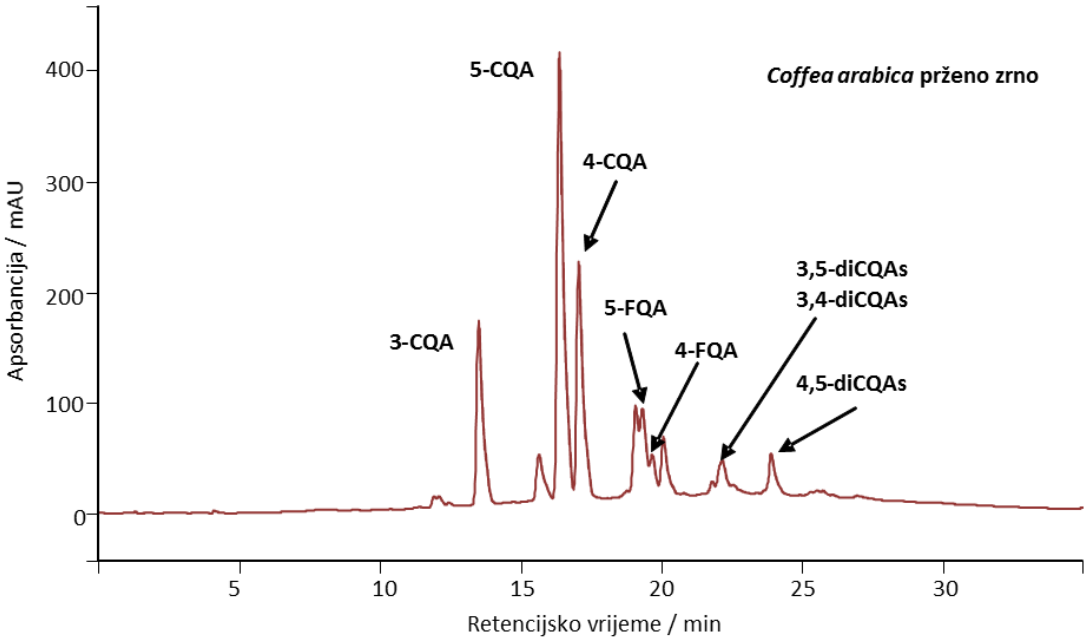
Klorogenska kiselina	t_r/ min
3-CQA	13,576
5-CQA	16,523
4-CQA	17,705
3-FQA	18,267
5-FQA	21,009
4-FQA	21,596
3,4-diCQA	22,399
3,5-diCQA	22,590
4,5-diCQA	24,063

4.1.2. Kromatogrami vodenih ekstrakata kava

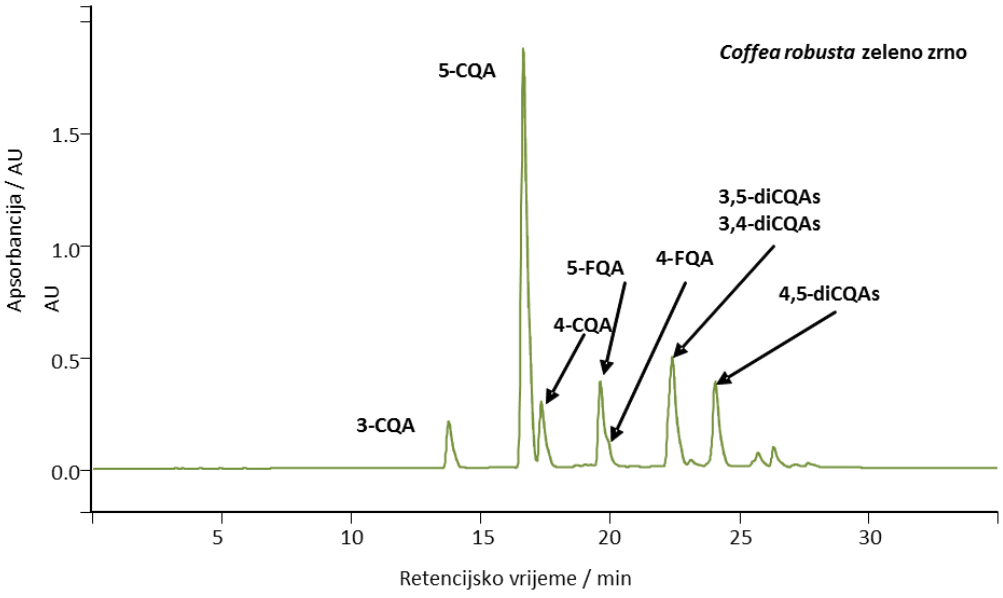
Na **Slikama 31-40** prikazani su kromatogrami vodenih ekstrakata zelenih zrna kave razrjeđenih u omjeru 1/100 (DF = 100), prženih zrna kave, mljevenih kava i *instant* kava razrjeđenih u omjeru 1/50 (DF = 50) dobiveni reverzno-faznom HPLC metodom, uz primjenu 0,1% fosforne kiseline i 100% metanola kao mobilnih faza, snimljeni na valnoj duljini 320 nm.



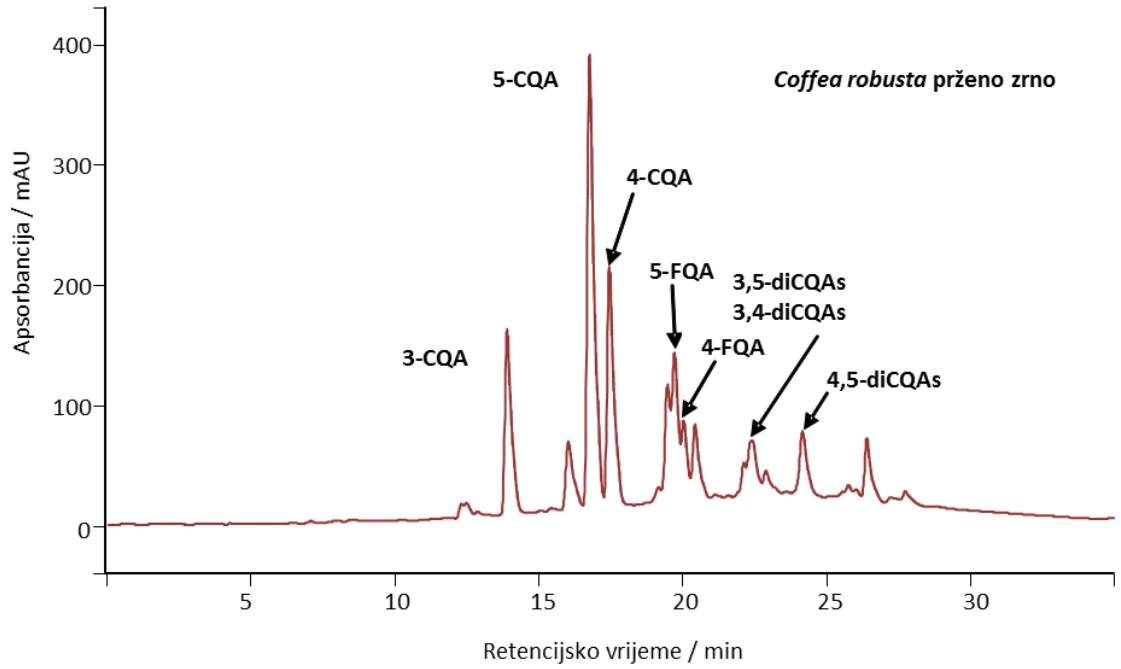
Slika 31 Kromatogram vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea arabica*, DF = 100, snimljen na 320 nm.



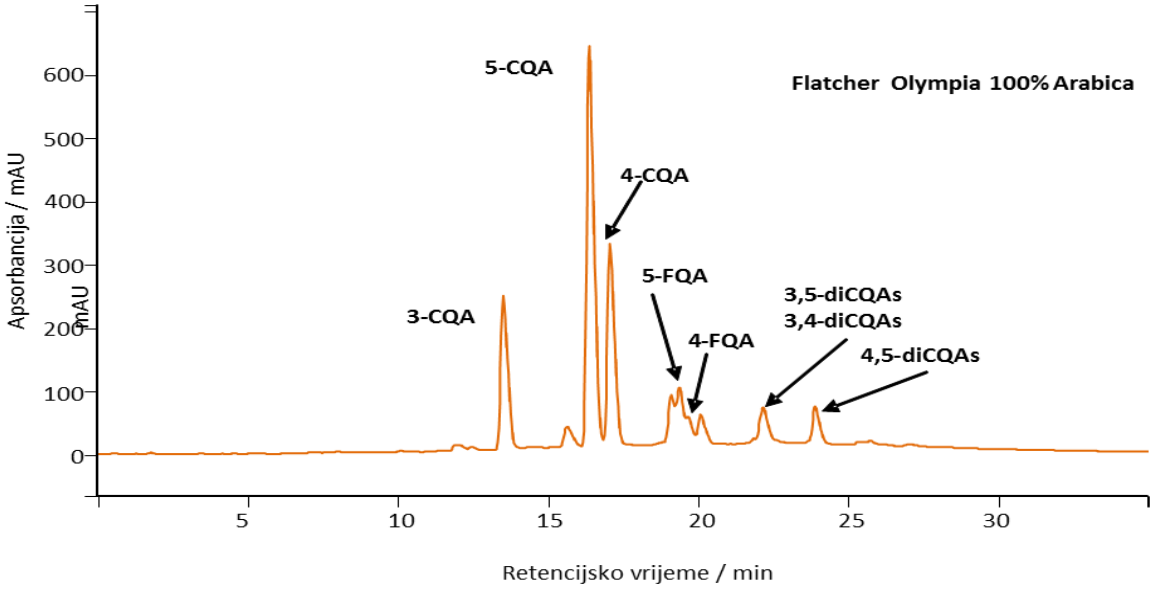
Slika 32 Kromatogram vodenog ekstrakta prženog zrna kave *Coffea arabica*, DF = 50, snimljen na 320 nm.



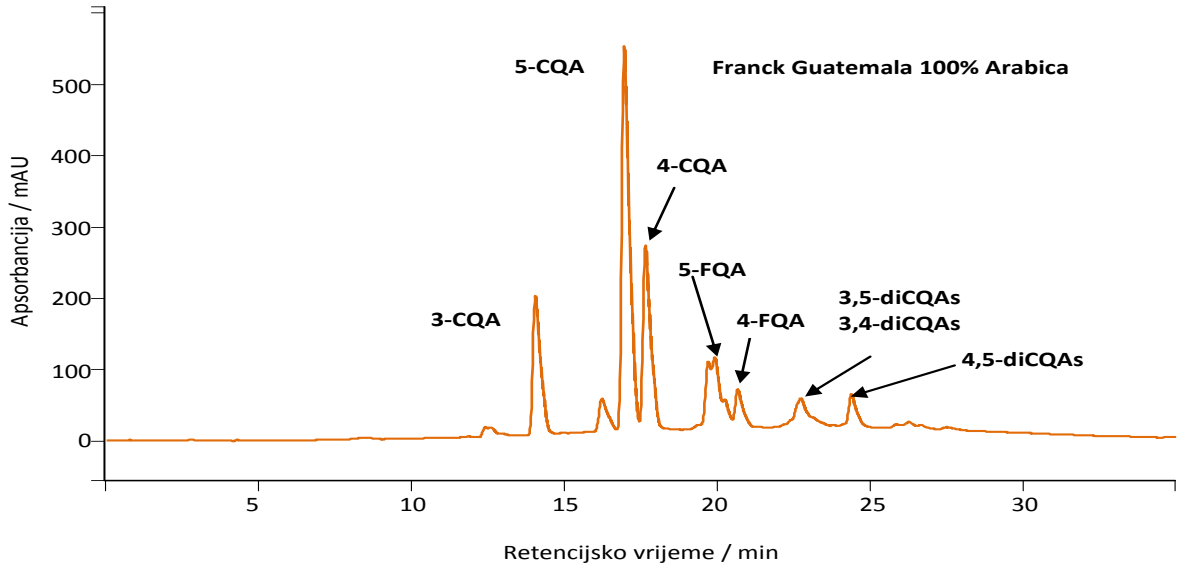
Slika 33 Kromatogram vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea robusta*, DF = 100, snimljen na 320 nm.



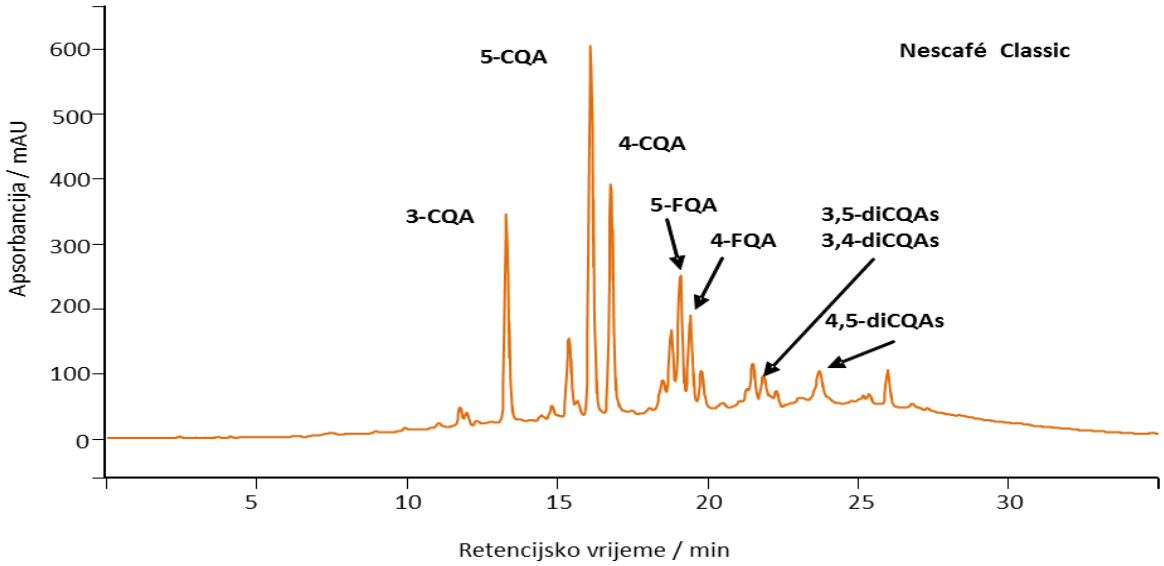
Slika 34 Kromatogram vodenog ekstrakta prženog zrna kave *Coffea robusta*, DF = 50, snimljen na 320 nm.



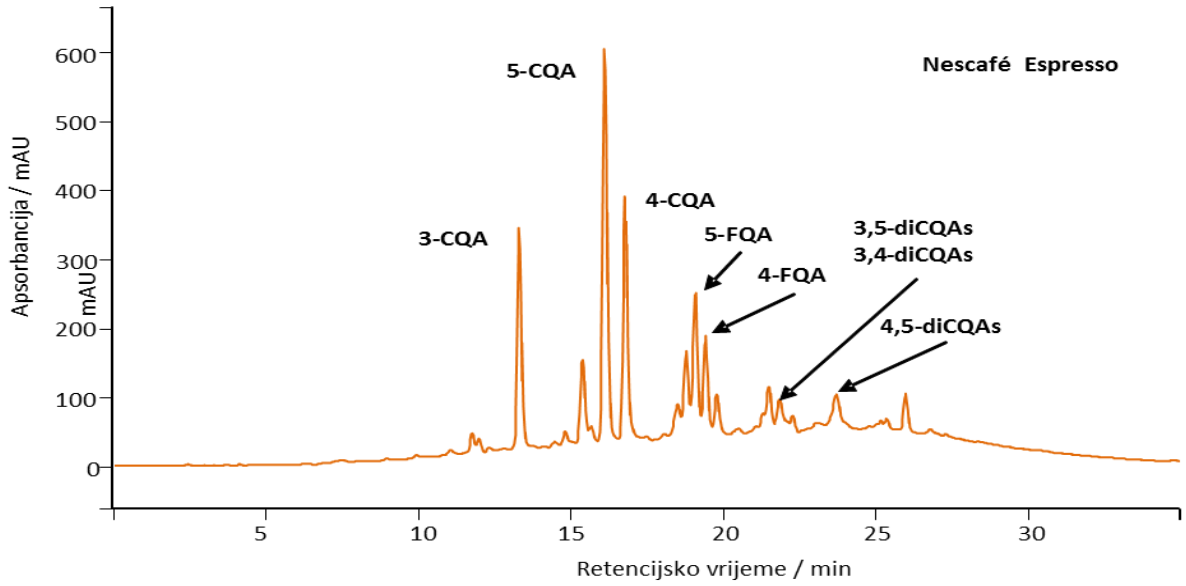
Slika 35 Kromatogram vodenog ekstrakta mljevene kave Flatscher Olympia, 100% *Arabica*, DF = 50, snimljen na 320 nm.



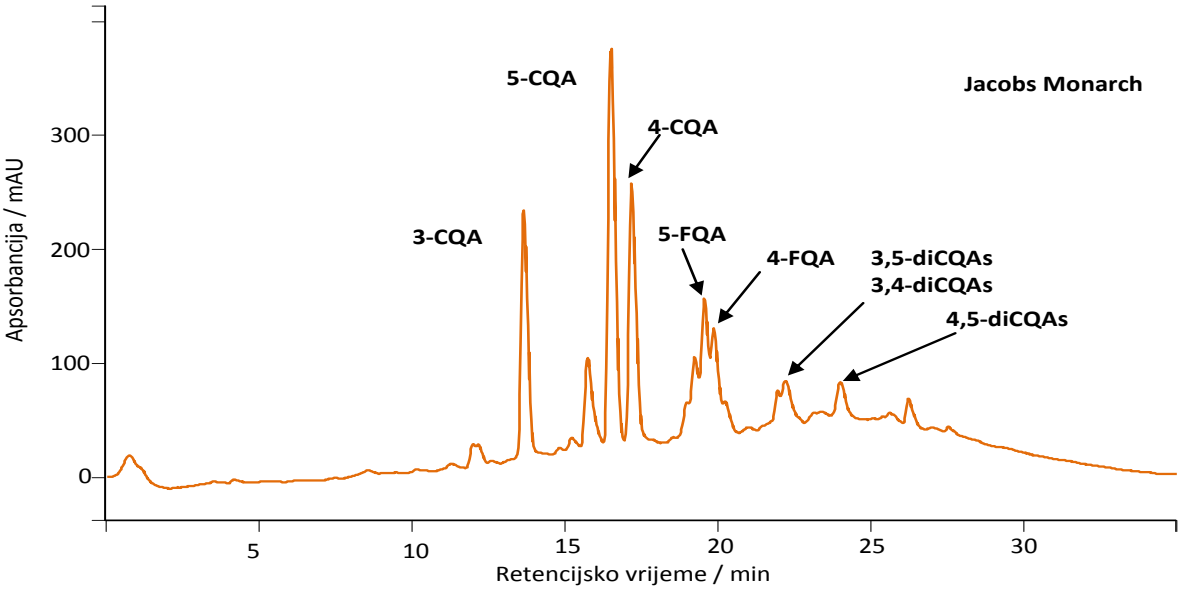
Slika 36 Kromatogram vodenog ekstrakta mljevene kave Franck Guatemala, 100% *Arabica*, DF = 50, snimljen na 320 nm.



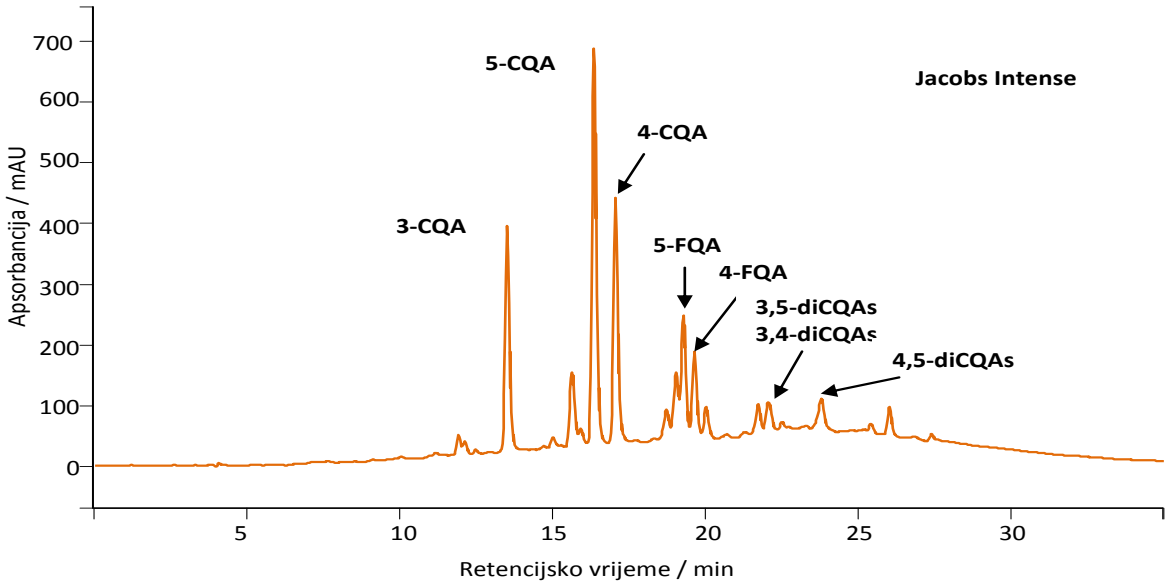
Slika 37 Kromatogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Classic, DF = 50, snimljen na 320 nm.



Slika 38 Kromatogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Espresso, DF = 50, snimljen na 320 nm.



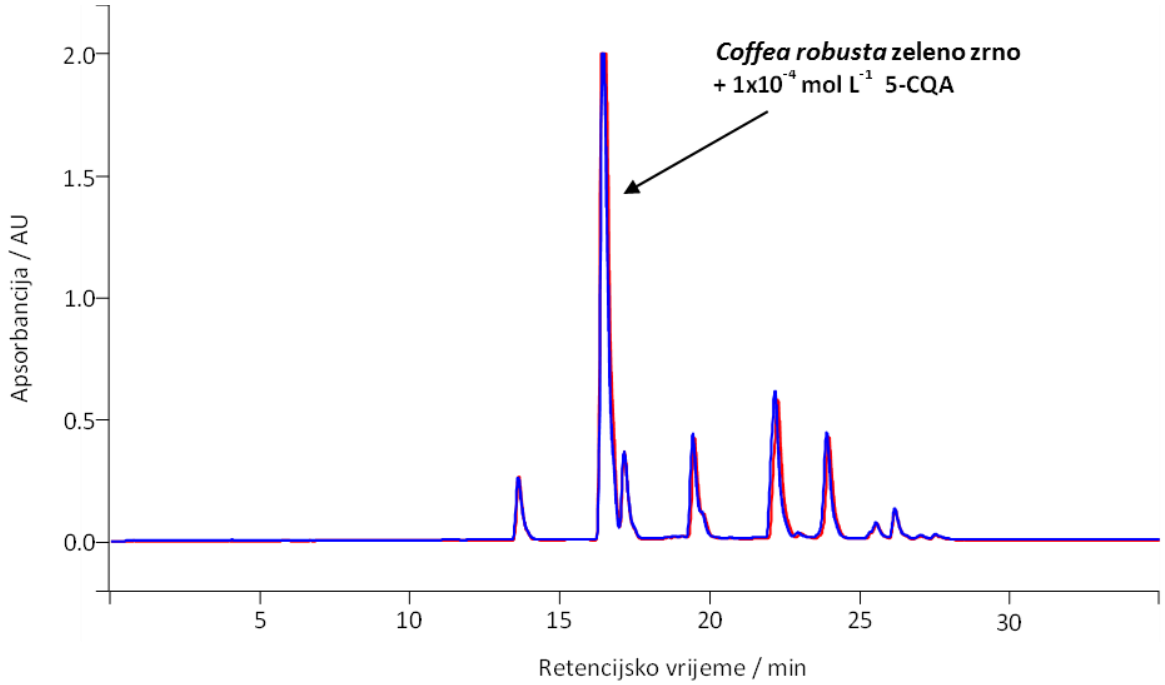
Slika 39 Kromatogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Monarch, DF = 50, snimljen na 320 nm



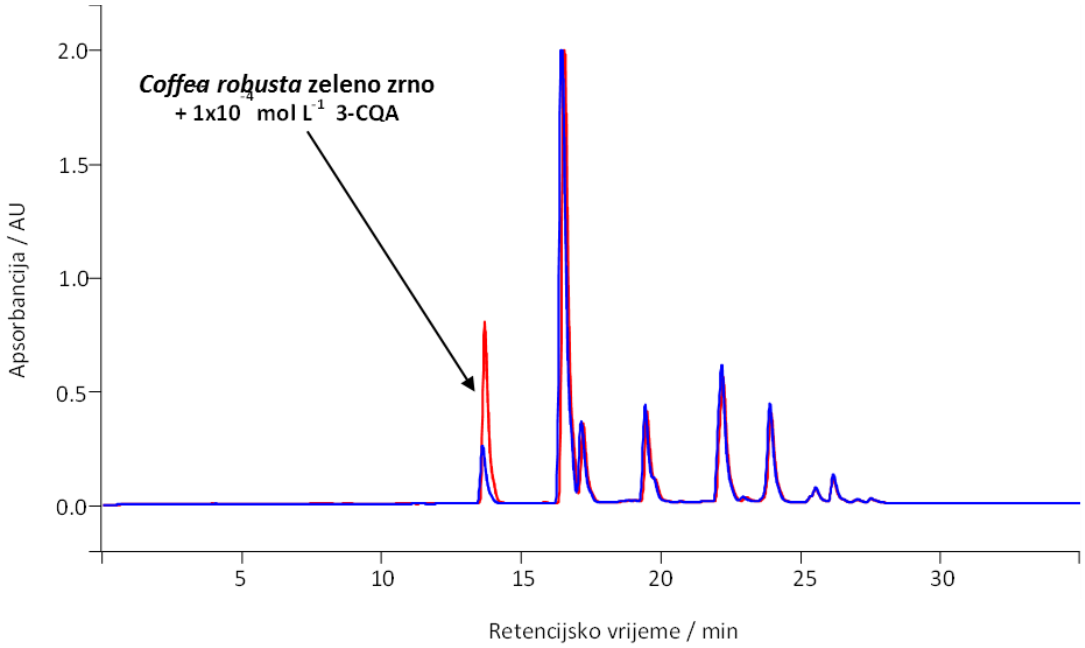
Slika 40 Kromatogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Intense, DF = 50, snimljen na 320 nm.

4.1.3. Identifikacija klorogenskih kiselina HPLC metodom

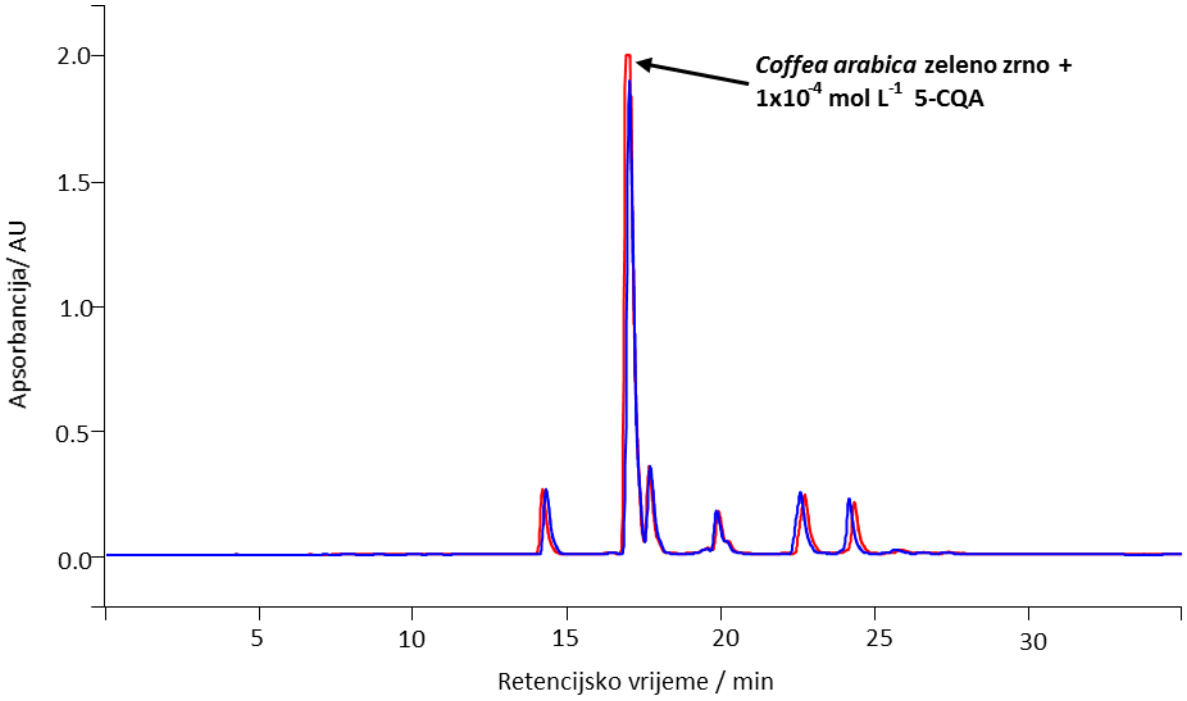
Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava, provedena je na osnovi retencijskih vremena pojedinih klorogenskih kiselina (**Tablica 15**), njihovih UV/Vis spektara, kao i dodavanja pojedinačnih klorogenskih kiselina (engl. *spiking*) u odabrane uzorke kava, a dobiveni rezultati poslužili su za identifikaciju pojedinih klorogenskih kiselina u svim uzorcima kava. Dodavanje pojedinih klorogenskih kiselina u uzorke kava u svrhu njihove identifikacije na HPLC kromatogramima kava, provedeno je u vodenim ekstraktima zelenih zrna kave *Coffea arabica* i *Coffea robusta* (*DF* = 100) te u vodenom ekstraktu *instant* kave Nescafé Classic (*DF* = 50). U određeni uzorak kave dodana je poznata količina pojedine klorogenske kiseline koncentracije: c=1·10^{-4} mol L^{-1} za 5-CQA i 3-CQA; γ=50 mg L^{-1} za 3,4-diCQA, 3,5-diCQA i 4,5-diCQA; te γ= 75 mg L^{-1} za 5-FQA. Zatim je provedena reverzno-fazna HPLC analiza pomoću 0,1% fosforne kiseline i 100% metanola kao mobilnih faza te su snimljeni kromatogrami na valnoj duljini od 320 nm. Na **Slikama** od **41** do **52** prikazani su preklopljeni kromatogrami, tj. kromatogrami pojedinih uzoraka kava bez i s dodatkom pojedinog standarda, odnosno neke od CGAs.



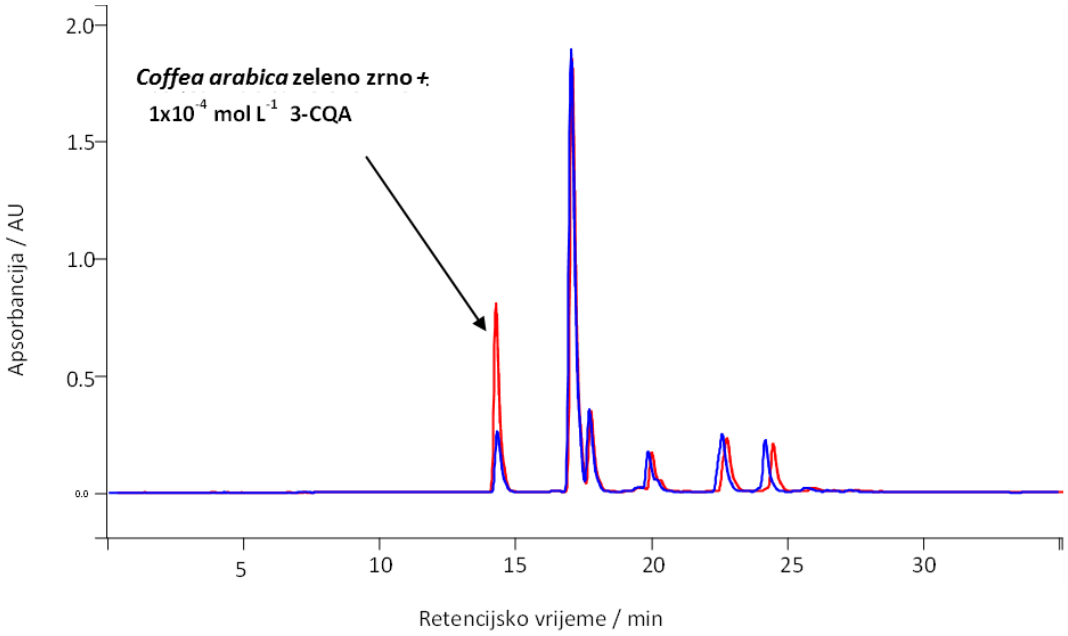
Slika 41 Preklopljeni kromatogrami vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea robusta* i vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea robusta* u koji je dodano 5-CQA, koncentracije c=1·10^{-4} mol L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



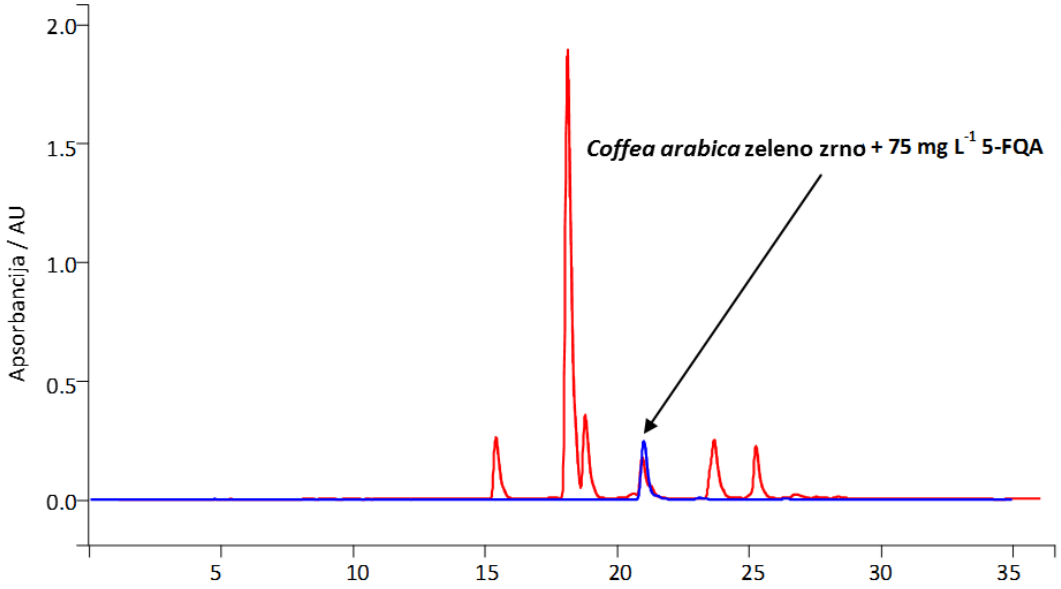
Slika 42 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea robusta* i zelenog zrna kave *Coffea robusta* u koju je dodana 3-CQA, koncentracije c=1x10^{-4} mol L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



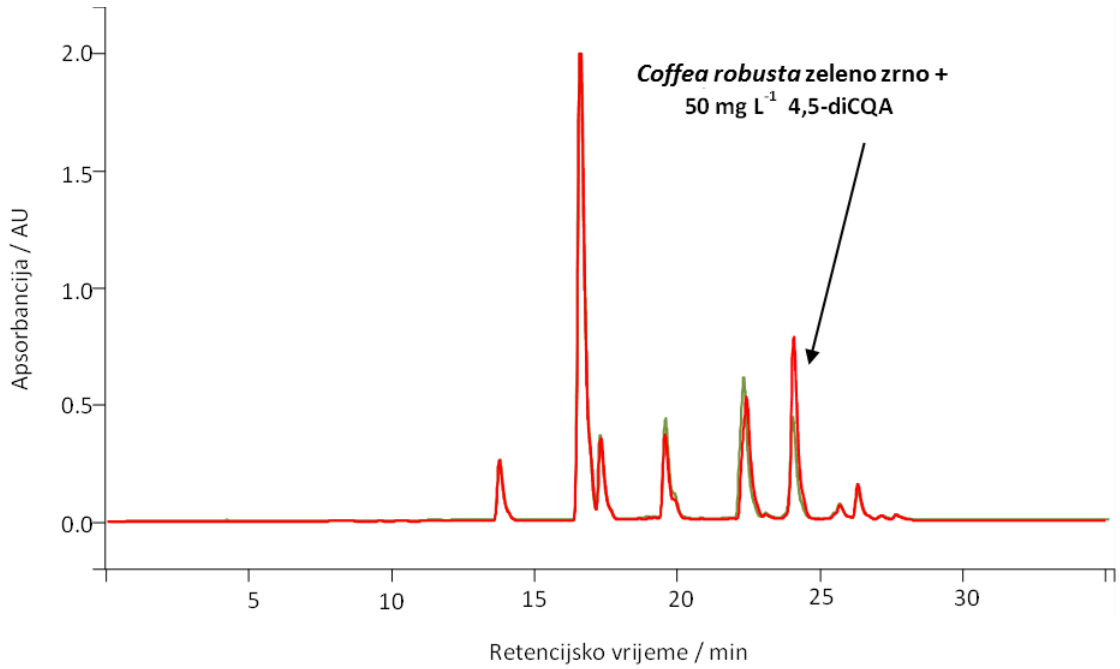
Slika 43 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea arabica* i zelenog zrna kave *Coffea arabica* u koju je dodana 5-CQA, koncentracije c=1x10^{-4} mol L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



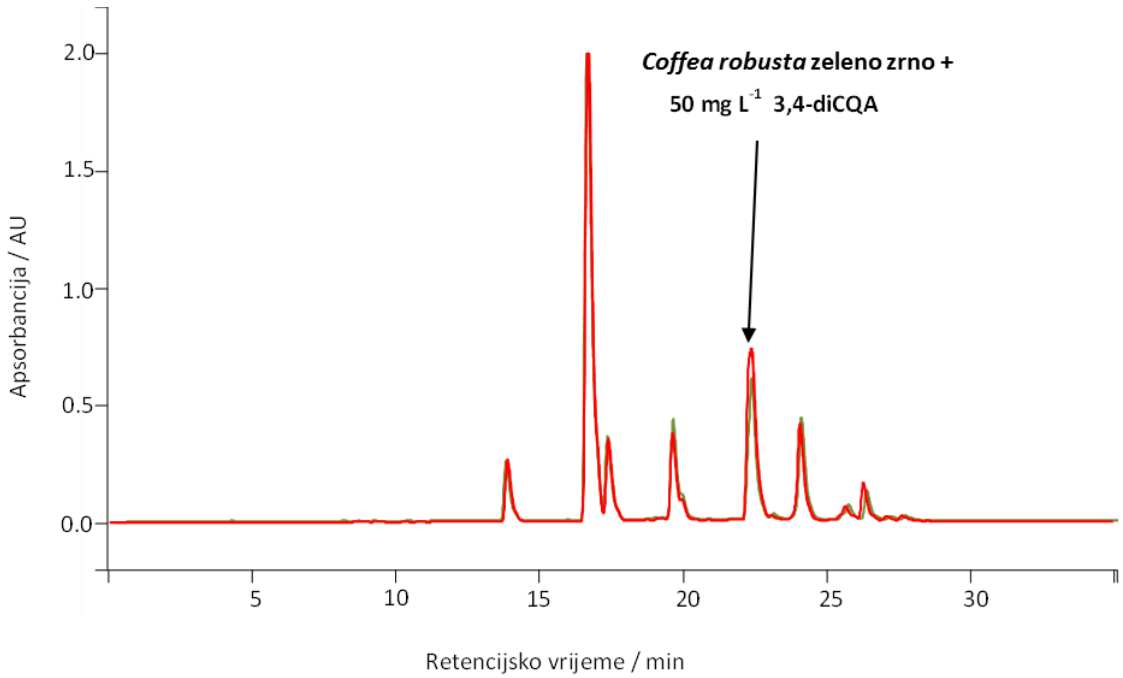
Slika 44 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea arabica* i zelenog zrna kave *Coffea arabica* u koju je dodana 3-CQA, koncentracije c=1x10^{-4} mol L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



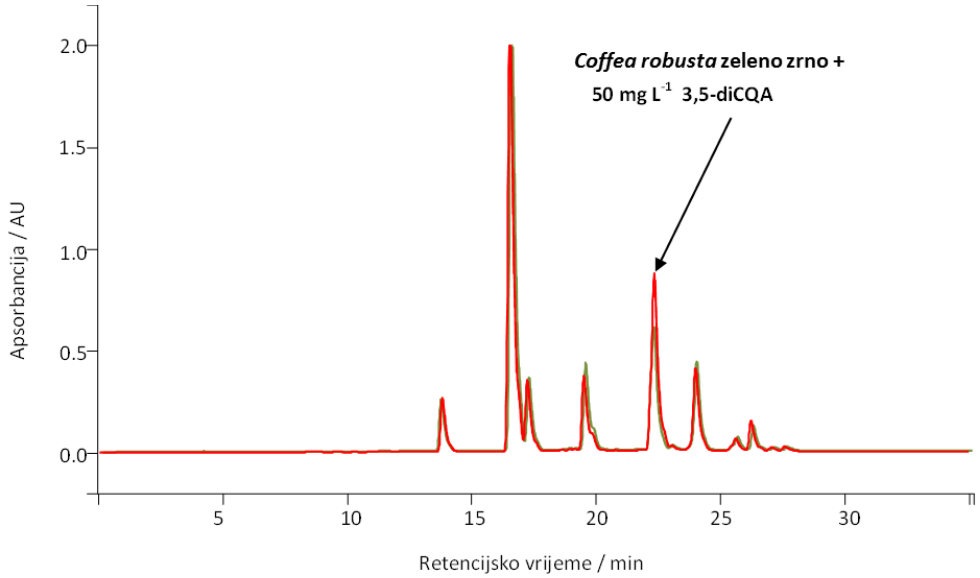
Slika 45 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea arabica* i zelenog zrna kave *Coffea arabica* u koju je dodana 5-FQA, koncentracije γ=75 mg L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



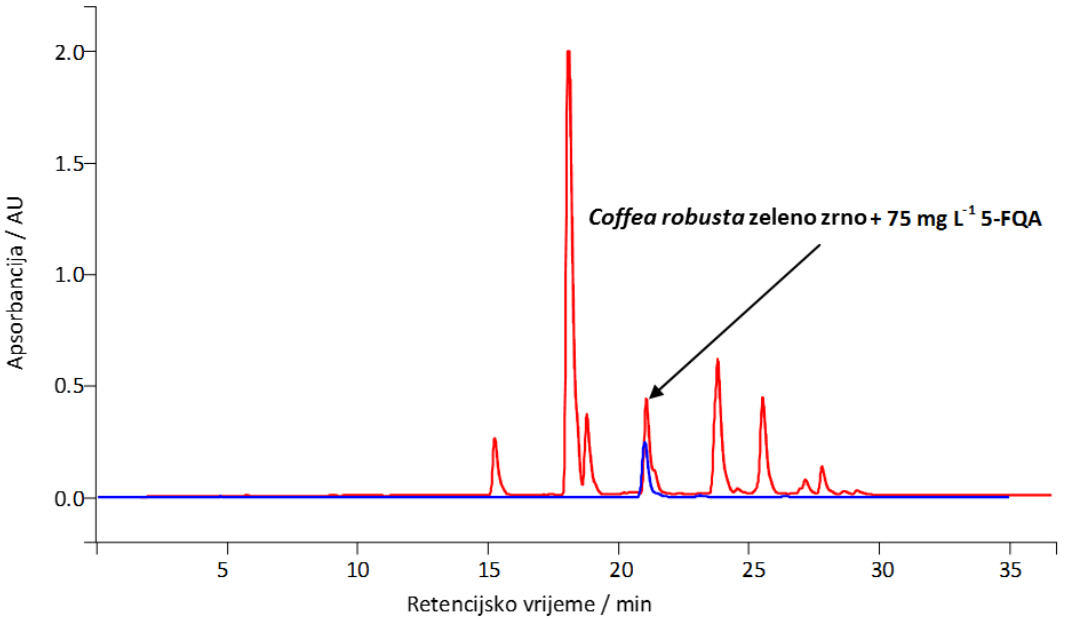
Slika 46 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea robusta* i zelenog zrna kave *Coffea robusta* u koju je dodana 4,5-diCQA, koncentracije γ=50 mg L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



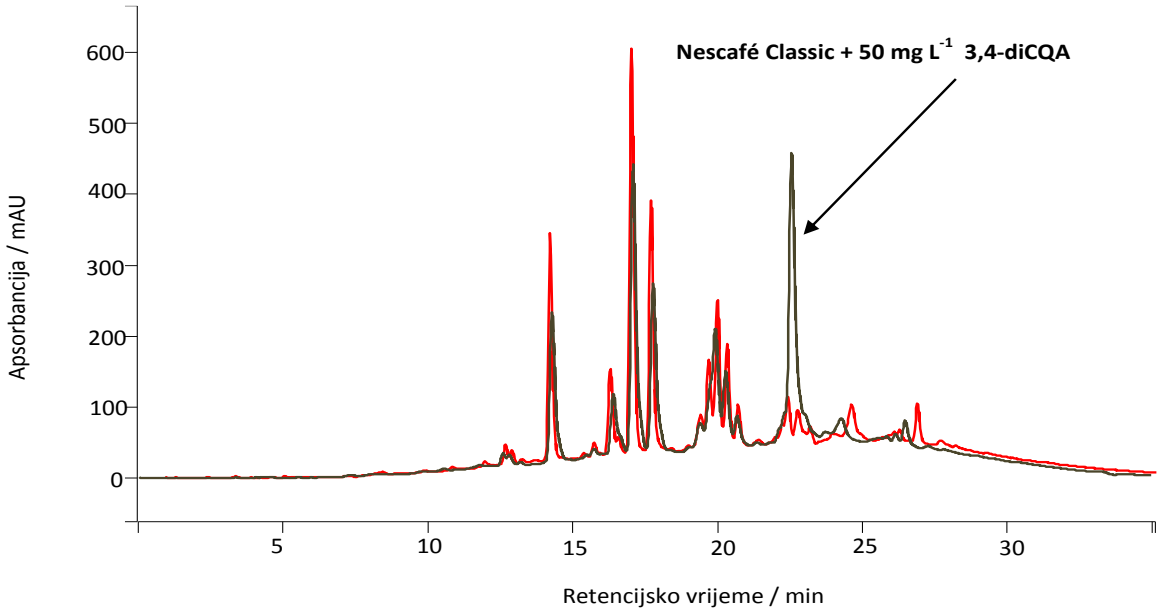
Slika 47 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea robusta* i zelenog zrna kave *Coffea robusta* u koju je dodana 3,4-diCQA, koncentracije γ=50 mg L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



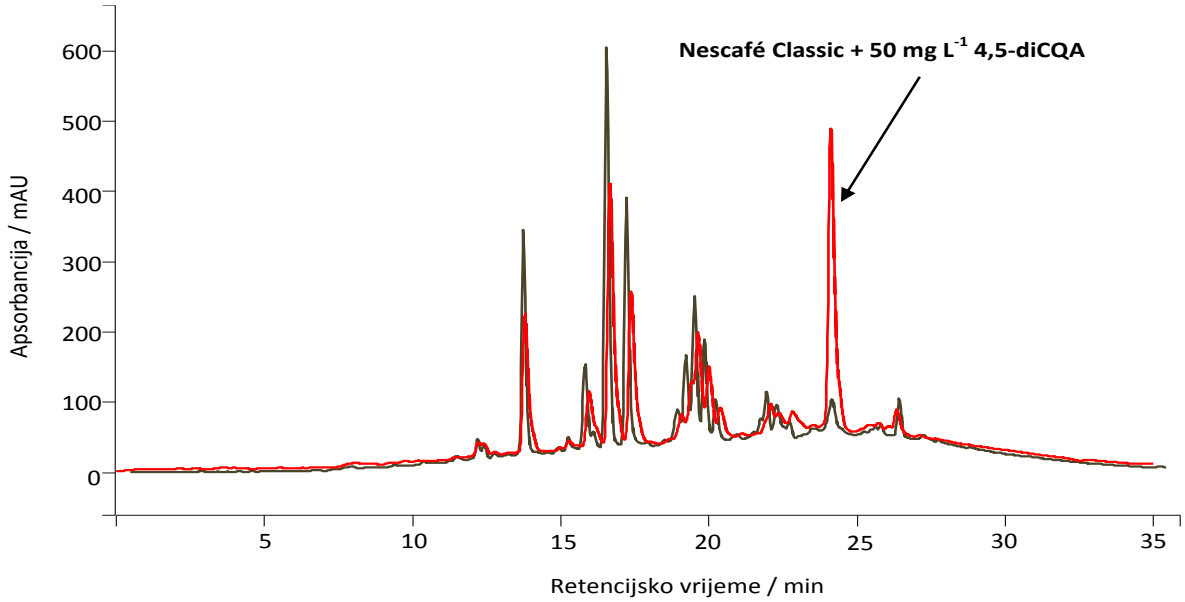
Slika 48 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea robusta* i zelenog zrna kave *Coffea robusta* u koju je dodana 3,5-diCQA, koncentracije γ=50 mg L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



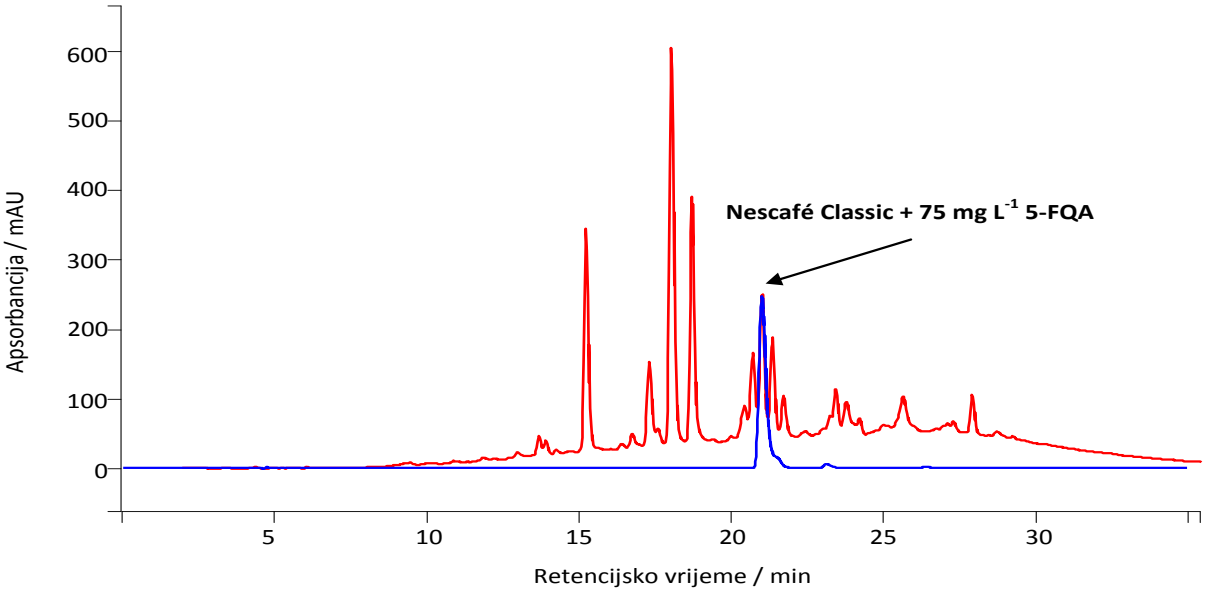
Slika 49 Preklopljeni kromatogrami zelenog zrna kave *Coffea robusta* i zelenog zrna kave *Coffea robusta* u koju je dodana 5-FQA, koncentracije γ=75 mg L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



Slika 50 Preklopljeni kromatogrami kave *Nescafé Classic* i kave *Nescafé Classic* u koju je dodana 3,4-diCQA, koncentracije γ=50 mg L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.



Slika 51 Preklopljeni kromatogrami kave *Nescafé Classic* i kave *Nescafé Classic* u koju je dodana 4,5-diCQA, koncentracije γ=50 mg L^{-1}, DF = 5, snimljeni na 320 nm.

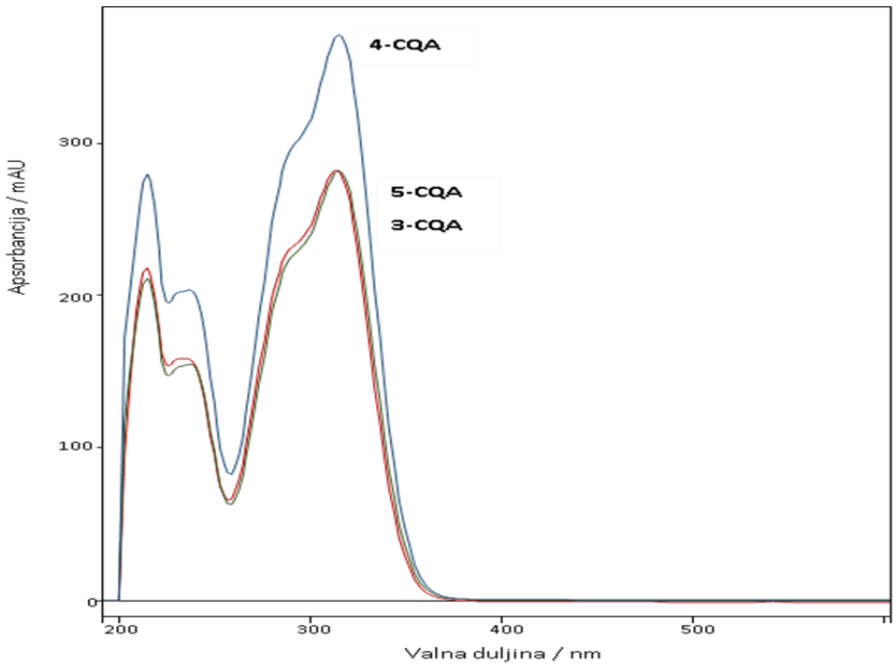


Slika 52 Preklopljeni kromatogrami kave *Nescafé Classic* i kave *Nescafé Classic* u koju je dodana 5-FQA, koncentracije γ=75 mg L^{-1}, DF = 50, snimljeni na 320 nm.

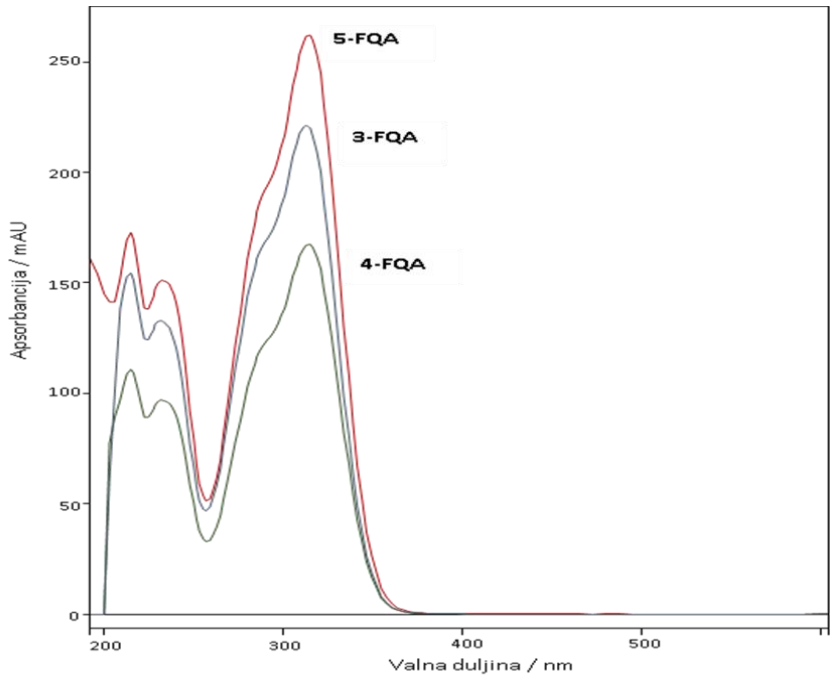
4.1.4. UV/Vis spektri otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata uzoraka kava

Na **Slikama 53-58** prikazani su UV/Vis spektri otopina klorogenskih kiselina i uzorka kave *C. arabica* zeleno zrno, snimljeni u području valnih duljina 200-600 nm. Maksimum apsorbancije na UV/Vis spektrima svih klorogenskih kiselina i svih uzoraka vodenih ekstrakata kava uočen

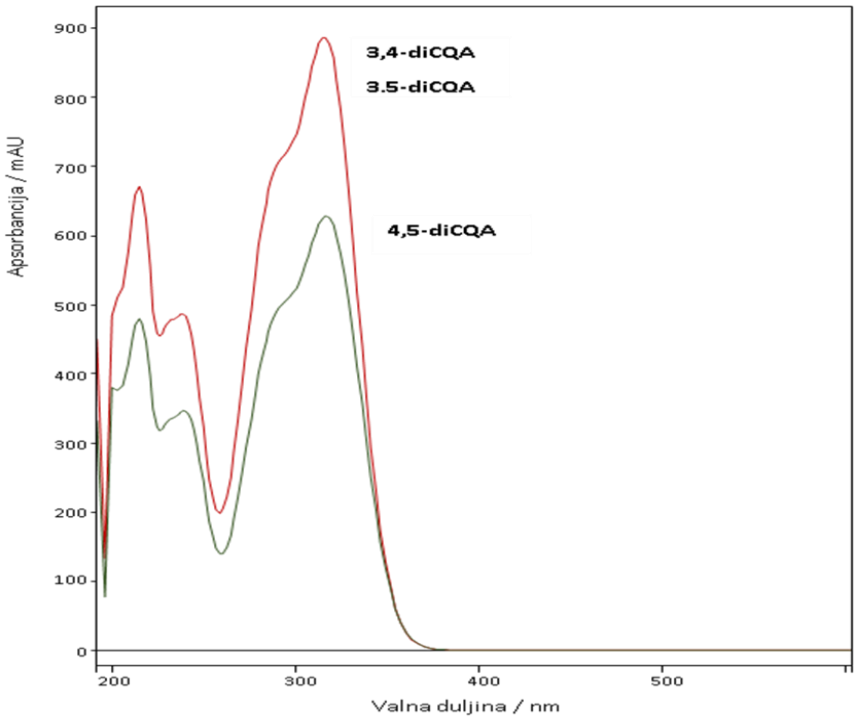
je na valnoj duljini, λ=320 nm te je stoga ova valna duljina odabrana za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenskih kiselina reverzno–faznom HPLC metodom.



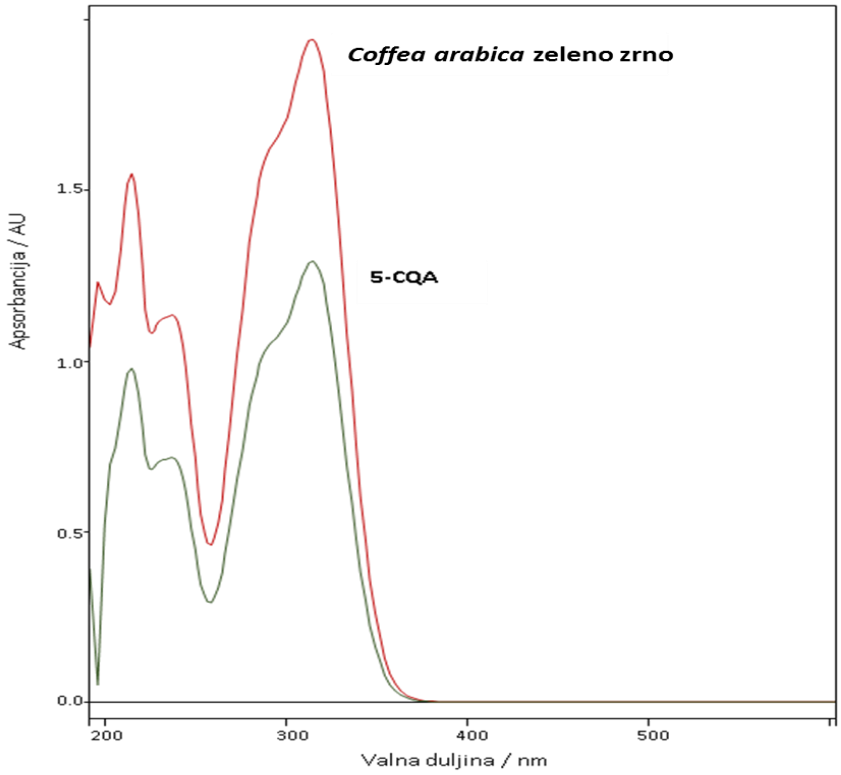
Slika 53 Preklopljeni UV/Vis spektri 3-CQA (maslinasto zelena), 5-CQA (crvena) i 4-CQA (plava). Koncentracija, γ = 75 mg L^{-1}.



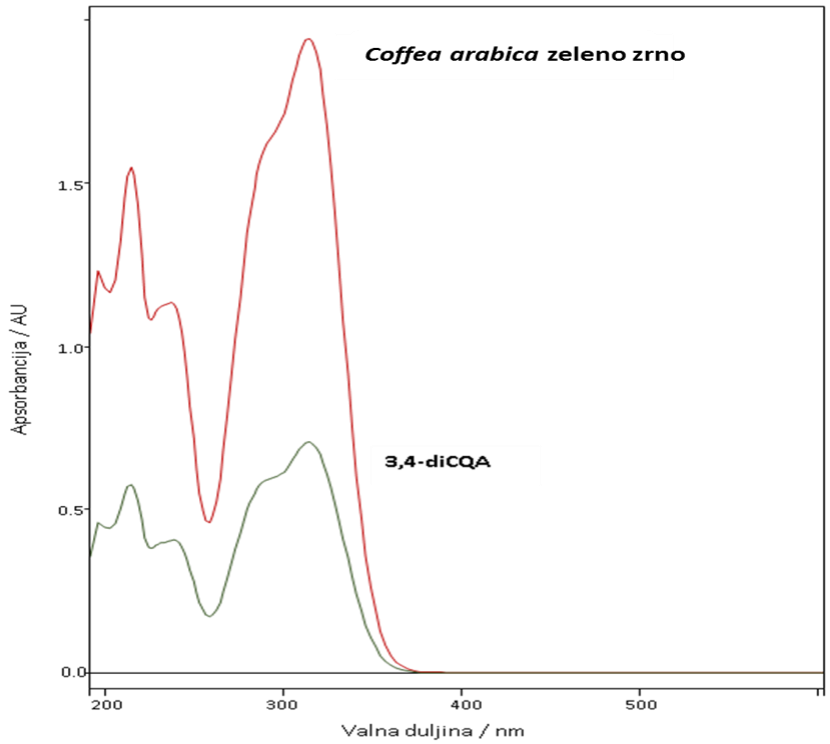
Slika 54 Preklopljeni UV/Vis spektri 3-FQA (plava), 5-FQA (crvena) i 4-FQA (maslinasto zelena). Koncentracija, γ = 75 mg L^{-1}.



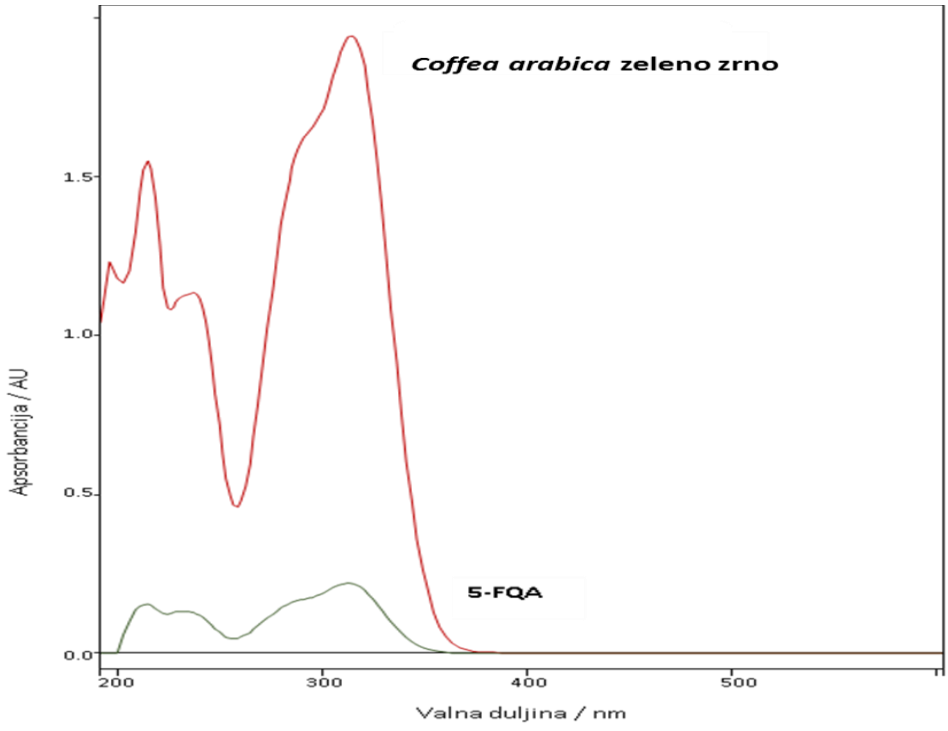
Slika 55 Preklopljeni UV/Vis spektri 3,4-diCQA i 3,5-diCQA (crvena)i 4,5-diCQA (zelena). Koncentracija, γ = 75 mg L^{-1}.



Slika 56 Preklopljeni UV/Vis spektri vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea arabica* (zelena) i 5-CQA (ružičasta). Koncentracija, γ = 75 mg L^{-1}.



Slika 57 Preklopljeni UV/Vis spektri vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea arabica* (zelena) i 3,4-diCQA (plava). Koncentracija, γ = 75 mg L^{-1}.



Slika 58 Preklopljeni UV/Vis spektrii vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea arabica* (zelena) i 5-FQA (crna). Koncentracija, γ = 75 mg L^{-1}.

4.1.5. Kvantifikacija sadržaja klorogenskih kiselina u uzorcima kava primjenom HPLC metode

Na **Slici 59** prikazana je kalibracijska krivulja otopine 5-CQA dobivena na osnovi kromatograma više otopina 5-CQA različitih koncentracija u rasponu masenih koncentracija od 20 mg L^{-1} do 300 mg L^{-1}, snimljenih na λ = 320 nm. 5-CQA odabrana je kao standard za kvantifikaciju sadržaja klorogenskih kiselina u uzorcima kava budući da je ona najzastupljenija CGAs u kavama. Kvantifikacija pojedinih klorogenskih kiselina, izvršena je usporedbom površine pika pojedine klorogenske kiseline i površine pika standarda 5-CQA tj. korištenjem kalibracijske krivulje te su količine pojedinih klorogenskih kiselina izražene kao 5-CQA ekvivalenti (5-CQAE). Stvarna količina pojedinih klorogenskih kiselina (uzimajući u obzir različite molarne ekstinkcijske koeficijente i različite molekulske mase) izračunata je primjenom **Jednadžbe (8)**, (Trugo i Macrae, 1984.; Farah i sur., 2005.):

$$C = \frac{RF\varepsilon_1 MR_2 A}{\varepsilon_2 MR_1} \qquad (8)$$

gdje je: C - koncentracija pojedine klorogenske kiseline (izomera) u mg L^{-1},

RF - faktor odziva za standard 5-CQA (koncentracija u mg L^{-1}/jedinici površine pika)-inverzna vrijednost nagiba kalibracijske krivulje

ϵ_1 - molarni ekstinkcijski koeficijent standarda 5-CQA,

ϵ_2 - molarni ekstinkcijski koeficijent pojedine klorogenske kiseline (izomera),

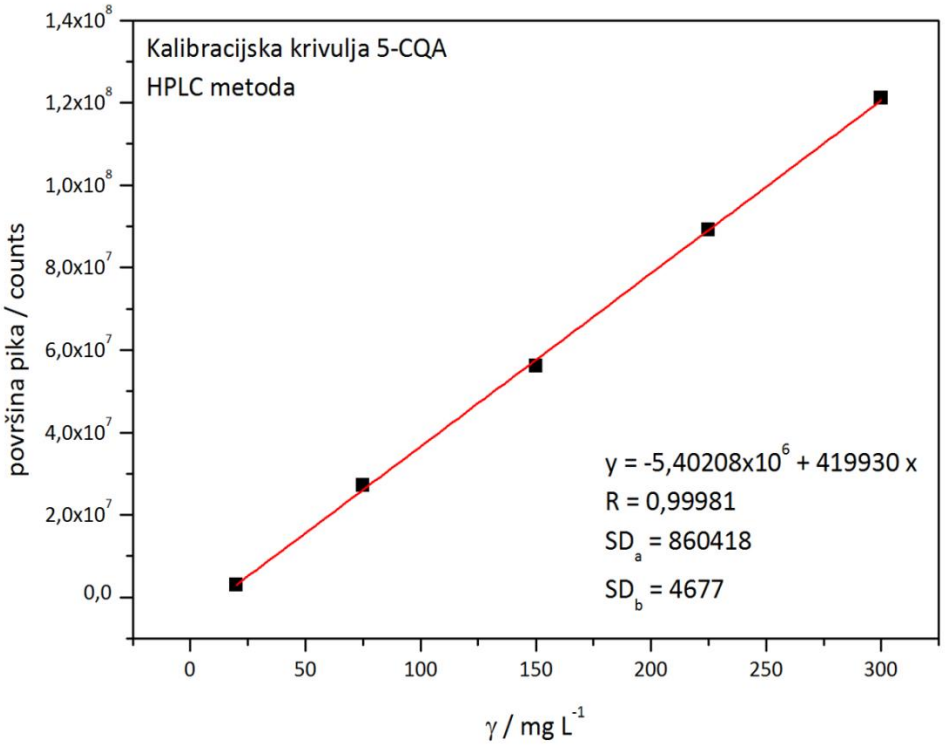
MR_1 - molekulska masa 5-CQA,

MR_2 -molekulska masa pojedine klorogenske kiseline (izomera),

A - površina pika pojedine klorogenske kiseline (izomera).

Molarni ekstinkcijski koeficijenti (x 10^4) iznose na λ = 330 nm za: 5-CQA = 1,95; 4-CQA = 1,80; 3-CQA = 1,84; 3,4-diCQA = 3,18; 3,5-diCQA = 3,16 i 4,5-diCQA = 3,32, dok na λ = 325 nm iznose za: 5-FQA = 1,93; 4-FQA = 1,95 i 3-FQA = 1,90 m^{-1} cm^{-1} (Farah i sur., 2005.).

Sadržaj pojedinih i ukupnih klorogenskih kiselina izračunat je na dva načina: primjenom kalibracijske krivulje tj. izražen kao 5-CQAE i primjenom **Jednadžbe (8)**. Nema praktički gotovo nikakve razlike (ili je ona vrlo mala) u koncentracijima pojedinih klorogenskih kiselina, kao i u sadržaju ukupnih klorogenskih kiselina izraženih preko 5-CQAE i izračunatih primjenom **Jednadžbe (8)**. Stoga su u **Tablici 16** prikazani rezultati dobiveni na osnovi primjene **Jednadžbe (8)**, jer oni prikazuju stvarnu-realnu koncentraciju pojedinih klorogenskih kiselina prisutnih u uzorcima kava.



Slika 59 Kalibracijska krivulja 5-CQA korištena za kvantifikaciju sadržaja pojedinih klorogenskih kiselina u uzorcima kava HPLC metodom.

Tablica 16 Sadržaj pojedinih i ukupnih klorogenskih kiselina (mg/100 g kave) u uzorcima kava određen pomoću HPLC metode

Uzorak	3-CQA	4-CQA	5-CQA	ΣCQAs	3,4-i 3,5-diCQAs	4,5-diCQA	ΣdiCQAs	5-FQA	4-FQA	ΣFQAs	**ΣCGAs (ukupno)**
C. arabica, Rio Minas, Brazil (zelena zrna)	655	909	3933	5497	777	634	1411	305	157	462	**7370**
C. arabica, Rio Minas, Brazil pržena zrna)	445	546	908	1899	174	199	373	197	143	340	**2612**
C. robusta, Cherry, India (zelena zrna)	576	801	4130	5507	1477	1047	2524	1046	35	1081	**9112**
C. robusta, Cherry, India (pržena zrna)	438	529	890	1857	250	244	494	237	237	474	**2825**
Flatscher Olympia (mljevena kava, 100% Arabica)	669	842	1519	3030	252	260	512	210	179	389	**3931**
Franck Guatemala (mljevena kava, 100% Arabica)	562	703	1308	2573	282	228	510	288	148	436	**3519**
Nescafé Classic (instant kava)	550	638	1025	2213	292	271	563	290	137	427	**3203**
Nescafé Espresso (instant kava)	544	630	1026	2200	290	275	565	302	118	420	**3185**
Jacobs Monarch (instant kava)	578	604	852	2034	293	202	495	596	25	621	**3150**
Jacobs Intense (instant kava)	622	691	970	2283	314	247	561	420	198	618	**3462**

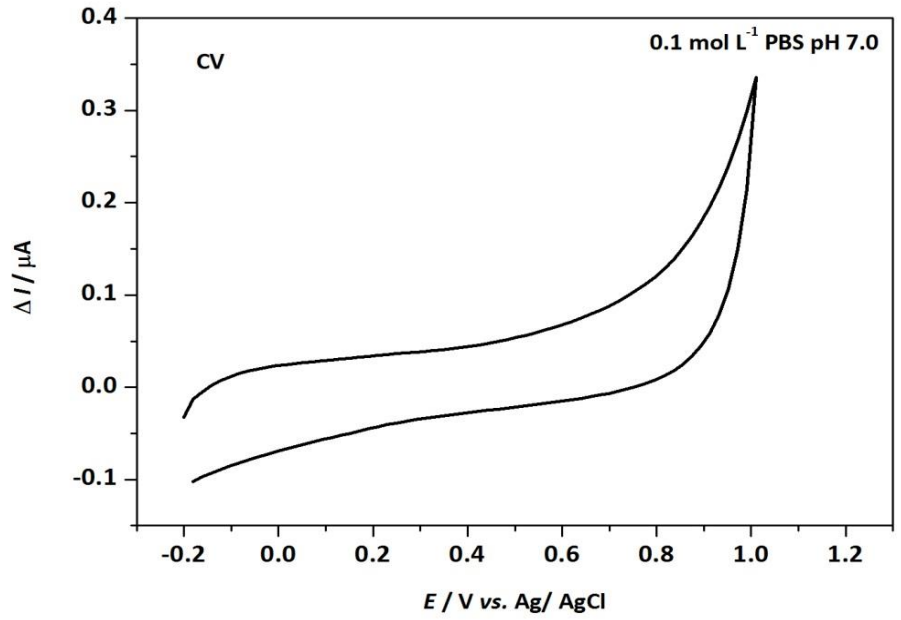
-Rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri međusobno neovisna mjerenja (*n*=3)

4.2. ELEKTROKEMIJSKA SVOJSTVA KLOROGENSKIH KISELINA

Elektrokemijska svojstva klorogenskih kiselina ispitana su primjenom tri elektrokemijske metode i to: pravokutnovalne voltametrije (SWV), diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) i protočne *stripping* kronopotenciometrije (FTSCP), prema eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablicama** od **10** do **12**.

4.2.1. Elektrokemijska priprema GC elektrode

Radna elektroda od staklastog ugljika (GCE) mehanički je polirana pomoću praha aluminijevog oksida veličine čestica 0,05 µm te nakon toga isprana ultračistom vodom. Nakon mehaničkog poliranja provedeno je kemijsko poliranje GCE primjenom cikličke voltametrije (CV) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu u rasponu potencijala od -0,2 do 1,0 V uz brzinu polarizacije 50 mV s^{-1}. Ovaj postupak primijenjen je prije svakog elektrokemijskog mjerenja, bez obzira na voltametrijsku tehniku koja je korištena za daljnja mjerenje. Cilj je mehaničkog i kemijskog poliranja stabilizacija odziva radne GC elektrode na elektrokemijsku pobudu, tj. postizanje optimalnog odziva radne elektrode i reproducibilnosti voltametrijskih mjerenja (Bott, 1997.). Primjer cikličkog voltamograma radne GC elektrode u otopini PBS pH 7,0 prikazan je na **Slici 60**.

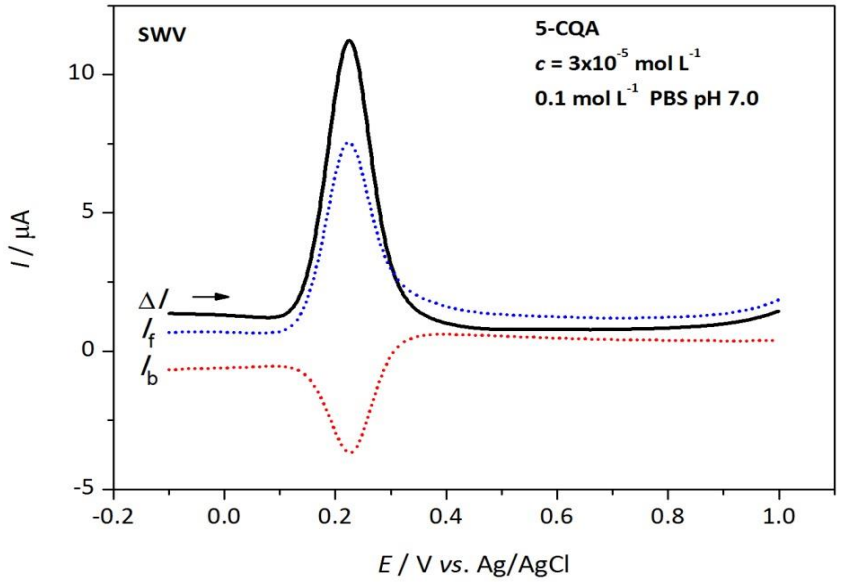


Slika 60 Ciklički voltamogram GCE u otopini 0,1 mol L^{-1} fosfatnog pufera (PBS)

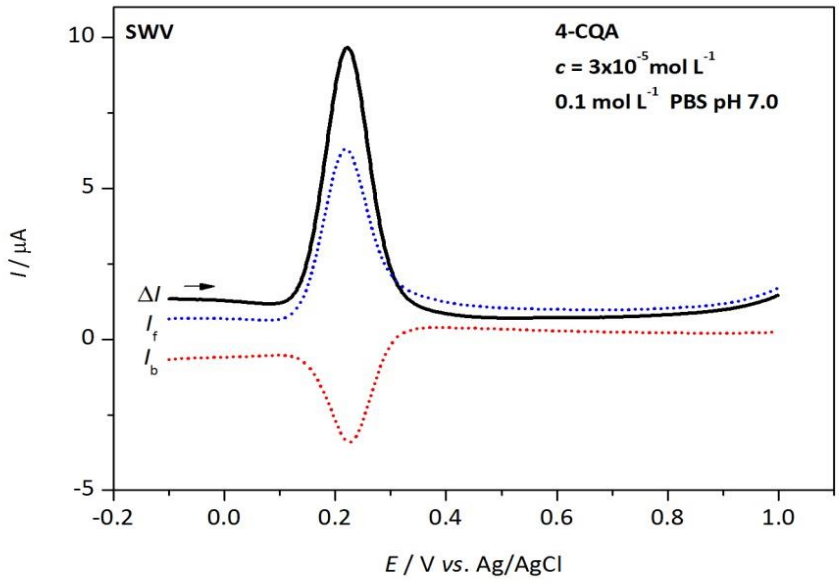
4.2.2. Pravokutnovalna voltametrija (SWV) klorogenskih kiselina

4.2.2.1. Pravokutnovalna voltametrija kafeoilkina i dikafeoilkina kiselina

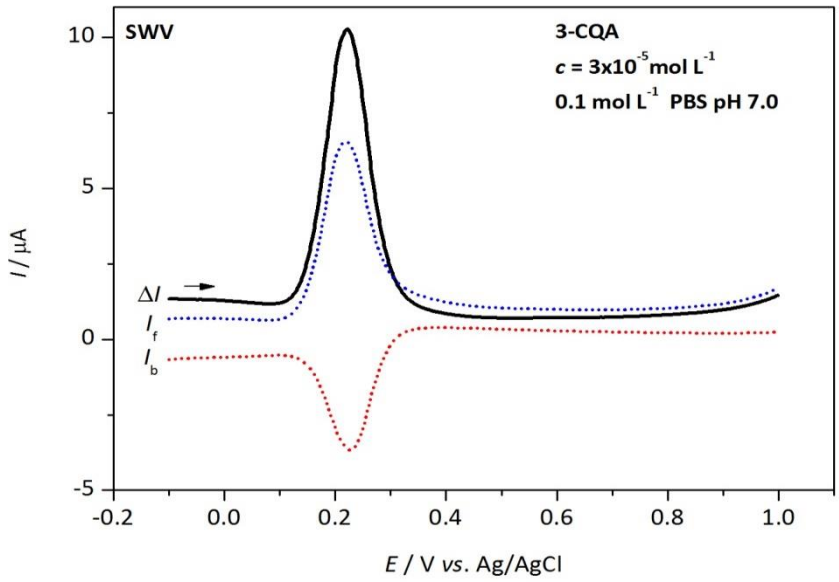
Na **Slikama** od **61** do **67** prikazani su pravokutnovalni voltamogrami otopina pojedinih CQAs, diCQAs te kafeinske kiseline (CFA), koja je osnovna strukturna jedinica svih ispitivanih CQAs i diCQAs.



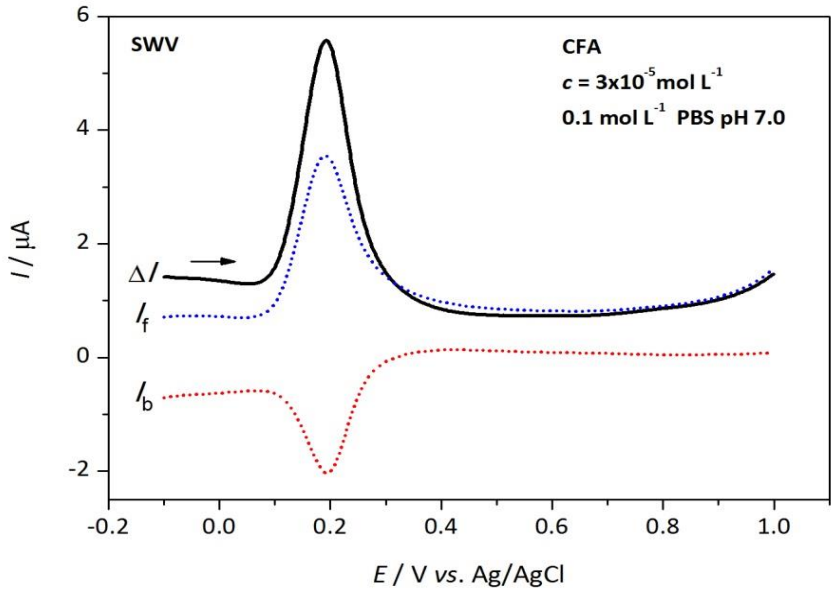
Slika 61 Pravokutnovalni voltamogram otopine 5-CQA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



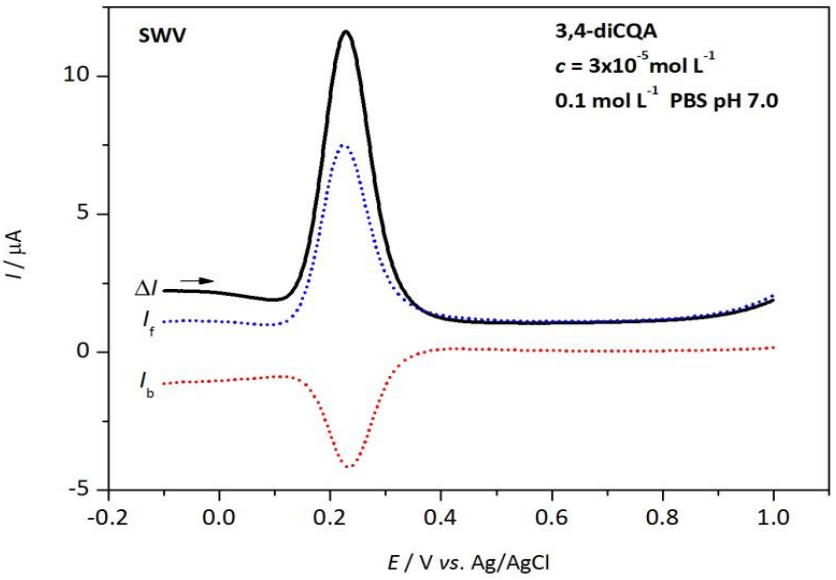
Slika 62 Pravokutnovalni voltamogram otopine 4-CQA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



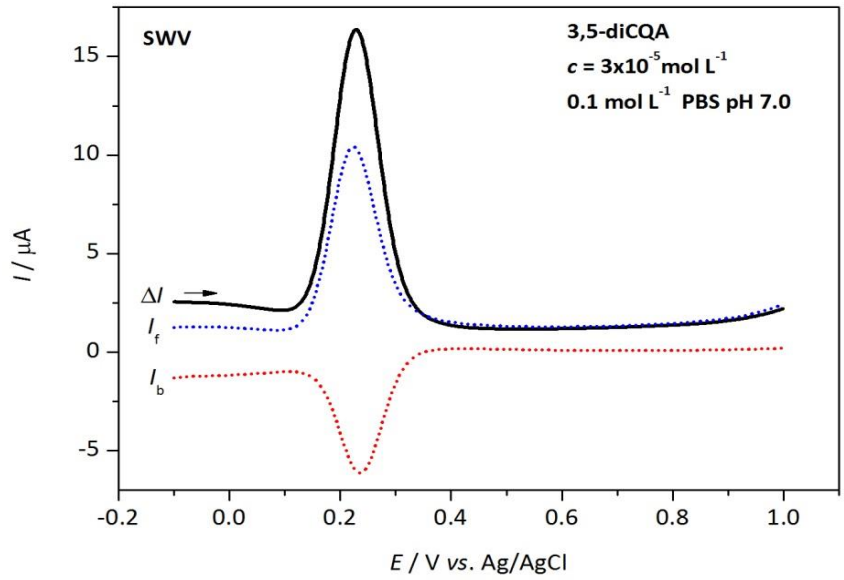
Slika 63 Pravokutnovalni voltamogram otopine 3-CQA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



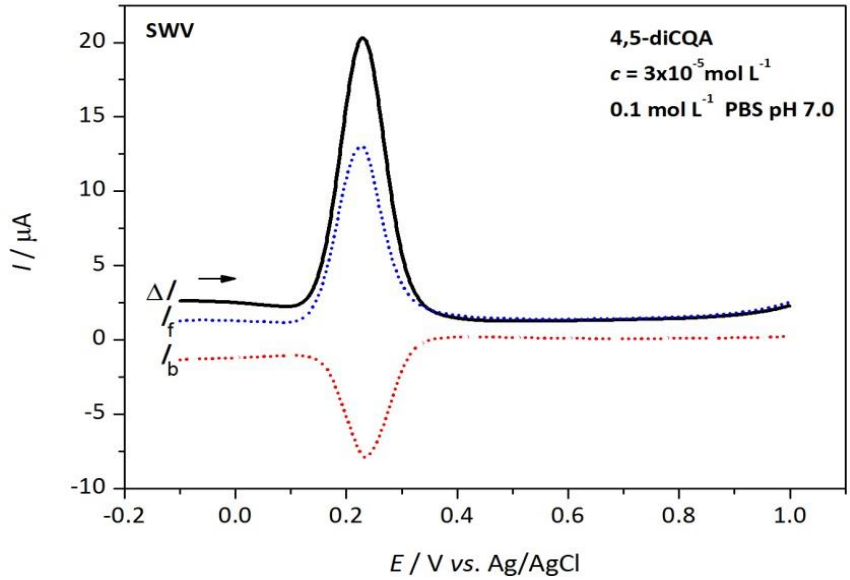
Slika 64 Pravokutnovalni voltamogram otopine CFA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



Slika 65 Pravokutnovalni voltamogram otopine 3,4-diCQA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



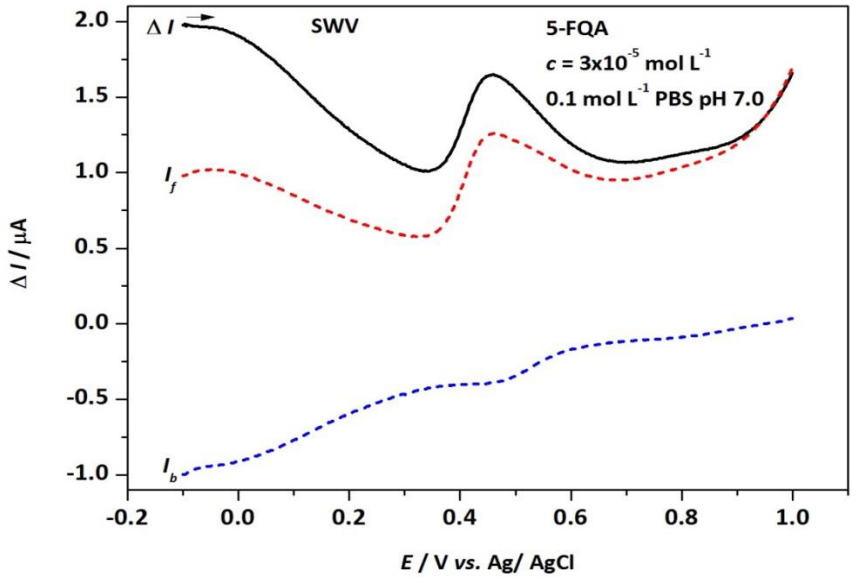
Slika 66 Pravokutnovalni voltamogram otopine 3,5-diCQA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje



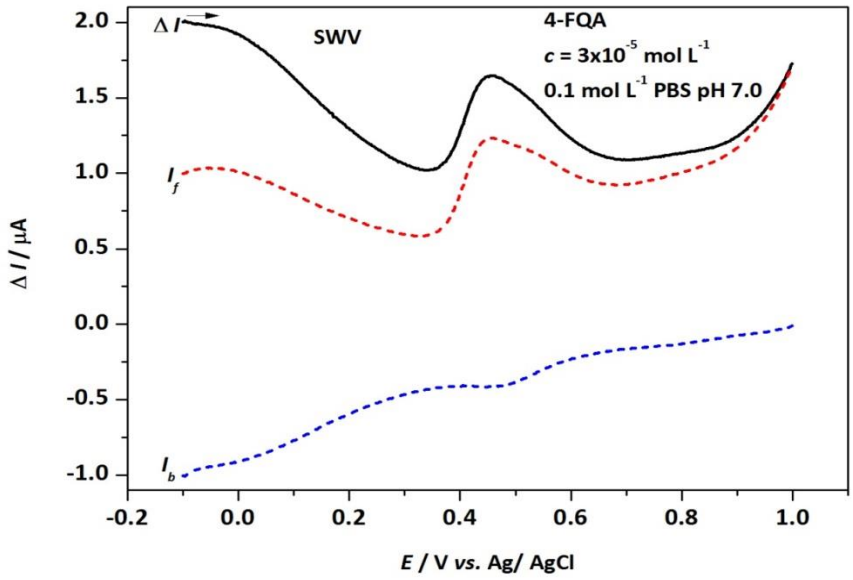
Slika 67 Pravokutnovalni voltamogram otopine 4,5-diCQA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.

4.2.2.2. Pravokutnovalna voltametrija feruloilkina kiselina

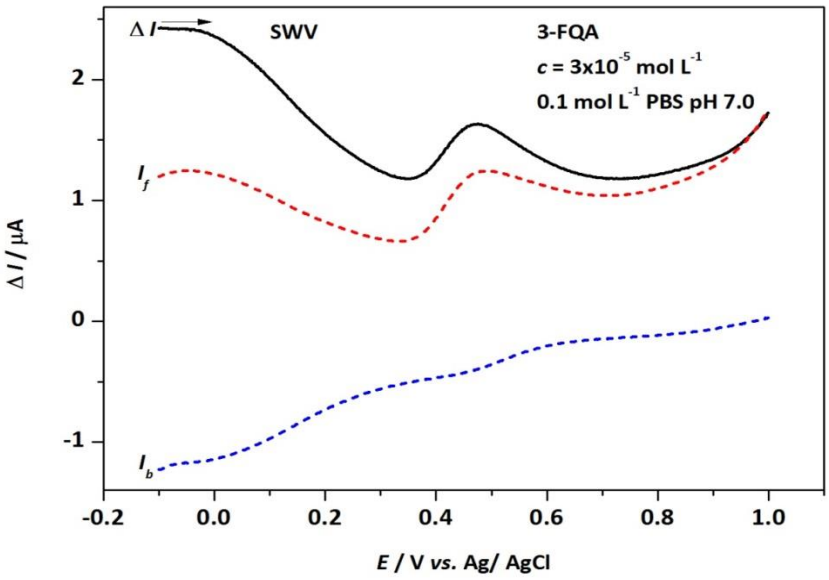
Na **Slikama** od **68** do **71** prikazani su pravokutnovalni voltamogrami FQAs i ferulične kiseline (FA), koja je osnovna strukturna jedinica FQAs.



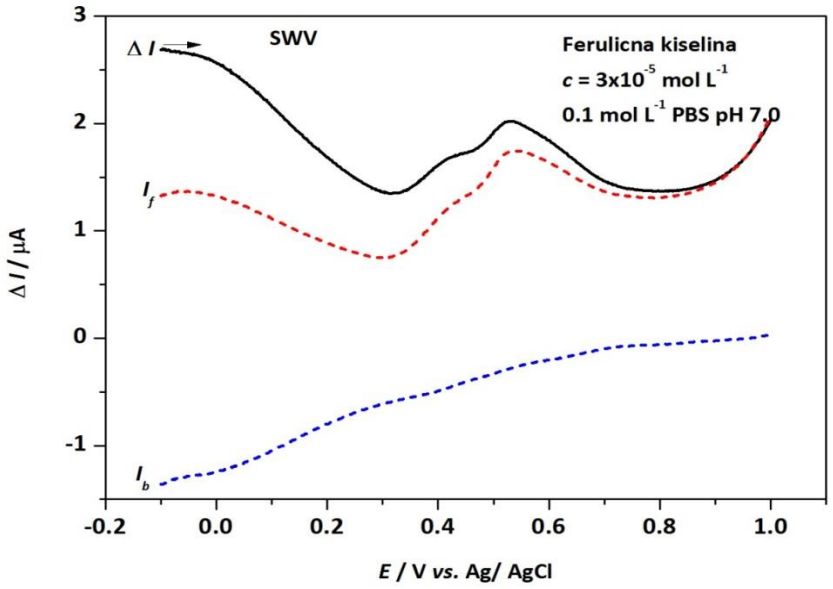
Slika 68 Pravokutnovalni voltamogram otopine 5-FQA, c= 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



Slika 69 Pravokutnovalni voltamogram otopine 4-FQA, c= 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



Slika 70 Pravokutnovalni voltamogram otopine 3-FQA, c= 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



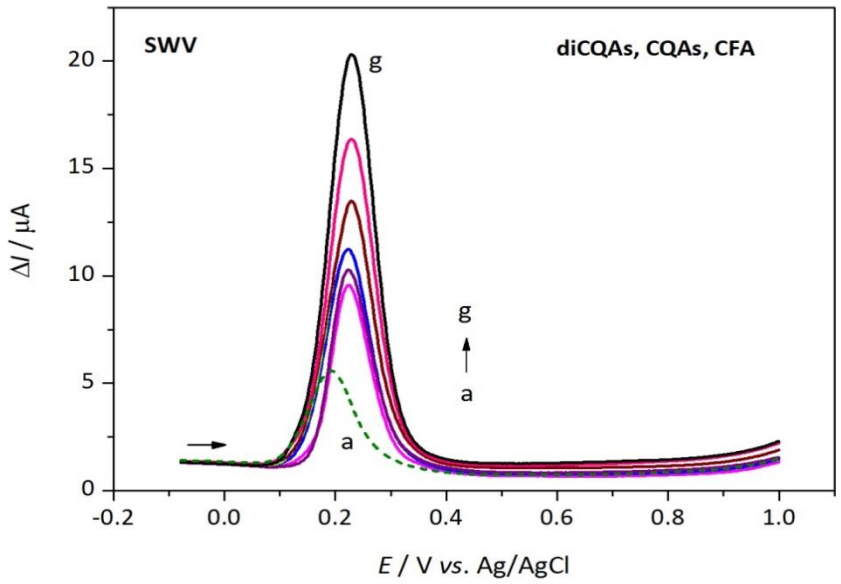
Slika 71 Pravokutnovalni voltamogram otopine ferulične kiseline, c=3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI)te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.

4.2.2.3. Utjecaj eksperimentalnih uvjeta na pravokutnovalne voltamograme klorogenskih kiselina

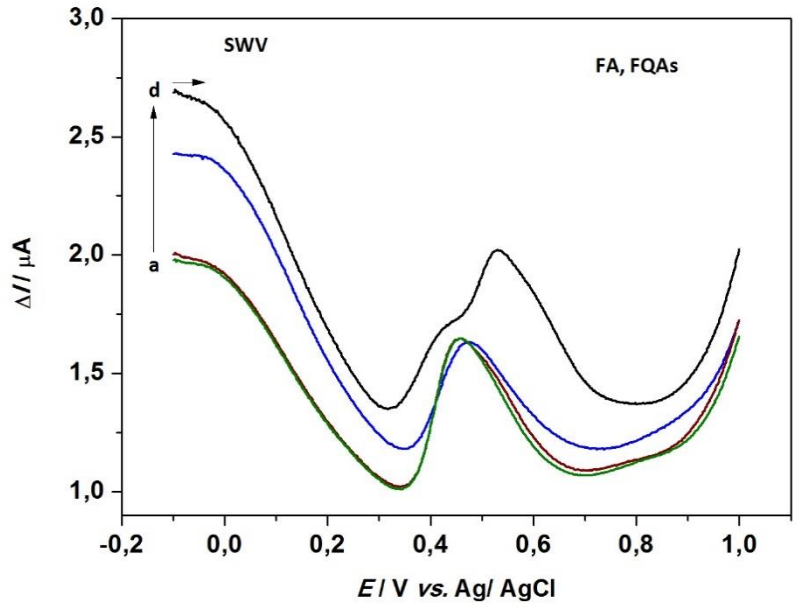
Na **Slikama 72-83** prikazani su utjecaji eksperimentalnih uvjeta (kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije, frekvencije pobudnog signala, pH vrijednosti otopina i koncentracije otopina) na izgled i elektrokemijske karakteristike pravokutnovalnih voltamograma CQAs, diCQAs i FQAs te njihovih strukturnih jedinica: kafeinske kiseline (CFA) i ferulične kiseline (FA).

Utjecaj kemijske strukture

Utjecaj kemijske strukture na izgled i elektrokemijske karakteristike SW voltamograma otopina CQAs, diCQAs, FQAs, CFA i FA prikazan je na **Slikama 72 i 73.**



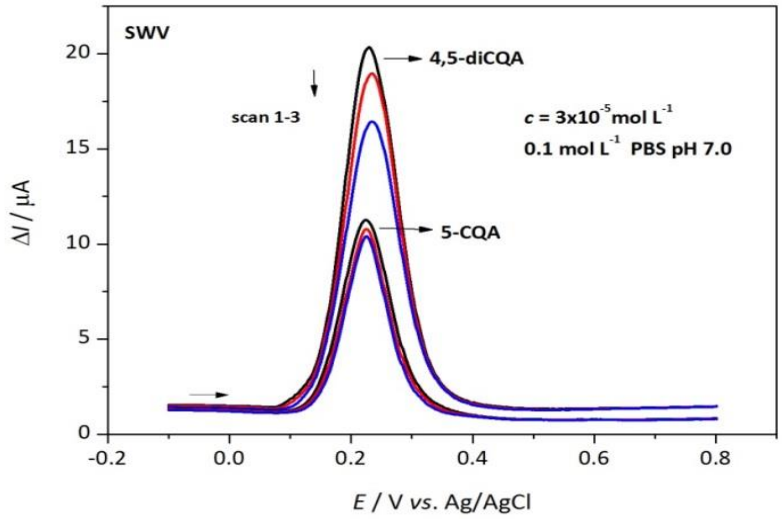
Slika 72 Utjecaj kemijske strukture na SW voltamograme otopina CQAs, diCQAs i CFA, c = $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI): (a) CFA;(b) 4-CQA; (c) 3-CQA; (d) 5-CQA; (e) 3,4-diCQA; (f) 3,5-diCQA; (g) 4,5-diCQA.



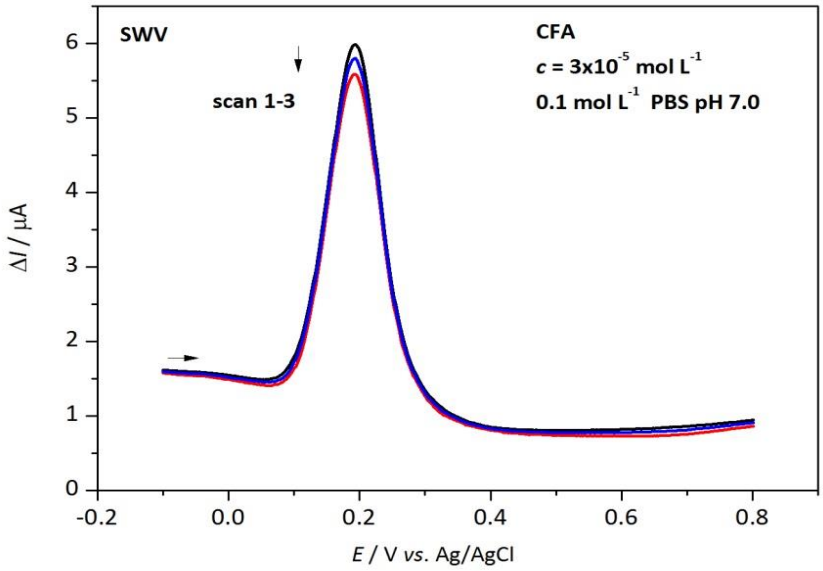
Slika 73 Utjecaj kemijske strukture na SW voltamograme otopina FQAs i FA, c = $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI): (a) 3-FQA; (b) 5-FQA; (c) 4-FQA; (d) FA.

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

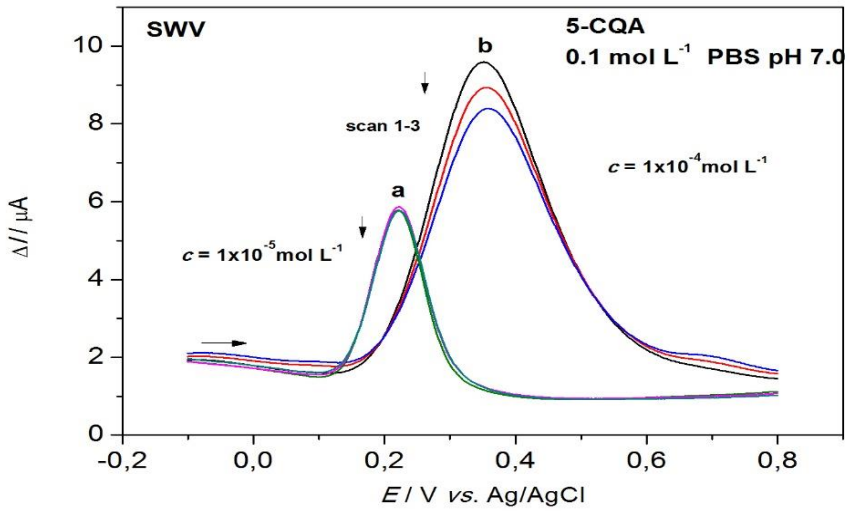
Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na izgled i elektrokemijske karakteristike SW voltamograma otopina CQAs, diCQAs, FQAs, CFA i FA prikazan je na **Slikama 74-81.**



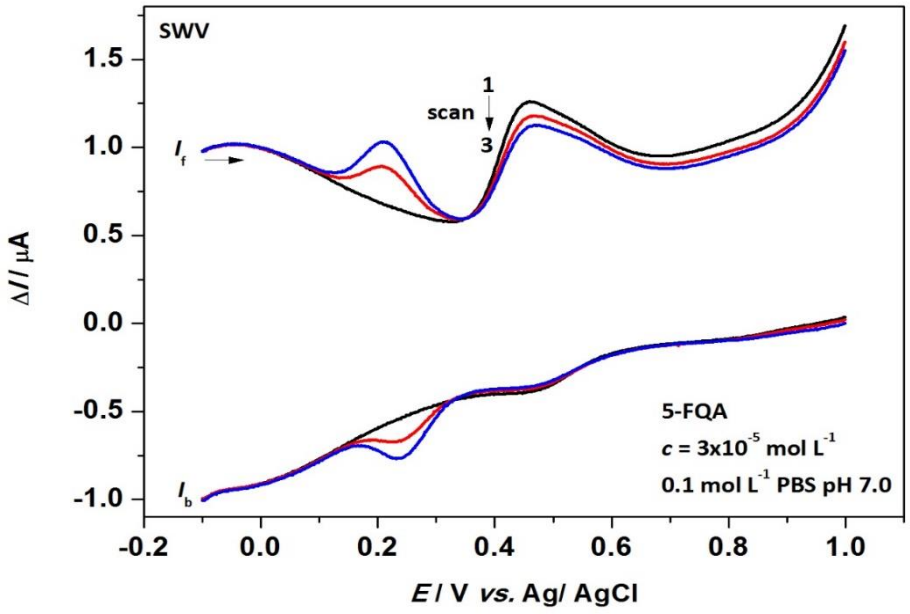
Slika 74 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW voltamograme otopina 5-CQA i 4,5-diCQA, c= 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI).



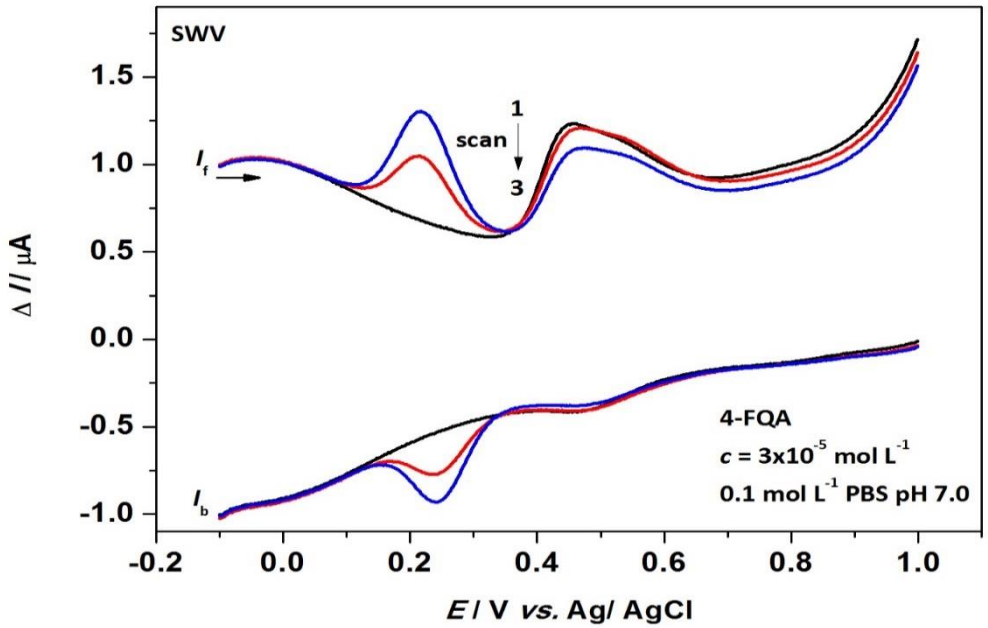
Slika 75 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW voltamograme otopine CFA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI).



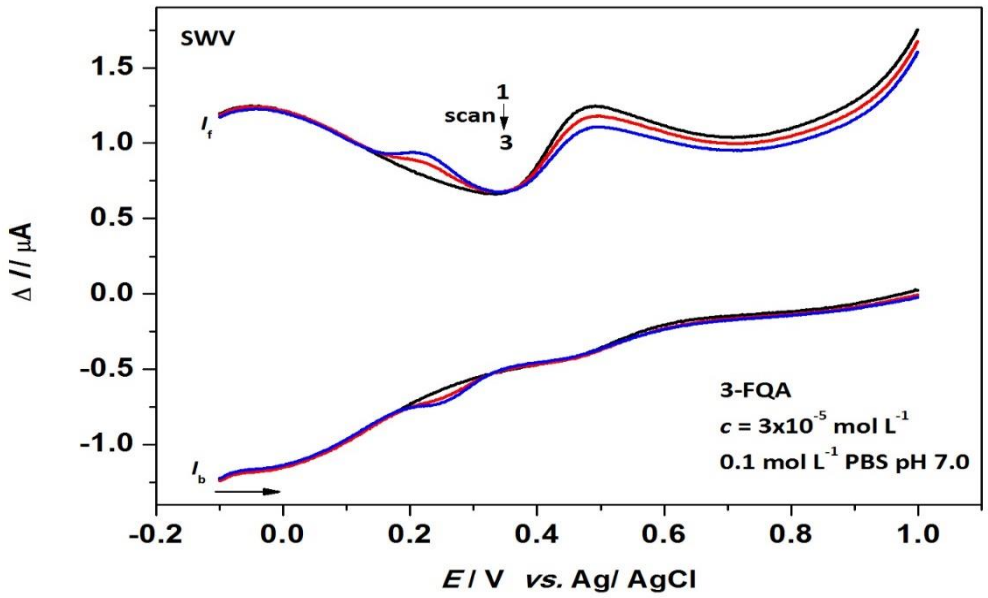
Slika 76 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW voltamograme otopina 5-CQA, c=1·10^{-5} mol L^{-1} (a) i c = 1·10^{-4} mol L^{-1} (b) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI).



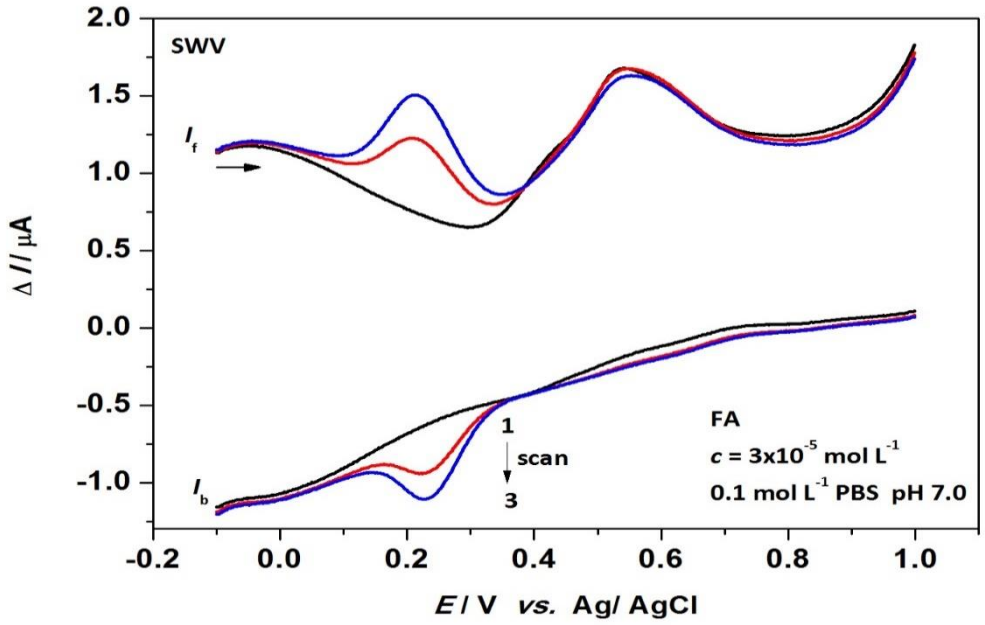
Slika 77 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW voltamograme otopine 5-FQA, c=3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazane početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje (ΔI).



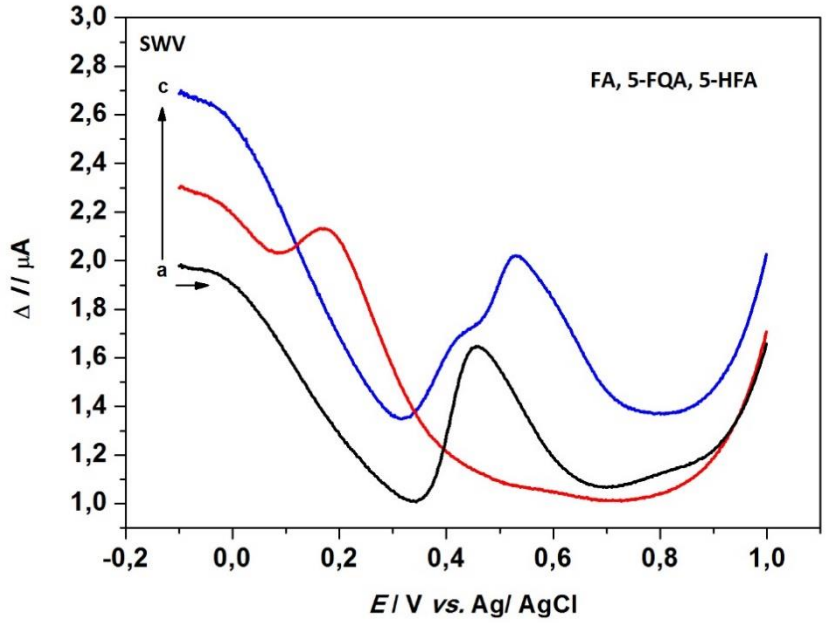
Slika 78 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW voltamograme otopine 4-FQA, c=3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazane početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje (ΔI).



Slika 79 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW voltamograme otopine 3-FQA, c=3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazane početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje (ΔI).



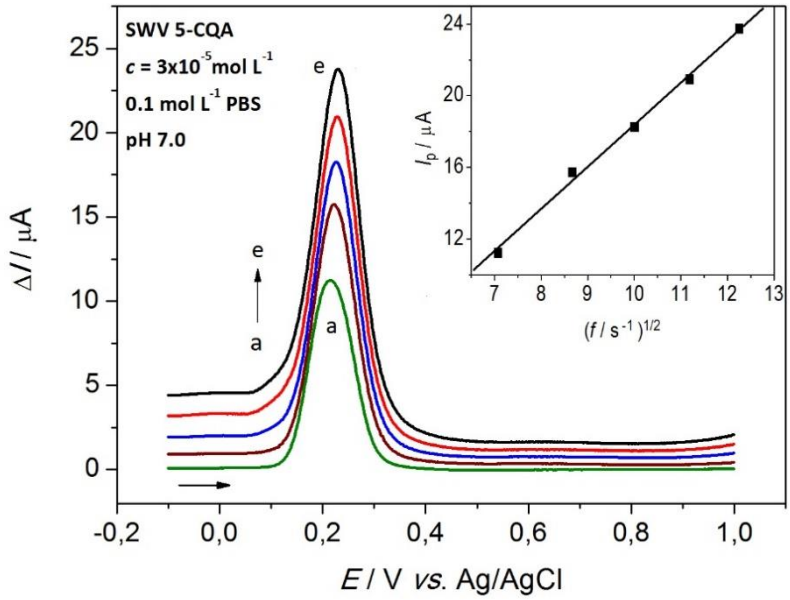
Slika 80 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW voltamograme otopine FA, c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazane početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje (ΔI).



Slika 81 SW voltamogrami otopina 5-FQA, ferulične kiseline (FA) i 5-hidroksiferulične kiseline (5-HFA), c = 3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI): (a) 5-FQA; (b) 5-HFA; (c) FA.

Utjecaj frekvencije pobudnog signala

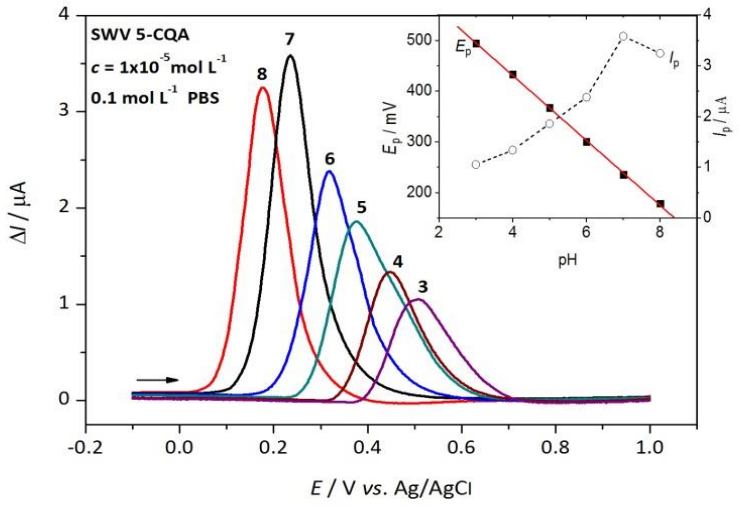
Utjecaj frekvencije pobudnog signala SWV na izgled i elektrokemijske karakteristike SW voltamograma otopine 5-CQA prikazan je na **Slici 82.**



Slika 82 Utjecaj frekvencije pobudnog signala (*f*) na SW voltamograme otopine 5-CQA, c = $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Frekvencija (*f*):(a) 25; (b) 50; (c) 100; (d) 125; (e) 150 Hz. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI). Na SW voltamogramima 5-CQA odbijen je SW voltamogram PBS pufera. Detalj: ovisnost struje pika (I_p) ukupnog strujnog odziva o drugom korijenu frekvencije pobudnog signala ($f^{1/2}$).

Utjecaj pH vrijednosti otopine

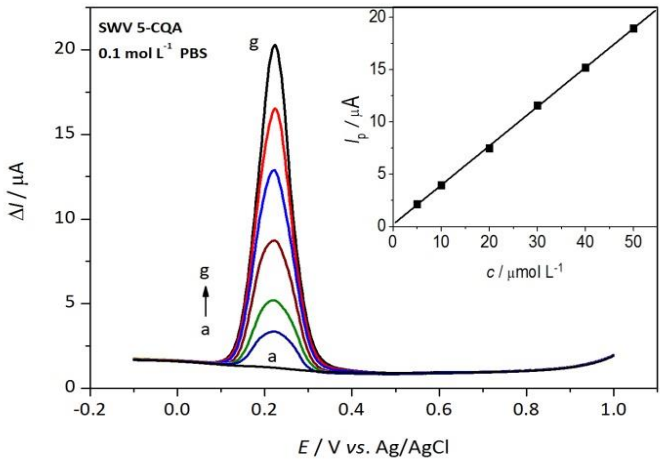
Utjecaj pH vrijednosti otopine 5-CQA (odnosno pH vrijednosti pufera-osnovnog elektrolita) na izgled i elektrokemijske karakteristike SW voltamograma 5-CQA, prikazan je na **Slici 83.**



Slika 83 Utjecaj pH vrijednosti otopine 5-CQA na SW voltamograme, c=1·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS od pH 3 do pH 8. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI). Na SW voltamogramima 5-CQA odbijen je SW voltamogram PBS pufera. Detalj: ovisnost potencijala pika (E_p) i struje pika (I_p) o pH vrijednosti otopine 5-CQA.

Utjecaj koncentracije

Utjecaj koncentracije otopine 5-CQA na izgled i elektrokemijske karakteristike SW voltamograma 5-CQA prikazan je na **Slici 84.**



Slika 84 Utjecaj koncentracije otopine 5-CQA na SW voltamograme u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazani ukupni strujni odzivi (ΔI). Koncentracija otopine 5-CQA, c=: (a) 0 µmol L^{-1} ; (b) 5 µmol L^{-1}; (c) 10 µmol L^{-1}; (d) 20 µmol L^{-1}; (e) 30 µmol L^{-1}, (f) 40 µmol L^{-1}: (g) 50 µmol L^{-1}. Detalj: ovisnost struje pika (I_p) ukupnog strujnog odziva o koncentraciji (c) otopine 5-CQA.

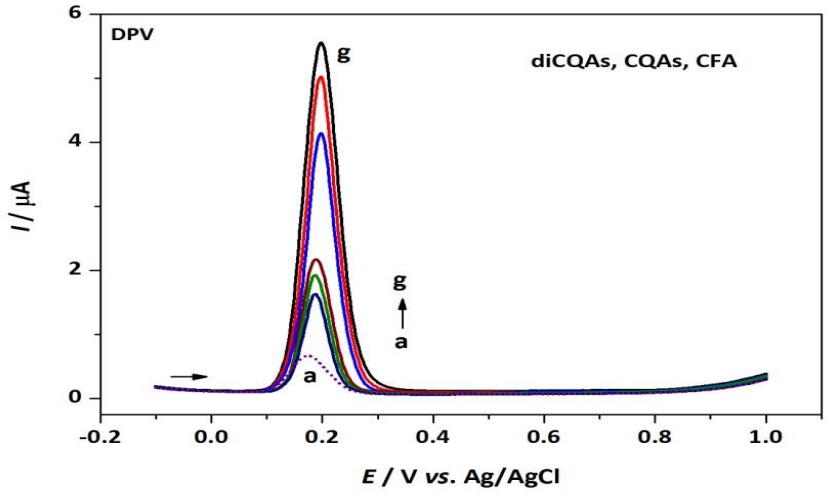
4.2.3. Diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) klorogenskih kiselina

4.2.3.1. Diferencijalna pulsna voltametrija kafeoilkina i dikafeoilkina kiselina

Na **Slikama** od **85** do **88** prikazan je utjecaj eksperimentalnih uvjeta (kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije, pH vrijednosti otopine i koncentracije otopine) na diferencijalne pulsne voltamograme CQAs, diCQAs te kafeinske kiseline (CFA), osnovne strukturne jedinice CQAs i diCQAs.

Utjecaj kemijske strukture

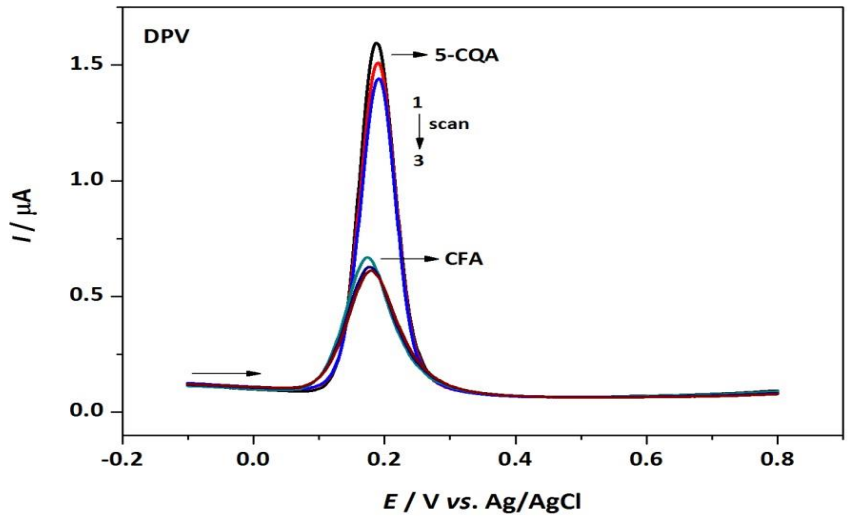
Utjecaj kemijske strukture CQAs, diCQAs i kafeinske kiseline (CFA) na izgled i elektrokemijske karakteristike njihovih DP voltamograma prikazan je na **Slici 85.**



Slika 85 Utjecaj kemijske strukture na DP voltamograme otopina CQA, diCQAs i CFA, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: E_1 = -0,1 V, E_2 = 1,0 V, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v = 5 mV/s. Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I): (a) CFA; (b) 5-CQA; (c) 3-CQA; (d) 4-CQA; (e) 3,4-diCQA; (f) 3,5-diCQA; (g) 4,5-diCQA.

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

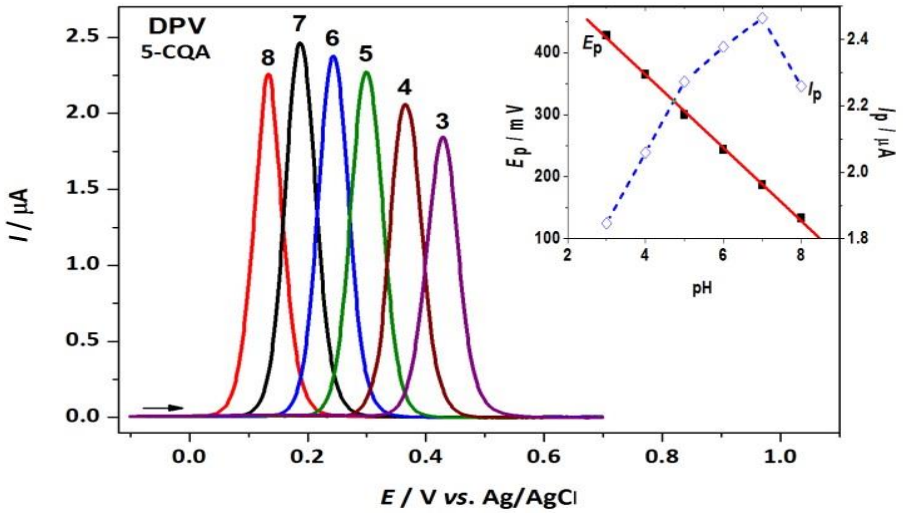
Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na izgled i elektrokemijske karakteristike DP voltamograma 5-CQA i CFA prikazan je na **Slici 86**.



Slika 86 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na DP voltamograme otopina 5-CQA i CFA, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: E_1 = -0,1 V, E_2 =0,8 V, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v = 5 mV/s. Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I).

Utjecaj pH vrijednosti otopine

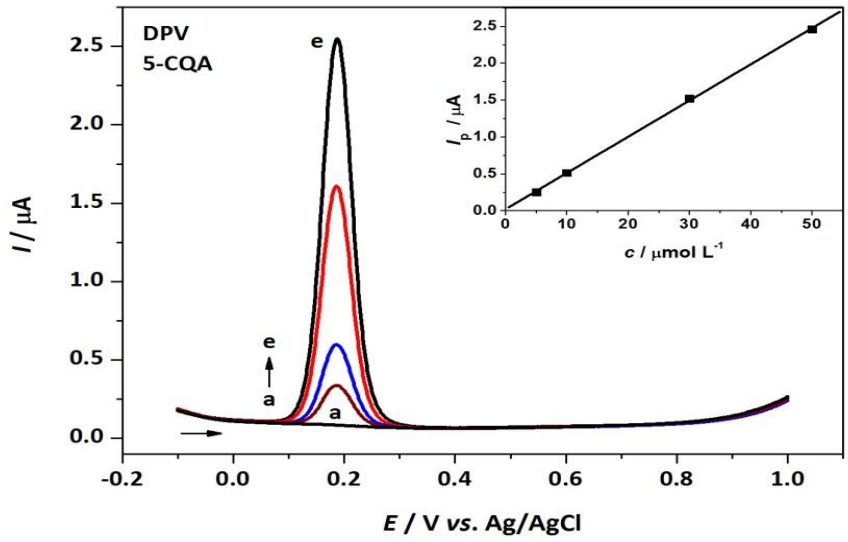
Utjecaj pH vrijednosti otopine elektrolita (pufera) na izgled i elektrokemijske karakteristike DP voltamograma 5-CQA prikazan je na **Slici 87**.



Slika 87 Utjecaj pH vrijednosti pufera na diferencijalne pulsne voltamograme (korekcija bazne linije) otopine 5-CQA, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferima pH 3 do pH 8. Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I): Detalj: ovisnost E_p i I_p o pH vrijednosti otopine.

Utjecaj koncentracije otopine

Utjecaj koncentracije otopine 5-CQA na izgled i elektrokemijske karakteristike DP voltamograma ove otopine prikazan je na **Slici 88**.



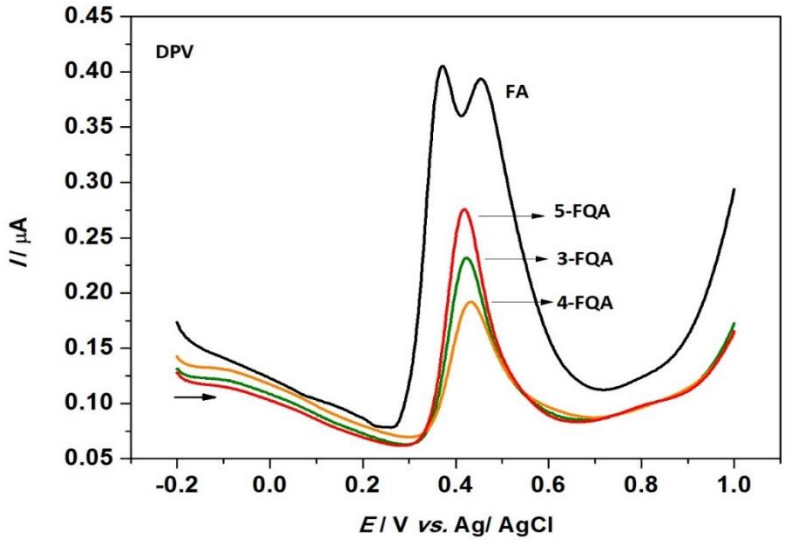
Slika 88 Utjecaj koncentracije otopine 5-CQA na DP voltamograme u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Koncentracija: *c* = (a) 0 µmol L^{-1} , (b) 5 µmol L^{-1}, (c) 10 µmol L^{-1}, (d) 30µmol L^{-1}, (e) 50 µmol L^{-1}. Detalj: ovisnost (I_p) o koncentraciji otopine 5-CQA.

4.2.3.2. Diferencijalna pulsna voltametrija feruloilkina kiselina

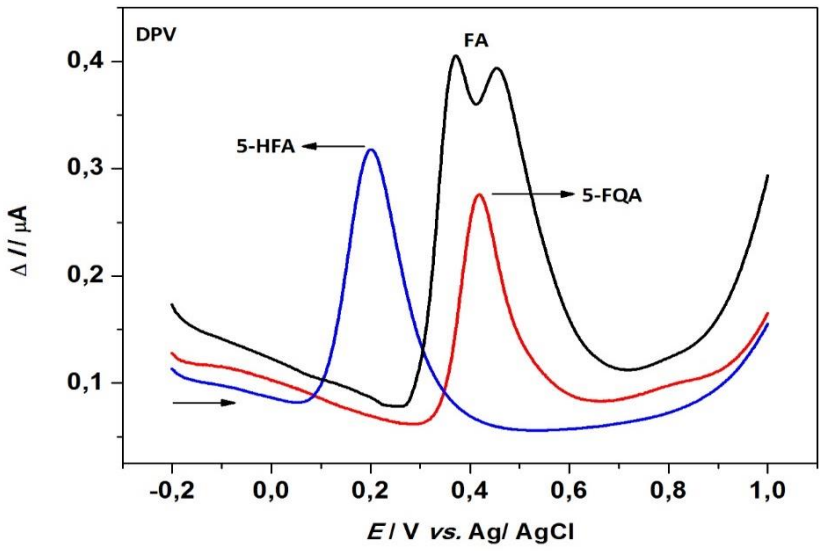
Na **Slikama** od **89** do **94** prikazani su utjecaji eksperimentalnih uvjeta (kemijske strukture i višestruke uzastopne polarizacije) na izgled i elektrokemijske karakteristike diferencijalnih pulsnih voltamograma FQAs i FA.

Utjecaj kemijske strukture

Na **Slikama 89-90** prikazan je utjecaj kemijske strukture na izgled i kemijske karakteristike FQAs i FA.



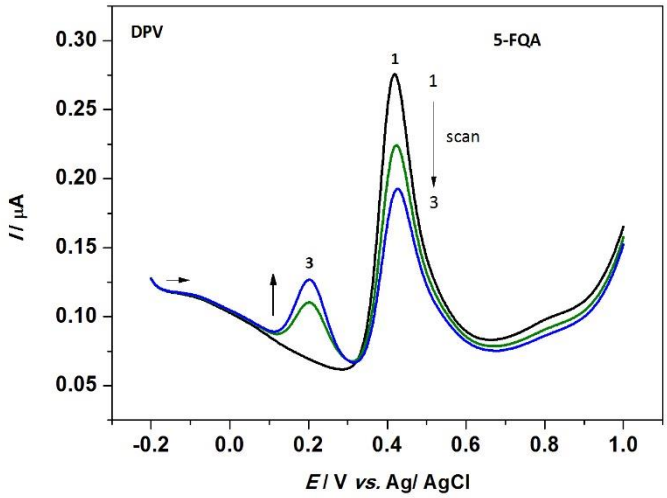
Slika 89 Utjecaj kemijske strukture na diferencijalne pulsne voltamograme otopina feruloilkina kiselina i ferulične kiseline, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: E_1 = -0,2 V, E_2 = 1,0 V, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I).



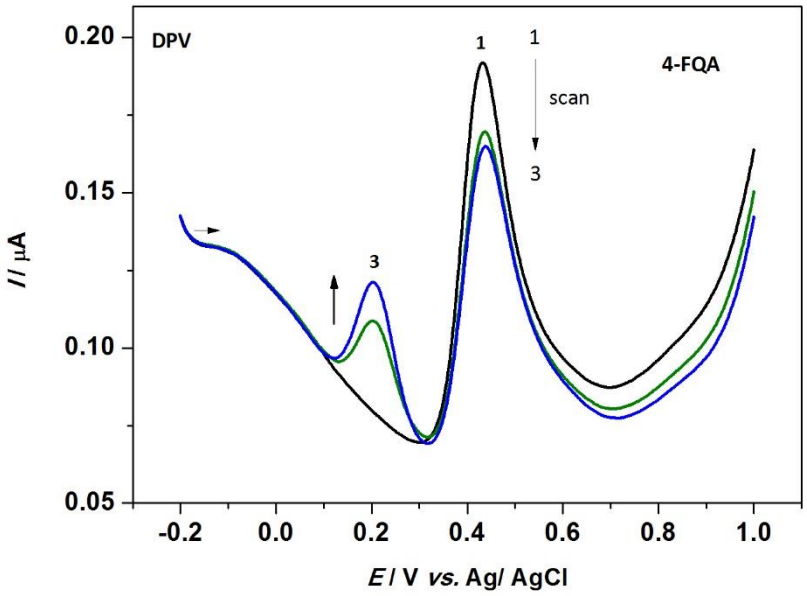
Slika 90 Utjecaj kemijske strukture na diferencijalne pulsne voltamograme otopina feruloil-kina kiselina, 5-hidroksiferulične kiseline i ferulične kiseline, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I).

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

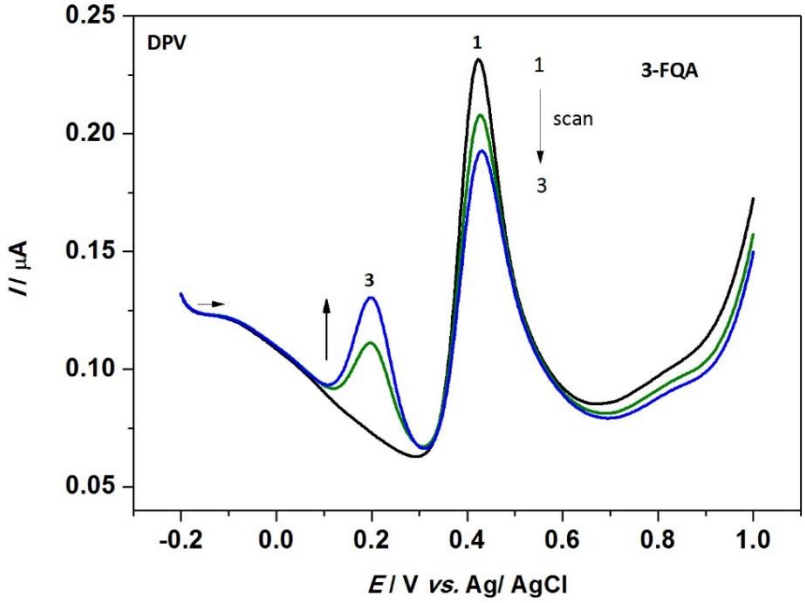
Na **Slikama 91-94** prikazan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na izgled i kemijske karakteristike FQAs i FA.



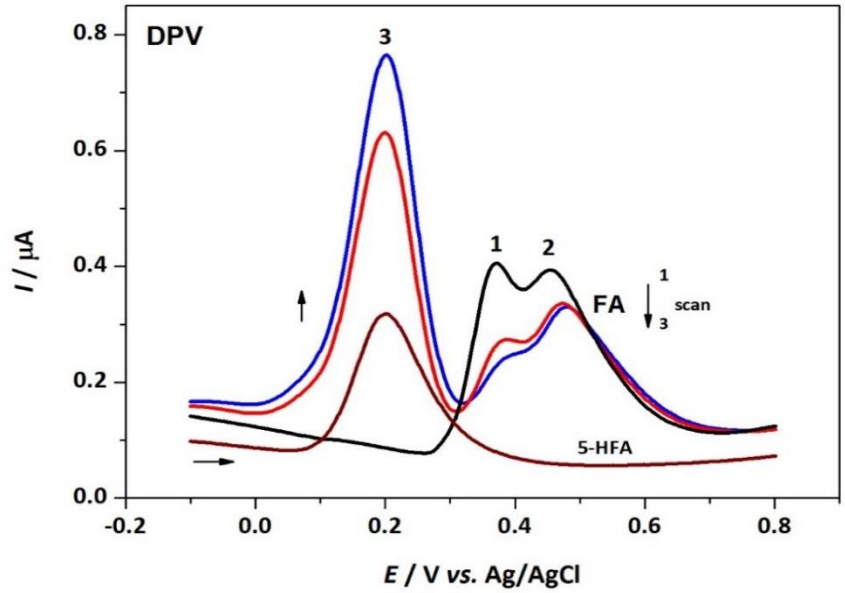
Slika 91 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na diferencijalne pulsne voltamograme otopine 5-FQA, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I).



Slika 92 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na diferencijalne pulsne voltamograme otopine 4-FQA, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I).



Slika 93 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na diferencijalne pulsne voltamograme otopine 3-FQA, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Na slici su prikazani anodni strujni odzivi (I).

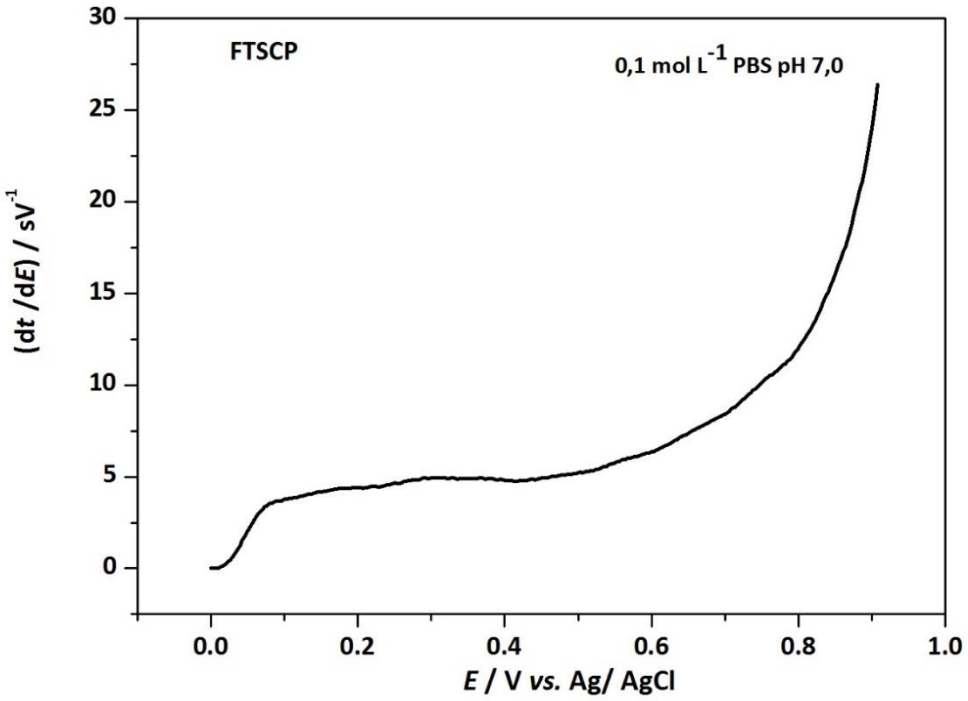


Slika 94 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na diferencijalne pulsne voltamograme otopine ferulične kiseline , $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pufera pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: E_1 = -0,2 V, E_2 = 1,0 V, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan i DP voltamogram otopine 5-HFA (prvi scan).

4.2.4. Protočna *stripping* kronopotenciometrija (FTSCP) klorogenskih kiselina

4.2.4.1. Elektrokemijska priprema radne elektrode

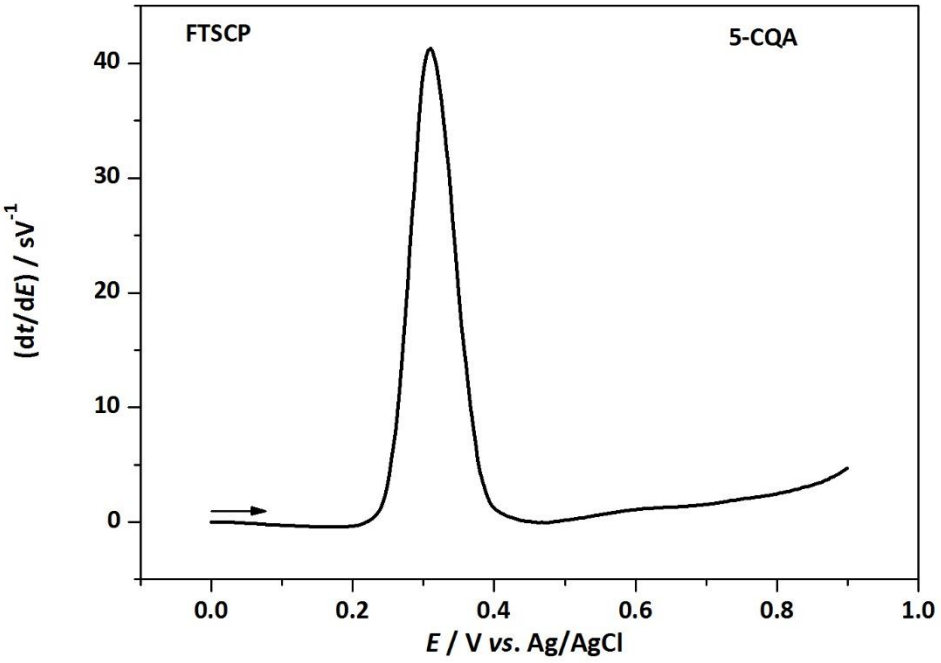
Mjerenja metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije provedena su na mikroporoznoj elektrodi od usitnjenog staklastog ugljika površine elektrode od 5x3 mm. Prije FTSCP mjerenja otopina klorogenskih kiselina i uzoraka kava, provedeno je nekoliko FTSCP mjerenja (pet polarizacija) u otopini 0,1 mol L^{-1} PBS pufera u rasponu potencijala od 0,0 V do 0,9 V sve do uspostavljanja stacionarnog profila kronopotenciograma. Ovaj postupak primijenjen je prije svakog novog mjerenja otopina klorogenskih kiselina ili uzoraka kava. Cilj ovog postupka je stabilizacija odziva i postizanje optimalnog odziva radne elektrode te postizanje bolje reproducibilnosti mjerenja, a ujedno je služilo i za ispiranje sustava (ćelije i elektrode) od prethodno zaostalog analita, budući da su mjerenja provedena u protočnim (hidrodinamičkim) uvjetima. Primjer stacionarnog FTS kronopotenciograma radne mikroporozne elektrode od staklastog ugljika u otopini PBS pH 7,0 prikazan je na **Slici 95**.



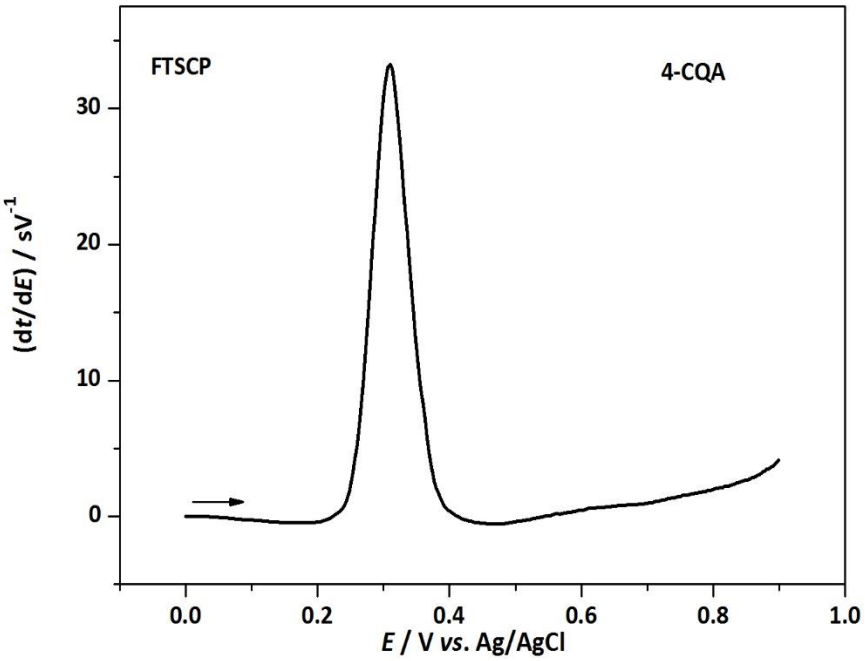
Slika 95 FTS kronopotenciogram u otopini 0,1 mol L^{-1} PBS pufera pH 7,0 na mikroporoznoj elektrodi od staklastog ugljika E54

4.2.4.2. Protočna *stripping* kronopotenciometrija (FTSCP) kafeoilkina kiselina i dikafeoilkina kiselina

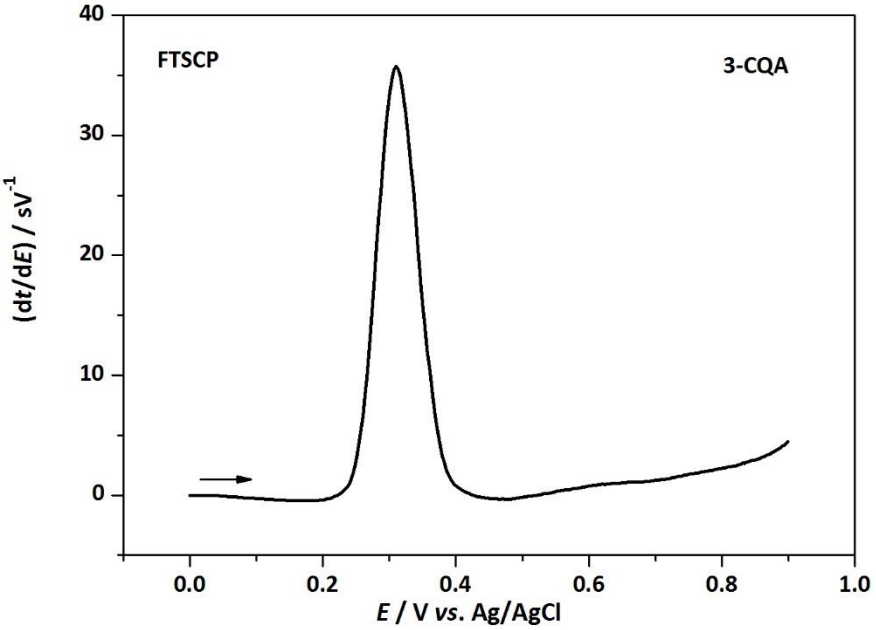
Na **Slikama** od **96** do **102** prikazani su FTS kronopotenciogrami otopina pojedinih CQAs, diCQAs i kafeinske kiseline (CFA), osnovne strukturne jedinice CQAs i diCQAs. Na **Slikama 103-107** prikazan je utjecaj eksperimentalnih uvjeta (kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije te koncentracije) na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma ispitivanih CQAs i diCQA. Kronopotenciogrami na **Slikama 96-103** prikazani su u korigiranom obliku (tj. odbijen je kronopoteciogram PBS pufera), dok su kronopoteciogrami na **Slikama 104-106** prikazani u izvornom obliku, tj. bez odbijanja kromatograma PBS pufera koji je služio kao osnovni elektrolit.



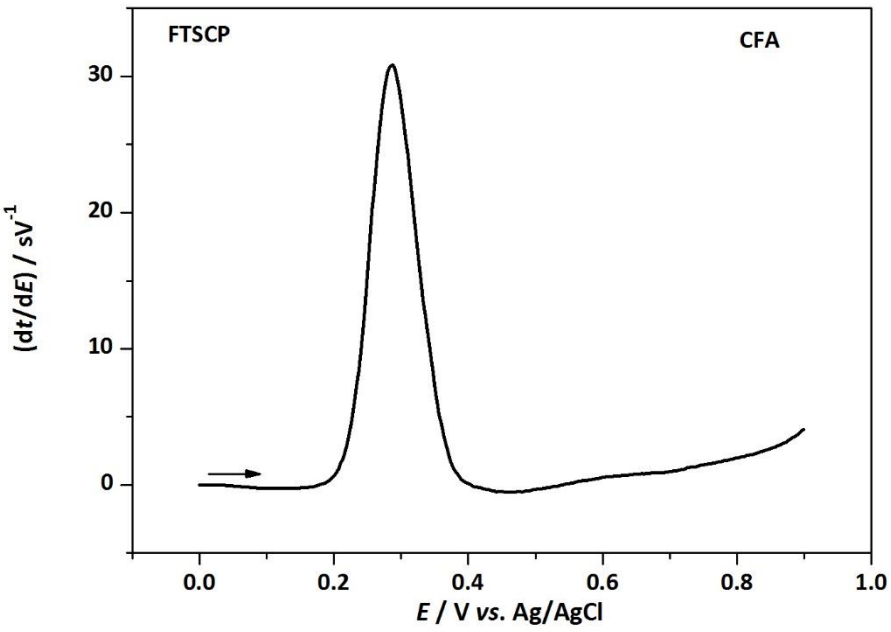
Slika 96 FTS kronopotenciogram otopine 5-CQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



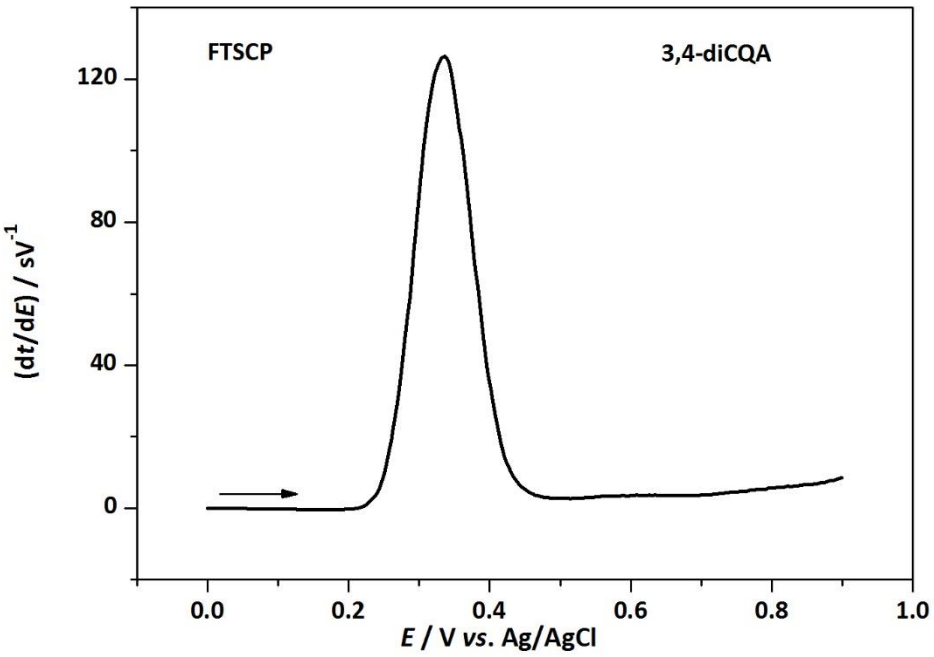
Slika 97 FTS kronopotenciogram otopine 4-CQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



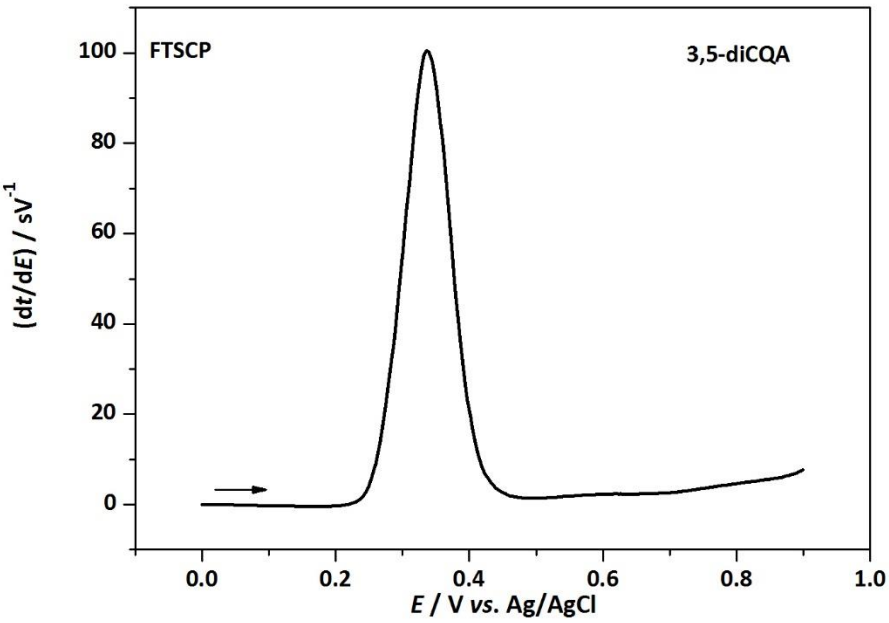
Slika 98 FTS kronopotenciogram otopine 3-CQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



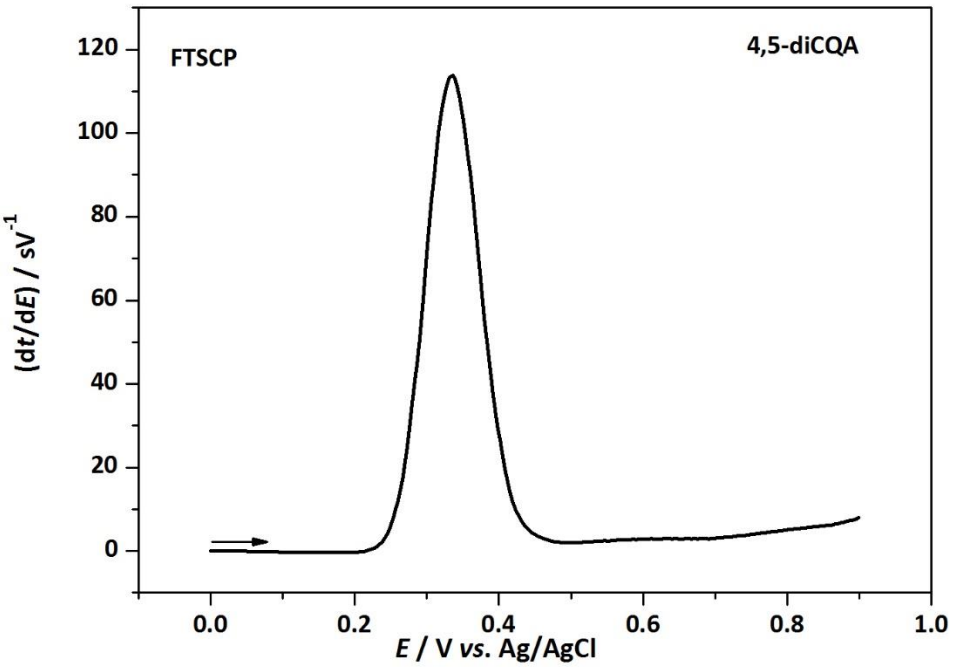
Slika 99 FTS kronopotenciogram otopine kafeinske kiseline, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



Slika 100 FTS kronopotenciogram otopine 3,4-diCQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



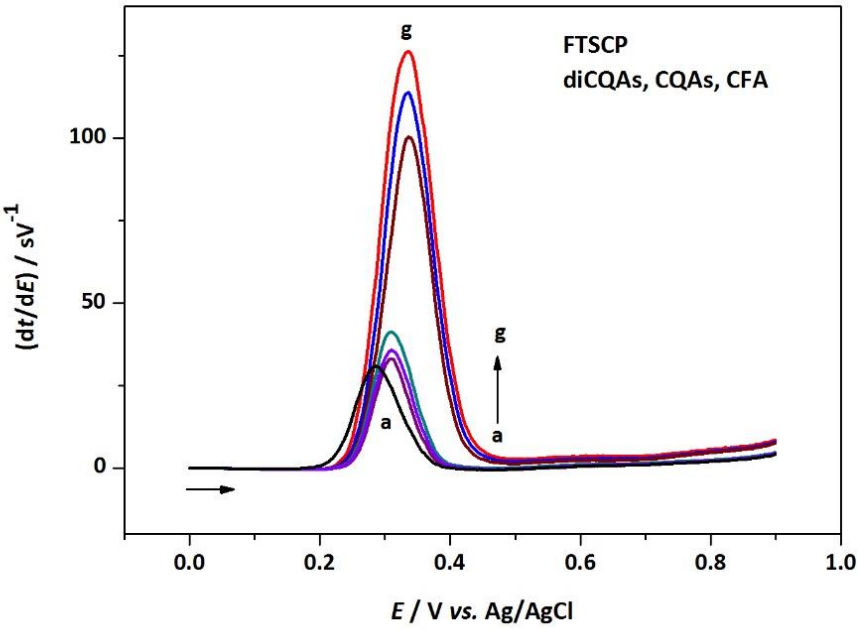
Slika 101 FTS kronopotenciogram otopine 3,5-diCQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



Slika 102 FTS kronopotenciogram otopine 4,5-diCQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).

Utjecaj kemijske strukture

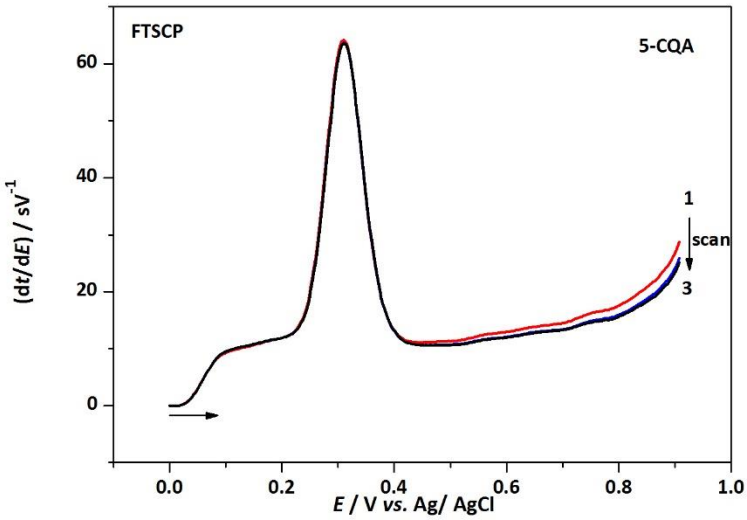
Na **Slici 103** prikazan je utjecaj kemijske strukture CQAs, diCQAs i CFA na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma navedenih spojeva.



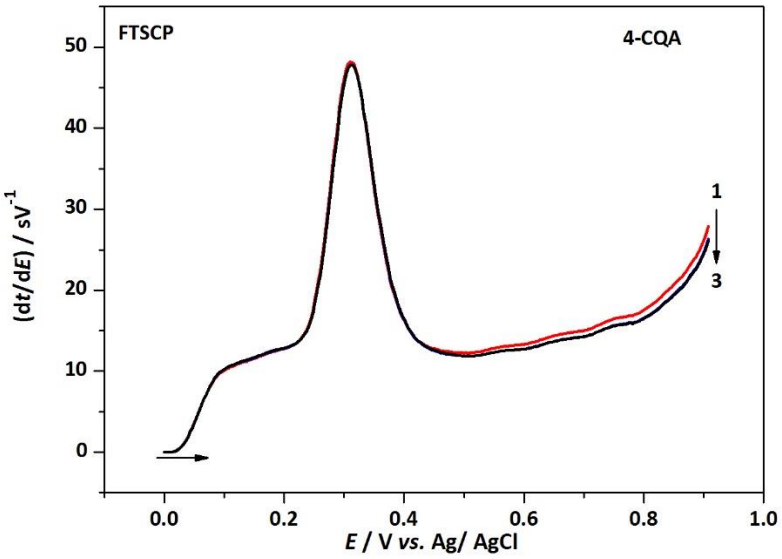
Slika 103 Utjecaj kemijske strukture na FTS kronopotenciograme otopina: (a) CFA; (b) 3-CQA; (c) 4-CQA; (d) 5-CQA; (e) 3,5-diCQA; (f) 4,5-diCQA; (g) 3,4-diCQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

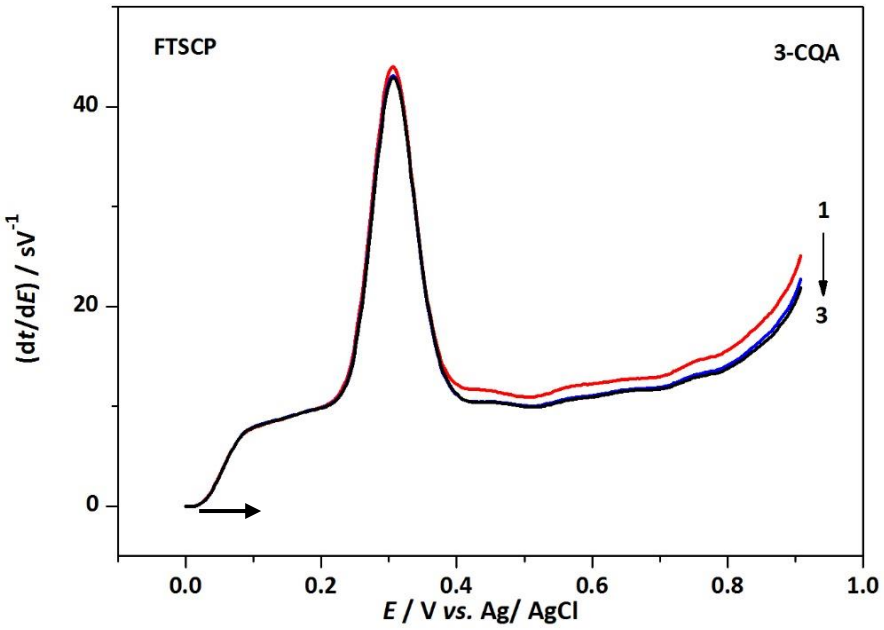
Na **Slikama 104-106** prikazan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma CQAs.



Slika 104 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na FTS kronopotenciograme otopine 5-CQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



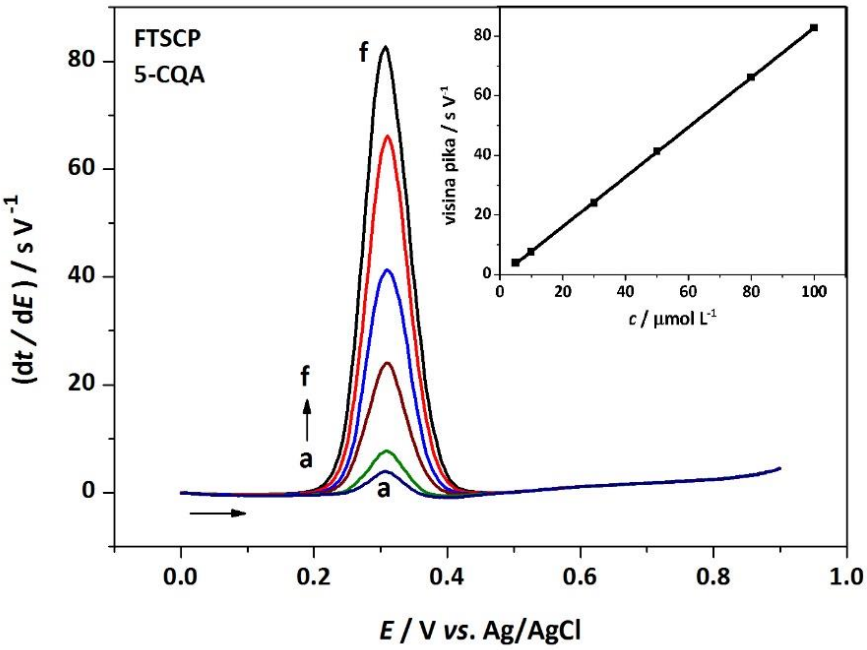
Slika 105 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na FTS kronopotenciograme otopine 4-CQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



Slika 106 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na FTS kronopotenciograme otopine 3-CQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).

Utjecaj koncentracije

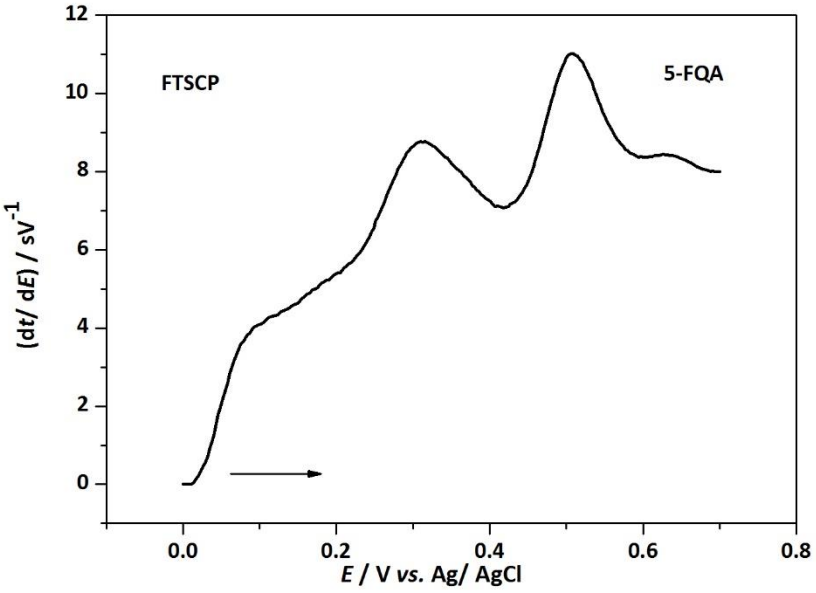
Na **Slici 107** prikazan je utjecaj koncentracije otopine 5-CQA u rasponu od 5-100 µmol L^{-1}, na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma 5-CQA. Ova FTSCP mjerenja poslužila su za izradu kalibracijske krivulje pomoću koje je izvršena kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u ispitivanim uzorcima kava FTSCP metodom.



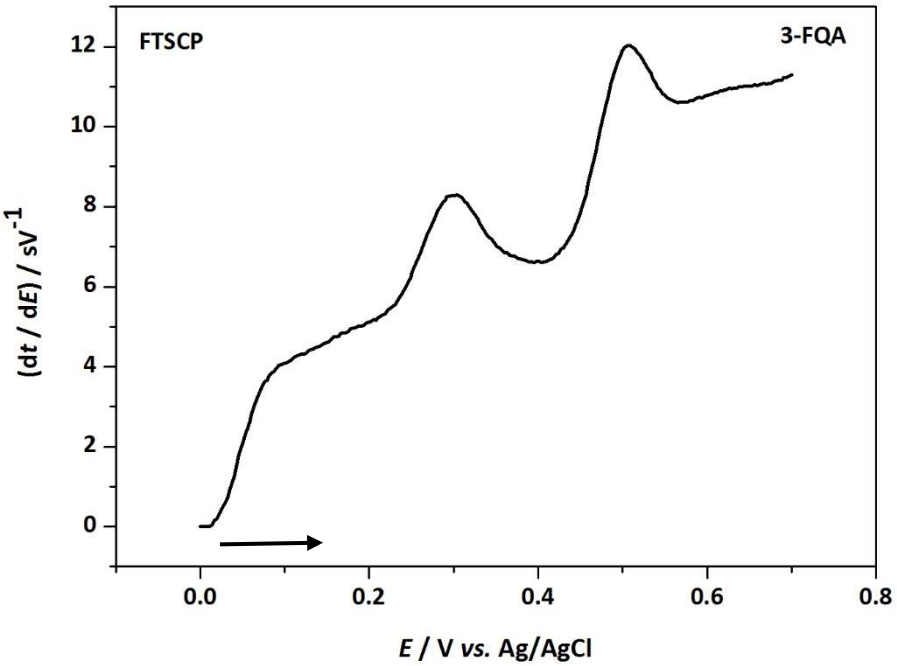
Slika 107 Utjecaj koncentracije otopine 5-CQA na FTS kronopotenciograme (korekcija bazne linije) u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio), *c* = (a) 5 µmol L^{-1}, (b) 10 µmol L^{-1}, (c) 30µmol L^{-1}, (d) 50 µmol L^{-1}, (e) 80 µmol L^{-1}, (f) 100 µmol L^{-1}. Detalj: ovisnost visine pika FTS kronopotenciograma o koncentraciji otopine 5-CQA.

4.2.4.3.Protočna stripping kronopotenciometrija (FTSCP) feruloilkina kiselina

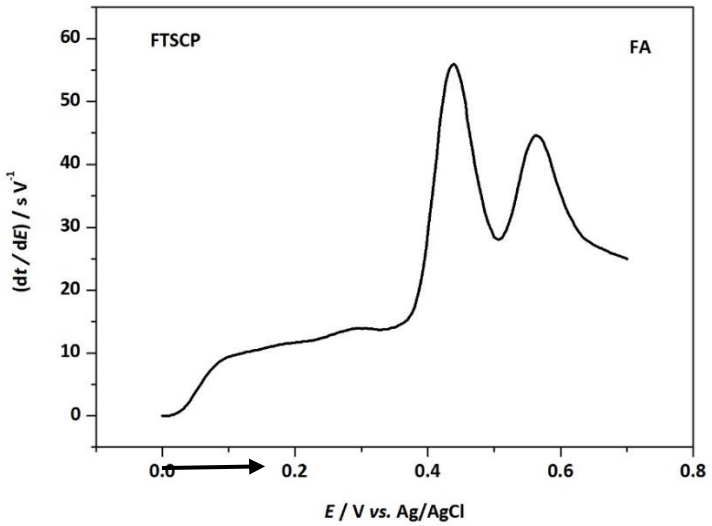
Na Slikama **108-110** prikazani su FTS kronopotenciogrami FQAs i ferulične kiseline (FA), osnovne strukturne jedinice FQAs. Utjecaj eksperimentalnih uvjeta (kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije i naknadne polarizacije radne elektrode uz ispiranje sustava osnovim elektrolitom, PBS puferom, kao priprema za slijedeće FTSCP mjerenje) na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma prikazani su na **Slikama 111-114**.



Slika 108 FTS kronopotenciogram otopine 5-FQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



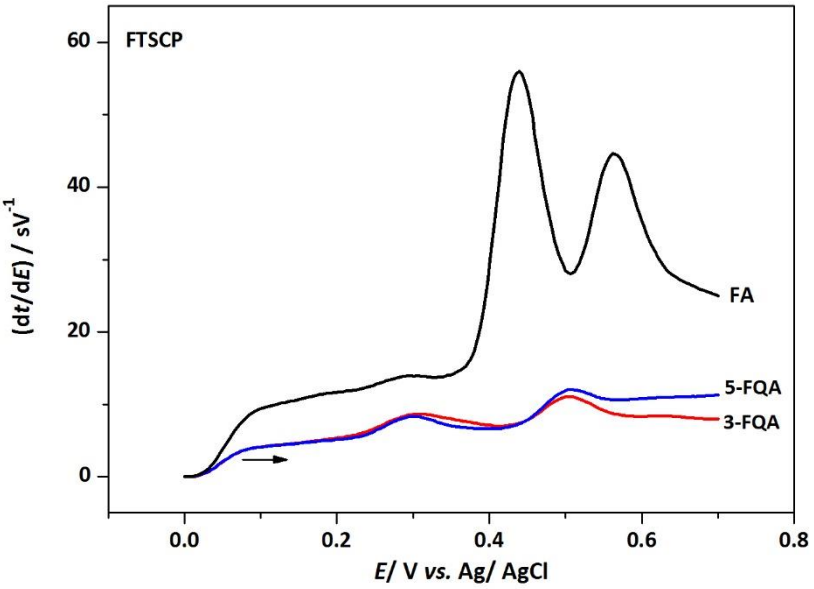
Slika 109 FTS kronopotenciogram otopine 3-FQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



Slika 110 FTS kronopotenciogram otopine ferulične kiseline, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).

Utjecaj kemijske strukture

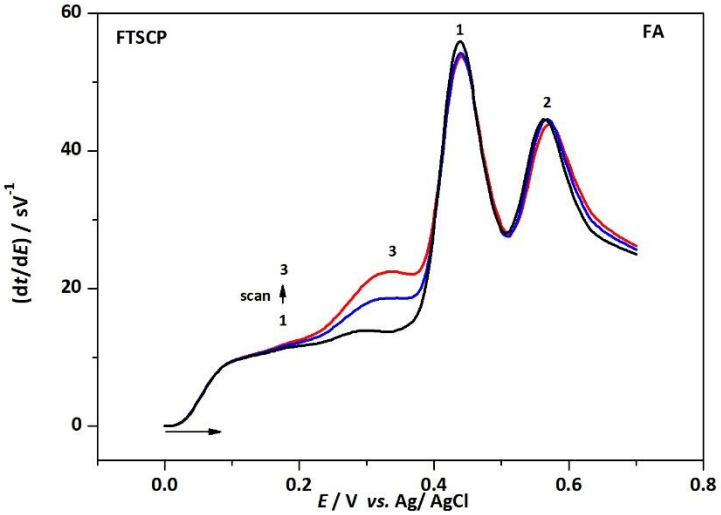
Na **Slici 111** prikazan je utjecaj kemijske strukture na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma 5-FQA i 3-FQA te ferulične kiseline (FA).



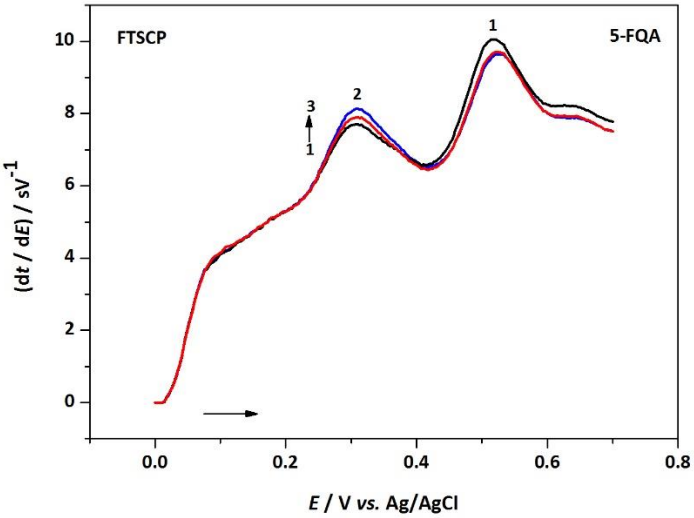
Slika 111 FTS kronopotenciogrami otopine ferulične kiseline i otopina 5-FQA i 3-FQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

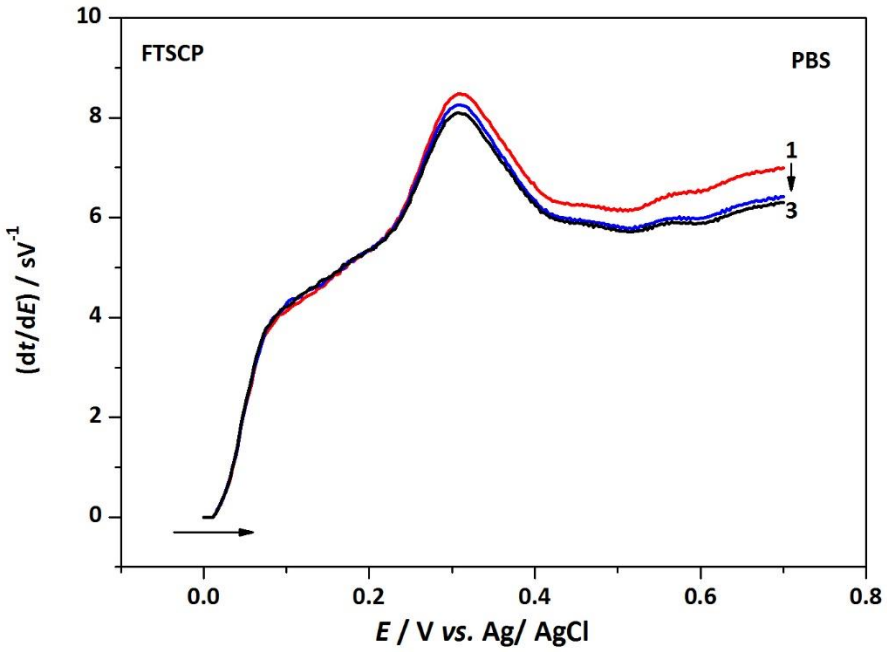
Na **Slikama 112-114** prikazan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na izgled i elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma ferulične kiseline (FA) i 5-FQA te kronopotenciograma PBS pufera nakon mjerenja u otopini 5-FQA.



Slika 112 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na kronopotenciograme otopine ferulične kiseline, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).



Slika 113 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na kronopotenciograme otopine 5-FQA, $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti kao u **Tablici 12** (Eksperimentalni dio).

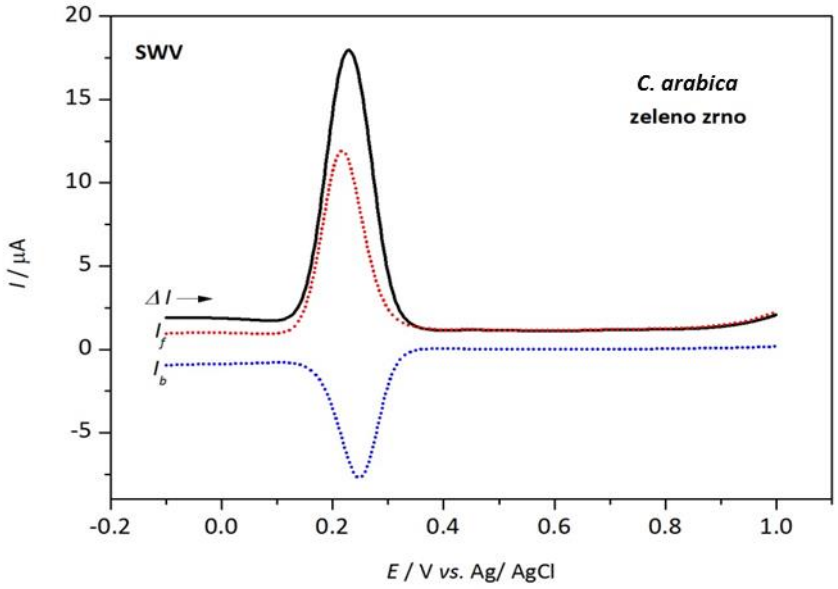


Slika 114 FTS kronoptenciogrami snimljeni nakon polarizacije 5-FQA u otopini 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0.

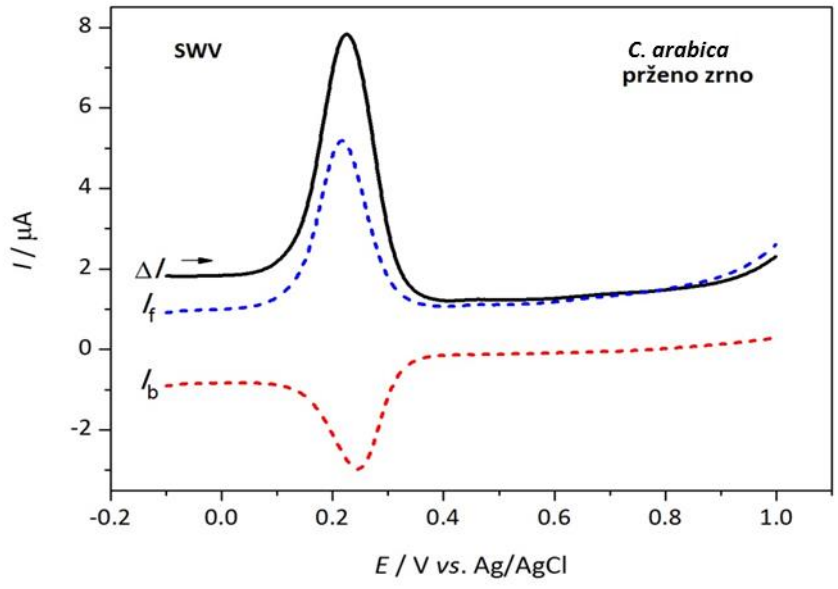
4.3. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PRAVOKUTNOVALNE VOLTAMETRIJE

4.3.1. Pravokutnovalna voltametrija vodenih ekstrakata kava

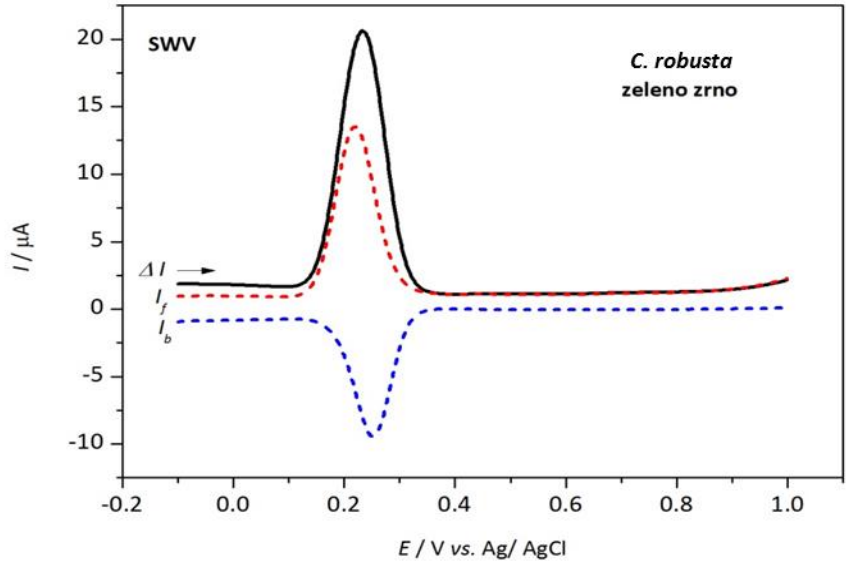
Na **Slikama** od **115** do **124** prikazani su pravokutnovalni voltamogrami vodenih ekstrakata kava, pripremljenih prema ranije opisanom postupku ekstrakcije, dobiveni u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti pravokutnovalne voltametrije: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Zelena zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* razrijeđena su u omjeru 1/100 (DF = 100), dok su pržena zrna kava *C. arabica* i *C. robusta*, mljevene kave i instant kave razrijeđene u omjeru 1/50 (DF = 50).



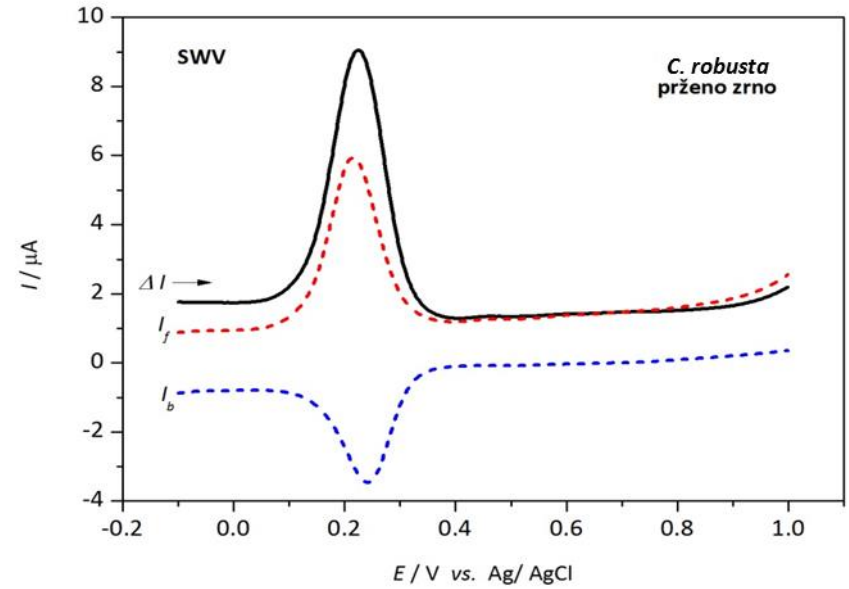
Slika 115 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea arabica* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



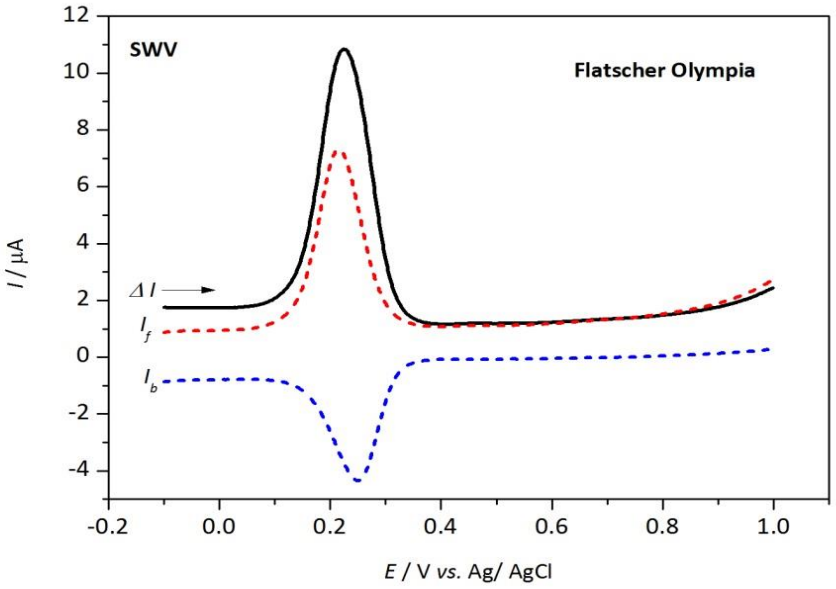
Slika 116 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta prženog zrna *Coffea arabica* (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



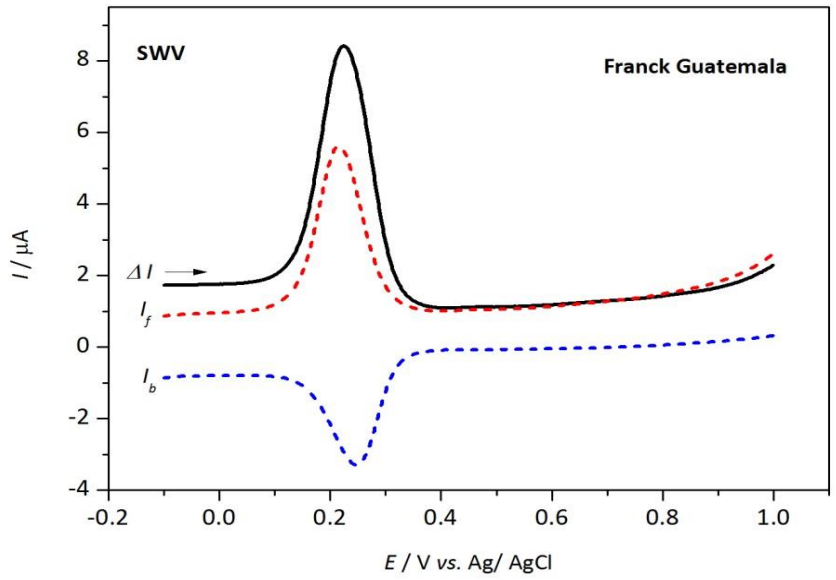
Slika 117 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea robusta* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



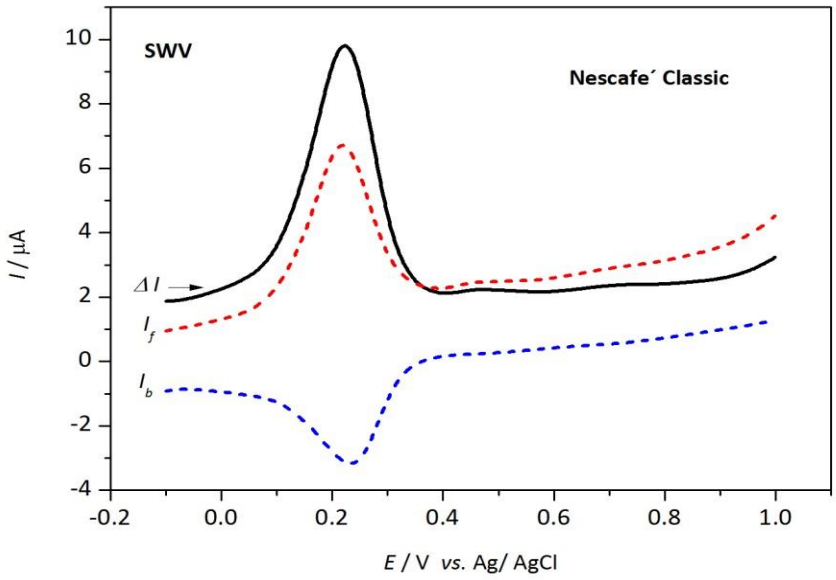
Slika 118 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta prženog zrna *Coffea robusta* (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



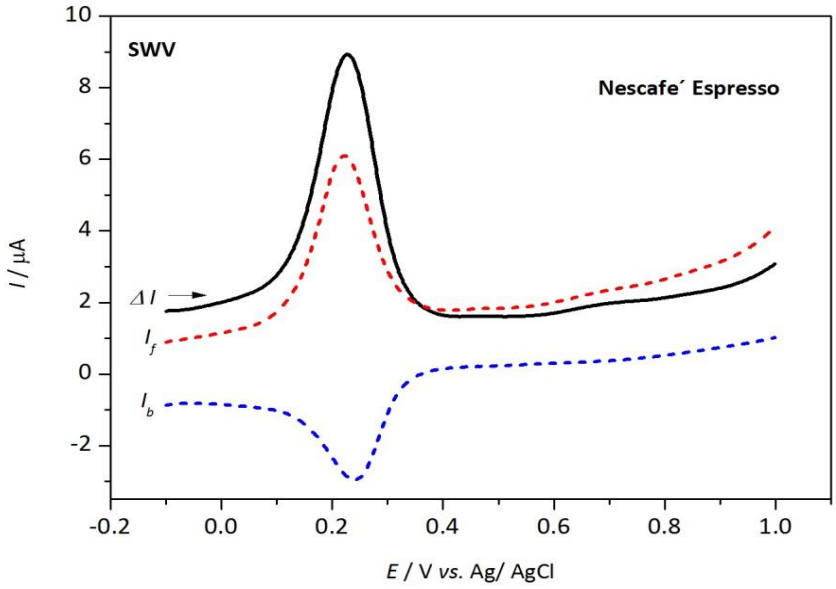
Slika 119 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Flatscher Olympia (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupi strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



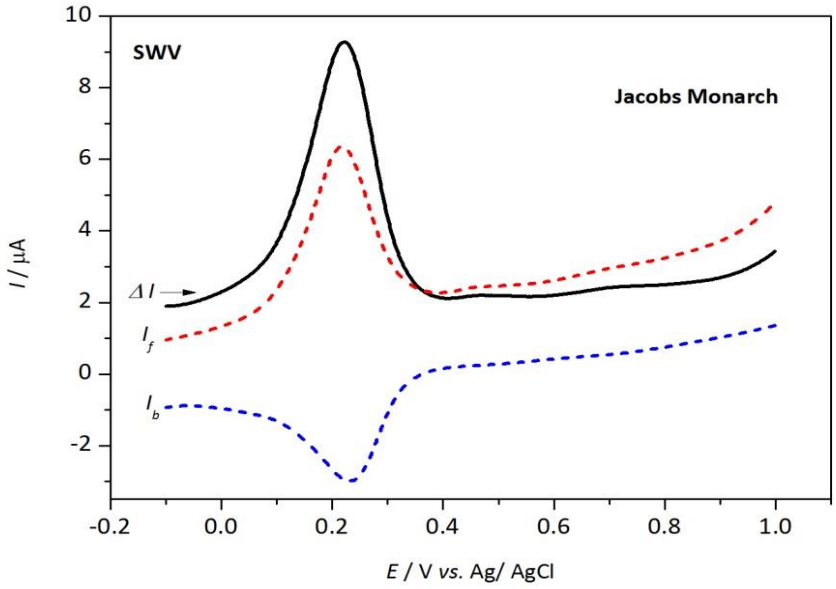
Slika 120 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Franck Guatemala (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



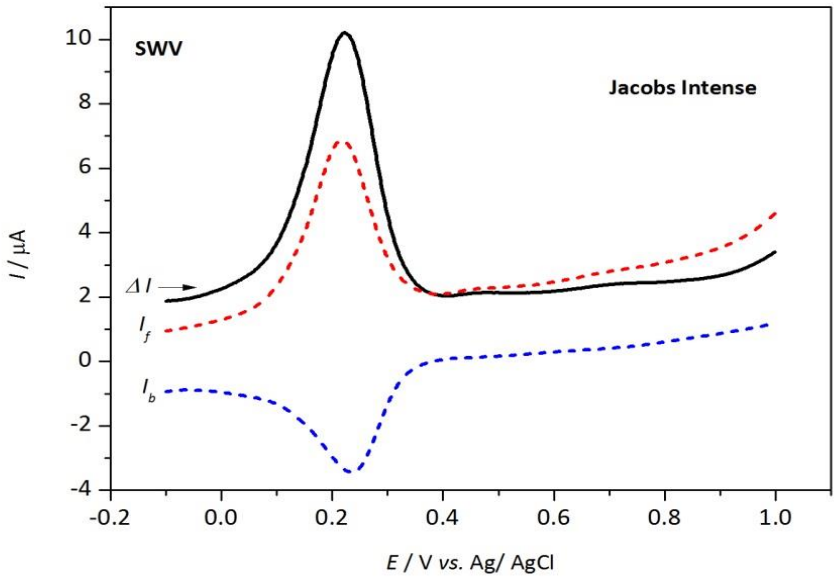
Slika 121 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Classic (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



Slika 122 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Espresso (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



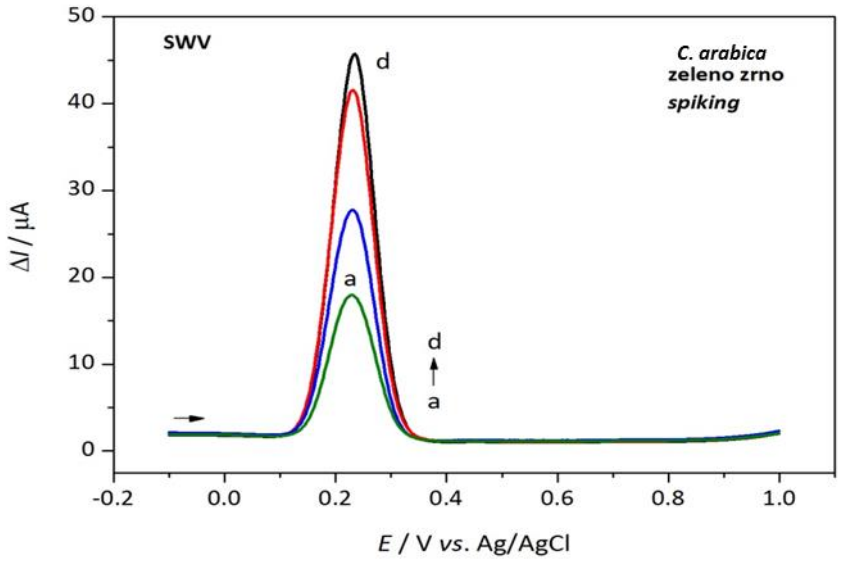
Slika 123 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Monarch (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.



Slika 124 Pravokutnovalni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Intense (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI) te početna (I_f) i povratna (I_b) komponenta ukupne struje.

4.3.2. Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom pravokutnovalne voltametrije

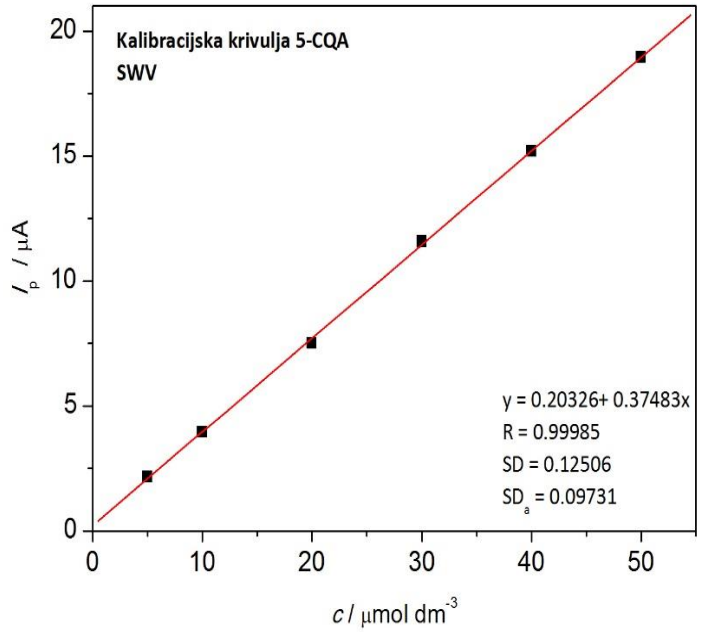
Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava provedena je na osnovi uspoređivanja izgleda SW voltamograma kava i klorogenskih kiselina, uspoređivanjem vrijednosti potencijala oksidacijskog pika uzoraka kava s vrijednostima potencijala oksidacijskih pikova CQAs i diCQAs te dodavanjem poznate količine pojedinih klorogenskih kiselina u uzorke kava (*spiking*). Primjer obogaćivanja uzoraka kava dodavanjem standarda tj. pojedinih klorogenskih prikazan je na uzorku vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea arabica* (*DF* = 100). U uzorak kave (voltamogram a) dodana je poznata koncentracija c=1·10^{-5} mol L^{-1} otopine standarda: 5-CQA (voltamogram b); 3,5-diCQA (voltamogram c) i 4,5-diCQA (voltamogram d). Dobiveni SW voltamogrami prikazani na **Slici 125.** Slični eksperimenti „*spikinga*" provedeni su i na nekim drugim uzorcima kava i pokazali su isti učinak. Ovi rezultati jasno ukazuju da oksidacijski pik koji se pojavljuje na SW voltamogramima svih uzoraka kava, pripada oksidaciji smjese CQAs i diCQAs koje su prisutne u svim uzorcima kava.



Slika 125 Pravokutnovalni voltamogrami vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea arabica* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. (a) *C. arabica*; (b) *C. arabica* + 1·10^{-5} mol L^{-1} 5-CQA; (c) *C. arabica* + 1·10^{-5} mol L^{-1} 3,5-diCQA; (d) *C. arabica* + 1·10^{-5} mol L^{-1} 4,5-diCQA. Eksperimentalni uvjeti: f = 50 Hz, E_{sw} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije, v= 100 mV/s. E_1=-0,1 V, E_2=1,0 V. Na slici je prikazan ukupni strujni odziv (ΔI).

4.3.3. Kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom pravokutnovalne voltametrije

Na **Slici 126** prikazana je kalibracijska krivulja dobivena iz pravokutnovalnih voltamograma otopine 5-CQA, koja je odabrana kao standard (budući da je ona najzastupljenija klorogenska kiselina u kavama), u rasponu množinskih koncentracija od 5 µmol L^{-1} do 50 µmol L^{-1}. Na temelju kalibracijske krivulje i iznosa struje oksidacijskih pikova (I_p)uzoraka kave, provedena je kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava. Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina izražen je kao mg 5-CQA ekvivalenata po 100 g kave (5-CQAE/100 g kave). Dobiveni sadržaji ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-*total*) za sve ispitivane uzorke kava prikazani su u **Tablici 17**.



Slika 128 Kalibracijska krivulja otopine 5-CQA korištena za kvantifikaciju sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina metodom pravokutnovalne voltametrije

Tablica 17 Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-total) u uzorcima kava, dobiven metodom pravokutnovalne voltametrije (SWV)

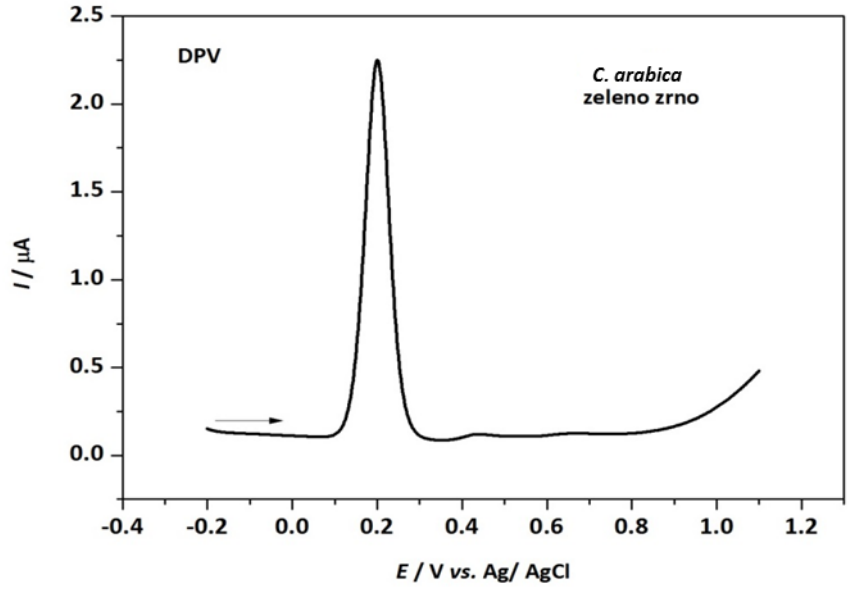
Uzorak kave	Ukupne klorogenske kiseline (mg 5-CQAE/ 100 g kave)
C. arabica, Rio Minas, Brazil (zelena zrna)	7631
C. arabica, Rio Minas, Brazil (pržena zrna)	2730
C. robusta, Cherry, Indija (zelena zrna)	9411
C. robusta, Cherry, Indija (pržena zrna)	3186
Flatscher Olympia (mljevena kava, 100% Arabica)	4278
Franck Guatemala (mljevena kava, 100% Arabica)	3914
Nescafé Classic (*instant* kava)	3566
Nescafé Espresso (*instant* kava)	3429
Jacobs Monarch (*instant* kava)	3447
Jacobs Intense (*instant* kava)	3796

-Rezultati predstavljalju srednju vrijednost pet međusobno neovisnih mjerenja (n=5)

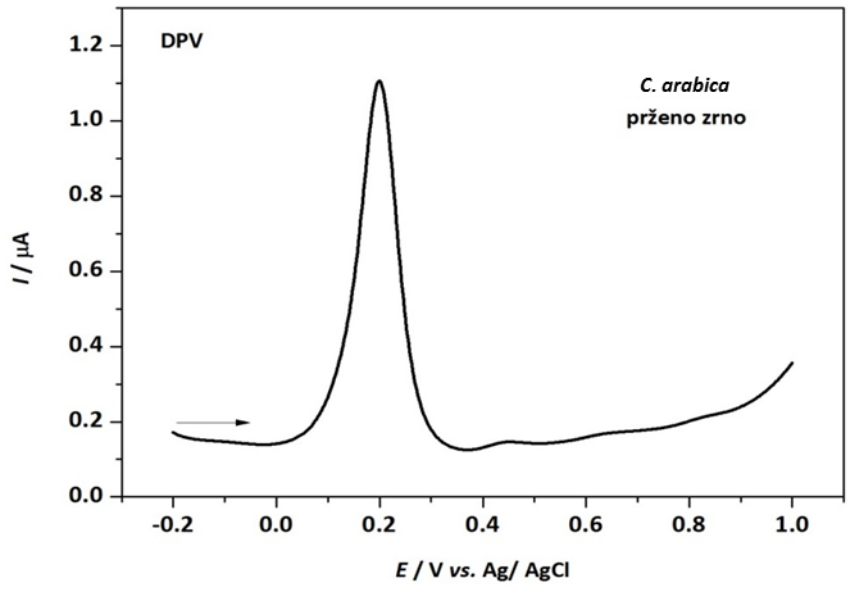
4.4. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE

4.4.1. Diferencijalna pulsna voltametrija vodenih ekstrakata kava

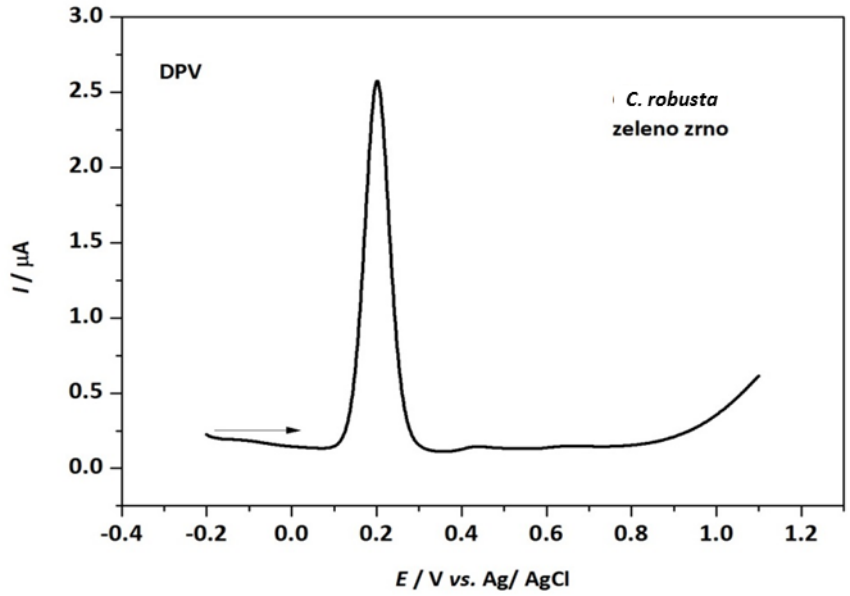
Na **Slikama** od **127** do **136** prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami vodenih ekstrakata kava, pripremljenih prema ranije opisanom postupku ekstrakcije, dobiveni u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti diferencijalne pulsne voltametrije: E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Zelena zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* razrijeđena su u omjeru 1/100 (DF = 100), a pržena zrna kava *C. arabica* i *C. robusta*, mljevene kave i *instant* kave razrijeđene su u omjeru 1/50 (DF = 50).



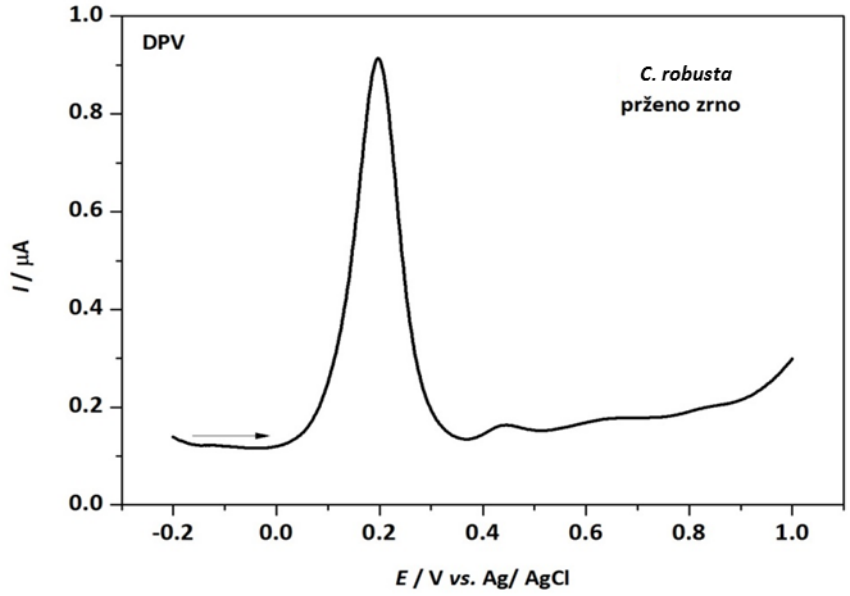
Slika 127 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea arabica* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



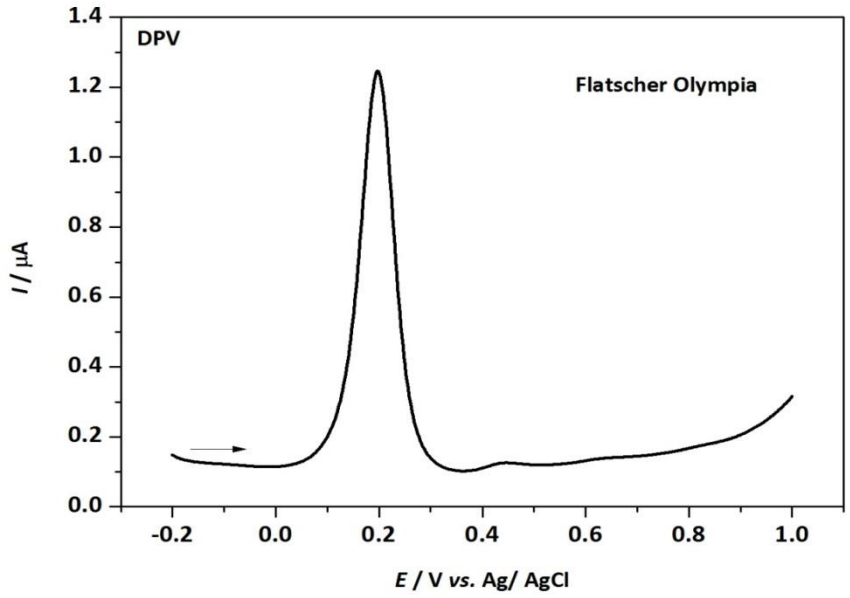
Slika 128 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta prženog zrna *Coffea arabica* (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV i efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



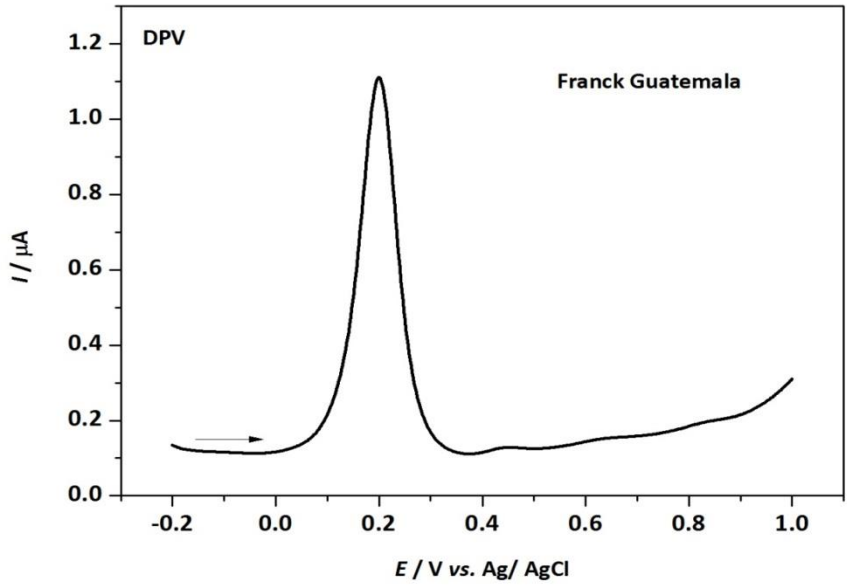
Slika 129 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea robusta* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



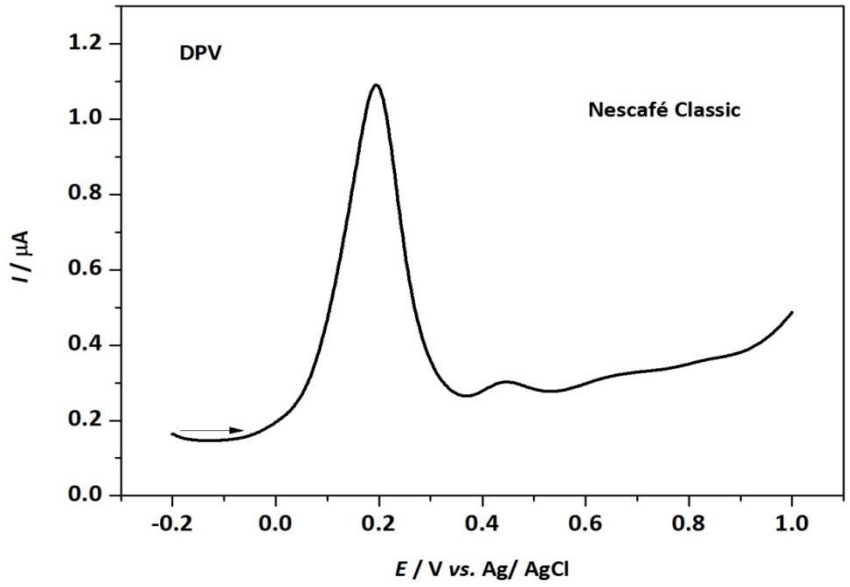
Slika 130 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta prženog zrna *Coffea robusta* (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni val odziv (*I*).



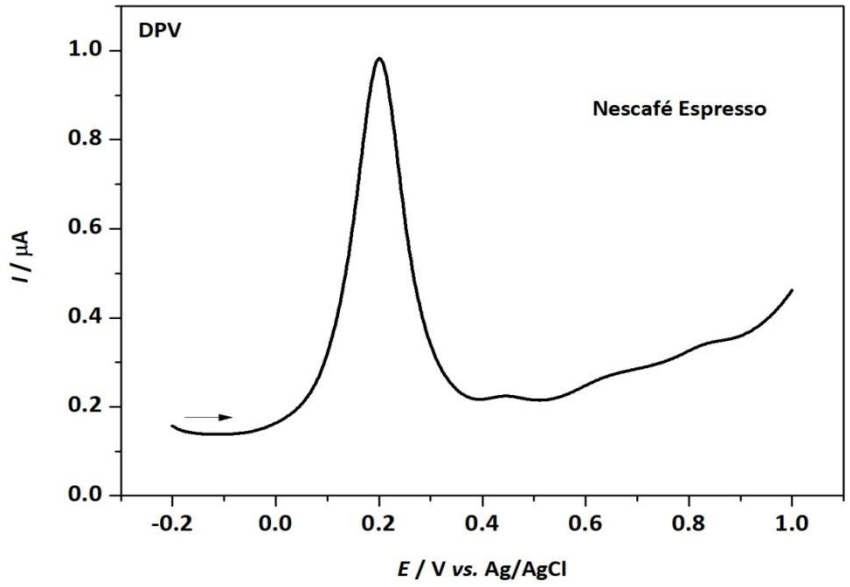
Slika 131 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Flatscher Olympia (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



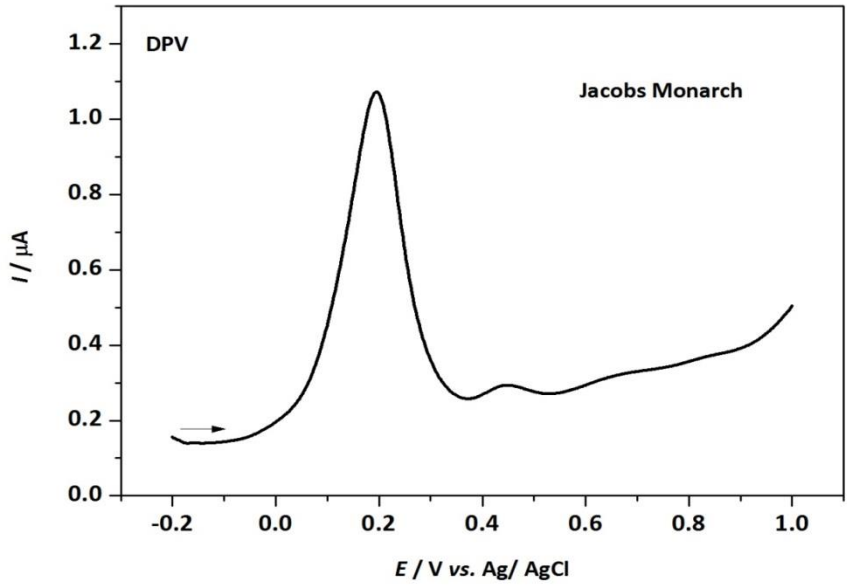
Slika 132 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta mljevene kave Franck Guatemala (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



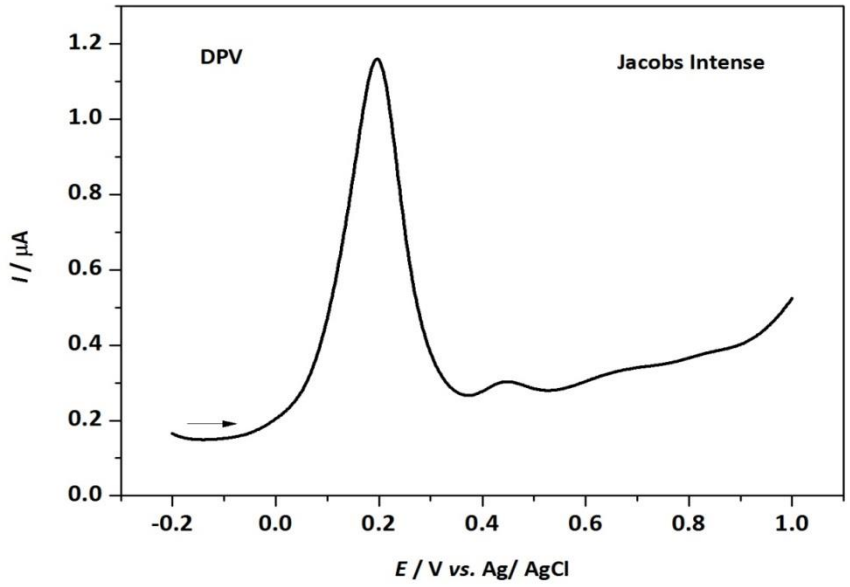
Slika 133 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Classic (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



Slika 134 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Espresso (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



Slika 135 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Monarch (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



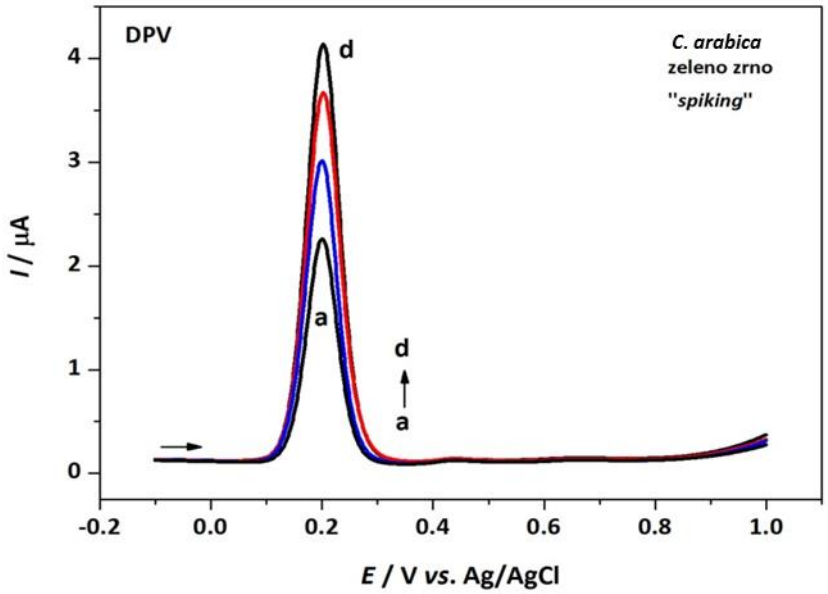
Slika 136 Diferencijalni pulsni voltamogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Intense (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 200 mV, E_2 = 1000 mV, E_{DPV} = 50 mV, ΔE = 2 mV, efektivna brzina polarizacije (v = 5 mV/s). Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).

4.4.2. Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom diferencijalne pulsne voltametrije

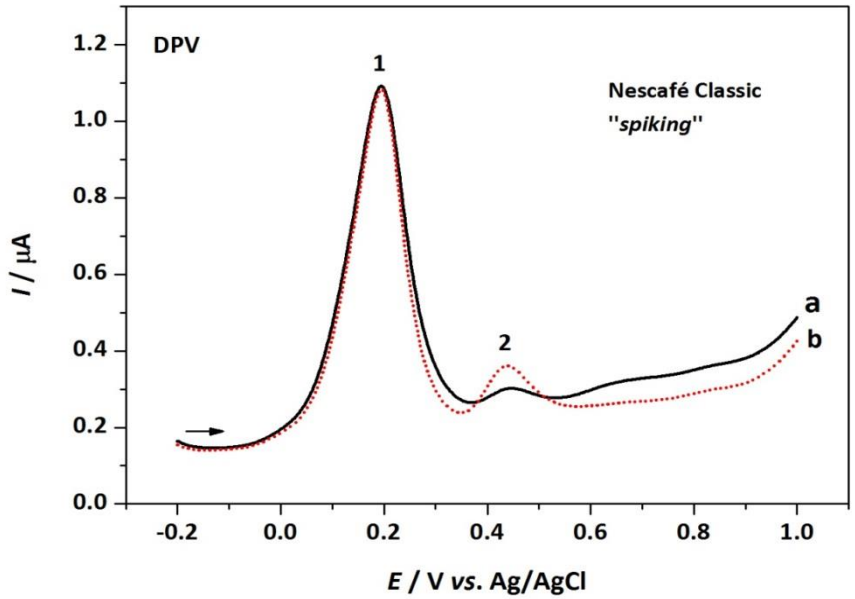
Identifikacija klorogenskih kiselina prisutnih u vodenim ekstraktima kava, provedena je na osnovi uspoređivanja izgleda DP voltamograma uzoraka kava i DP voltamograma klorogenskih kiselina, uspoređivanjem vrijednosti potencijala oksidacijskih pikova (pika 1 i pika 2) uzoraka kava s vrijednostima potencijala oksidacijskih pikova CQAs i diCQAs (za prvi oksidacijski pik) te vrijednostima oksidacijskog potencijala FQAs (za drugi oksidacijski pik). Dodatna identifikacija provedena je dodavanjem poznate količine pojedinih klorogenskih kiselina u uzorke kava. Obogaćivanje uzoraka kave dodavanjem standarda CQAs i diCQAs u vodene ekstrakte kava prikazan je na primjeru vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea arabica* (*DF* = 100) za identifikaciju pika 1, dok je identifikacija drugog oksidacijskog pika prisutnog u kavama prikazana na primjeru obogaćivanja uzorka kave Nescafe Classic (DF=50) dodatkom otopine 5-CQA.

Identifikacija prisustva CQAs i diCQAs tj. njihove oksidacije na potencijalu prvog oksidacijskog pika opaženog u svim uzorcima kava, prikazana je na primjeru vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea arabica* (*DF* = 100), tako da su dodane poznate koncentracije otopina 5-CQA; 3,4-diCQA i 4,5-diCQA u uzorak kave *C. arabica* zeleno zrno (*spiking*) (**Slika 137**). Identifikacija CGAs koje oksidiraju na potencijalu drugog oksidacijskog pika u kavama, prikazana je na primjeru obogaćivanja uzorka *instant* kave Nescafé Classic (*DF* = 50) i to tako da je u uzorak kave dodana poznata koncentracija otopine 5-FQA (*spiking*) (**Slika 138).**

Slični eksperimenti „*spikinga*“ provedeni su i na nekim drugim uzorcima kava i pokazali su isti učinak. Ovi rezultati jasno ukazuju da prvi oksidacijski pik koji se jasno uočava na DP voltamogramima svih uzoraka kava, pripada oksidaciji smjese CQAs i diCQAs koje su prisutne u svim uzorcima kava u značajnim količinama. Drugi oksidacijski pik prisutan na DP voltamogramima svih uzoraka kava puno je slabije izražen i pripada oksidaciji FQAs koje su znatno manje zastupljene u ispitivanim uzorcima kava (kako to pokazuju rezultati HPLC analize).



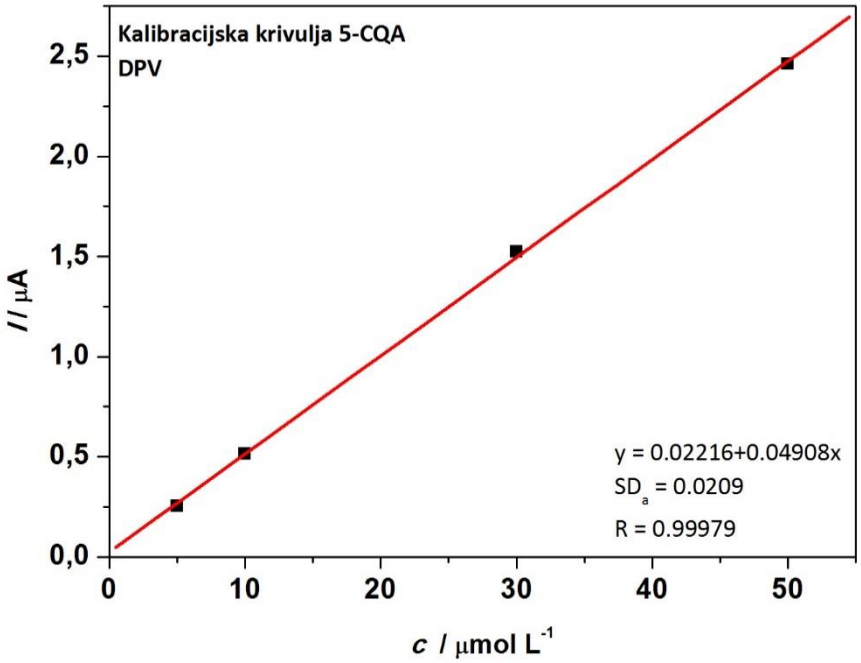
Slika 137 Diferencijalni pulsni voltamogrami vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea arabica* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0. (a), *C. arabica*; (b) *C. arabica* + $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-CQA; (c) *C. arabica* + $1 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 3,4-diCQA; (d) *C. arabica* + $1 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 4,5-diCQA. Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).



Slika 138 Diferencijalni pulsni voltamogrami vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Classic (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. (a) Nescafé Classic; (b) Nescafé Classic + $2 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-FQA. Na slici je prikazan anodni strujni odziv (*I*).

4.4.3. Kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom diferencijalne pulsne voltametrije

Na **Slici 139** prikazana je kalibracijska krivulja dobivena na osnovi diferencijalnih pulsnih voltamograma otopine 5-CQA koja je odabrana kao standard (budući da je ona najzastupljenija klorogenska kiselina u kavama), u rasponu množinskih koncentracija od 5 µmol L^{-1} do 50 µmol L^{-1} . Na temelju kalibracijske krivulje i iznosa struje oksidacijskih pikova (I_p) 1 i 2., tj. sume vrijednosti struja prvog i drugog oksidacijskog pika za pojedini uzorak kave, provedena je kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava. Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina izražen je u mg 5-CQA ekvivalenata po 100 g kave (5-CQAE/100 g kave). Dobiveni sadržaji ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-*total*) za sve ispitivane uzorke kava prikazani su u **Tablici 18**.



Slika 139 Kalibracijska krivulja otopine 5-CQA korištena za kvantifikaciju sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina metodom diferencijalne pulsne voltametrije.

Tablica 18 Sadržaji ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-total) u uzorcima kava, dobiveni metodom diferencijalne pulsne voltametrije (DPV)

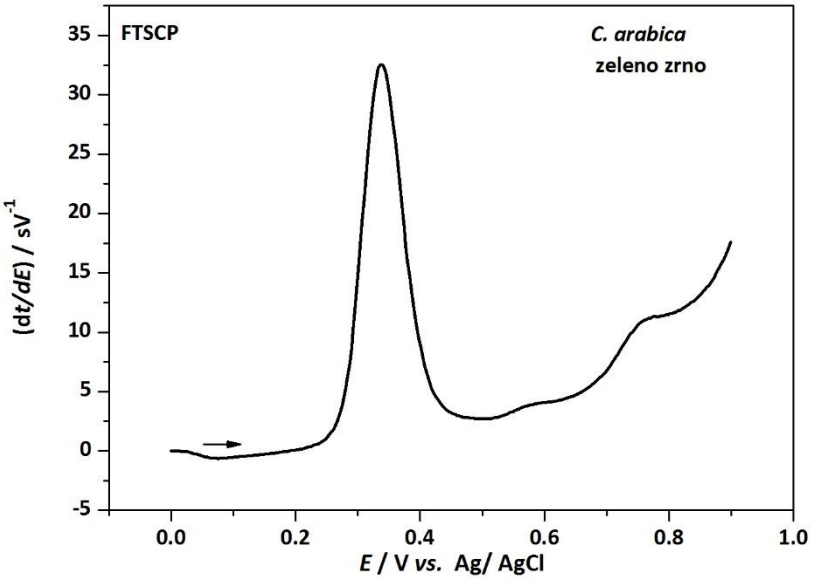
Uzorak kave	Ukupne klorogenske kiseline (mg 5-CQAE/ 100g)
C. arabica, Rio Minas, Brazil (zelena zrna)	7451
C. arabica, Rio Minas, Brazil (pržena zrna)	2630
C. robusta, Cherry, Indija (zelena zrna)	9115
C. robusta, Cherry, Indija (pržena zrna)	2852
Flatscher Olympia (mljevena kava, 100% Arabica)	4101
Franck Guatemala (mljevena kava, 100% Arabica)	3574
Nescafé Classic (*instant* kava)	3283
Nescafé Espresso (*instant* kava)	3229
Jacobs Monarch (*instant* kava)	3203
Jacobs Intense (*instant* kava)	3465

-Rezultati predstavljalju srednju vrijednost pet međusobno neovisnih mjerenja (n=5)

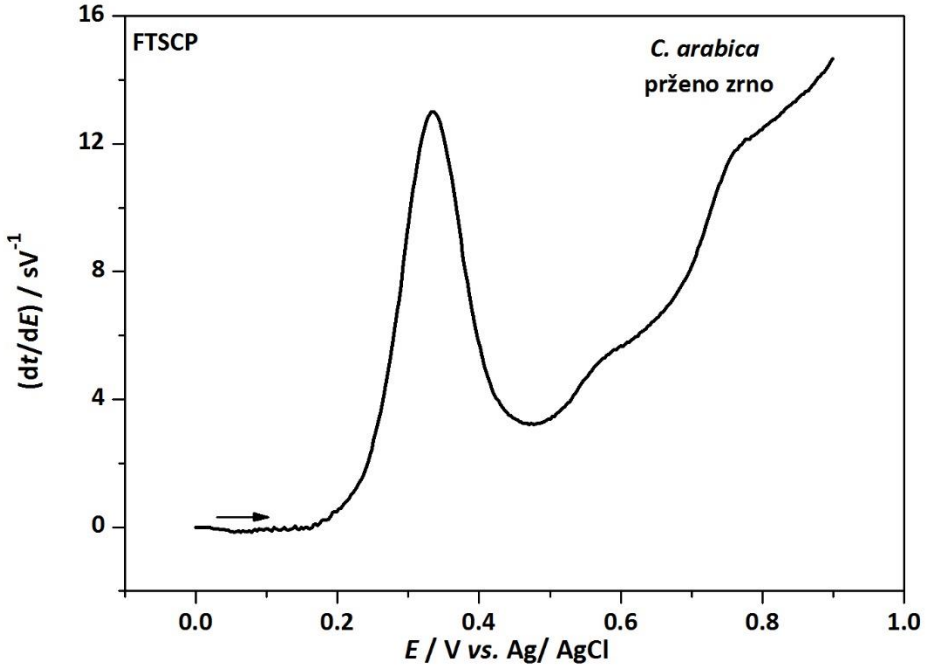
4.5. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PROTOČNE *STRIPPING* KRONOPOTENCIOMETRIJE

4.5.1. Protočna *stripping* kronopotenciometrija vodenih ekstrakata kava

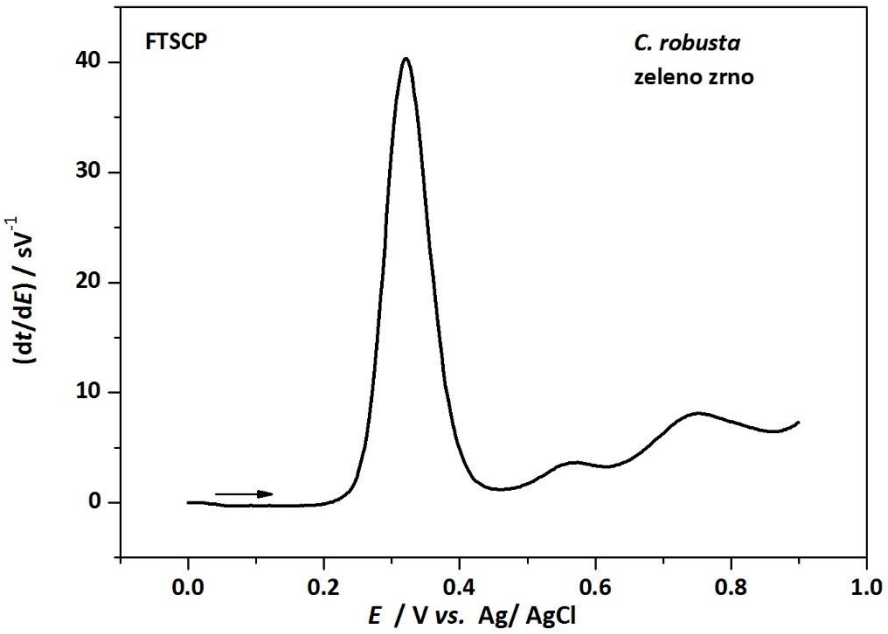
Na **Slikama** od **140** do **149** prikazani su FTS kronopotenciogrami vodenih ekstrakata kava pripremljenih prema ranije opisanom postupku ekstrakcije, dobiveni tehnikom protočne *stripping* kronopotenciometrije (FTSCP) u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Eksperimentalni uvjeti protočne *stripping* kronopotenciometrije: početni potencijal, E_1 = 0 mV, konačni potencijal, E_2 = 900 mV, protok elektrolita 6 mL/min. Zelena zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* razrijeđena su u omjeru 1/100 (faktor razrjeđenja, DF = 100), dok su pržena zrna kava *C. arabica* i *C. robusta*, mljevene kave i instant kave razrijeđene u omjeru 1/50 (DF = 50).



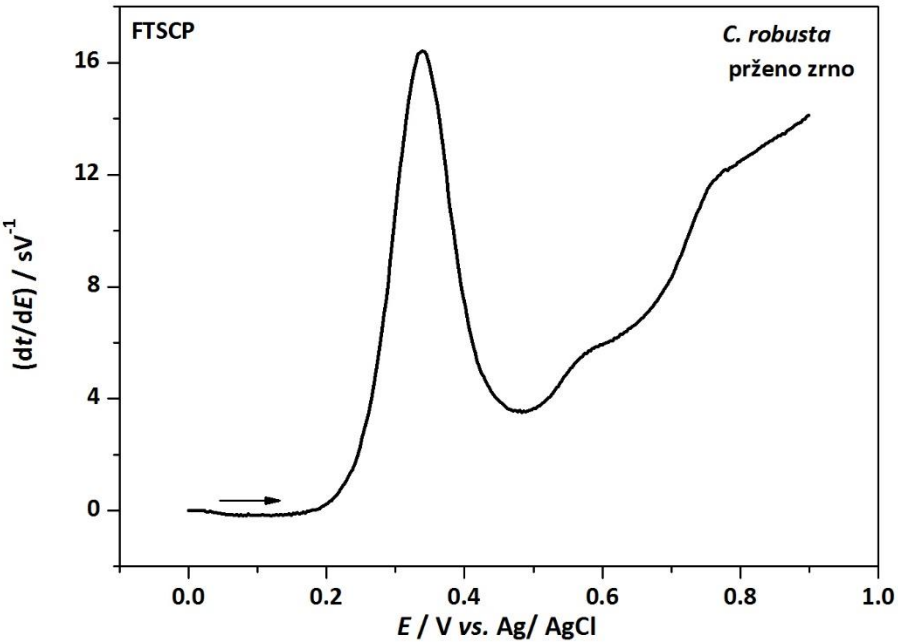
Slika 140 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea arabica* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferi pH 7,0.



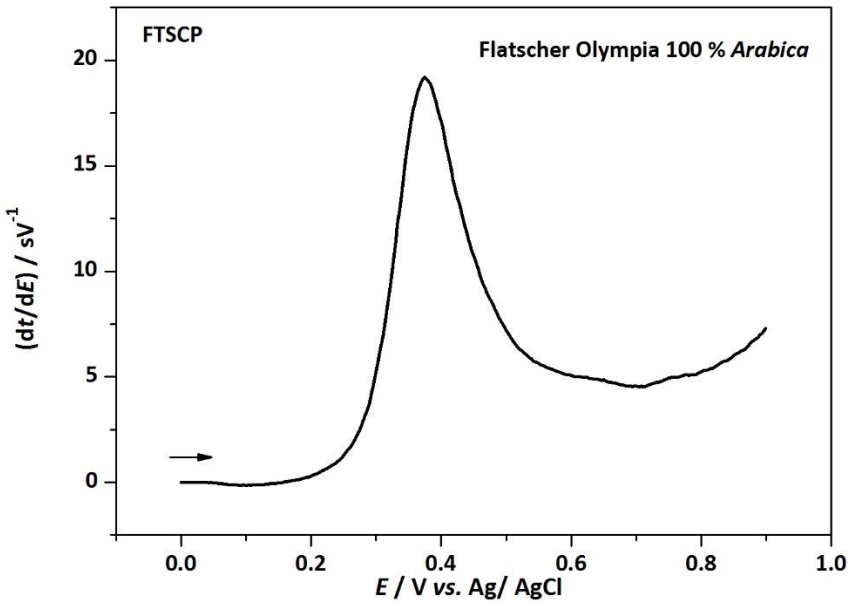
Slika 141 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta prženog zrna *Coffea arabica* (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



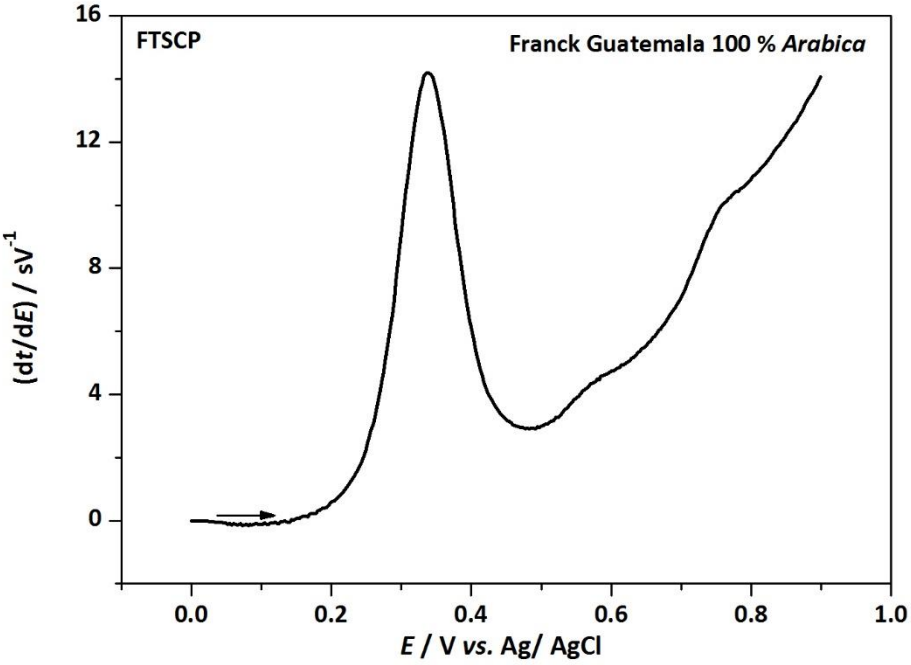
Slika 142 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea robusta* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



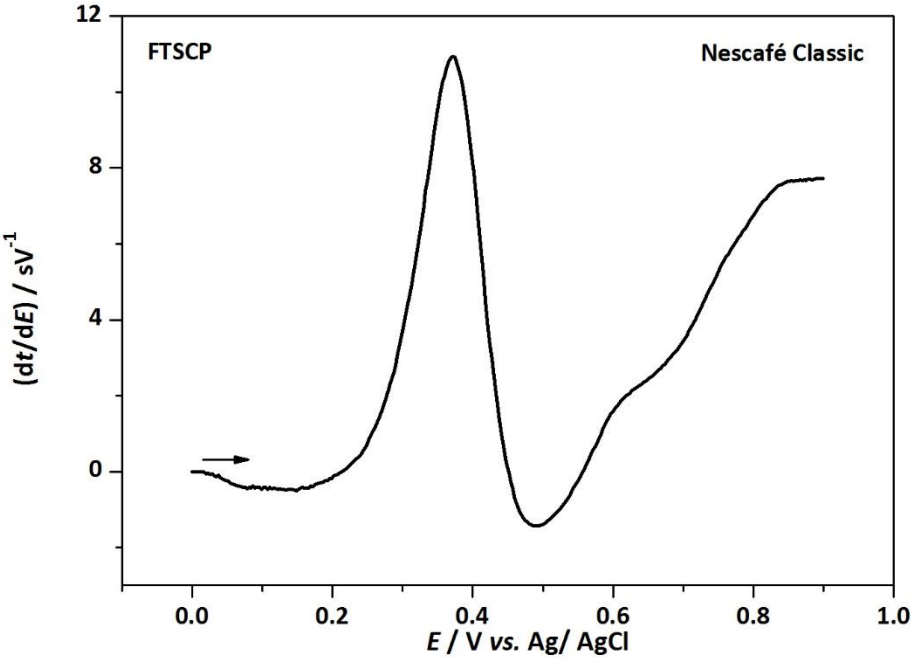
Slika 143 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta prženog zrna *Coffea robusta* (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



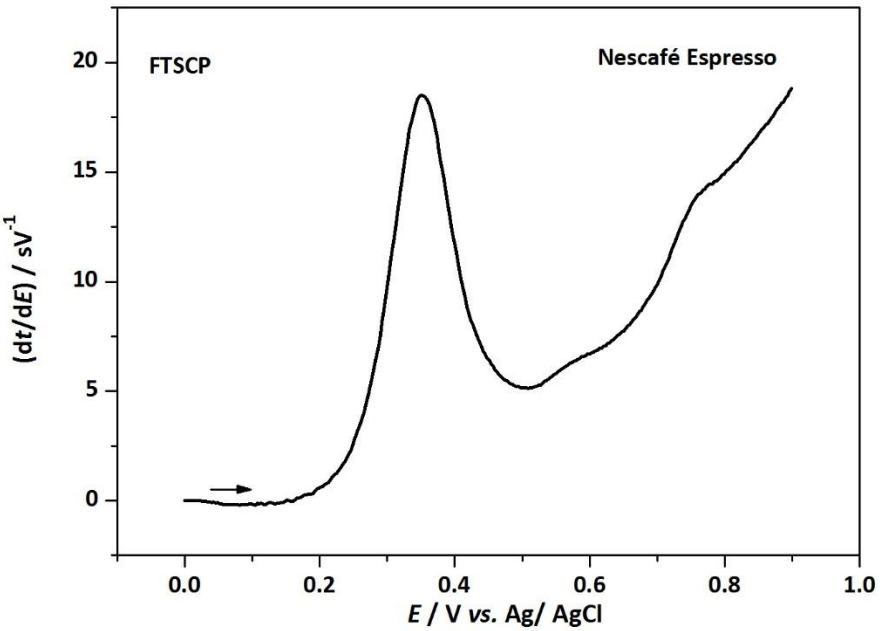
Slika 144 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta mljevene kave Flatscher Olympia (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



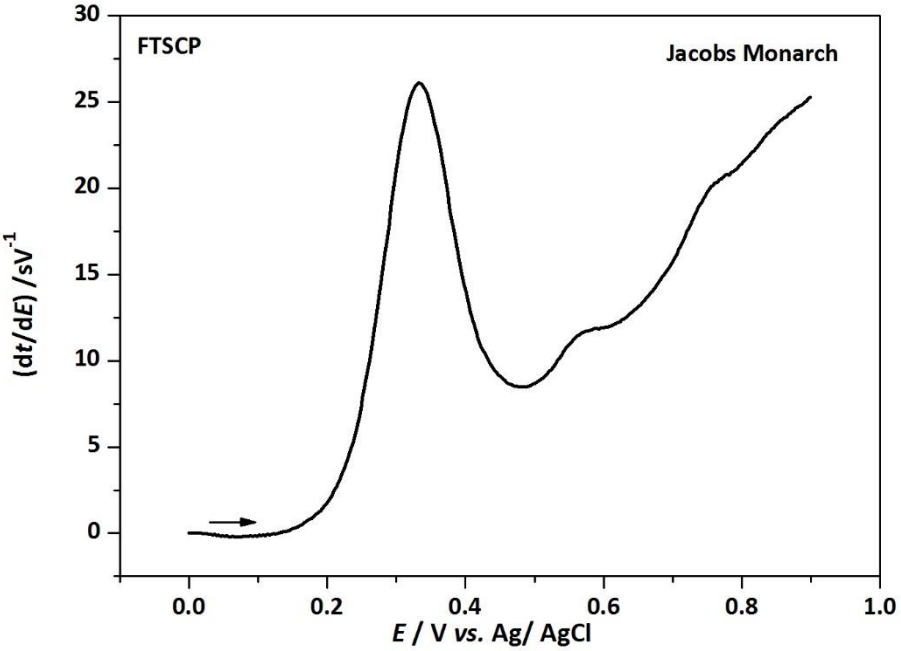
Slika 145 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta mljevene kave Franck Guatemala (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



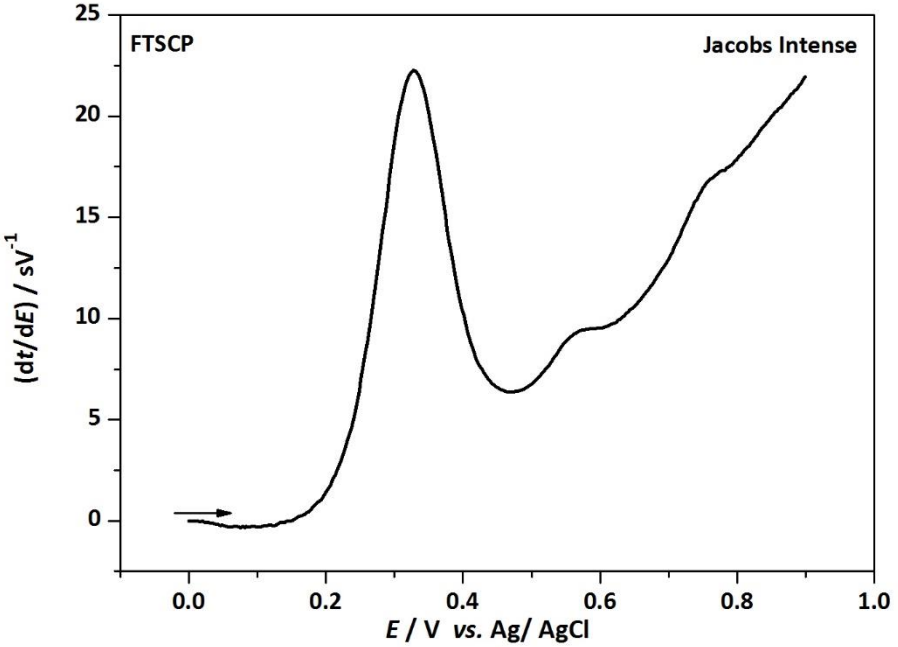
Slika 146 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Classic (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



Slika 147 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Nescafé Espresso (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



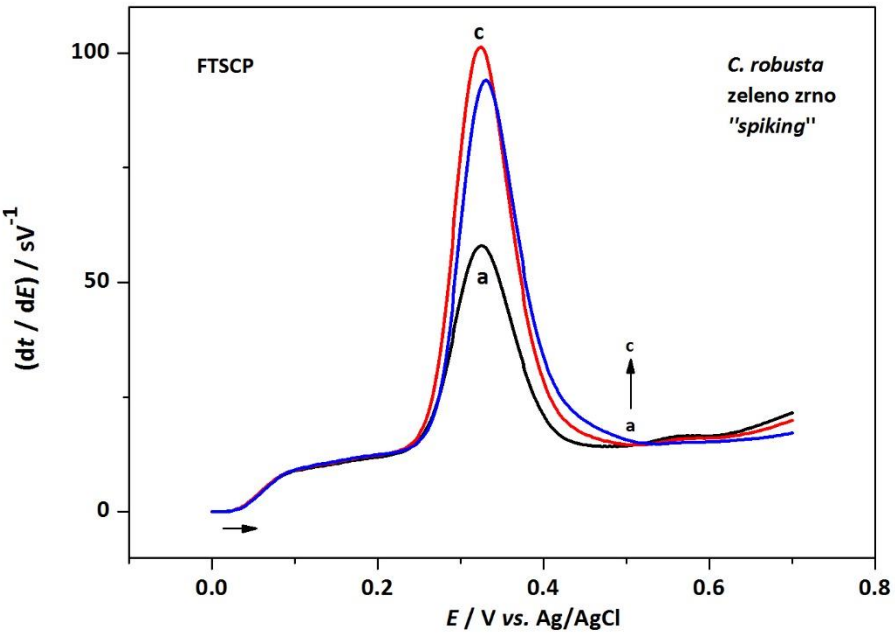
Slika 148 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Monarch (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.



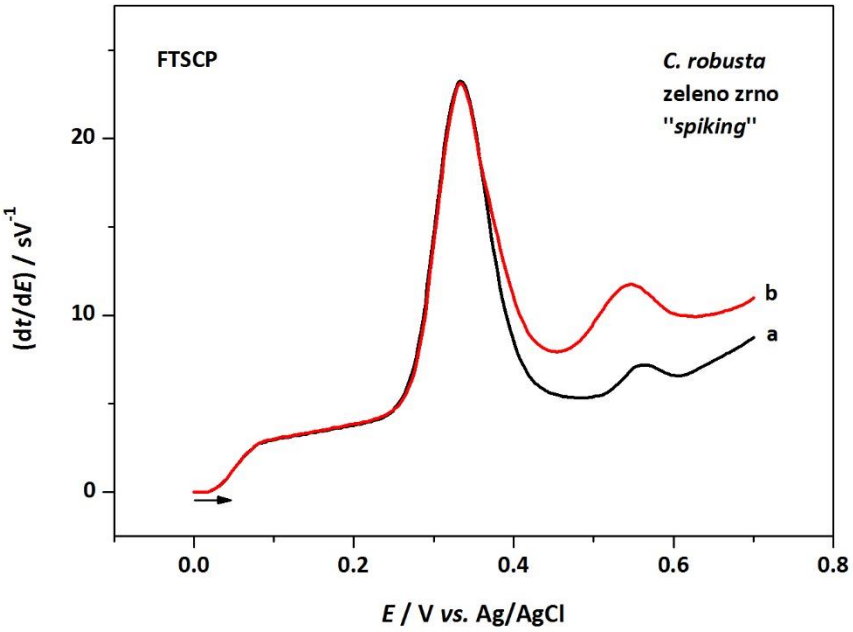
Slika 149 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta *instant* kave Jacobs Intense (DF = 50) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0.

4.5.2. Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije

Identifikacija klorogenskih kiselina prisutnih u vodenim ekstraktima kava, provedena je na osnovi uspoređivanja izgleda FTS kronopotenciograma uzoraka kava i FTS kronopotenciograma klorogenskih kiselina, uspoređivanjem vrijednosti potencijala oksidacijskih pikova (pika 1 i pika 2) uzoraka kava s vrijednostima potencijala oksidacijskih pikova CQAs i diCQAs (za prvi oksidacijski pik) te vrijednostima oksidacijskog potencijala FQAs (za drugi oksidacijski pik). Dodatna identifikacija provedena je dodavanjem poznate količine pojedinih klorogenskih kiselina u uzorke kava. Obogaćivanja uzoraka kave dodavanjem standarda CQAs i diCQAs prikazano je na primjeru vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *Coffea robusta* (*DF* = 100) za identifikaciju pika 1 (**Slika 150**). Identifikacija drugog oksidacijskog pika 2 prisutnog u kavama prikazana je na primjeru obogaćivanja uzorka kave *Coffea robusta* (DF=200) dodatkom otopine 5-CQA (**Slika 151**). Identifikacija trećeg oksidacijskog pika u vodenim ekstraktima kava nije bila moguća zbog nedostatka komercijalno dostupnih ostalih izomera CGAs.



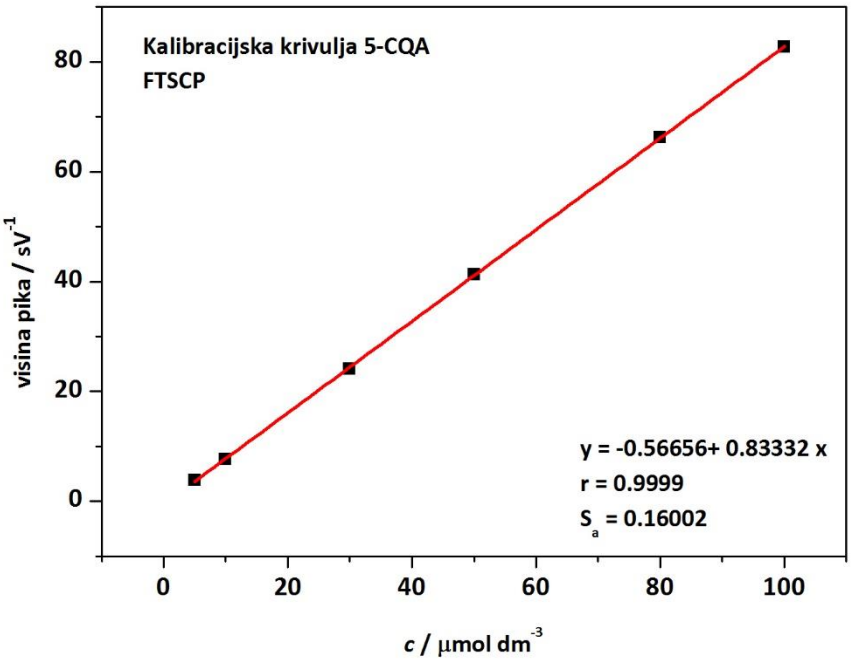
Slika 150 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea robusta* (DF = 200) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0 (a), *C. robusta* + $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-CQA (b), *C. robusta* + $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 3,5-diCQA, (c). Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 0 mV, E_2 = 700 mV.



Slika 151 FTS kronopotenciogram vodenog ekstrakta zelenog zrna *Coffea robusta* (DF = 200) u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0 (a), *Coffea robusta* + $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-FQA (b). Eksperimentalni uvjeti : E_1 = 0 mV, E_2 = 700 mV.

4.5.3. Kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije

Na **Slici 152** prikazana je kalibracijska krivulja dobivena iz FTS kronopotenciograma otopine 5-CQA u rasponu množinskih koncentracija od 5 µmol L^{-1} do 100 µmol L^{-1}, pomoću koje je izvršena kvantifikacija sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava dobivenih protočnom *stripping* kronopotenciometrijom. Kvantifikacija ukupnih klorogenskih kiselina izvršena je na osnovi prvog oksidacijskog pika na pojedinom FTS kronopotenciogramu kava. Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-*total*) izražen je kao mg 5-CQA ekvivalenta u 100 grama kave (mg 5-CQAE/100 g kave) i prikazan je u **Tablici 19.**



Slika 152 Kalibracijska krivulja otopine 5-CQA za kvantifikaciju sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina protočnom *stripping* kronopotenciometrijom.

Tablica 19 Sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava, dobiven protočnom *stripping* kronopotenciometrijom (FTSCP).

Uzorak kave	Ukupne klorogenske kiseline (CGAs-*total*) mg 5-CQAE/100 g kave
C. arabica, Rio Minas, Brazil (zelena zrna)	7382
C. arabica, Rio Minas, Brazil (pržena zrna)	2632
C. robusta, Cherry, Indija (zelena zrna)	9231
C. robusta, Cherry, Indija (pržena zrna)	3165
Flatscher Olympia (mljevena kava, 100% Arabica)	3967
Franck Guatemala (mljevena kava, 100% Arabica)	3895
Nescafé Classic (*instant* kava)	3118
Nescafé Espresso (*instant* kava)	3585
Jacobs Monarch (*instant* kava)	3313
Jacobs Intense (*instant* kava)	3547

-Rezultati predstavljalju srednju vrijednost pet međusobno neovisnih mjerenja (n=5)

4.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST OTOPINA KLOROGENSKIH KISELINA I VODENIH EKSTRAKATA KAVA

4.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava

Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava provedeno je primjenom DPPH metode i ABTS metode, a klorogenska kiselina 5-CQA i Trolox poslužili su kao standardi za izražavanje relativnog iznosa antioksidacijske aktivnosti. U **Tablici 20** prikazana je antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava dobivena DPPH i ABTS metodama, a relativne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izražene su preko 5-CQA ekvivalenata (5-CQAE) i Trolox ekvivalenata (TE). U **Tablici 21** prikazan je postotak (%) inhibicije DPPH radikala i % inhibicije ABTS radikal kationa u vodenim ekstraktima kava.

Tablica 20 Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava dobivena DPPH i ABTS metodoma izražena preko 5-CQAE i TE

Uzorak kave	DPPH		ABTS	
	5-CQAE	TE	5-CQAE	TE
	mmol L^{-1}			
C. arabica, Rio Minas, Brazil (zelena zrna)	10,82	2,09	21,20	10,80
C. arabica, Rio Minas, Brazil (pržena zrna)	0,95	0,95	3,60	0,52
C. robusta, Cherry, Indija (zelena zrna)	11,00	2,10	23,05	11,90
C. robusta, Cherry, Indija (pržena zrna)	1,30	1,02	8,60	3,05
Flatscher Olympia (mljevena kava, 100% Arabica)	9,00	1,95	19,70	9,90
Franck Guatemala (mljevena kava, 100% Arabica)	8,50	1,70	19,10	9,60
Nescafé Classic (*instant* kava)	5,50	1,58	14,90	7,13
Nescafé Espresso (*instant* kava)	3,20	1,42	13,05	6,20
Jacobs Monarch (*instant* kava)	4,00	1,08	13,30	6,04
Jacobs Intense (*instant* kava)	6,60	1,60	17,05	8,40

-Rezultati predstavljalju srednju vrijednost tri međusobno neovisna mjerenja (*n*=3)

Tablica 21 Postotak (%) inhibicije DPPH$^{\bullet}$ radikala i ABTS$^{\bullet+}$ radikal kationa u vodenim ekstraktima kava

Uzorak kave	% inhibicije DPPH radikala	% inhibicije ABTS radikal kationa
C. arabica, Rio Minas, Brazil (zelena zrna)	61,35	71,42
C. arabica, Rio Minas, Brazil (pržena zrna)	32,14	34,21
C. robusta, Cherry, Indija (zelena zrna)	71,01	83,31
C. robusta, Cherry, Indija (pržena zrna)	33,87	35,93
Flatscher Olympia (mljevena kava, 100% Arabica)	58,11	58,27
Franck Guatemala (mljevena kava, 100% Arabica)	51,20	55,64
Nescafé Classic (*instant* kava)	45,21	48,56
Nescafé Espresso (*instant* kava)	37,23	47,33
Jacobs Monarch (*instant* kava)	43,40	43,25
Jacobs Intense (*instant* kava)	48,84	54,02

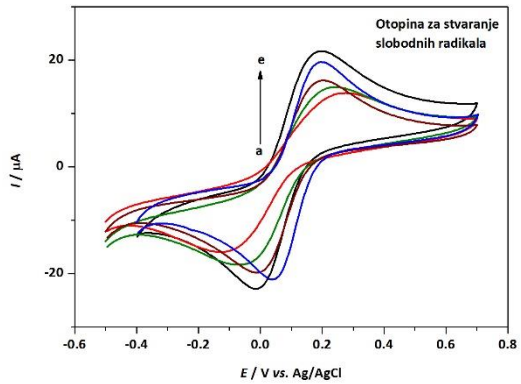
-Rezultati predstavljalju srednju vrijednost tri međusobno neovisna mjerenja (*n*=3)

4.6.2. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava

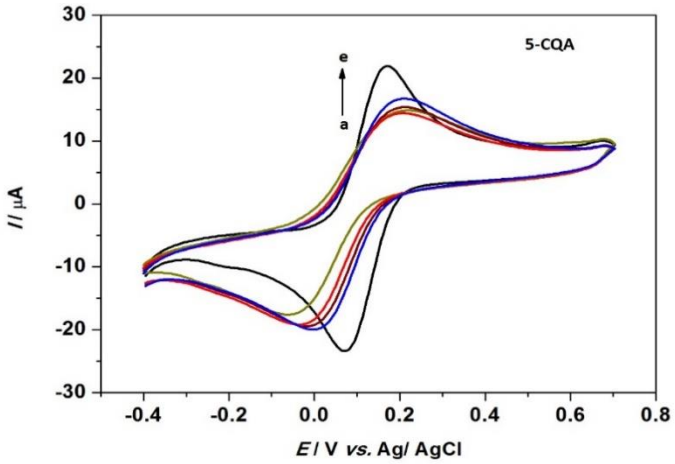
Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava provedeno je pomoću DNA biosenzora, primjenom metode cikličke voltametrije. Na **Slici 153** prikazani su ciklički voltamogrami redoks-sustava $Fe(CN_6^{3-})$ / $Fe(CN)_6^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 mjereni prije i nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (H_2O_2+ Cu^{2+} ion) bez prisustva antioksidansa. Na **Slikama** od **154** do **160** prikazani su ciklički voltamogrami redoks-sustava $Fe(CN_6^{3-})$/$Fe(CN)_6^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 mjereni prije i nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (H_2O_2+Cu^{2+} ion) u koju su dodane otopine CQAs, diCQAs ili CFA. Na **Slikama** od **161** do **170** prikazani su ciklički voltamogrami redoks-sustava $Fe(CN_6^{3-})$/ $Fe(CN)_6^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 mjereni prije i nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (H_2O_2+ Cu^{2+} ion) u koju su dodani vodeni ekstrakti kava u određenom razrijeđenju. Na **Slikama 153-170** ciklički voltamogrami označeni su na sljedeći način: (a) crveno obojen ciklički

voltamogram predstavlja odziv DNA biosenzora u redoks-sustavu $Fe(CN_6)^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0; ciklički voltamogrami (b)-(d) predstavljaju odziv DNA biosenzora u redoks-sustavu $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 nakon inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala u trajanju od 2 min (**Slika 153**), uz dodatak CGAs (**Slike 154-160**) ili uz dodatak vodenih ekstrakata kava (**Slike 161-170**). Na **Slikama 153-170** crno označen voltamogram (e) predstavlja odziv SWCNT elektrode (bez sloja dsDNA) u redoks-sustavu $Fe(CN_6^{3-})/Fe(CN)_6^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0.

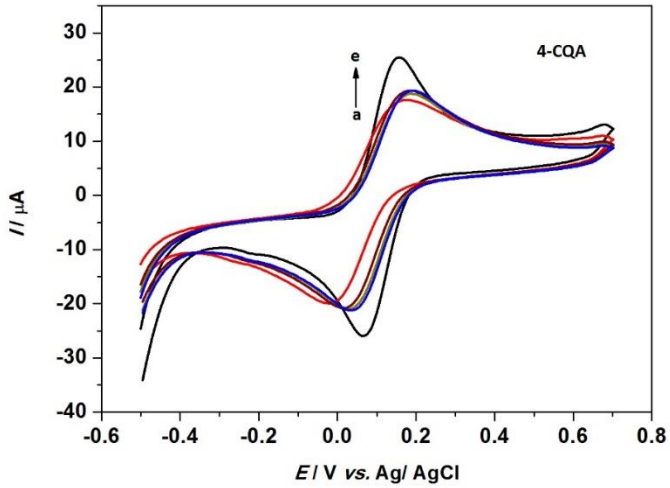
4.6.2.1. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina kafeoilkina kiselina i dikafeoilkina kiselina



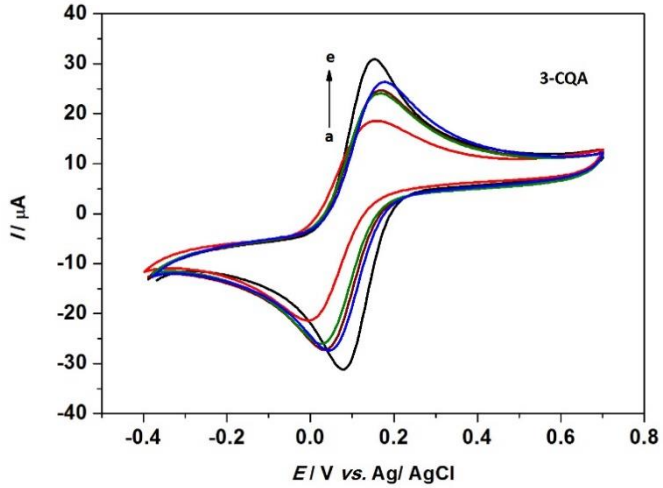
Slika 153 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala (bez dodatka antioksidansa).



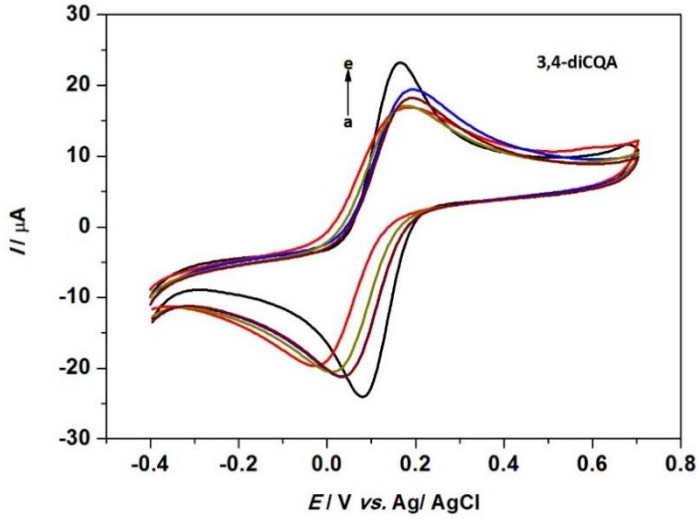
Slika 154 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablica 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} 5-CQA.



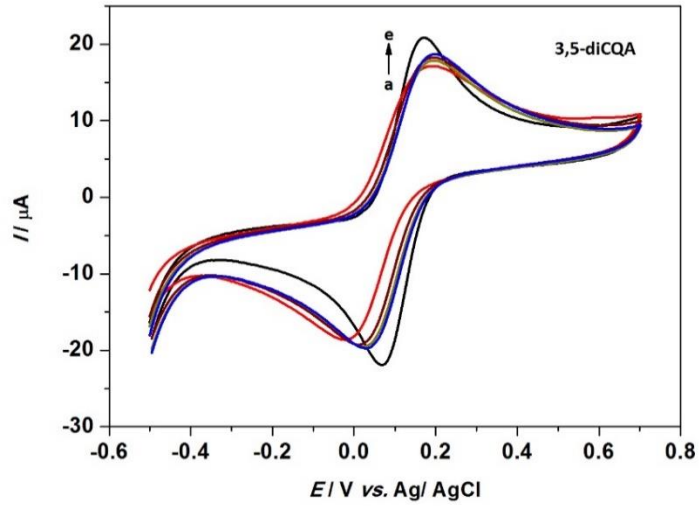
Slika 155 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} 4-CQA.



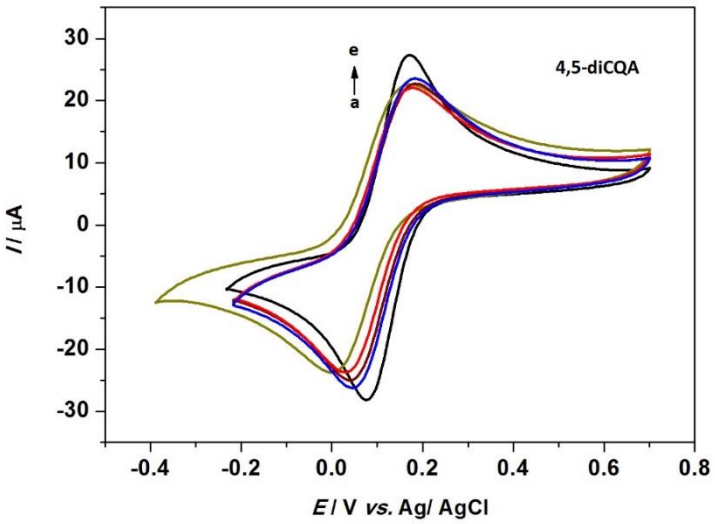
Slika 156 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} 3-CQA.



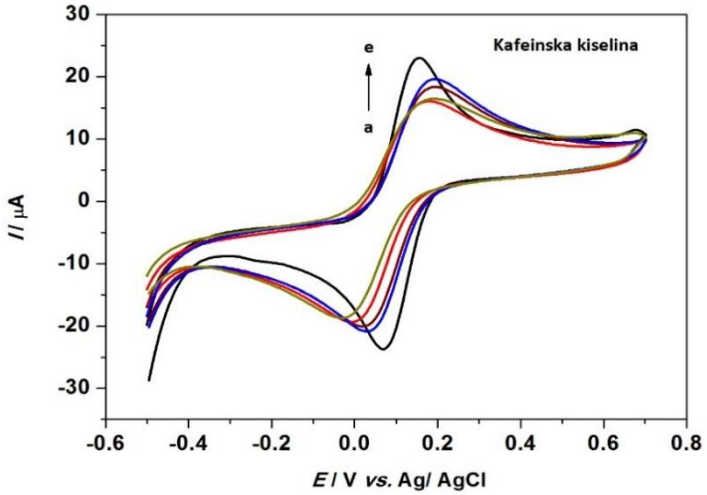
Slika 157 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} 3,4-diCQA.



Slika 158 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} 3,5-diCQA.



Slika 159 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablica 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} 4,5-diCQA.



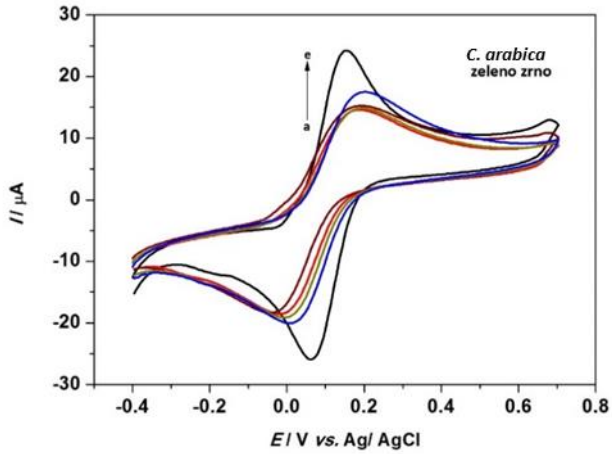
Slika 160 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} kafeinske kiseline.

Tablica 22 Antioksidacijska aktivnost otopina CQAs, diCQAs i CFA dobivena primjenom DNA biosenzora. Uvjeti: 15 min inkubacije DNA biosenzora u smjesi za dobivanje $OH^{\bullet}$ radikala uz dodatak $1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} antioksidansa. Podaci su izračunati na osnovi CV mjerenja redoks-sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14.** Rezultati su izraženi kao relativni strujni CV odziv biosenzora (ΔI_{rel}/%) tj. kao strujni odziv preživjela DNA na površini DNA biosenzora, odnosno kao relativni udio (izražen u %) preživjele DNA (engl. *surv*. DNA).

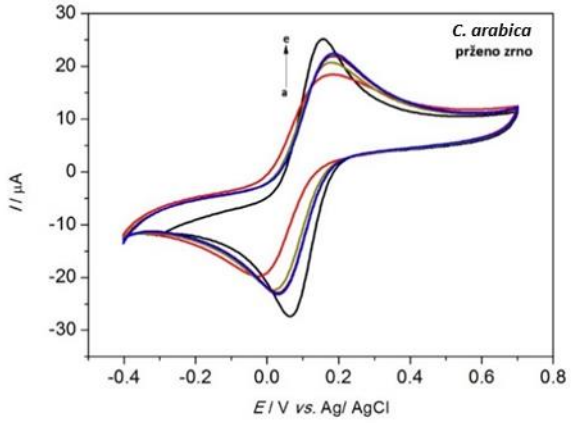
$1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} antioksidansa	ΔI_{rel} (%) surv.DNA(%)
Bez antioksidansa	31,00
Kafeinska kiselina	94,40
5-CQA	92,07
3-CQA	91,04
4-CQA	84,94
3,4-diCQA	81,70
3,5-diCQA	80,18
4,5-diCQA	79,58

-Rezultati predstavljalju srednju vrijednost pet međusobno neovisnih mjerenja (n=5)

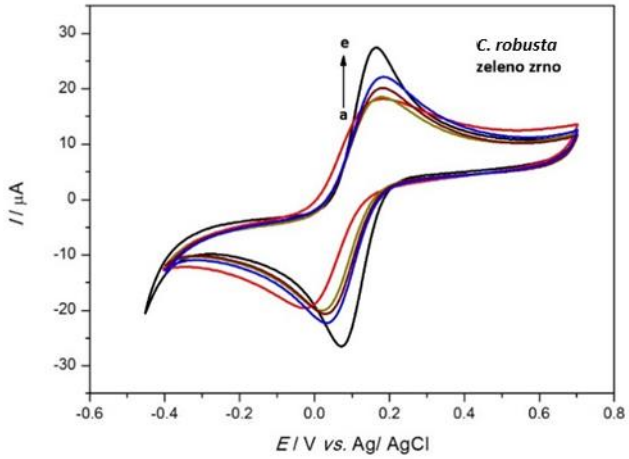
4.6.2.2. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava



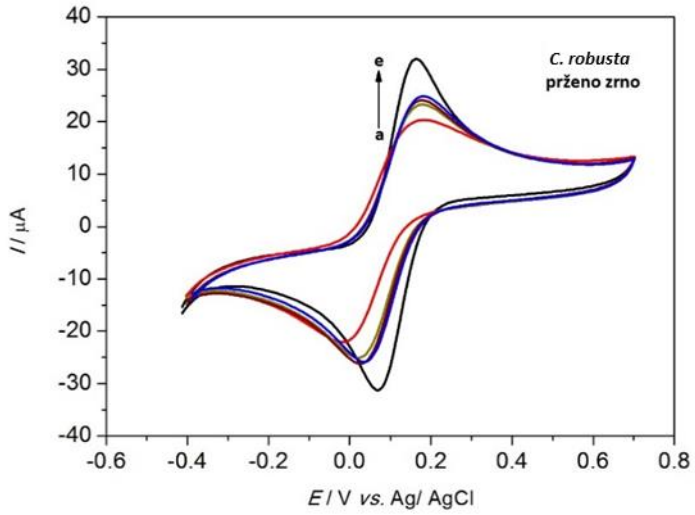
Slika 161 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži vodeni ekstrakt kave *C. arabica*, zeleno zrno (DF=100).



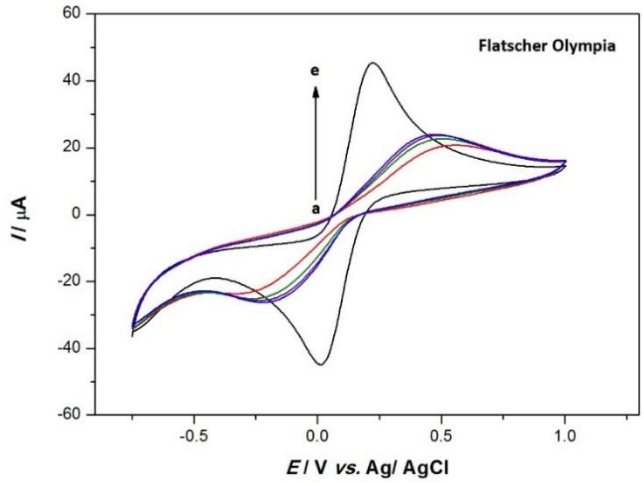
Slika 162 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala koja sadrži vodeni ekstrakt kave *C. arabica*, prženo zrno (DF=50).



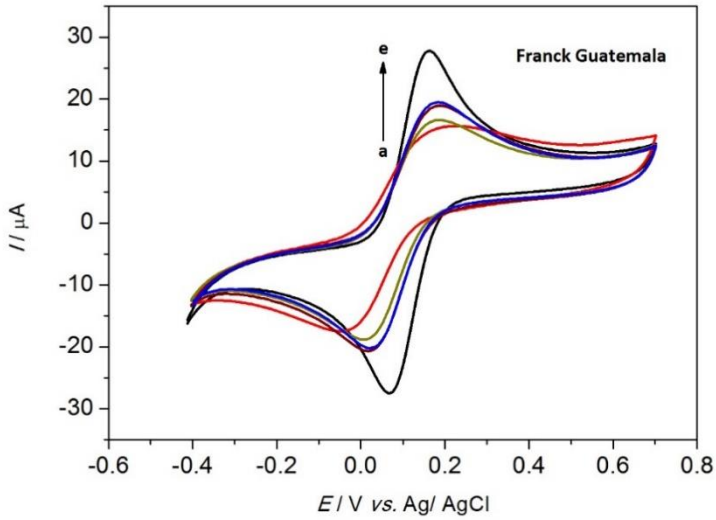
Slika 163 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala koja sadrži vodeni ekstrakt kave *C. robusta,* zeleno zrno (DF=100).



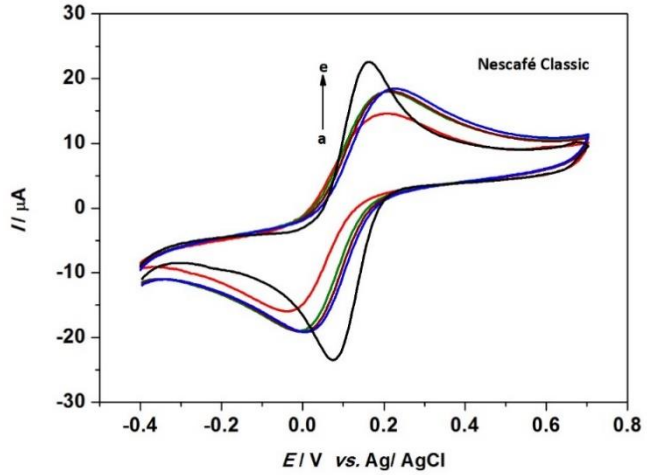
Slika 164 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala koja sadrži vodeni ekstrakt kave *C. robusta*, prženo zrno (DF=50).



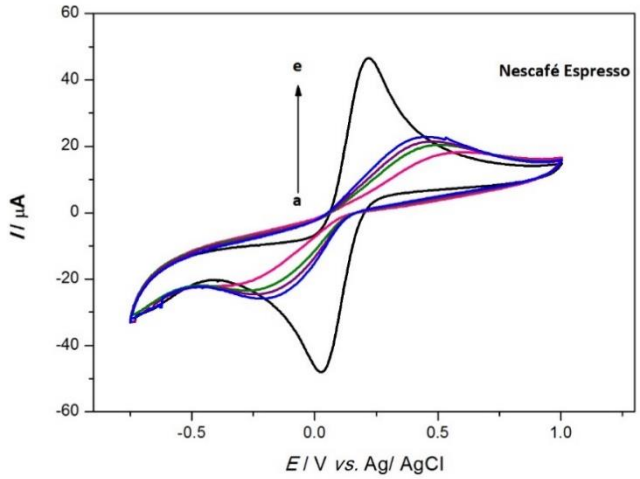
Slika 165 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži vodeni ekstrakt kave Flatscher Olympia 100% Arabica (DF=50).



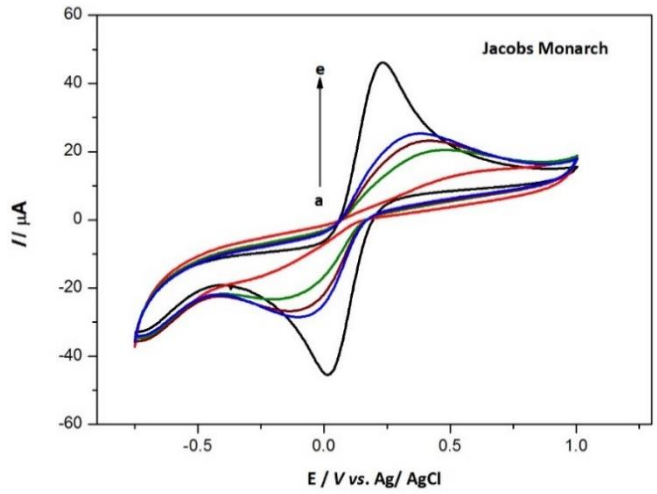
Slika 166 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži vodeni ekstrakt kave Franck Guatemala 100% *Arabica* (DF=50).



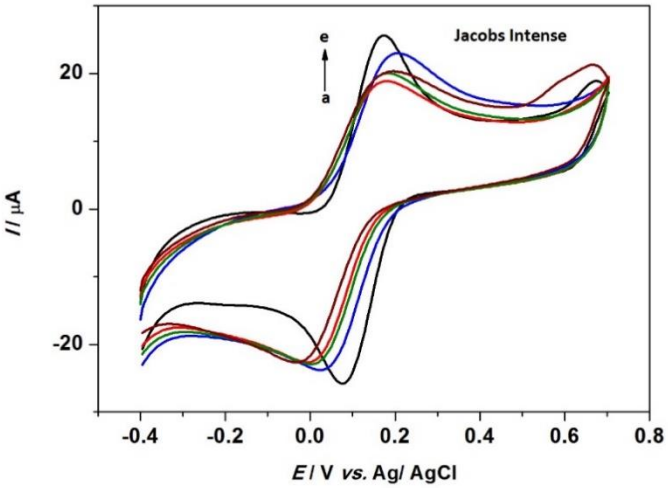
Slika 167 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži vodeni ekstrakt kave Nescafé Classic (DF=50).



Slika 168 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži vodeni ekstrakt kave Nescafé Espresso (DF=50).



Slika 169 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži vodeni ekstrakt kave Jacobs Monarch (DF=50).



Slika 170 CV redoks sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži vodeni ekstrakt kave Jacobs Intense (DF=50).

Tablica 23 Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava dobivena primjenom DNA biosenzora. Uvjeti: 15 min inkubacije DNA biosenzora u smjesi za dobivanje $OH^{\bullet}$ radikala uz dodatak vodenih ekstrakata kava. Podaci su izračunati na osnovi CV mjerenja redoks-sustava 1 mmol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14.** Rezultati su izraženi kao relativni strujni CV odziv biosenzora (ΔI_{rel}/%) tj. strujni odziv preživjele DNA na površini DNA biosenzora, odnosno kao relativni udio (izražen u %) preživjele DNA (engl. *surv.* DNA).

Uzorci kava	ΔI_{rel} (%), surv. DNA (%)
C. arabica, Rio Minas, Brazil (zelena zrna)	81,02
C. arabica, Rio Minas, Brazil (pržena zrna)	52,23
C. robusta, Cherry, Indija (zelena zrna)	81,08
C. robusta, Cherry, Indija (pržena zrna)	53,56
Flatscher Olympia (mljevena kava, 100% Arabica)	77,51
Franck Guatemala (mljevena kava, 100% Arabica)	76,56
Nescafé Classic (*instant* kava)	62,63
Nescafé Espresso (*instant* kava)	55,97
Jacobs Monarch (*instant* kava)	61,61
Jacobs Intense (*instant* kava)	63,23

-Rezultati predstavljalju srednju vrijednost pet međusobno neovisnih mjerenja (n=5)

4.7. KORELACIJE SADRŽAJA UKUPNIH KLOROGENSKIH KISELINA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VODENIH EKSTRAKATA KAVA

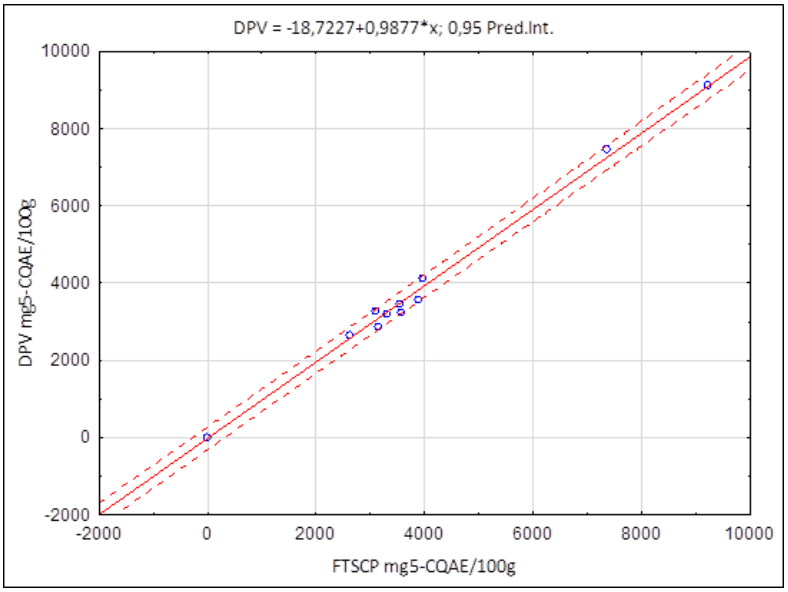
Tablicom 24 i **Slikama** od **171 do 180** prikazane su korelacije između rezultata mjerenja dobivenih elektrokemijskim metodama (DPV, SWV, FTSCP i DNA biosenzora), spektrofotometrijskih metodama (DPPH i ABTS) i HPLC metodom. Korelacije se odnose na sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina, koji je dobiven primjenom SWV, DPV, FTSCP i HPLC metoda te antioksidacijsku aktivnost mjerenu spektrofotometrijskim metodama (DPPH i ABTS) i elektrokemijskom metodom DNA biosenzora. Korelacijski dijagrami nacrtani su na osnovi vrijednosti iz **Tablica 16-20, 22** i **23**, a korelacije su izražene Pearsonovim koeficijentom korelacije, r (p<0.05) i prikazane su u **Tablici 24.**

Tablica 24 Korelacija između elektrokemijskih i spektrofotometrijskih sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina i antioksidacijske aktivnosti

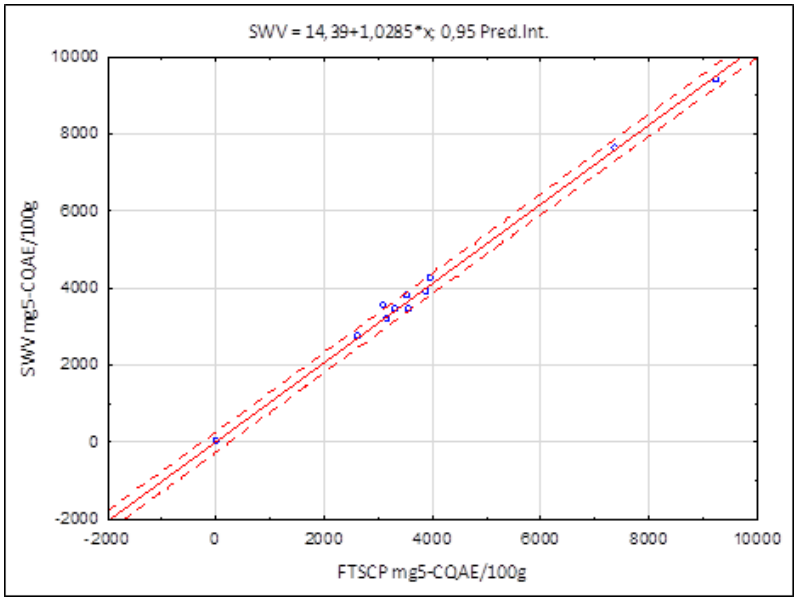
	% inhibicije DPPH radikala	% ihibicije ABTS radikal kationa	DPPH 5-CQAE	DPPH TE	TEAC 5-CQAE	TEAC TE	DNA biosenzor	DPV	SWV	FTSCP	HPLC
% inhibicije DPPH radikala	1,000000	0,967747	0,969206	0,926669	0,931629	0,929578	0,949270	0,871573	0,875924	0,853991	0,864909
% ihibicije ABTS radikal kationa	0,967747	1,000000	0,938089	0,929887	0,910388	0,912575	0,896241	0,930886	0,934844	0,924696	0,927437
DNA	0,949270	0,896241	0,978782	0,918304	0,921924	0,919656	1,000000	0,769119	0,772236	0,754034	0,759159
FTSCP	0,853991	0,924696	0,772233	0,755283	0,718668	0,716004	0,754034	0,996248	0,996962	1,000000	0,997043
DPPH5	0,969206	0,938089	1,000000	0,962200	0,961776	0,962514	0,978782	0,789695	0,794589	0,772233	0,781343
DPPHT	0,926669	0,929887	0,962200	1,000000	0,936122	0,940995	0,918304	0,774409	0,776934	0,755283	0,765067
ABTS5	0,931629	0,910388	0,961776	0,936122	1,000000	0,999259	0,921924	0,725138	0,735991	0,718668	0,717270
ABTST	0,929578	0,912575	0,962514	0,940995	0,999259	1,000000	0,919656	0,722801	0,733001	0,716004	0,714977
DPV	0,871573	0,930886	0,789695	0,774409	0,725138	0,722801	0,769119	1,000000	0,999297	0,996248	0,999743
SWV	0,875924	0,934844	0,794589	0,776934	0,735991	0,733001	0,772236	0,999297	1,000000	0,996962	0,999333
HPLC	0,864909	0,927437	0,781343	0,765067	0,717270	0,714977	0,759159	0,999743	0,999333	0,997043	1,000000

4.7.1. Korelacije sadržaja klorogenskih kiselina mjerenih elektrokemijskim metodama i HPLC metodom

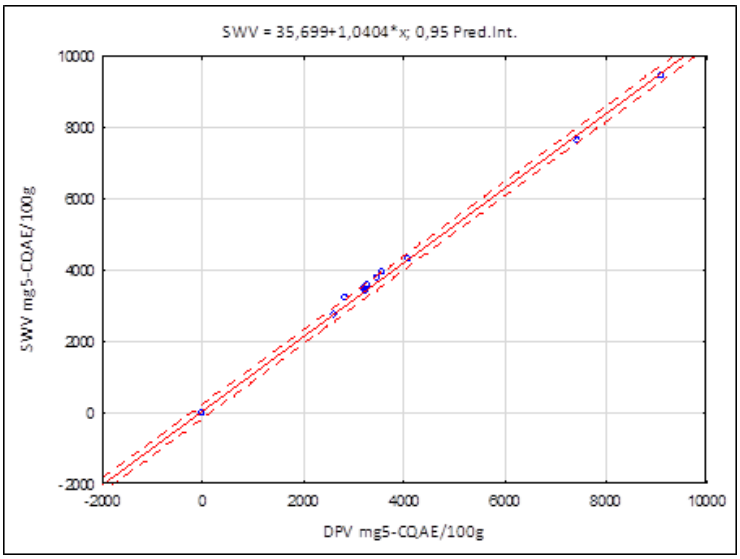
Na **Slikama 171-176** prikazane su korelacije koje se odnose na sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina u ispitivanim uzorcima vodenih ekstrakata kava, određenih primjenom triju elektrokemijskih metoda (SWV, DPV, FTSCP) i kromatografske metode (HPLC).



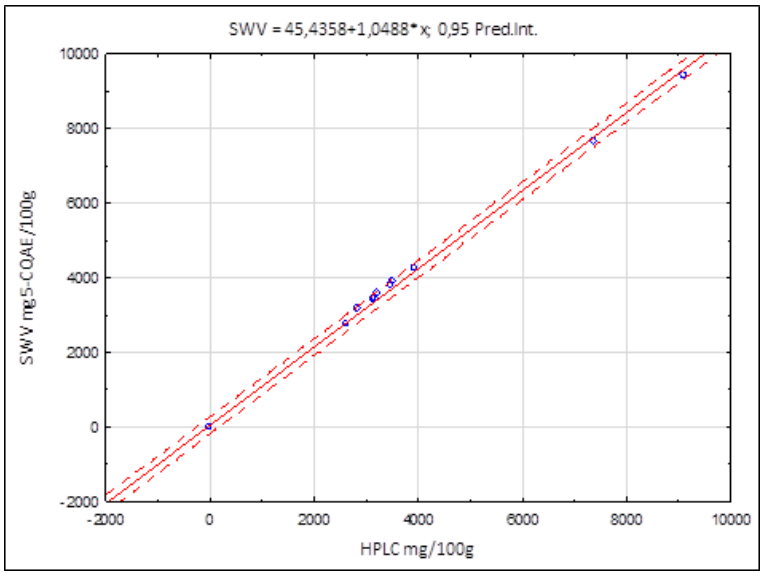
Slika 171 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs dobivenih metodama DPV i FTSCP



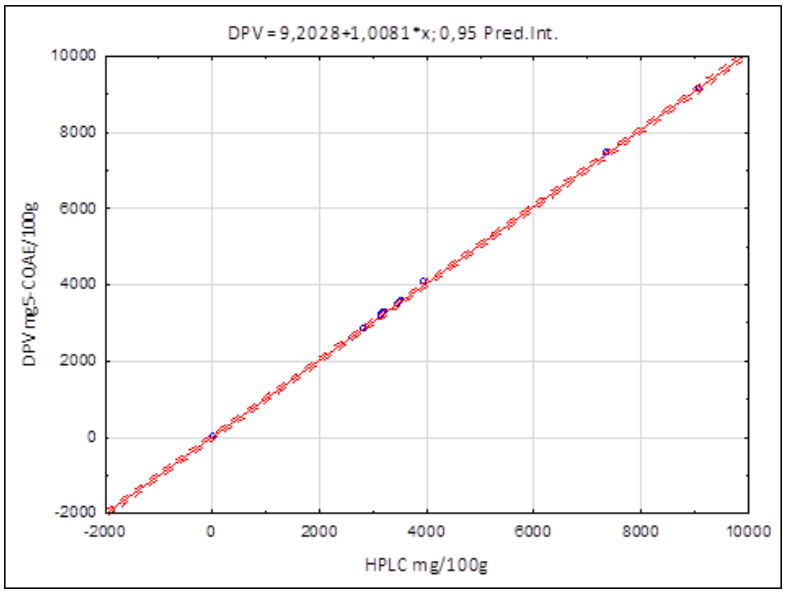
Slika 172 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs dobivenih metodama SWV i FTSCP



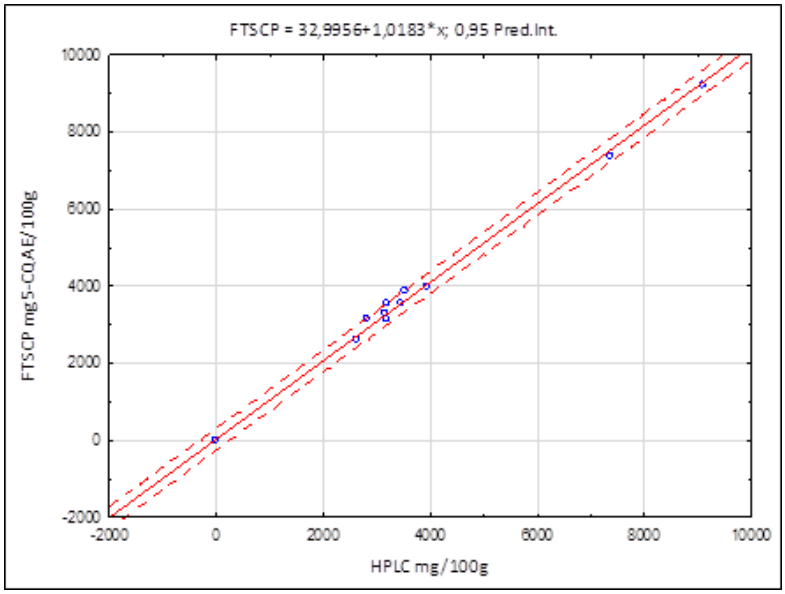
Slika 173 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs dobivenih metodama DPV i SWV



Slika 174 Korelacijska sadržaja ukupnih CGAs dobivenih metodama SWV i HPLC



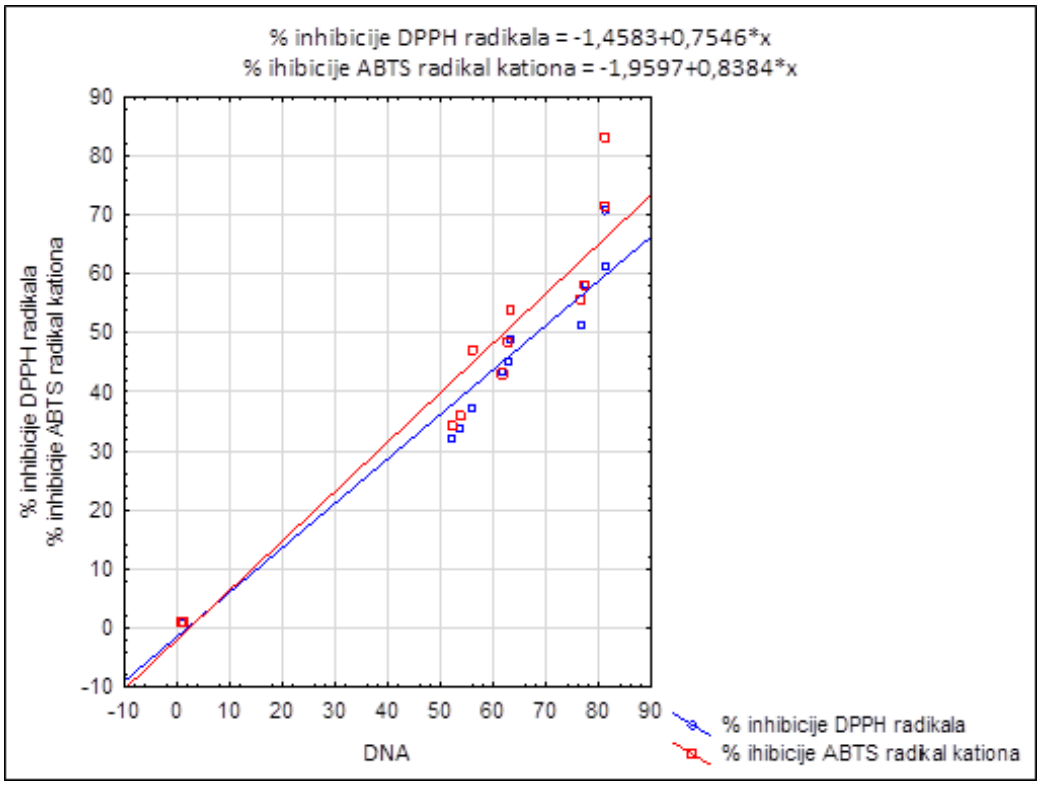
Slika 175 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs dobivenih metodama DPV i HPLC



Slika 176 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs dobivenih metodama FTSCP i HPLC

4.7.2. Korelacije rezultata mjerenja antioksidacijske aktivnosti

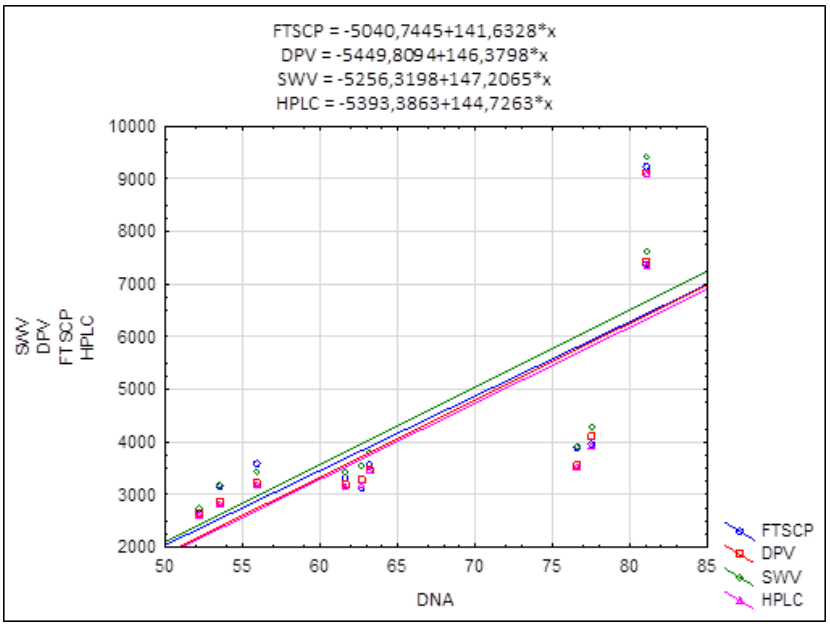
Na **Slici 177** prikazane su korelacija rezultata antioksidacijske aktivnosti dobivenih dvjema spektrometrijskim metodama (DPPH, ABTS) i elektrokemijskom metodom pomoću DNA biosenzora, a na osnovi **Tablice 21** (% inhibicije) i **Tablice 23** (% preživjele DNA)**.**



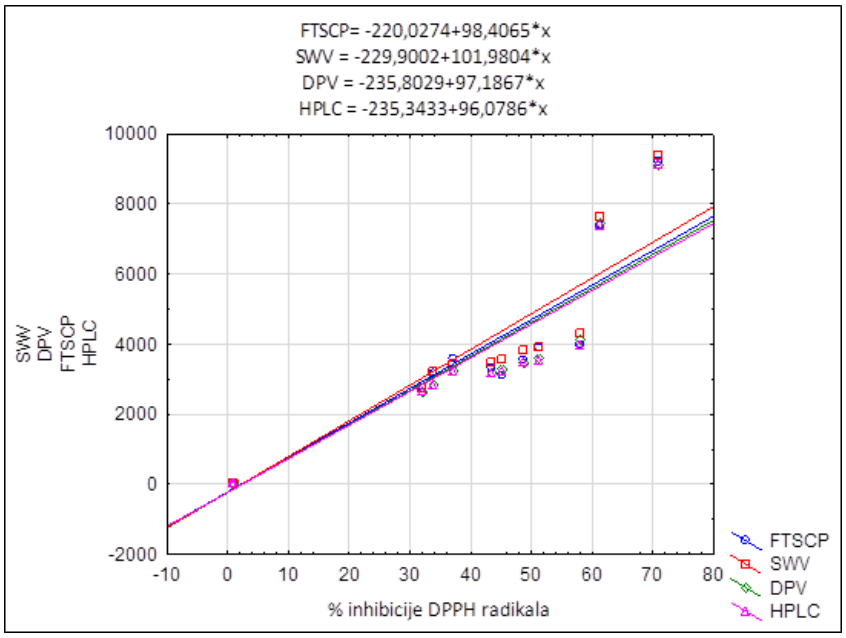
Slika 177 Korelacijski dijagram antioksidacijskih aktivnosti dobivenih pomoću DNA biosenzora i spektrofotometrijskih metoda DPPH i ABTS

4.7.3. Korelacija između sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava i antioksidacijske aktivnosti kava

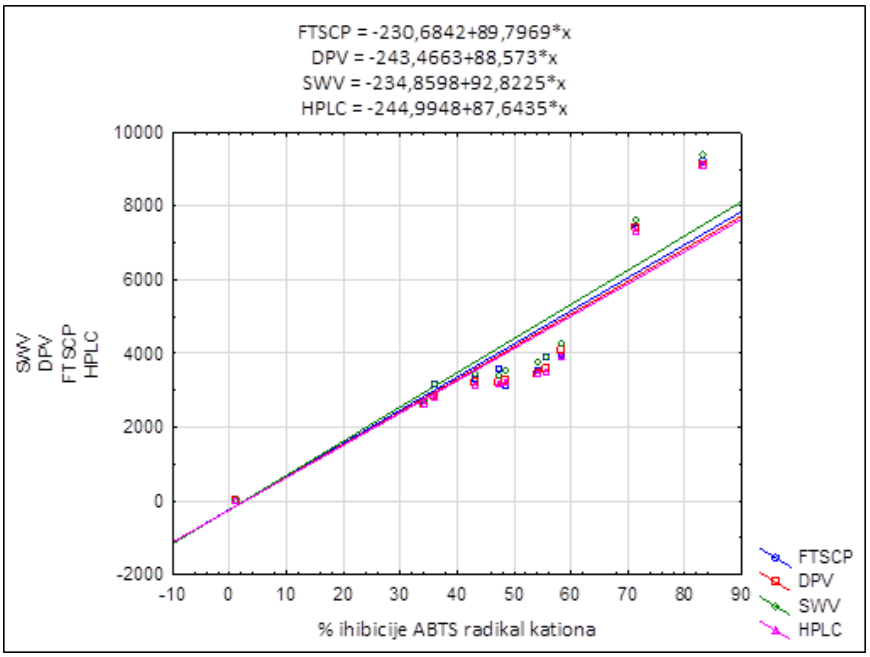
Na **Slikama 178-180** prikazane su korelacije između sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina ispitivanih uzoraka kava dobivenih elektrokemijskim metodama (SWV, DPV i FTSCP) i antioksidacijske aktivnosti određene spektrometrijskim metodama (DPPH i ABTS) i elektrokemijskom metodom DNA biosenzora.



Slika 178 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs u uzorcima kava dobivena SWV, DPV, FTSCP i HPLC metodom i antioksidacijske aktivnosti određene metodomDNA biosenzora



Slika 179 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs u uzorcima kava dobivena SWV, DPV, FTSCP i HPLC metodom i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom



Slika 180 Korelacija sadržaja ukupnih CGAs u uzorcima kava dobivena SWV, DPV, FTSCP i HPLC metodom i antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom

5. RASPRAVA

5.1. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U KAVI HPLC METODOM

Separacija, identifikacija i kvantifikacija pojedinih klorogenskih kiselina prisutnih u vodenim ekstraktima uzoraka kava, provedene su reverzno-faznom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (RP-HPLC) u kombinaciji s PDA detektorom. Opći eksperimentalni uvjeti za HPLC analizu preuzeti su iz radova drugih autora (Ky i sur., 1997.; Jakobek, 2007.) te optimirani i prilagođeni korištenoj koloni i uzorcima kave ispitivanim u ovoj disertaciji, a opisani su u poglavlju **3.2.5.** (Materijali i metode) u **Tablici 13**.

5.1.1. Kromatogrami model otopina klorogenskih kiselina

Na **Slikama** od **27** do **29** prikazani su kromatogrami model otopina devet klorogenskih kiselina koje prema literaturnim podacima dominiraju u kavi i to: tri CQAs (**Slika 27**) , tri diCQAs (**Slika 28**) i tri FQAs (**Slika 29**), masene koncentracije, γ=75 mgL^{-1}. Na **Slici 30** prikazan je kromatogram model otopine u kojoj se nalaze zajedno sve ispitivane klorogenske kiseline (CQAs, diCQAs, FQAs), masene koncentracije, γ=75 mgL^{-1}. Retencijska vremena izlaska (eluiranja) pojedinih klorogenskih kiselina prikazana su u **Tablici 15**. Redoslijed eluiranja pojedinih klorogenskih kiselina u skladu je s literaturnim podacima drugih autora (Trugo i Macrae, 1984.; Schrader i sur., 1996.; Farah i sur., 2005. Fujioka i Shibamoto, 2008.). Sve ispitivane klorogenske kiseline dobro su razdvojene, osim 3,4-diCQA i 3,5-diCQA (**Slike 28** i **30),** gdje je uočen zajednički pik za 3,4-diCQA i 3,5-diCQA. Razlog je u tome što su retencijska vremena obje diCQAs vrlo bliska (razlika u retencijskim vremenima iznosi 0,191 minuta) te su se stoga njihovi pojedinačni pikovi spojili u jedan zajednički pik.

5.1.2. Kromatogrami vodenih ekstrakata kava

Kromatogrami vodenih ekstrakata kava prikazani su na **Slikama** od **31** do **40**. Na kromatogramima vodenih ekstrakata zelenih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* prikazanim na **Slikama 31** i **33**, uočava se prisustvo sedam kromatografskih pikova (3,5-diCQA i 3,4-diCQA eluiraju zajedno). Prema retencijskim vremenim izlazaka (**Tablica 15**) i kromatogramima model otopina CQAs, diCQAs i FQAs (**Slike 27-30**) uočeni pikovi mogu se pripisati prisustvu osam od devet dominantnih CGAs koje se navode u HPLC analizama zelenih zrna kave provedenim od strane drugih autora (Trugo i Macrae, 1984; Farah i sur., 2005; Fujioka i Shibamoto, 2008; Duarte i sur, 2010). Profil klorogenskih kiselina u ispitivanim vodenim ekstraktima zelenih zrna kave *C. arabica* i *C. robusta*, relativno je jednostavan, tj. ove kave

sadrže osam dominantnih CGAs (tri CQAs, tri diCQAs i dvije FQAs; 5-FQA i 4-FQA, dok 3-FQA nije identificirana u ispitivanim uzorcima kave). Sličan HPLC profil kava tj. prisustvo osam dominantnih CGAs, bez 3-FQA, prikazan je u radu Mills i sur., 2013. Kromatogrami ostalih ispitivanih uzoraka kava (prženih zrna kava, mljevenih zrna kava i *instant* kava) znatno su kompleksniji, uslijed značajnih promjena u kemijskom sastavu kava, koje se događaju tijekom procesiranja kava, a posebno tijekom procesa prženja zelenog zrna kave (Trugo i Macrae, 1984; Farah i sur, 2005; Farah, 2012.; Mills i sur., 2013.). Na kromatogramima ovih uzoraka kava, prikazanim na **Slikama 32, 34-40** moguće je identificirati samo sedam pikova tj. osam izomera klorogenskih kiselina, sukladno **Tablici 15** i retencijskim vremenima model otopina CGAs (slično kao i kod uzoraka zelenih zrna kave *C. arabica* i *C. robusta*). Identifikacija ostalih pikova na kromatogramima navedenih vodenih ekstrakata kava, nije moguća zbog nepostojanja komercijano dostupnih standarda ostalih izomera klorogenskih kiselina, a inače u literaturi koja se odnosi na HPLC analizu uzoraka kave, obično se navodi samo devet ranije navedenih dominantnih CGAs. Profil i identifikacija ostalih izomera klorogenskih kiselina (osim ovih devet dominantnih), a koji su u kavi prisutni u vrlo malim količinama odnosno u tragovima, moguća je jedino primjenom HPLC-MS^n analize. Tako, npr. Jaiswal i sur., 2010. te Despande i sur., 2014., navode identifikaciju 69 vrlo različitih izomera klorogenskih kiselina prisutnih u zelenom zrnu kava *C. robusta* i *C. arabica,* dok se neke procjene o broju CGAs izomera u prženim zrnima kava *C. robusta* i *C. arabica* kreću oko broja od preko 200 mogućih izomera (Kuhnert i sur., 2012.). Općenito, profil klorogenskih kiselina dobiven na osnovi kromatograma vodenih ekstrakata kava ispitanih u ovoj disertaciji, u vrlo dobrom je suglasju s literaturnim podacima drugih autora koji su analizirali profil CGAs u kavama HPLC analizom (Trugo i Macrae, 1984; Schrader i sur., 1996.; Farah i sur., 2005.; Perrone i sur, 2008; Fujioka i Shibamoto, 2008; Duarte i sur., 2010; Fernandez-Gomez, 2015.).

5.1.3. Identifikacija klorogenskih kiselina HPLC metodom

Identifikacija pojedinih klorogenskih kiselina prisutnih u vodenim ekstraktima kava provedena je na osnovi: retencijskih vremena standarda pojedinih CGAs, UV/VIS spektara kava i standarda CGAs, literaturnih podataka te dodatno obogaćivanjem (engl. *spiking*) uzoraka nekih kava, tj. dodavanjem otopina CQAs, diCQAs i FQAs poznatih koncentracija u ekstrakte zelenih zrna kave *C. arabica* i *C. robusta* te *instant* kavu Nescafé Classic (**Slike 41-52**). Ovim postupkom obogaćivanja uzoraka kava potvrđena je identifikacija osam izomera klorogenskih

kiselina na kromatogramima obogaćenih uzoraka vodenih ekstrakata kava, zbog znatnog porasta apsorbancije pikova na retencijskim vremenima na kojima eluiraju pojedine dodavane klorogenske kiseline. Kromatogrami vodenih ekstrakata zelenih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta*, u koje je dodavana otopina 5-CQA (**Slike 41 i 43**) imaju „odrezani" vrh pika koji pripada 5-CQA, a koji je znatno porastao uslijed obogaćivanja uzorka kava dodavanjem otopine 5-CQA. Vrh pika je „odrezan" radi ograničenja HPLC uređaja u očitanju apsorbancije do vrijednosti 2 AU.

5.1.4. UV/Vis spektri model otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata uzoraka kava

UV/Vis apsorpcijski spektri model otopina svih ispitivanih klorogenskih kiselina prikazani su na **Slikama 53-55**. UV/Vis spektri vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *C. arabica* (kao primjera koji ilustrira spektre ostalih uzoraka kava) zajedno sa spektrima pojedinih CGAs (5-CQA, 3,4-diCQA i 5-FQA) prikazani su na **Slikama 56-58**. UV/Vis spektri snimljeni su u području valnih duljina od 200 nm do 600 nm. Na UV/Vis spektrima svih ispitivanih klorogenskih kiselina kao i uzoraka kava, uočena su četiri maksimuma (vrha) apsorbancije na različitim valnim duljinama. Prvi vrh apsorbancije pojavljuje se na 215 nm, drugi vrh apsorbancije uočen je na 238 nm, treći na 286 nm, a četvrti apsorbancijski vrh uočen je na različitim valnim duljinama: na 315 nm za CQAs, na 316 nm za diCQAs i na 313 nm za FQAs. Maksimalni iznos apsorbancije na UV/Vis spektrima za sve CGAs i vodene ekstrakte kava, uočen je dakle u rasponu valnih duljina od 313 do 316 nm. Izgled i valne duljine apsorbancijskih vrhova UV/Vis spektara vodenih ekstrakata kava i model otopina CGAs, identični su ili gotovo identični (**Slike 56-58**). To dokazuje da je svih osam navedenih izomera klorogenskih kiselina zaista prisutni u uzorcima ispitivanih kava te da je moguća njihova identifikacija i kvantifikacija u uzorcima kava na osnovi UV/Vis spektara (Belay i Golap, 2009., Kuhnert i sur., 2012.).

U literaturi ima relativno malo podataka o UV/Vis spektrima klorogenskih kiselina ispitivanih u ovoj disertaciji. Najviše podataka odnosi se na istraživanja UV/Vis spektara 5-CQA (Kuhnert i sur., 2012., Cornard i sur., 2008.; Belay i Gollap, 2009.; Belay i sur., 2016. A. i 2016. B; Cornard i Lapouge, 2004.), dok Kuhnert i sur. (2012.) navode podatke o λ_{max} za više izomera CGAs, uključujući i sve CGAs ispitivane u ovoj disertaciji. Svi navedeni autori uočili su četiri apsorbancijska vrha (engl. *absorption bands*) na UV/Vis spektrima 5-CQA i to u UV području valnih duljina (200-400 nm). Valne duljine prvog, drugog i trećeg apsorbancijskog maksimuma

(vrha) dobivene u navedenim radovima vrlo dobro se slažu sa vrijednostima dobivenim u ovoj disertaciji. Jedina je značajnija razlika u vrijednostima λ_{max} četvrtog apsorbancijskog maksimuma koji je u radovima Cornarda i sur.(2008.), i Belaya i sur. (2009., 2016. A, 2016. B) identificiran na 324 nm, u radu Kuhnerta i sur.(2012.) se nalazi u rasponu od 310-330 nm (ovisno o CGAs), dok je u ovoj disertaciji uočen u valnom području 313-316 nm. Do ove male razlike u λ_{max} četvrtog apsorpcijskog maksimuma, dolazi vjerojatno uslijed korištenja različitih eksperimentalnih uvjeta (upotrebe različitih otapala s različitom polarnošću, različite pH vrijednosti otopine, različite koncentracije klorogenskih kiselina, itd.).

Na temelju rezultata navedenih istraživanja, autori navode svoja obrazloženja karakteristika UV/Vis spektra 5-CQA, s posebnim osvrtom na dominantni dio spektra tj. četvrti apsorbancijski maksimum koji se nalazi u području valnih duljina 310-330 nm. Kuhnert i sur. (2012.) navode da je ovaj apsorbancijski maksimum, λ_{max} (engl. *absorption band maximum*) koji se pojavljuje oko 320 nm, posljedica prisustva kromoforne skupine iz cimetne kiseline koja je strukturna jedinica 5-CQA (i općenito svih CGAs). Cornrad i sur. (2008.) te Belay i sur. (2009., 2016. A, 2016. B) smatraju da četvrti i glavni apsorpcijski vrh (engl. *absorption band*) koji se u njihovim radovima pojavljuje na 324 nm i koji pokazuje maksimalnu apsorbanciju, odgovara HOMO→LUMO prijelazu, tj. prijelazu elektrona iz π u π^* molekulsku orbitalu u strukturi benzenske jezgre i bočnog lanca molekule 5-CQA. Drugim riječima to znači da se apsorpcija UV zraka svjetlosti odvija samo na ovom dijelu molekule 5-CQA. To je i očekivano budući da su i u benzenskoj jezgri i u bočnom lancu ove molekule i drugih CGAs prisutne -C=C- skupine koje su tipični kromofori, tj. skupine (funcionalne skupine) koje apsorbirati energiju elektromagnetskog zračenja u navedenom valnom području.

5.1.5. Kvantifikacija sadržaja klorogenskih kiselina u uzorcima kava primjenom HPLC metode

Kvantifikacija sadržaja pojedinih klorogenskih kiselina prisutnih u vodenim ekstraktima kava, provedena je korištenjem kalibracijske krivulje otopine 5-CQA kao standarda (budući da je to najzastupljenija CGAs u kavi) prikazane na **Slici 59**. Sadržaj pojedinih klorogenskih kiselina izračunat je usporedbom površine pika pojedine klorogenske kiseline i površine pika standarda 5-CQA te izražen kao 5-CQA ekvivalent (5-CQAE). Stvarna količina pojedinih klorogenskih kiselina izračunata je primjenom **Jednadžbe 8**. Utvrđeno je da ne postoji razlika u sadržaju pojedinih klorogenskih kiselina izračunata primjenom **Jednadžbe 8** i kalibracijske krivulje

otopine 5-CQA (granica detekcije, *LOD*=1,7·10^{-5} mol L^{-1}; granica kvantifikacije, *LOQ*=5,7·10^{-5} mol L^{-1}). Količine pojedinih klorogenskih kiselina, kao i sadržaj ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-total) prikazane su u **Tablici 16**. Iz **Tablice 16** uočeno je da su u svim ispitanim vodenim ekstraktima kava najzastupljenije CQAs i to u rasponu 60,44% - 77,08% od ukupnih CGAs, zatim slijede diCQAs u rasponu od 13,02% - 27,69% od ukupnih CGAs te FQAs u rasponu 6,26% - 19,7% od ukupnih CGAs. Prema literaturnim podacima, a i podacima dobivenim u ovoj disertaciji, najzastupljenija CGAs u vodenim ekstraktima kava je 5-CQA. Sadržaj 5-CQA dobiven HPLC analizom vodenih ekstrakata kava u ovoj disertaciji iznosi: 3933-4130 mg/100 g kave za zelena zrna kave; za pržena zrna kave 890-908 mg/100 g kave; za mljevene kave 1308-1519 mg/100 g kave i za instant kave od 852-1026 mg/100 g kave (**Tablica 16)**, a u suglasju je s literaturnim podacima drugih autora (Trugo i Macrae, 1984.; Farah i sur., 2005.; Farah i sur, 2006. A; Farah i sur., 2006. B; Duarte i sur., 2010.; Vignoli i sur., 2011.; Monteiro i Farah, 2012.).

Općenito, sadržaj CGAs u vodenim ekstraktima kava ovisi o više čimbenika, a posebno ovisi o vrsti i načinu proizvodnje zelenog zrna kave te o načinu prženja i daljnje prerade (procesiranja) kave. Sadržaj pojedinih CGAs kao i ukupni sadržaj CGAs u vodenim ekstraktima kava ispitivanih RP-HPLC metodom u ovoj disertaciji u skladu je s literaturnim podacima drugih autora (Trugo i Macrae, 1984.;Schrader i sur., 1996; Farah i sur., 2005.; Farah i sur, 2006. A; Farah i sur., 2006. B; Duarte i sur., 2010.; Hečimović i sur., 2011.; Vignoli i sur., 2011.; Duarte i Farah, 2011.; Niseteo i sur., 2012.; Nunes i sur., 2012.; Monteiro i Farah, 2012.). RP-HPLC metoda korištena u ovoj disertaciji pokazala se kao vrlo dobra metoda za identifikaciju i kvantifikaciju CGAs u vodenim ekstraktima kava, što je u skladu s radovima mnogih drugih autora koji su također koristili RP-HPLC metodu za karakterizaciju CGAs u vodenim ekstraktima kava (Trugo i Macrae, 1984.; Schrader i sur., 1996; Farah i sur., 2005.; Farah i sur, 2006. A; Farah i sur., 2006. B; Duarte i sur., 2010.; Hečimović i sur., 2011.; Vignoli i sur., 2011.; Duarte i Farah, 2011.; Niseteo i sur., 2012.; Nunes i sur., 2012.; Monteiro i Farah, 2012.).

5.2. ELEKTROKEMIJSKA SVOJSTVA KLOROGENSKIH KISELINA

5.2.1. Elektrokemijska svojstva kafeoilkina kiselina

Ispitana su elektrokemijska svojstva CQAs koje su prisutne u značajnoj količini u kavi (5-CQA, 4-CQA, 3-CQA), primjenom tri elektrokemijske metode i to: pravokutnovalne voltametrije (SWV), diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) i protočne *stripping* kronopotenciometrije (FTSCP). Također su ispitana i elektrokemijska svojstva kafeinske kiseline (CFA), budući da je ona strukturna jedinica svih CQAs (**Slika 10**) te predstavlja elektroaktivni dio (centar) u kemijskoj strukturi molekula CQAs na kojem se odvijaju elektrokemijski procesi. Voltamogrami i kronopotenciogrami dobiveni SWV, DPV i FTSCP mjerenjima, prikazani su na **Slikama 61-64, 72, 74-76, 82-88, 96-99, 103-107**.

Ispitan je utjecaj kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije, pH vrijednosti otopine i koncentracije elektroaktivne tvari, na elektrokemijska svojstva CQAs i CFA, praćenjem promjena izgleda i elektrokemijskih karakteristika pravokutnovalnih i diferencijalno pulsnih voltamograma CQAs i CFA u ovisnosti o gore navedenim utjecajima. Kod SWV dodatno je ispitan i utjecaj frekvencije pobudnog signala tj. efektivne brzine polarizacije. FTSCP metodom ispitan je utjecaj kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije i koncentracije analita na elektrokemijske karakteristike FTS kronopotenciograma, odnosno na elektrokemijska svojstva CQAs i CFA.

Utjecaj kemijske strukture

Utjecaj kemijske strukture CQAs i CFA na njihova elektrokemijska svojstva, istraživan primjenom SWV i DPV, prikazan je na **Slikama 61-64**, **72**, **85**, a primjenom FTSCP na **Slikama 96-99, 103**. Svi SW voltamogrami CQAs i CFA (**Slike 61-64**) pokazuju jedan oksidacijski i jedan redukcijski pik. Anodni oksidacijski pik CQAs na SW voltamogramima nalazi se na potencijalu od 0,223 V, a onaj od CFA na potencijalu od 0,191 V. Katodni redukcijski pik CQAs uočen je na potencijalu od 0.225 V, a kod CFA na potencijalu 0,191 V. Početna, oksidacijska komponenta (I_f) ukupne struje (ΔI) i povratna, redukcijska komponenta (I_b) ukupne struje (ΔI) vrlo su jasno izražene na svim SW voltamogramima, a oksidacijski odnosno redukcijski potencijali nalaze se na istoj (CFA) ili gotovo istoj vrijednosti potencijala (CQAs), a što je vidljivo na **Slikama 60-64**. Ove dvije činjenice indiciraju da se na površini GC elektrode u otopinama CQAs i CFA odvijaju reverzibilne redoks elektrokemijske reakcije (Mirčeski i sur., 2007.).

Na **Slici 72** prikazani su SW voltamogrami (ukupne struje, Δ*I*) svih istraživanih CQAs i CFA. Može se uočiti da CQAs pokazuju značajan pomak potencijala pika (E_p) prema pozitivnijim vrijednostima i značajni porast struje pika (I_p) u odnosu na CFA. Ovo jasno ukazuje da kemijska struktura ima bitan utjecaj na izgled SW voltamograma, odnosno na elektrokemijska svojstva ispitivanih spojeva.

Na DP voltamogramima CQAs i CFA (**Slika 85**) uočen je jedan jasno izražen anodni oksidacijski pik na potencijalu od 0,175 V za CFA i 0.187 V za CQAs. Struja anodnog pika (I_p) CQAs značajno je veća od one za CFA (isto kao i kod SWV mjerenja). Širina na polovici visine anodnog oksidacijskog pika ($W_{1/2}$) za CQAs i CFA iznosi približno 60 mV, što ukazuje, prema dijagnostičkim kriterijima DPV (Scholz, 2010.), na izmjenu dva elektrona tijekom elektrokemijske anodne oksidacije CFA i CQAs.

Na FTS kronopotenciogramima **(Slike 96-99, 103)** u otopinama CQAs vidljiv je jedan jasno izražen anodni oksidacijski pik na potencijalu od 0.310 V, dok se u otopini CFA oksidacijski pik pojavljuje na potencijalu od 0,287 V.

Utjecaj kemijske strukture na elektrokemijska svojstva CQA i CFA najbolje se može uočiti promatrajući SW voltamograme, DP voltamograme i FTS kronopotenciograme svih ispitivanih CQAs i CFA (**Slike 72, 85, 103)**. Na svim navedenim slikama vidljiv je pomak potencijala oksidacijskog pika (E_p) prema pozitivnijim vrijednostima i porast struje oksidacijskog pika (I_p) od CFA prema CQAs, što jasno ukazuje da razlika u elektrokemijskim svojstvima između CQAs i CFA bitno ovisi o razlici u njihovoj kemijskoj strukturi (**Slika 10-11**).

U pokušaju da se objasni utjecaj kemijske strukture molekula na njihova elektrokemijska svojstva mogući su različiti pristupi. Jedan od mogućih, novijih pristupa je primjena kvantno kemijskih modela i proračuna. U više radova temeljenim na kvantno kemijskim proračunima i različitim kvantnim modelima uočena je značajna korelacija između kemijske strukture te elektronskih i elektrokemijskih svojstava različitih molekula. Tako je uočena jasna korelacija između vrijednosti redoks potencijala i HOMO i LUMO energije molekulskih orbitala za različite elektroaktivne molekule (Riahi i sur., 2009.; Eschwege i Conradie, 2011.; Gil i sur., 2012.; Mendez-Hernandez i sur., 2013.).

Prema teoriji molekulskih orbitala, u kemijskim reakcijama najčešće sudjeluju elektroni iz tzv. HOMO i LUMO molekulskih orbitala. HOMO orbitala (engl. *Highest Occupied Molecular*

Orbital) molekulska je orbitala najviše energije, koja je popunjena elektronima te stoga može djelovati kao donor elektrona, a vrijednost njene E_{HOMO} energije predstavlja sposobnost HOMO orbitale da donira elektrone. Što je viša vrijednost E_{HOMO} energije, to lakše HOMO orbitala donira elektrone, što u elektrokemijskom smislu znači nižu vrijednost oksidacijskog potencijala. LUMO orbitala (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) je orbitala najniže energije koja još nije popunjena (ili je prazna) i ima prostora za prihvat elektrona te stoga djeluje kao akceptor elektrona. Vrijednost E_{LUMO} energije predstavlja sposobnost primanja elektrona LUMO orbitale. Što je vrijednost E_{LUMO} energije niža, to lakše LUMO orbitala prima elektrone, što u elektrokemijskom smislu znači nižu vrijednost redukcijskog potencijala. Što je razlika u energiji između LUMO i HOMO orbitale manja, to je lakše HOMO orbitali donirati elektrone LUMO orbitali, što kemijski znači lakšu mogućnost oksidacije, odnosno u elektrokemijskom smislu niži elektrooksidacijski potencijal.

U literaturi ima relativno malo podataka o E_{HOMO} i E_{LUMO} energijama elektroaktivnih molekula. U odnosu na spojeve ispitivane u ovoj disertaciji, u literaturi su pronađeni samo podaci za 3-CQA i CFA. Tako, Mishra i sur. (2013.), navode vrijednost E_{HOMO} energije za molekulu 3-CQA od -6,246 eV. Za molekulu CFA u literaturi su pronađene dvije E_{HOMO} vrijednosti: Riahi i sur. (2009.), navode vrijednost od -5,711 eV, dok su Conrad i Lapouge (2004.), izračunali vrijednost E_{HOMO} za molekulu CFA od -5.60 eV. U skladu s teorijom molekulskih orbitala i gore navedenim vrijednostima E_{HOMO} energije za 3-CQA i CFA, može se logički zaključiti: budući da molekula 3-CQA ima nižu E_{HOMO} vrijednost od molekule CFA, ona teže donira elektrone i shodno tome mora imati viši oksidacijski potencijal od molekule CFA. Takav zaključak koji proizlazi iz kvantne teorije molekulskih orbitala, potvrđen je i u provedenim elektrokemijskim mjerenjima. U svim elektrokemijskim mjerenjima, tj. primjenom sve tri elektrokemijske metode (SWV, DPV i FTSCP), molekula 3-CQA pokazuje viši oksidacijski potencijal od CFA molekule. Moglo bi se također pretpostaviti da ovakav zaključak vrijedi i za ostale izomere CQAs, tj. za 4-CQA i 5-CQA, budući da ove molekule pokazuju u svim provedenim elektrokemijskim mjerenjima istu vrijednost oksidacijskog potencijala kao i molekula 3-CQA, a kemijska struktura im je vrlo slična (različit je samo položaj esterifikacije s QA, **Slika 11**). U literaturi do danas nema podataka o E_{HOMO} i E_{LUMO} energijama za ostale izomere CQAs (kao ni za ostale izomere CGAs) te stoga nije moguće objasniti utjecaj kemijske strukture na elektrokemijska svojstva ostalih izomera CGAs ispitivanih u ovoj disertaciji primjenom teorije molekulskih orbitala.

Drugi pristup kojim se može objasniti utjecaj kemijske strukture molekula na njihova elektrokemijska svojstva temelji se na postojanju EDG (engl., *Electron Donating Group*) i EWG (engl., *Electron Withdrawing Group*) funcionalnih skupina u kemijskoj strukturi neke molekule. EDG su funkcionalne skupine (ili atomi) koje doniraju svoje elektrone nekom elektronski nestabilnom sustavu povećavajući njegovu elektronsku gustoću i kemijsku aktivnost, dok EWG funcionalne skupine (ili atomi) privlače elektrone i time smanjuju elektronsku gustoću sustava, čineći ga time slabije aktivnim. Među elektron donirajuće, aktivirajuće (EDG) skupine pripadaju: -OH, $-NH_2$, -Cl, -F, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$,-C=C-, -CH=CH-COOH; itd. Među skupine koje privlače elektrone i time deaktiviraju sustav, pripadaju: $-NO_2$,-C=O, -CN, -COOH, -COOR, itd. Obje ove skupine kao supstituenti (EWG i EDG) svojim djelovanjem znatno mijenjaju elektronska, kemijska, i elektrokemijska svojstva osnovne molekule (sustava), npr. spojeva koji u sebi sadrže benzensku strukturu. Ako se EDG skupine nalaze prisutne kao supstituenti na benzenskoj strukturi, one donirajući elektrone aktiviraju aromatski prsten povećavajući elektronsku gustoću prstena i brzinu reakcije na *ortho*- i *para*-položajima. Prisustvo EWG skupina na benzenskom prstenu deaktivira aromatski prsten smanjujući gustoću elektrona u *para*- i *ortho*-položajima te se stoga reakcije odvijaju sporije i to na *meta* položajima.

Stoga se razlike u elektrokemijskom ponašanju ispitivanih CQAs i CFA mogu objasniti na osnovi prisustva različitih EDG i EWG skupina u njihovoj strukturi. EDG i EWG grupe prije svega imaju utjecaj na promjenu elektronskih svojstava molekula, a prema tome i na elektrokemijska svojstva molekula (npr. oksidacijski potencijal).

Utjecaj različite kemijske strukture CQAs i CFA na njihova elektronska svojstva i kemijsku reaktivnost istraživan je primjenom Raman spektroskopije (Eravuchira i sur., 2012.; Mishra i sur., 2013.; Swislocka, 2013.). Utvrđeno je da su elektronska svojstva CQAs i CFA dominantno određena prisustvom kateholne skupine s dvije –OH skupine u *ortho*-položaju. S elektrokemijskog stajališta katehol je temeljna strukturna jedinica svih ispitivanih CQAs i CFA i predstavlja aktivni centar svih elektrokemijskih reakcija navedenih spojeva.

Dodatno, funkcionalne skupine u bočnom lancu spojenom na kateholnu strukturu navedenih spojeva (**Slika 11**) imaju utjecaj na elektronska svojstva navedenih molekula, pa tako i na elektrokemijska svojstva. Tako prisustvo karboksilne skupine (-COOH) i ester skupine (-COOR), koje su EWG skupine, odvlači gustoću elektrona s benzenske, odnosno katehol strukture što dovodi do smanjenja gustoće elektrona na kateholnoj strukturi i porasta oksidacijskog

potencijala. S druge strane prisustvo vinil (–CH=CH-) skupine (kao EDG) u bočnom lancu, dovodi do porasta gustoće elektrona na kateholnoj strukturi i nižeg oksidacijskog potencijala. Iz literaturnih podataka poznato je da su karboksilna (-COOH) skupina i esterska skupina (-COOR) elektron akceptorske skupine, dok su –OH i supstituenti s dvostruko nezasićenom vezom (-CH=CH-) elektron donorske skupine. Elektron donorski utjecaj pokazuje i akrilna skupina (–CH=CH-COOH), što povećava elektronsku gustoću benzenskog prstena u molekuli CFA i snižava joj oksidacijski potencijal u usporedbi s oksidacijskim potencijalom katehola koji ne sadrži ovakav bočni lanac (**Slika 10** i **Slika 11**), (Enache i Brett, 2011.; Rice-Evans i sur., 1996.; Gil i sur., 2013.; Yakovleva i sur., 2007.).

U slučaju CQAs čini se da jaki EWD efekt esterske skupine (-COOR) i utjecaj kinoil strukture prevladavaju nad EDG efektom –CH=CH- skupine u bočnom lancu ove molekule (**Slika 11**). To je potvrđeno Raman spektroskopijom i kompjutorskim modelima (Mishra i sur., 2013.), gdje se pokazalo da se područje visoke gustoće elektrona u molekuli 3-CQA pomiče s kateholne strukture prema esterskoj skupini, potvrđujući da ona ima snažni EWD efekt. Prema tome smanjuje se gustoća elektrona na kateholnoj strukturnoj jedinici u molekuli 3-CQA, što ima za posljedicu otežani transfer elektrona s –OH skupine na kateholnoj strukturi, odnosno dovodi do porasta oksidacijskog potencijala molekule 3-CQA u odnosu na molekulu CFA. Ovakvo objašnjenje vjerojatno vrijedi i za ostale izomere CQA (tj. 4-CQA i 5CQA), budući da u svim elektrokemijskim mjerenjima (SWV, DPV i FTSC) sve ispitivane CQAs pokazuju pozitivniji oksidacijski potencijal od CFA.

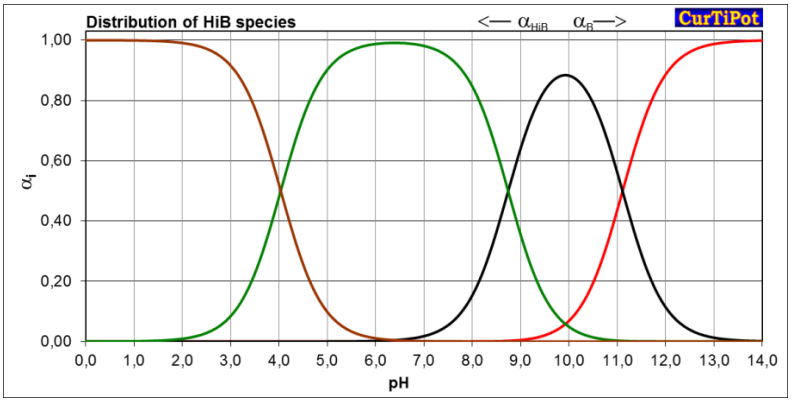
Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije CQAs i CFA ispitan je pomoću tri elektrokemijske metode: SWV **(Slike 74-76)**, DPV (**Slika 86**) i FTSCP (**Slike 104-106**). Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije ispitan je tako da je provodena uzastopna polarizacija u istoj otopini, bez vađenja i poliranja radne elektrode između polarizacija. Iz voltamograma i kronopotenciograma prikazanih na **Slikama 74-76**, **86** i **104-106** uočava se da tijekom druge i treće uzastopne polarizacije radne elektrode, anodni oksidacijski strujni odziv opada, tj. vrijednosti struje anodnog pika (I_p) se smanjuju. Elektrooksidacija CGAs i CFA na površini GC elektrode vjerojatno stvara adsorpcijski sloj oksidacijskog produkta ili produkata. Oksidacija molekula CGAs i CFA u drugoj i trećoj uzastopnoj polarizaciji na površini GC elektrode, otežana je zbog toga što se difuzija molekula iz otopine na površinu radne elektrode odvija kroz sloj

adsorpcijskih produkata. Zbog toga se strujni odziv smanjuje, a potencijal oksidacijskog pika se pomiče prema pozitivnijim vrijednostima potencijala, jer je potrebna veća energija (viši potencijal) da bi došlo do transfera elektrona odnosno oksidacije. Ovakvo ponašanje uvjetovano procesom adsorpcije primijećeno je kod svih ispitivanih CQAs i CFA.

Utjecaj pH vrijednosti otopine

Utjecaj pH vrijednosti otopine osnovnog elektrolita (0,1 mol L^{-1} PBS) na SW i DP voltamograme CQAs ispitan je na primjeru 5-CQA, budući da je ona najzastupljenija CQAs u kavi, i predstavlja standard za određivanje sadržaja ukupnih CGAs u ispitivanim uzorcima kave. Utjecaj pH vrijednosti otopina pufera, u rasponu pH vrijednosti od 3,0 do 8,0, na elektrokemijsko ponašanje 5-CQA prikazan je na **Slikama 83** i **87**. Vidljivo je i kod SWV metode (**Slika 83**) i kod DPV metode (**Slika 87**), da oksidacijski strujni odziv 5-CQA raste od pH vrijednosti 3,0 do 7,0, kada doseže svoj maksimum, a daljnjim povećanjem pH vrijednosti strujni odziv opada. Ovakvo ponašanje 5-CQA (i CQAs općenito) može se objasniti na sljedeći način. Molekula 5-CQA (i ostale CQAs) sadrži u svojoj kemijskoj strukturi tri moguća mjesta za disocijaciju (karboksilnu skupinu na cikloheksanskom prstenu QA te dvije –OH skupine u kateholnoj strukturi molekule 5-CQA) (**Slika 10-10**). Prema Maegawa i sur. (2007.) pK_a za 5-CQA iznose: pK_1=3,50, pK_2=8,42 i pK_3=11,0. Ove tri pK_a vrijednosti upotrijebljene su za crtanje distribucijskog dijagrama (**Slika 181**) mogućih specija u otopini 5-CQA, koncentracije $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} i ionske jakosti I=0,1. Za crtanje distribucijskog dijagrama specija prisutnih u otopini 5-CQA različitih pH vrijednosti korišten je kompjutorski program CurTiPot software (Gutz, 2014).



Slika 181 Distribucijski dijagram $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} otopine 5-CQA (*http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html*)

Iz distribucijskog dijagrama specija vidljivo je da su pri pH vrijednostima 3,0 i 4,0 u otopini 5-CQA prisutne neutralna molekula 5-CQA i anion 5-CQA$^-$, a pri pH vrijednosti 5,0-7,0 prisutan je uglavnom anion 5-CQA$^-$, koji pri pH 7,0 čini oko 95% od svih specija u otopini. Pri pH vrijednosti 8,0 prisutni su anioni 5-CQA$^-$ i 5-CQA^{2-}. Anion 5-CQA$^-$ nastao je disocijacijom karboksilne skupine (deprotonizacija) na cikloheksanskom prstenu QA u sklopu strukture 5-CQA. Budući da se fenolatni anioni lakše oksidiraju nego neutralna fenolna molekula (Janeiro i Brett, 2004.), čini se logičnim da oksidacijska struja 5-CQA$^-$ aniona postiže svoj maksimum kod pH 7,0, budući da kod te pH vrijednosti ima i maksimalnu koncentraciju u otopini. Prema distribucijskom dijagramu opadanjem pH vrijednosti otopine od 7,0 prema 3,0, koncentracija 5-CQA$^-$ opada i opada strujni odziv. Ovakvo ponašanje 5-CQA u ovisnosti o pH u distribucijskom dijagramu, pokazalo se i na SW i DP voltamogramima (**Slike 83** i **87**). Dobiveni maksimum oksidacijskog strujnog odziva 5-CQA pri pH 7,0 slaže se s rezultatima istraživanja koje su proveli Santos i sur. (2011.), ispitujući ovisnost struje anodnog pika 5-CQA o pH vrijednosti pufera koristeći DPV metodu.

Iz detalja prikazanog na **Slikama 83** i **87** vidljivo je da je oksidacija 5-CQA ovisna o pH vrijednosti otopine. Potencijal oksidacijskog pika (E_p) linearno opada prema manje pozitivnijim vrijednostima s povećanjem pH vrijednostima otopine u rasponu pH vrijednost od 3 do 8. To ukazuje da deprotonacija ima značajnu ulogu u oksidacijskom procesu (**Slika 83**). Nagib linearne ovisnosti d(E)/d(pH) iznosi -59 mV/pH, što prema dijagnostičkim kriterijima znači da oksidacija 5-CQA na površini GC elektrode uključuje izmjenu jednakog broja elektrona (n) i protona (m) (Stradins i Hasanli, 1993.). Uzimajući u obzir širinu na polovici visine anodnog pika kod DP voltamograma 5-CQA od $W_{1/2}$~60 mV što odgovara izmjeni dva elektrona (n=2), može se zaključiti da se oksidacija molekule 5-CQA na GC elektrodi odvija putem izmjene dva elektrona (n) i dva protona (m), tj. može se prikazati kao $2e^-$-$2H^+$ oksidacijski mehanizam. Maksimalni strujni odziv 5-CQA dobiven je u otopinama pH vrijednosti 7,0 (**detalj Slike 83**).

Utjecaj frekvencije pobudnog signala (efektivne brzine polarizacije)

Kinetika elektrokemijskih reakcija koje se odvijaju na nekoj elektrodi može se pratiti preko promjene brzine polarizacije. Kod SWV metode ova promjena prati se preko utjecaja frekvencije pobudnog signala, budući da je frekvencija pobudnog signala povezana s efektivnom brzinom polarizacije (umnožak frekvencije pobudnog signala, f, i porasta stepenastog potencijala, ΔE, predstavlja efektivnu brzinu polarizacije kod SWV).

Ispitan je utjecaj frekvencije pobudnog signala u otopini 5-CQA na SW voltamograme (**Slika 82**) u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0, c=3·10^{-5} mol L^{-1}, u rasponu frekvencija od 50 do 150 Hz. Na **Slici 82** prikazan je ukupni strujni odziv (ΔI), u ovisnosti o frekvenciji pobudnog signala (f/Hz). Izgled SW voltamograma ne mijenja se značajno u ovisnosti o frekvenciji pobudnog signala. Ukupni strujni odziv pika (ΔI_p) linearna je funkcija korijena iz frekvencije pobudnog signala $(f/s^{-1})^{1/2}$ (**detalj Slike 82**). Potencijal pika (E_p) pomiče se neznatno prema pozitivnijim vrijednostima sa porastom frekvencije pobudnog signala, ali ne više od 16 mV. Prema SWV kriterijima o reverzibilnosti procesa (Mirčeski i sur., 2007.), ove dvije činjenice o ovisnosti E_p i ΔI_p o frekvenciji pobudnog signala ukazuju da se u otopini 5-CQA na površini GC elektrode odvija reverzibilna, difuzijski kontrolirana reakcija izmjene naboja tj. elektrona i protona. Drugim riječima, elektrokemijska reakcija oksidacije 5-CQA na GC elektrodi odvija se putem $2e^-$-$2H^+$ mehanizma koji je kontroliran difuzijom 5-CQA specija iz otopine na GC elektrodu.

Utjecaj koncentracije

Ispitan je utjecaj koncentracija 5-CQA na SW i DP voltamograme te na FTS kronopotenciograme u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 (**Slike 84, 88** i **107**). Područje koncentracije u kojem su SW i DP voltamogrami pokazali linearnu ovisnost struje pika I_p o koncentraciji (c) otopine 5-CQA, nalazi se u području koncentracije od 5-50 µmol L^{-1}. FTS kronopotenciogrami su linearni za šire koncentracijsko područje od 5 do 100 µmol L^{-1}. Struja pika (I_p) ukupnog strujnog odziva (ΔI) na potencijalu od 0,223 V kod SWV, linearno raste s povećanjem koncentracije 5-CQA (**Detalj Slike 84**). Povećanjem koncentracije 5-CQA kod SW voltamograma iznad 50 µmol L^{-1} ukupni strujni odziv nije više linearna funkcija koncentracije, nego opada, vjerojatno uslijed snažne adsorpcije 5-CQA i njenih oksidacijskih produkata na površini GC elektrode. Kalibracijska krivulja (pravac) u linearnom području koncentracije od 5 do 50 µmol L^{-1} kod SWV metode, prikazana je **Jednadžbom 9**

$$I_p/\mu A = 0{,}20326 + 0{,}37483\ x \qquad (9)$$

Gdje su: I_p= struja pika ukupnog strujnog odziva (ΔI)

x =koncentracija 5-CQA izražena u µmol L^{-1},

(koeficijent korelacije, r=0,99985; p<0,0001). Osjetljivost SWV metode određena je preko granice detekcije (*LOD*) i granice kvantifikacije (*LOQ*) i izračunata korištenjem **Jednadžbe 9**. U ovoj disertaciji za SWV metodu, granica detekcije (*LOD*) za analitičko određivanje 5-CQA iznosi

$7{,}7\cdot10^{-7}$ mol L^{-1}, a granica kvantifikacije (*LOQ*)= $2{,}5\cdot10^{-6}$ mol L^{-1}. Osjetljivost SWV metode (*LOD* i *LOQ*) dobivena u ovoj disertaciji u skladu je s literaturnim podacima objavljenim u radovima drugih autora koji su koristili SWV za analitičko određivanje klorogenske kiseline (5-CQA). (Fernandes i sur., 2009.;Carvalho i sur., 2008.; Moccelini i sur., 2008.).

Kod DPV metode anodni oksidacijski strujni odziv (struja pika, I_p) na potencijalu od 0,187 V za 5-CQA linearno se povećava porastom koncentracije 5-CQA u rasponu koncentracija od 5 do 50 µmol L^{-1} (**Detalj Slike 88**). Pri višim koncentracijama ovaj odnos nije više linearna funkcija, uslijed adsorpcijskih procesa (kao i kod SWV). Kalibracijski pravac dobiven iz DP voltamograma 5-CQA prikazan je **Jednadžbom 10**.

$$I_p/\mu A=0{,}02216+0{,}04908\ x \qquad (10)$$

Gdje su: I_p= struja anodnog pika

x= koncentracija 5-CQA izražena u µmol L^{-1},

(koeficijent korelacije, r=0,9998; p<0,0001). S ciljem određivanja osjetljivosti DPV metode izračunate su *LOD* i *LOQ* koje za korištenu DPV metodu iznose: *LOD*=$1{,}2\cdot10^{-6}$ mol L^{-1}, *LOQ*=$4{,}0\cdot10^{-6}$ mol L^{-1}.

Kod FTS kronopotenciograma, oksidacijski strujni odziv za otopinu 5-CQA, linearan je u području koncentracija od 5 do 100 µmol L^{-1} (**Slika 107**). Pri višim koncentracijama 5-CQA, opada strujni odziv i njihov odnos nije više linearna funkcija, uslijed adsorpcijskih procesa (**detalj Slike 107**). Kalibracijski pravac za izračun sadržaja CGAs preko 5-CQA ekvivalenta, prikazan je **Jednadžbom 11**.

$$dt/dE= -0{,}56656 +0{,}83332x \qquad (11)$$

Gdje su: *dt/dE* strujni odziv

x = koncentracija 5-CQA izražena u µmol L^{-1},

(koeficijent korelacije, r=0,9999; p<0,0001).

Osjetljivost FTSCP metode, izražena preko *LOD* i *LOQ* iznosi za *LOD*=$5{,}76\cdot10^{-7}$ mol L^{-1} i *LOQ*=$1{,}92\cdot10^{-6}$ mol L^{-1} u odnosu na SWV i DPV metode, pokazala je linearnu ovisnost u znatno širem rasponu koncentracija.

Mehanizam oksidacije CQAs

Na osnovi rezultata SWV, DPV i FTSC mjerenja elektrokemijskih svojstava CQA, kao i objašnjena u tekstu ove disertacije, povezanih s utjecajem pojedinih eksperimentalnih parametara (kemijske strukture, višestruke uzastopne polarizacije, pH vrijednosti otopine, frekvencije pobudnog signala SWV te koncentracije) na elektrokemijska svojstva CQAs, može se zaključiti da se elektrokemijska oksidacija CQAs odvija na kateholnoj strukturnoj jedinici u molekulama CQAs (**Slika 11**).

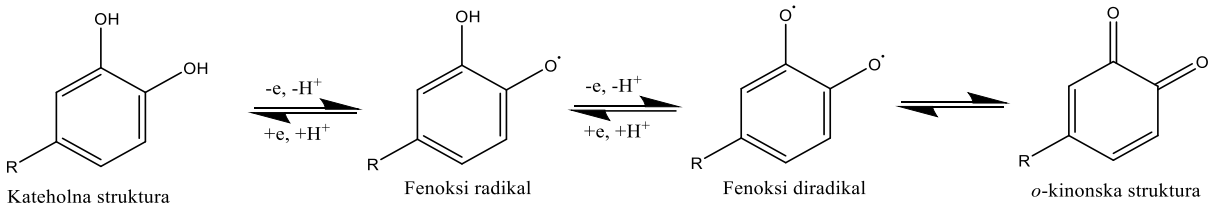
Iz literaturnih podataka poznato je da katehol i polifenolni spojevi koji u sebi sadrže kateholnu strukturnu jedinicu (katehin, kvercetin, rutin, kafeinska kiselina, itd.), podliježu reverzibilnoj oksidaciji formirajući *o*-kinonsku strukturu putem dvoelektronskog i dvoprotonskog procesa tijekom anodne polarizacije (tzv. $2e^-$, $2H^+$ mehanizam), (Enache i Brett, 2011.; Janeiro i Brett, 2004.; Brett i Ghica, 2003.; Ghica i Brett, 2005.; Trabelsi i sur., 2004.; Gil i Couto, 2013.). Mehanizam oksidacije katehola i svih onih molekula koje u sebi sadrže kateholnu strukturu nije ipak tako jednostavan kako ga predstavljaju u svojim istraživanjima navedeni autori. Naime u najnovijem, vrlo detaljnom istraživanju mehanizma i kinetike oksidacije katehola, Lin i sur. (2015.) utvrdili su da se mehanizam elektrokemijske oksidacije/redukcije katehola odvija različitim putevima, prije svega u ovisnosti o pH mediju te da uključuje formiranje niza međuprodukata, kao što su različiti radikali, radikal kationi, anionske i kationske specije, itd. Ipak, ovaj proces završava nastankom *o*-kinonske strukture, kako su zaključili navedeni autori. Budući da u svojoj strukturi CQAs sadrže kateholnu strukturnu jedinicu kao elektroaktivni centar, vrlo je vjerojatno da se i elektrokemijska oksidacija/redukcija CQAs odvija na isti ili sličan način kao i kod katehola i gore navedenih spojeva s kateholnom strukturom.

Ovakav zaključak o mehanizmu oksidacije CQAs u skladu je s literaturnim podacima istraživanja elektrokemijskog ponašanja klorogenske kiseline (5-CQA) od strane drugih autora, gdje je također predložen dvoelektronski i dvoprotonski oksidacijsko/redukcijski mehanizam za klorogensku kiselinu, 5-CQA (Namazian i Zare, 2005.; Yardim, 2012.).

Mehanizam oksidacije CQAs, odvija se dakle u dva stupnja. U prvom stupnju otpuštanjem jednog elektrona i jednog protona, nastaje fenoksi radikal koji je nestabilan. Slijedi daljnja reakcija otpuštanja još jednog elektrona i protona te nastaje fenoksi diradikal koji je također termodinamički i kemijski nestabilan te se stabilizira nastajanjem *o*-kinonske strukture. Svi su stupnjevi u ovoj elektrokemijskoj reakciji reverzibilni. Dakle mehanizam elektrokemijske

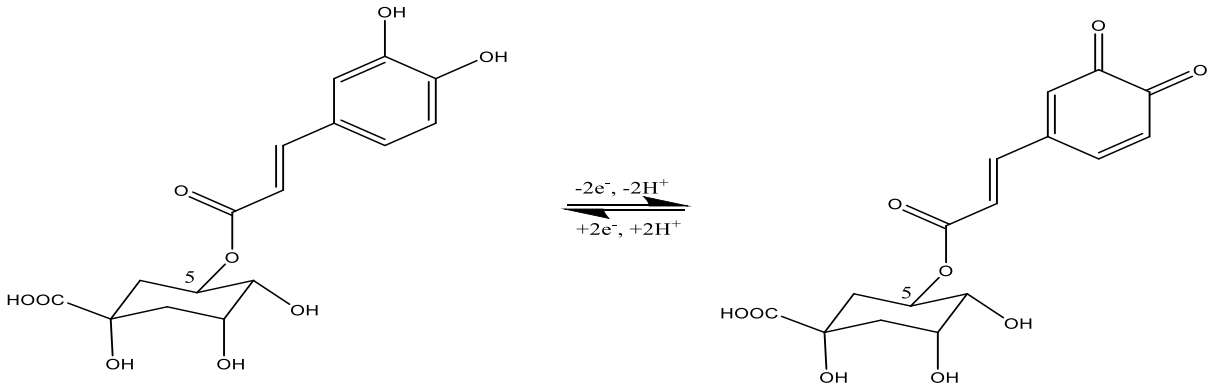
oksidacije CQAs (5-CQA, 4-CQA i 3-CQA) odvija se reverzibilnim $2e^{-}$-$2H^{+}$ mehanizmom te uključuje oksidaciju dvije –OH skupine u *o*-položaju CQAs u *ortho*-kinonsku strukturu (**Slika 181**). Istom slikom može se opisati i elektrokemijska oksidacija CFA, budući da ona također sadrži u sebi kateholnu strukturu, a ujedno je i sama strukturna jedinica u molekulama CQAs.

Također shemom prikazanom na **Slici 181** može se opisati i mehanizam oksidacije diCQAs, budući da te kiseline u svojoj strukturi sadrže dvije kateholne strukturne jedinice i pretpostavka je da se mehanizam njihove elektrokemijske oksidacije može također opisati shemom prikazanom na **Slici 181**.



Slika 181 Mehanizam elektrokemijske oksidacije CQAs, diCQAs i CFA

Na **Slici 182** prikazan je mehanizam elektrokemijske oksidacije 5-CQA, kao primjer mehanizma oksidacije i ostalih izomera CQAs.



Slika 182 Mehanizam elektrokemijske oksidacije 5-CQA

5.2.2. Elektrokemijska svojstva dikafeoilkina kiselina

Kemijska struktura 3,4-diCQA, 3,5-diCQA i 4,5-diCQA ispitanih u ovoj disertaciji prikazana je na **Slici 11**. Elektrokemijska svojstva diCQAs ispitana su SW i DP voltametrijom te FTS kronopotencijometrijom i to na način da je ispitan utjecaj nekih eksperimentalnih parametara (kemijske strukture i višestruke uzastopne polarizacije) na SW i DP voltamograme te FTS kronopotenciograme.

Utjecaj kemijske strukture

Utjecaj kemijske strukture diCQAs na njihova elektrokemijska svojstva, ispitan je pomoću SW i DP voltametrije te FTS kronopotenciometrije (**Slike 65-67, 72, 85** i **100-103**). Kemijska struktura diCQAs uspoređena je s kemijskom strukturom CQAs i CFA kao njihovim strukturnim jedinicama.

Iz **Slika 65-67** na kojima su prikazani SW voltamogrami diCQAs, $c = 3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0, vidljiv je jedan oksidacijski strujni odziv kod svih ispitanih diCQAs na potencijalu od 0,229 V i jedan redukcijski strujni odziv na potencijalu od 0,233 V. Činjenica da je na SW voltamogramima prikazanim na **Slikama 65-67**, prisutna i oksidacijska i redukcijska komponenta ukupnog strujnog odziva i da se vrijednosti oksidacijskog i redukcijskog pika razlikuju samo 4 mV, prema kriterijima SWV reverzibilnosti, ukazuje da se na GC elektrodi odvija reverzibilan proces (Mirčeski i sur., 2007). Na **Slici 72** prikazan je ukupni strujni odziv (ΔI) za sve ispitivane diCQAs, CGAs i CFA, i to na potencijalima za CFA na 0,191 V, CQAs na 0,223 V i diCQAs na 0,229 V. Trend pomaka oksidacijskog potencijala prema pozitivnijim vrijednostima je od CFA, preko CQAs do diCQAs.

Na **Slici 85** prikazana je usporedba DP voltamograma diCQAs s onim od CQAs i CFA; vidljiv je pomak anodnog oksidacijskog potencijala prema pozitivnijim vrijednostima i porast strujnog odziva u nizu: CFA, CQAs i diCQAs, što je i očekivano s obzirom na njihovu različitu kemijsku strukturu. Iz DPV mjerenja u otopinama diCQAs (**Slika 85**) vidljivo je da širina na polovici visine anodnog oksidacijskog pika za sve DP voltamograme CGAs iznosi $W_{1/2} \sim 60$ mV, što ukazuje na izmjenu dva elektrona tijekom elektrokemijske anodne oksidacije diCQAs,CQAs i CFA (Scholz, 2010.). Ista pojava (pomak potencijala prema pozitivnijim vrijednostima i porast strujnog odziva) za diCQAs primijećena je i na FTS kronopotenciogramima (**Slike 100-103**). Prema kemijskoj strukturi prikazanoj na **Slici 11** diCQAs sadrže dvije kateholne skupine sa po dvije –OH skupine u *o*-položaju. S obzirom na sličnu kemijsku strukturu i SWV odziv, moguće je zaključiti da se mehanizam oksidacije i redukcije diCQAs odvija na jednak ili vrlo sličan način kao i kod CQAs i CFA.

U literaturni nema podataka za E_{HOMO} vrijednosti diCQAs te se stoga elektrokemijska svojstva diCQAs ne mogu objasniti prema teoriji molekulskih orbitala. Objašnjenje utjecaja kemijske strukture diCQAs na njihova elektrokemijska svojstva, moguće je jedino na osnovi utjecaja ED i EW skupina prisutnih u njihovoj strukturi. Na **Slici 11** vidljivo je da diCQAs sadrže dvije

kateholne i dvije esterske skupine u svojoj kemijskoj strukturi. Jaki EWD efekt (tj. „odvlačenje elektrona“) dvije esterske skupine, jako je izražen i zbog toga je oksidacijski potencijal diCQAs pomaknut prema pozitivnijim vrijednostima u usporedbi s CQAs i CFA. Viši oksidacijski potencijal odgovara višem strujnom odzivu, odnosno što je prijenos elektrona kompliciraniji (teži), to je potrebna viša struja (više energije) za oksidaciju molekule. Stoga strujni odziv anodnog oksidacijskog pika (I_p) raste slijedom: CFA, CQAs, diCQAs (**Slike 72, 85, 103**).

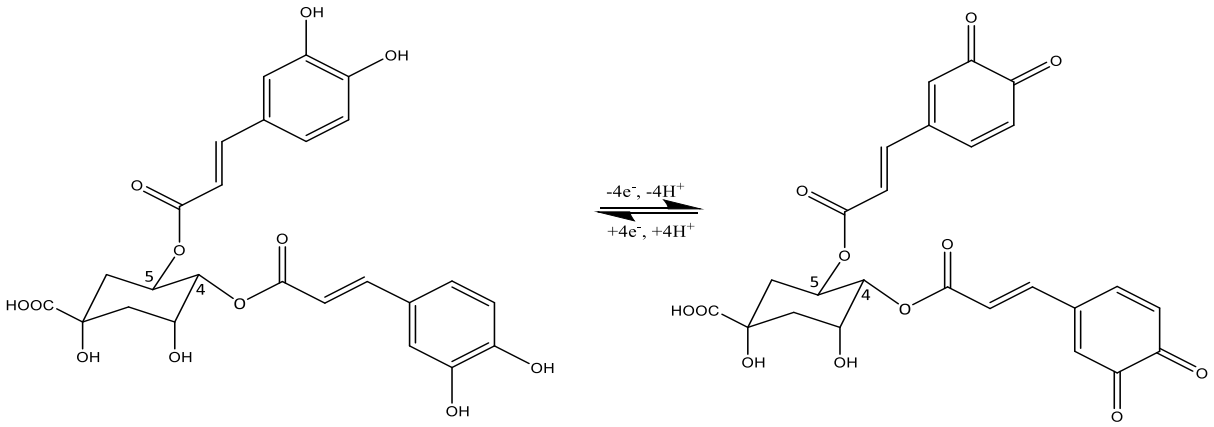
Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije kod SWV proveden je u istoj otopini bez dodatnog poliranja GC elektrode. Na **Slici 74** prikazana je višestruka uzastopna polarizacija 4,5-diCQA (kao predstavnika diCQAs) c=3·10^{-5} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS pufera pH 7,0. Iz SW voltamograma vidljivo je da u drugoj i trećoj uzastopnoj polarizaciji oksidacijski strujni odziv opada, a oksidacijski potencijal se pomiče prema pozitivnijim vrijednostima. Tijekom elektrooksidacije diCQAs (4,5-diCQAs) na površini GC elektrode vjerojatno se stvara adsorpcijski sloj oksidacijskog produkta ili produkata. Daljnja elektrooksidacija, u drugoj i trećoj uzastopnoj polarizaciji, otežana je zbog stvaranja tog adsorpcijskog sloja na površini GC elektrode te se zbog toga strujni odziv smanjuje višestrukom uzastopnom polarizacijom. Ovakav utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na vrijednosti oksidacijskih potencijala i oksidacijskih struja, uočen je kod svih CGAs, dok je izrazito naglašen kod diCQAs.

Mehanizam oksidacije diCQAs

DiCQAs sadrže u svojoj kemijskoj strukturi dvije kateholne skupine, ali pokazuju samo jedan anodni oksidacijski strujni odziv kod SW i DP voltamograma i FTS kronopotenciograma, jednako kao i CQAs. To ukazuje da oksidacijski potencijali obje kateholne skupine imaju iste ili vrlo slične vrijednosti te je stoga nemoguće razdvojiti njihove strujne odzive tj. pikove. Uzimajući u obzir SWV, DPV i FTSCP rezultate prikazane u ovoj disertaciji, mogući mehanizam elektrokemijske oksidacije diCQAs odvija se preko dva reverzibilna 2e$^-$-2H$^+$ procesa koji se vjerojatno odvijaju istodobno. To znači da se oksidacija odvija istovremeno na obje kateholne skupine u strukturi diCQAs (**Slika 11**). Ovakav, odnosno sličan mehanizam elektrooksidacije, predložen je u radu Gil i sur. (2013.) za ružmarinsku kiselinu koja u svojoj kemijskoj strukturi također sadrži dvije kateholne skupine.

Općenita shema mehanizma elektrokemijske oksidacije diCQAs prikazana je na **Slici 181**, a na **Slici 183** prikazan je mehanizam elektrokemijske oksidacije 4,5-diCQA, kao predstavnika ostalih diCQAs.



Slika 183 Mehanizam elektrokemijske oksidacije 4,5-diCQA

5.2.3. Elektrokemijska svojstva feruloilkina kiselina

Ispitana su elektrokemijska svojstva feruloilkina kiselina, FQAs i to: (5-FQA, 4-FQA i 3-FQA) te ferulične kiseline (FA) kao njihove strukturne jedinice, metodama pravokutnovalne (SW) i diferencijalne pulsne (DP) voltametrije te FTS kronopotenciometrije. Ispitani su utjecaji kemijske strukture i višestruke uzastopne polarizacije na SW i DP voltamograme te FTS kronopotenciograme.

Utjecaj kemijske strukture

Utjecaj kemijske strukture FQAs i FA, koncentracije $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} PBS puferu pH 7,0, na SW i DP voltamograme te FTS kronopotenciograme prikazan je na **Slikama 68-71, 73, 89-90 i 108-111.** SW voltamogrami FQAs (**Slike 68-70**) pokazuju jedan oksidacijski strujni odziv (pik) na potencijalu 0,459 V, dok FA (**Slika 71**) pokazuje dva oksidacijska pika; prvi slabije izražen pik na približno 0,420 V i drugi bolje izražen oksidacijski pik na potencijalu 0,528 V. Na DP voltamogramima FQAs (**Slika 89**) uočen je jedan vrlo izražen oksidacijski pik na potencijalima: 0,419 V (5-FQA), 0,425 V (3-FQA) i 0,430 V (4-FQA). Na DP voltamogramu FA (**Slika 89**) pojavljuju se dva dobro izražena oksidacijska pika: prvi na potencijalu 0,363 V i drugi na potencijalu 0,466 V. Na FTS kronopotenciograma FQAs (**Slike 108-109**) pojavljuju se dva oksidacijska pika: jedan oksidacijski pik na potencijalu 0,495 V za 5-FQA i 0,506 V za 3-FQA, a drugi oksidacijski pik (predpik) na potencijalu 0,3 V. FTS kronopotenciogram FA (**Slika 110**)

pokazuje dva jasno izražena oksidacijska pika: prvi na potencijalu 0,439 V i drugi na potencijalu 0,562 V.

Rezultati mjerenja dobiveni primjenom tri elektrokemijske metode (SWV, DPV i FTSCP) ukazuju da FQAs pokazuju slično elektrokemijsko ponašanje u odnosu na FA, koja predstavlja njihovu strukturnu jedinicu. Rezultati mjerenja ukazuju da esterifikacija FA s QA, kod čega nastaju FQAs, znatno utječe na elektrokemijska svojstava FQAs, mijenjajući neka njihova svojstva, npr. vrijednost oksidacijskog potencijala. Utjecaj kemijske strukture na elektrokemijska svojstva FQAs prikazan je na **Slikama 73, 89 i 111.**

U svim mjerenjima (SWV,DPV i FTSCP) uočeno je da se kod elektrokemijske oksidacije FA pojavljuju dva oksidacijska pika. Oksidacijski pik FQAs (kod sve tri elektrokemijske metode, SWV, DPV i FTSCP) pomaknut je prema pozitivnijim vrijednostima potencijala u odnosu na prvi oksidacijski pik FA. To je u skladu s ranijim objašnjenjima utjecaja kemijske strukture na elektrokemijsko ponašanja CQAs i diCQAs. I kod FQAs (kao i kod CQAs i diCQAs) uslijed esterifikacije i snažnog EWD efekta esterske skupine (-COOR) oksidacijski potencijal FQAs pomaknut je prema pozitivnijim vrijednostima u odnosu na molekulu FA. Objašnjenje ovakvog elektrokemijskog ponašanja FQAs proizlazi iz činjenice da –COOR skupina prisutna u strukturi FQAs ima jaki elektron EWD efekt, koji pomiče gustoću elektronskog oblaka s benzenskog prstena na estersku skupinu u bočnom lancu (**Slika 11**), što otežava proces otpuštanja elektrona na benzenskoj jezgri, odnosno proces oksidacije. To je razlog zbog kojeg FQAs imaju pozitivniji oksidacijski potencijal od FA.

U nekim ranijim elektrokemijskim mjerenjima pronađenim u literaturi, autori navode da FA ima znatno pozitivniji oksidacijski potencijal od kafeinske kiseline (CFA), (Kilmartin, 2001.; Gaspar i sur., 2009.; Enache i sur., 2013.). Supstitucija 3-hidroksi skupine kafeinske kiseline metoksi-skupinom (-OCH_3) u kemijskoj strukturi ferulične kiseline, pomiče redoks potencijal prema pozitivnijim vrijednostima. Metoksi-skupina (-OCH_3) je slabiji elektron donor od hidroksi-skupine (-OH), što utječe na manju elektronsku gustoću na benzenskoj jezgri i teži proces oksidacije (otpuštanja elektrona) u molekuli FA u odnosu na CFA. Metoksi-skupina smanjuje stabilnost fenoksi radikala koji nastaje oksidacijom FA i onemogućuje stvaranje intermolekularnih veza (npr. vodikove veze) koja stabiliziraju fenoksi radikal. Za stabilnost fenoksi-radikala i lakšu oksidaciju elektroaktivnih specija, kao što su npr. hidroksicimetne kiseline (CFA i FA), bitno je prisustvo dvije –OH skupine u *o*-položaju, tj. kateholna struktura.

Na temelju svega navedenoga, logično je da ferulična kiselina u usporedbi s kafeinskom kiselinom ima viši oksidacijski potencijal, jer ne posjeduje kateholnu strukturu. Stoga i esteri FA tj. FQAs pokazuju znatno viši oksidacijski potencijal u odnosu na estere CFA tj. CQAs i diCQAs.

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije

Na **Slikama 77-81, 91-94 i 112** prikazan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na SW i DP voltamograme te FTS kronopotenciograme u otopinama $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} FQAs i FA u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Na **Slikama 80, 81, 94 i 112** prikazan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije FA na SW i DP voltamograme i FTS kronopotenciograme. Vidljivo je iz navedenih slika da se tijekom prve anodne polarizacije FA, pojavljuju dva anodna oksidacijska strujna odziva (pik 1 i 2). Višestrukom uzastopnom polarizacijom FA nastaje treći anodni oksidacijski strujni odziv (pik 3) i to na nižim vrijednostima potencijala u odnosu na pikove 1 i 2 nastale tijekom prve polarizacije. Istovremeno nastankom trećeg anodnog strujnog odziva (pik 3) smanjuje se anodni oksidacijski strujni odziv pika 1, što znači da je nastanak novog elektroaktivnog spoja koji se oksidira u piku 3, usko povezan s oksidacijskim produktom FA nastalim na potencijalu prvog pika 1 (**Slika 94**). Strujni odziv drugog oksidacijskog pika 2 smanjuje se višestrukom uzastopnom polarizacijom, uslijed adsorpcije oksidacijskih produkata FA. Novonastali elektroaktivni spoj (pik 3) vjerojatno se može pripisati molekuli 5-hidroksiferuliče kiseline (5-HFA), a na temelju SW i DP voltamograma iste (**Slika 81 i 90).** Vidljivo je da je oksidacijski strujni odziv na potencijalu od 0,200 V za 5-HFA identičan onom koji se pojavljuje pri drugoj i trećoj polarizaciji FA (**Slike 80, 81, 90 i 94**), tj. da 5-HFA predstavlja novonastali oksidacijski produkt FA koji je povezan s pikom 1. Slično elektrokemijsko ponašanje tj. nastajanje nove, elektrokemijski aktivnije specije tijekom uzastopne oksidacije FA zabilježeno je u literaturi u radu Manaia i sur. (2012.), ali i za spojeve koji imaju kemijsku strukturu sličnu FA (tj. -OH i $-OCH_3$ skupine na benzenskoj jezgri), kao što su kurkumin, kapsaicin i eugenol (Kachoosangi i sur., 2008.; Li i sur., 2014.; Lin i sur., 2014.; Lau i sur., 2015.).

Istraživanje utjecaja višestruke uzastopne polarizacije FQAs (**Slike 77-79, 91-113**) pokazalo je jedan jasno izražen oksidacijski strujni odziv tijekom prve polarizacije. Daljnjom uzastopnom polarizacijom nastaje novi elektroaktivni spoj na potencijalu od 0,200 V, slično kao i kod FA. Također kao i kod FA, nastajanjem novog spoja (pik 3), strujni odziv prvog pika 1 se smanjuje, što govori o uskoj poveznici FQAs i FA, tj. novonastali oksidacijski produkt FQAs koji se oksidira

na nižim potencijalima (pik 3) ima u sebi istu strukturnu jedinicu (vjerojatno 5-HFA), kao i novonastali oksidacijski produkt FA.

Mehanizam oksidacije FQAs

Na osnovi rezultata SWV, DPV i FTSCP mjerenja elektrokemijskih svojstava FQAs, kao i objašnjena u tekstu vezanim za utjecaj kemijske strukture i višestruke uzastopne polarizacije na elektrokemijska svojstva FQAs, može se zaključiti da se elektrokemijska oksidacija FQAs odvija na metoksi-fenolnoj strukturnoj jedinici u molekuli FQAs (**Slika 11**). Međutim da bi se objasnio mehanizam elektrokemijske oksidacije FQAs, potrebno je prije opisati mehanizam oksidacije FA, budući da je ona elektroaktivni dio (centar) u molekulama FQAs na kojem se odvijaju svi elektrooksidacijski procesi tijekom polarizacije FQAs.

U literaturi postoji znatno neslaganje o broju anodnih oksidacijskih pikova, njihovoj identifikaciji, a posebno o mehanizmu elektrokemijske oksidacije FA. Neki autori (Hapiot i sur., 1996.; Liu i sur., 2014.) uočili su samo jedan anodni oksidacijski pik koji pripisuju jednoelektronskoj, jednoprotonskoj oksidaciji FA i formiranju fenoksi radikala, koji zatim dimerizira putem radikal-radikal mehanizma, stvarajući na površini radne elektrode polimerni film. Neki drugi autori uočili su postojanje dva anodna oksidacijska pika, ali se znatno razlikuju u identifikaciji ovih pikova i objašnjenju mehanizma njihovog nastajanja. Tako, Trabelsi i sur. (2005.), predlažu tri različita mehanizma oksidacije FA u kojima kao konačni produkti oksidacije nastaju tri različita spoja: kafeinska kiselina, metoksi-hidrokinon i 5-hidroksiferulična kiselina (5-HFA). Oni pripisuju prvi oksidacijski pik oksidaciji FA u njenoj slobodnoj formi tj. oksidaciji FA iz otopine, dok drugi oksidacijski pik pripisuju oksidaciji FA koja je adsorbirana na površini elektrode. Manaia i sur. (2012.), pripisuju prvi oksidacijski pik ireverzibilnoj oksidaciji FA i formiranju kateholne strukture, dok drugi oksidacijski pik pripisuju reverzibilnoj oksidaciji na dvostrukoj vezi u bočnom lancu FA (**Slika 10**).

Iz SWV, DPV i FTSC istraživanja FA provedenih u ovoj disertaciji (**Slike 71, 73, 80, 81, 89, 90, 94, 110, 111**) može se zaključiti da FA pokazuje dva anodna oksidacijska pika tijekom prve anodne polarizacije. Prvi oksidacijski pik (pik 1) može se pripisati ireverzibilnom jednoelektronskom, jednoprotonskom procesu u kojem nastaje fenoksi radikal, koji može postojati u više izomernih formi (**Slika 184 A, B, C, D).** Ireverzibilnost prvog pika 1 potvrđena je u SWV mjerenjima , budući da se tijekom povratne polarizacije ne pojavljuje katodni pik (**Slika 71**). Svi izomerni oblici fenoksi radikala (**Slika 11**) termodinamički su nestabilni i nastoje

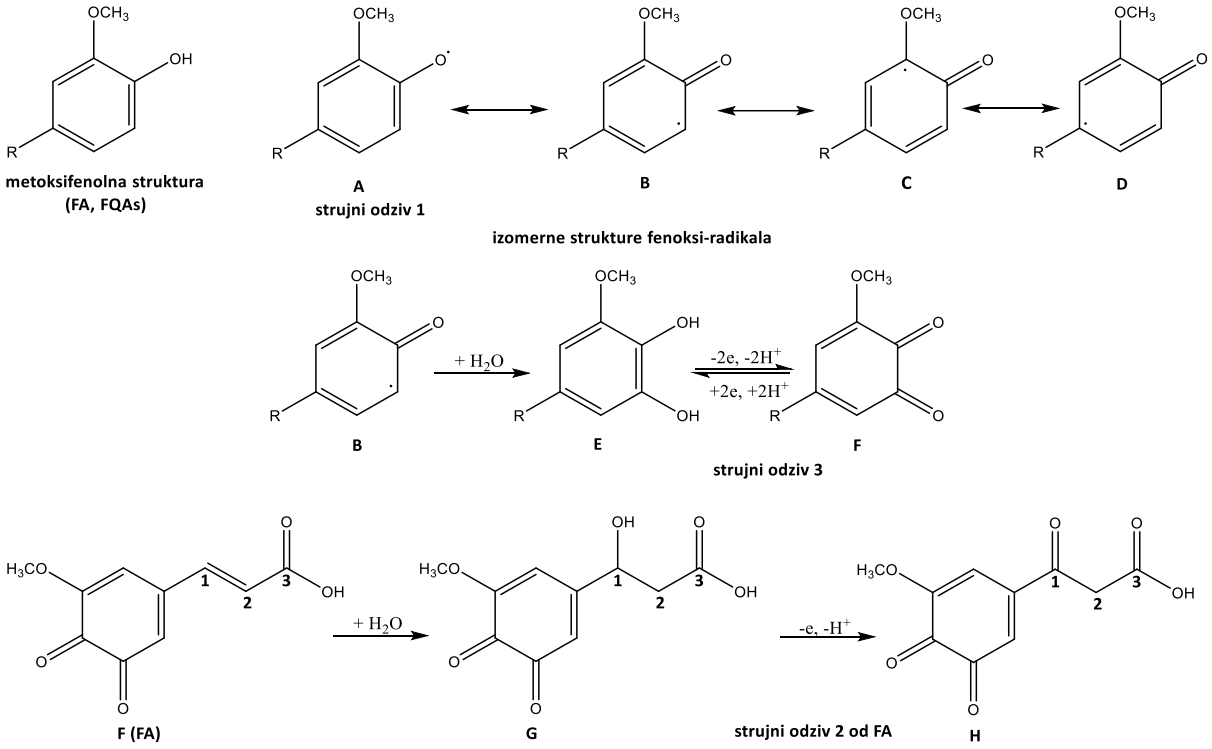
se stabilizirati različitim reakcijama kao što su: daljnja oksidacija, kemijska reakcija dimerizacije (Hapiot i sur., 1996.; Liu i sur., 2014.), i/ili različitim kemijskim reakcijama s molekulama vode koje su prisutne u otopini (vjerojatno reakcijama hidrolize) (Enache i Brett, 2011.; Manaia i sur., 2012.). Kemijski proces hidrolize dovodi do hidroksilacije benzenskog prstena (Manaia i sur., 2012.). Najveća gustoća elektrona u benzenskom prstenu fenoksi radikala, nalazi se na *o*- i *p*-položaju, u odnosu na –OH grupu prisutnu u fenolnoj strukturi prije oksidacije (Enache i Brett, 2011.). Budući da je *p*-položaj u strukturi fenoksi radikala FA zauzet bočnim lancem (R), hidroksilacija se odvija na *o*-položaju (**Slika 184).** Nakon hidroksilacije nastaje nova elektroaktivna specija s metoksi-kateholnom strukturom (5-hidroksiferulična kiselina, 5-HFA) (**Slika 184 E).** Ovakva identifikacija novonastale specije potvrđena je SW i DP voltamogramima komercijalno nabavljene 5-HFA (**Slike 81 i 90**). Nova specija nastala elektrokemijskom oksidacijom FA pokazuje tijekom druge i treće polarizacije (**Slike 80, 94**) istu vrijednost oksidacijskog potencijala (0,200 V), kao i komercijalno nabavljena 5-HFA **(Slika 81, 90**). Obje specije bivaju reverzibilno oksidirane tijekom druge i treće polarizacije putem mehanizma izmjene 2-elektrona i 2-protona ($2e^-$,$2H^+$mehanizam) (**Slika 184 F**). Ovakvo objašnjene mehanizma oksidacije FA potvrđeno je u SWV mjerenjima (**Slika 80**), gdje se jasno uočava redoks par na nižim potencijalima (pik 3). Slično objašnjenje oksidacijskog mehanizma FA predložili su i Manaia i sur. (2012.). Novonastala elektroaktivna specija (5-HFA, pik 3) ima niži oksidacijski potencijal od FA. To je i očekivano, budući da uvođenje dodatne –OH skupine u strukturu FA stabilizira fenoksi radikal, povećava gustoću elektrona na benzenskom prstenu, olakšava otpuštanje elektrona te stoga snižava oksidacijski potencijal. Iz svega navedenog može se zaključiti da se oksidacija FA odvija putem složenog elektrokemijskog-kemijskog (EC) mehanizma (**Slika 184)**.

Identifikacija anodnog pika 2 kod oksidacije FA opaženog primjenom sve tri elektrokemijske tehnike: SWV, DPV i FTSC (**Slike 71, 73, 81, 89, 90, 94, 110, 111**) ostaje i dalje nedovoljno jasna. Jedno je od mogućih objašnjenja da taj pik potječe od oksidacije dvostruke veze u bočnom lancu molekule FA (**Slika 10**), kao što su to predložili Manaia i sur. (2012.). Nakon hidroksilacije na poziciji 1 u bočnom lancu molekule FA nastaje nova –OH skupina (**Slika 184 G**), koja tijekom daljnje anodne polarizacije na višim potencijalima biva oksidirana u okso skupinu (**Slika 184 H**). Utvrđeno je u SWV mjerenjima FA (**Slika 71**) da ova oksidacija koja se odvija na potencijalu

pika 2 predstavlja ireverzibilni proces (nema katodnog pika) te da se odvija putem izmjene jednog elektrona i jednog protona.

Može se zaključiti da se oksidacija FQAs odvija istim ili vrlo sličnim mehanizmom kao i kod FA. Razlog za ovakav zaključak prije svega temelji se na činjenici da molekula FA predstavlja strukturnu jedinicu FQAs. Sva provedena SWV, DPV i FTSCP mjerenja pokazuju da molekule FQAs imaju veoma slično elektrokemijsko ponašanje odnosno vrlo slična elektrokemijska svojstva u odnosu na FA. To ukazuje da elektrokemijska svojstva FQAs potječu uglavnom od prisustva FA strukturne jedinice u njihovoj strukturi, tj. da FA predstavlja elektroaktivni dio (centar) u molekulama FQAs. Razlika u elektrokemijskom ponašanju FQAs u odnosu na FA jedino je u broju anodnih pikova. FQAs pokazuju samo jedan anodni oksidacijski pik tijekom prve polarizacije, dok FA pokazuje dva anodna pika (**Slika 80**). Nastanak drugog oksidacijskog pika kod FQAs nije moguć vjerojatno uslijed jakog EWD efekta ester (-COOR) grupe prisutne u njihovoj strukturi (**Slika 11**), koja odvlači elektrone s dvostruke veze u bočnom lancu, sprječavajući time mogućnost hidroksilacije na poziciji 1.

Sva ostala elektrokemijska svojstva FQAs (osim nepostojanja anodnog pika 2) vrlo su slična onima koja pokazuje FA, uključujući i stvaranje 5-HFA (pik 3) tijekom uzastopne polarizacije FQAs. Primjećuje se da je vrijednost oksidacijskog pika 3 ista i kod FQAs i kod FA, premda FQAs imaju pozitivniji potencijal pika 1 u odnosu na onaj kod FA, što je posljedica esterifikacije, odnosno EWD efekta esterske skupine u strukturi FQAs. Može se dakle na osnovi svih SWV, DPV i FTSCP rezultata mjerenja za FQAs zaključiti da se elektrokemijska oksidacija FQAs u njihovu metoksi-*ortho*-kinon strukturu odvija (kao i kod FA) putem složenog elektrokemijskog-kemijskog (EC) mehanizma, kako je to prikazano na **Slici 184**.



Slika 184 Mehanizam elektrokemijske oksidacije FQAs i FA

5.3. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PRAVOKUTNOVALNE VOLTAMETRIJE

Na osnovi rezultata dobivenih istraživanjima elektrokemijskih svojstava devet glavnih klorogenskih kiselina (CGAs) prisutnih kavi, vidljivo je da sve tri primijenjene elektrokemijske metode (SWV, DPV i FTSCP) koje su korištene za istraživanje elektrokemijskih svojstava CGAs, ispunjavaju analitičke kriterije kao metode za određivanje sadržaja CGAs u kavama. Stoga su sve tri metode odabrane za analizu ukupnog sadržaja CGAs u kavama.

Pravokutnovalna voltametrija (SWV) već je ranije korištena kao metoda za analizu sadržaja CGAs u kavi (Carvalho i sur., 2008.; Fernandes i sur., 2009.; Yardim, 2012.) U ovoj disertaciji odabrana je kao analitička metoda jer su SW voltamogrami svih CGAs bili vrlo dobro izraženi te se jasno mogla uočiti razlika u elektrokemijskom ponašanju između CQAs, diCQAs i FQAs. SWV odabrana je kao metoda i radi velike brzine analize, male potrebe za količinom ispitanog uzorka i niskog *LOD* i *LOQ*.

Elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava

Na **Slikama 115-124** prikazani su pravokutnovalni voltamogrami vodenih ekstrakata ispitivanih kava: *C. arabica* zeleno i prženo zrno, *C. robusta* zeleno i prženo zrno, Flatscher Olympia 100% Arabica (mljevena kava), Franck Guatemala 100% Arabica (mljevena kava), Nescafé Classic, Nescafé Espresso, Jacobs Monarch i Jacobs Intense (*instant* kave). Vodeni ekstrakti zelenih zrna kave za mjerenja su razrijeđeni u omjeru 1/100, dok su vodeni ekstrakti prženih zrna kava, mljevenih kava i instant kava razrijeđeni u omjeru 1/50 otopinom 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Potencijal strujnog vrha ukupnog strujnog odziva (potencijal pika, E_p) za vodene ekstrakte kava ima vrijednosti između 0,223 V i 0,229 V, ovisno o vrsti kave, (**Slike 115-124**), tj. nalazi se u području oksidacijskih potencijala 0,223 V za CQAs (**Slike 61-63**) i na diCQAs 0,229V (**Slike 65-67**). Izgled SW voltamograma vodenih ekstrakata svih kava identičan je ili vrlo sličan SW voltamogramima dobivenim u istraživanjima CQAs i diCQAs. SW voltamogrami svih uzoraka kava pokazuju jasno izraženu početnu (oksidacijsku) komponentu (I_f) i povratnu (redukcijsku komponentu (I_b) ukupnog strujnog odziva (ΔI). Iz ovih dviju činjenica (izgleda SW voltamograma kava i vrijednosti E_p) može se zaključiti da strujni odziv dobiven u uzorcima kava predstavlja zbroj pojedinačnih strujnih odziva svih CQAs i diCQAs prisutnih u ispitivanim vodenim ekstraktima kava, i to SWV registrira kao jedan ukupni strujni odziv, budući da je razlika u vrijednostima oksidacijskih potencijala između CQAs i diCQAs vrlo mala (6 mV). Dakle anodni oksidacijski pik opažen na SWV u svim ispitivanim uzorcima kave, može se pripisati istovremenoj oksidaciji smjese svih CQAs (5-CQA, 4-CQA, i 3-CQA) i diCQAs (3,4-diCQAs; 3,5-diCQAs i 4,5-diCQAs) prisutnih u kavama.

Razlike u vrijednostima potencijala anodnog pika ($E_{p,a}$) i katodnog pika ($E_{p,k}$) tj. ΔE_p vrijednosti u svim ispitivanim uzorcima kave, vrlo su male i maksimalno iznose 26 mV. Omjeri anodne i katodne struje pika, I_f/I_b iznose -1,7. Prema kriterijima o reverzibilnosti SWV, dobiveni rezultati za ΔE_p i omjer I_f/I_b ukazuju da se na GC elektrodi u vodenim ekstraktima kava tijekom anodne polarizacije odvija reverzibilna elektrokemijska reakcija oksidacije smjese svih prisutnih CQAs i diCQAs (Scholz, 2010.), po mehanizmu identičnom kao i u model otopinama CQAs i diCQAs.

Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava

Identifikacija prisustva pojedinih klorogenskih kiselina (CGAs) prvo je provedena primjenom HPLC metode pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 13**. SWV mjerenja (putem izgleda voltamograma, kao i elektrokemijskih svojstava) potvrdila su prisustvo CQAs i diCQAs u svim ispitivanim uzorcima kave. SWV metoda nije registrirala prisutnost FQAs u ispitivanim uzorcima kava (za razliku od DPV i FTSCP), vjerojatno uslijed velike brzine polarizacije (100 mV/s) u vrlo kratkom vremenskom periodu mjerenja (nekoliko sekundi).

Da bi se dodatno provela identifikacija anodnog pika, odnosno potvrdila oksidacija smjese CQAs i diCQAs u anodnom oksidacijskom piku na SW voltamogramima kava, u vodene ekstrakte kava dodavane su poznate koncentracije standarda pojedinih CQAs i diCQAs, tj izvršeno je tzv. obogaćivanje uzoraka kava (engl. *spiking*). Na **Slici 125** prikazana je na primjeru vodenog ekstrakta zelenog zrna *C. Arabice* identifikacija CGAs. U uzorak vodenog ekstrakta zelenog zrna *C. Arabice* (DF = 100) u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 dodano je: $1 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-CQA, 3,5-diCQA i 4,5-diCQA, u zasebnim neovisnim mjerenjima. Na pravokutnovalnim voltamogramima (**Slika 124)** uočava se porast strujnog odziva, ali bez promjene potencijala kod *spikinga* s 5-CQA, dok kod *spikinga* s diCQAs uočava se osim porasta strujnog odziva i mali pomak potencijala u iznosu od 2-6 mV prema pozitivnijim vrijednostima, vjerojatno zbog jakog utjecaja adsorpcije oksidacijskih produkata diCQAs na površini GC elektrode. Mjerenja provedena obogaćivanjem osnovnog uzorka kave (tj. *spiking*) nedvojbeno su potvrdila da se anodni oksidacijski strujni odziv dobiven u vodenim ekstraktima kava, odnosi na elektrokemijsku oksidaciju smjese CQAs i diCQAs prisutnih u svakom od ispitanih uzoraka kava.

Kvantifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava

Ukupni sadržaj CGAs u vodenim ekstraktima kava (CGAs-*total*) izračunat je iz struje anodnog pika (I_p) pojedinog uzorka kave, korištenjem kalibracijske krivulje otopine 5-CQA kao standarda u rasponu koncentracija od 5-50 µmol L^{-1} (**Slika 126**). Ukupne CGAs izražene su kao sadržaj 5-CQA ekvivalenata, tj. u mg 5-CQAE /100 g kave i prikazane u **Tablici 17.** Vidljivo je iz **Tablice 17** da je ukupni sadržaj CGAs najveći u ekstraktima zelenih zrna kave, zatim slijede mljevene kave, instant kave, a najmanji sadržaj ukupnih CGAs izmjeren je u ekstraktima prženih zrna kave. Sadržaj CGAs u ispitanim vodenim ekstraktima kava dobiven SWV metodom u skladu je s rezultatima dobivenih HPLC metodom (**Tablica 16**) te s literaturnim podacima

drugih autora koji su koristili HPLC metodu za analizu sadržaja ukupnih CQAs u kavama (Farah i sur., 2005.; Farah i sur., 2006. A i B; Farah i Donangelo, 2006.; Farah, 2012.; Perrone i sur., 2010.; Duarte i sur., 2010.; Mills i sur., 2013.). Uočava se značajan gubitak sadržaja ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava tijekom procesa prženja zelenih zrna (Farah i sur., 2005.; Farah i sur., 2006. A i B; Farah i Donangelo, 2006.; Farah, 2012.; Duarte i sur., 2010.; Perrone i sur., 2012.; Mills i sur., 2013.). Usporedbom dobivenih rezultata SWV metodom u ovoj disertaciji sa literaturnim podacima drugih autora koji su određivali sadržaj CGAs u uzorcima kava pomoću elektrokemijskih metoda (uglavnom primjenom biosenzora), prisutno je slaganje rezultata, iako potpuno slaganje nije moguće zbog različitih vrsta uzoraka kava, načina prženja te načina priprave ekstrakata kava (Kilmartin i Hsu, 2003.; Carvalho i sur., 2008.; Moccelini i sur., 2008.; Fernandes i sur., 2009.; Yardim, 2012.).

5.4. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE

Karakterizacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava provedena je i metodom diferencijalne pulsne voltametrije (DPV metodom), a na temelju rezultata koji su dobiveni DPV mjerenjima elektrokemijskih svojstava model otopina CGAs prisutnih u kavi. Stoga su ispitana elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava DPV metodom, s ciljem karakterizacije CGAs u navedenim uzorcima kave.

Elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava

Na **Slikama 127 do 136** prikazani su DP voltamogrami vodenih ekstrakata svih uzoraka kava, dobiveni u osnovnom elektrolitu 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Uzorci vodenih ekstrakata zelenih zrna kava za DPV mjerenja, razrijeđeni su s PBS puferom u omjeru 1/100, a uzorci prženih zrna, mljevene i *instant* kave u omjeru 1/50. Na **Slikama 127-136** uočavaju se dva anodna oksidacijska strujna odziva. Prvi, jasno definiran i visoki strujni odziv (pik) pojavljuje se u svim uzorcima kave i to u području potencijala od 0,195 do 0,200 V, tj. na potencijalima koji se nalaze između potencijala strujnog odziva CQAs i diCQAS (**Slika 85**). Drugi oksidacijski pik, koji je relativno slabo izražen, pojavljuje se u području potencijala od 0,400 V do 0,444 V, tj. u području oksidacijskih potencijala FQAs (**Slika 89**). To znači da se prvi oksidacijski pik uočen u DPV mjerenjima uzoraka kave, može pripisati oksidaciji smjese CQAs i diCQAs, dok drugi anodni pik vjerojatno pripada oksidaciji FQAs prisutnih u svim ispitivanim kavama (**Slike 49**).

Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava

S ciljem da se utvrdi je li prvi anodni oksidacijski strujni pik opažen kod svih uzoraka kava, zaista pripada oksidaciji smjese CQAs i diCQAs, u vodene ekstrakte nekih kava dodavana je poznata koncentracija CQAs i diCQAs, tj. provedeno je obogaćivanje uzorka (engl. *spiking*), kao i kod SWV mjerenja. Primjer koji predstavlja uočeno ponašanje prikazan je na **Slici 137,** a predstavlja DP voltamograme vodenog ekstrakta zelenog zrna *C. arabice* (DF = 100) u koji je dodano: $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-CQA; 3,4-diCQA; i 4,5-diCQA, u zasebnim eksperimentima. Na slici se jasno može uočiti značajan porast struje prvog anodnog oksidacijskog pika *C. arabice* ekstrakta nakon dodatka $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-CQA, dok se potencijal pika (0.200 V) nije promijenio dodatkom 5-CQA. Dodatak 3,4-diCQA i 4,5-diCQA značajno povisuje struju prvog anodnog oksidacijskog pika, ali vrlo malo (oko 3 mV) pomiče potencijal prema pozitivnijim vrijednostima. Pomak potencijala oksidacije vjerojatno je posljedica adsorpcije oksidacijskih produkata diCQAs na površini GC elektrode. Iz DP voltamograma prikazanih na **Slici 137**, tj. na temelju navedenog eksperimenta može se zaključiti da se prvi anodni oksidacijski strujni pik nedvojbeno odnosi na oksidaciju smjese CQAs i diCQAs prisutnih u uzorcima kave. Ovakvu identifikaciju prvog oksidacijskog pika potvrdila su i SWV mjerenja (**Slika 125**), kao i HPLC analiza uzoraka kave (**Slike 41-48, 50-51**).

S ciljem identifikacije drugog anodnog oksidacijskog strujnog pika opaženog na DP voltamogramima ispitanih vodenih ekstrakata kava, provedeno je obogaćivanje uzoraka kave (*spiking*) s otopinama FQAs, a korišteni su i rezultati HPLC analize. HPLC analiza pokazala je relativno mali (oko 10%) sadržaj FQAs u vodenim ekstraktima kava (**Slike 49 i 52**), što je u skladu s rezultatima drugih autora (Farah i sur., 2005.; Farah i sur., 2006. A i B; Farah i Donangelo, 2006.; Farah, 2012.; Perrone i sur., 2012.; Duarte i sur., 2010.; Mills i sur., 2013.; Ziyatdinova i sur., 2013.). Prisustvo slobodne ferulične kiseline u ispitanim vodenim ekstraktima kava, u ovoj disertaciji nije utvrđeno.

Dodavanje otopine 5-FQA u koncentraciji od $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1}, u vodene ekstrakte kava (npr. Nescafé Classic), rezultirao je povišenjem struje drugog anodnog oksidacijskog pika (**Slika 138).** Potencijali drugog pika i sirovog i obogaćenog uzorka Nescafé Classic ekstrakta, nalaze se u području oksidacijskog potencijala 0,419-0,430 V za FQAs (**Slika 89**). Na temelju *spiking*a s poznatom koncentracijom 5-FQA, kao i HPLC analize, može se zaključiti da drugi anodni

oksidacijski strujni pik koji je opažen u svim ispitivanim uzorcima kave, nedvojbeno pripada oksidaciji FQAs koje su prisutne u uzorcima svih kava.

Kvantifikacija klorogenskih kiselina u vodenim uzorcima kava

Sadržaj ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava pomoću DPV metode određen je na temelju zbrajanja vrijednosti oba strujna odziva (pika) na DP voltamogramima. Na **Slici 139** prikazana je kalibracijska krivulja otopine 5-CQA koja je korištena za izračunavanje ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava, a izračunati sadržaj ukupnih CGAs prikazan je u **Tablici 18** i izražen je u mg 5-CQAE/100g kave. Sadržaj CGAs ima trend opadanja (kao i kod SWV metode), od zelenih zrna, preko mljevenih kava, instant kava do prženih zrna. Rezultati ukupnog sadržaja CQAs u uzorcima kave dobiveni u ovoj disertaciji u skladu su s rezultatima rada autora Ziyatdinova i sur. (2013.), koji su također koristili DPV metodu za određivanje CGAs u uzorcima kave, ali i s rezultatima ostalih autora koji su koristili neke druge elektrokemijske metode ili druge radne elektrode, npr. biosenzor elektrode (Kilmartin, 2001.; Moccelini i sur., 2008., Carvalho i sur., 2008.; Fernandes i sur., 2009.; Santos i sur., 2011.; Yardim, 2012.; Ziyatdinova i sur., 2013.).

5.5. KARAKTERIZACIJA KLOROGENSKIH KISELINA U VODENIM EKSTRAKTIMA KAVA METODOM PROTOČNE STRIPPING KRONOPOTENCIOMETRIJE

Karakterizacija klorogenskih kiselina (CGAs) u vodenim ekstraktima zelenih i prženih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta*, mljevenih kava Flatscher Olympia 100% Arabica i Franck Guatemala 100% Arabica i *instant* kava Nescafé Classic, Nescafé Espresso, Jacobs Monarch i Jacobs Intense provedena je i pomoću protočne *stripping* kronopotenciometrije (FTSCP metode). U tu svrhu ispitana su elektrokemijska svojstva navedenih uzoraka kava primjenom FTSCP, kako bi se na temelju kronopotenciogrami mogla provesti identifikacija i kvantifikacija sadržaja CGAs.

Elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava

Na **Slikama 140-149**. prikazani su FTS kronopoteciogrami vodenih ekstrakata kava (DF=100 za zelena zrna, a za pržena zrna, mljevene kave i *instant* kave DF=50) u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Na FTS kronopotenciogramima vodenih ekstrakata kava uočena su tri anodna oksidacijska strujna pika. Prvi oksidacijski pik, koji je kod svih uzoraka kave dominantan, pojavljuje se u području potencijala 0,322-0,380 V ovisno o vrsti kave. Druga dva oksidacijska pika puno su slabije

izražena i pojavljuju se u području potencijala 0,550-0,600 V (pik 2) i 0,750-0,800 V (pik 3). Potencijali prvog oksidacijskog strujnog pika vodenih ekstrakata kava, nalaze se u području potencijala prvih strujnih pikova CQAs (0,325-0,336 V) i diCQAs (0,328-0,339 V) te se iz toga može zaključiti da taj prvi oksidacijski strujni odziv (pik) vodenih ekstrakata kava pripada oksidaciji smjese CQAs i diCQAs u kavi. Drugi anodni oksidacijski strujni odziv (pik) vodenih ekstrakata kava koji se pojavljuje u rasponu potencijala od 0,550-0,600 V, nalazi se u području potencijala drugih strujnih odziva (pikova) FQAs (0,495-0,600 V) te se stoga može pripisati oksidaciji FQAs. Identifikacija trećeg oksidacijskog strujnog odziva (pika), uočenog na FTS kronopotenciograma vodenih ekstrakata kava u području potencijala 0,750-0,800 V, nije moguća sa sigurnošću na osnovi provedenih mjerenja. Pretpostavka je da bi ovaj pik mogao odgovarati oksidaciji nekih drugih izomera klorogenskih kiselina koje su prisutne u vrlo malim količinama u kavama i stoga nisu mogle biti identificirane niti u HPLC analizi (npr. *p*-kumaroilkina kiseline, jer *p*-kumarinska kiselina pokazuje oksidacijski potencijal u navedenom području potencijala, tj. u području potencijala 0,750 V-0,800 V).

Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava

S ciljem identifikacije prvog anodnog oksidacijskog pika vodenih ekstrakata kava, provedeno je dodavanje, tj. *spiking*, otopina CQAs i diCQAs u vodene ekstrakte kava. **Slika 150** prikazuje FTS kronopotenciograme vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *C. arabica* obogaćenog dodavanjem otopine $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-CQA i 3-CQA u kavu. Iz FTS kronopotenciograma vidljiv je značajan porast struje prvog anodnog pika, dok se potencijal pika nije promijenio. Na temelju ranije prikazanih FTS kronopotenciograma CQAs i diCQAs te *spikinga,* može se zaključiti da prvi strujni pik uočen na kronopotenciogramima kava odgovara oksidaciji smjese CQAs i diCQAs prisutnih u svim uzorcima kava. Drugi oksidacijski pik u kavama odgovara vjerojatno oksidaciji FQAs, a ovakav zaključak se temelji na vrlo sličnim vrijednostima oksidacijskih potencijala drugog pika FQAs i drugog pika opaženog u FTS kronopotenciogramima kava. Ovakav zaključak o identifikaciji drugog oksidacijskog pika podržan je i rezultatima DPV mjerenja. Identifikacija drugog oksidacijskog pika potvrđena je rezultatima obogaćivanja ekstrakta uzorka kave *C. robusta* zeleno zrno dodavanjem $3 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} 5-FQA (**Slika 151**). Na **Slici 151** jasno je vidljiv porast struje drugog oksidacijskog pika uslijed dodatka 5-FQA u uzorak kave *C. robusta* zeleno zrno. Sigurna identifikacija trećeg oksidacijskog pika koji se pojavljuje na FTS kronopotenciogramima kava kod viših oksidacijskih potencijala (0,750-0,800 V), nije moguća

na temelju provedenih mjerenja i za to su potrebna dodatna istraživanja. Treba napomenuti da je u literaturi pronađen samo jedan rad (Oliveira-Neto i sur, 2016.) u kojem se spominje postojanje tri oksidacijska pika u uzorcima kave, ali navedeni autori također nisu identificirali o kojem se spoju ili skupini spojeva radi, već navode općenitu tvrdnju da se vjerojatno radi o oksidaciji nekih polifenolnih specija koje su prisutne u kavi u vrlo malim količinama.

Kvantifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava

Kvantifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima svih uzoraka kava provedena je primjenom kalibracijske krivulje dobivene iz prvog strujnog odziva (pika) FTS kronopotenciograma otopine 5-CQA prikazane na **Slici 152**. Sadržaj ukupnih CGAs u ispitanim vodenim ekstraktima kava prikazan je u **Tablici 19**. Iz **Tablice 19** uočava se da sadržaj ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava slijedi isti trend kao i kod SWV i DPV metoda, tj. da najveći sadržaj ukupnih CGAs imaju uzorci zelenog zrna kave, a najmanji sadržaj uzorci prženih zrna kave. Rezultati sadržaja ukupnih CGA za sve ispitivane uzorke kave, dobiveni primjenom FTSCP metode vrlo dobro se slažu s rezultatima dobivenim primjenom ostale dvije elektrokemijske metode (SWV, DPV) te s rezultatima dobivenim HPLC metodom. To znači da su sve četiri metode koje su korištene u ovoj disertaciji, pokazale vrlo visoku korelaciju rezultata sadržaja ukupnih CGAs u ispitivanim uzorcima kava.

Prema dostupnim literaturnim podacima FTSCP metoda do danas nije korištena u analizi sadržaja CGAs u kavama, a niti u sličnim istraživanjima (npr. u analizi sadržaja polifenola u hrani). FTSCP je do sada uglavnom korištena za analizu metala u vodi, hrani i sličnim biološkim uzorcima. Stoga primjena FTSCP u analizi sadržaja CGAs u uzorcima kave, korištena u ovoj disertaciji, predstavlja značajan znanstveni doprinos ove disertacije.

5.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST OTOPINA KLOROGENSKIH KISELINA I VODENIH EKSTRAKATA KAVA

5.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava

U ovoj disertaciji primijenjene su dvije spektrofotometrijske metode (DPPH i ABTS) za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava, a klorogenska kiselina 5-CQA i Trolox, poslužili su kao standardi za izražavanje relativne vrijednosti antioksidacijske

aktivnosti. Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava izražena je kao 5-CQA ekvivalent (5-CQAE), Trolox ekvivalent (TE), % inhibicije DPPH radikala i % inhibicije ABTS radikal kationa (**Tablice 20** i **21**).

DPPH metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava

Iz **Tablice 20** i **21** uočava se da kod rezultata dobivenih primjenom DPPH metode najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuju vodeni ekstrakti zelenih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* aktivnost (10,82-11,00 mmol L^{-1} 5-CQAE; 2,09-2,10 mmol L^{-1} TE; 61,35-71,01 % inhibicije DPPH radikala). Zatim slijede po vrijednosti antioksidacijske aktivnosti: mljevene kave, *instant* kave, a najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazuju vodeni ekstrakti pržena zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* (0,95-1,30 mmol L^{-1} 5-CQAE; 0,95-1,02 mmol L^{-1} TE; 32,14-33,87 % inhibicije DPPH radikala). Ovakav redoslijed antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava dobiven DPPH metodom u suglasju je s količinama ukupnih klorogenskih kiselina (CGAs-*total*) izraženih preko 5-CQAE u pojedinim vodenim ekstraktima kava određenih elektrokemijskim metodama (DPV, SWV, FTSCP) te HPLC metodom (**Tablice 16, 17, 18** i **19**). Također, dobiveni rezultati u ovoj disertaciji u skladu su s literaturnim podacima drugih autora koji su koristili DPPH metodu za analizu antioksidacijske aktivnosti kava. U navedenim radovima se pokazalo da najveću antioksidacijsku aktivnosti imaju ekstrakti zelenih zrna, a najmanju antioksidacijsku aktivnost ekstrakti prženih zrna kava (Delgado –Andrade i sur., 2005.; Naidu i sur., 2008.; Votavova i sur., 2009.; Dudonne i sur., 2009.; Somporn i sur., 2011.; Erdem i sur., 2015.).

ABTS metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava

Primjenom ABTS metode (**Tablice 20** i **21**), u ovoj disertaciji, uočava se isti trend opadanja antioksidacijske aktivnosti kao i kod primjene DPPH metode na vodene ekstrakte kava. Najveća antioksidacijska aktivnost zabilježena je kod vodenih ekstrakata zelenih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* (21,20-23,05 mmol L^{-1} 5-CQAE; 10,80-11,90 mmol L^{-1} TE; 71,42-83,31 % inhibicije $ABTS^{\bullet+}$ radikal kationa), a najmanja kod vodenih ekstrakata prženih zrna kava *C. arabica* i *C. robusta* (3,60-8,60 mmol L^{-1} 5-CQAE; 0,52-3,05 mmol L^{-1} TE; 34,21-35,93 % inhibicije $ABTS^{\bullet+}$ radikal kationa). Ovaj trend opadanja antioksidacijske aktivnosti dobiven primjenom ABTS metode, u suglasju je s literaturnim podacima drugih autora koji su koristili ABTS metodu za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava (Delgado-

Andrade i sur., 2005.; Cämmerer i Kroh, 2006.; Parras i sur., 2007.; Liu i Kitts, 2011.; Vignoli i sur., 2011.; Garcia-Lomillo i Gonzales-Sanjose, 2014.; Vignoli i sur., 2014.). Iz **Tablica 20 i 21** uočava se da su numeričke vrijednosti rezultata dobivenih primjenom ABTS metode na antioksidacijsku aktivnost vodenih ekstrakata kava veće od onih dobivenih DPPH metodom, što je vjerojatno povezano s razlikama u kemijskim reakcijama koje se odvijaju između ABTS radikal kationa odnosno $DPPH^{\bullet}$ radikala s antioksidantima prisutnim u ekstraktima kava (prije svega klorogenskim kiselinama). Također $ABTS^{\bullet+}$ radikal kation ima slabu selektivnost u reakcijama s donorima H^+ jer reagira s bilo kojim aromatskim spojem koji sadrži hidroksilnu skupinu bez obzira na njegov stvarni antioksidacijski učinak (Roginsky i Lissi, 2005.) te su vjerojatno zbog slabe selektivnosti $ABTS^{\bullet+}$ radikal kationa, rezultati dobiveni primjenom ABTS metode u ovoj disertaciji, veći od rezultata dobivenih primjenom DPPH metode.

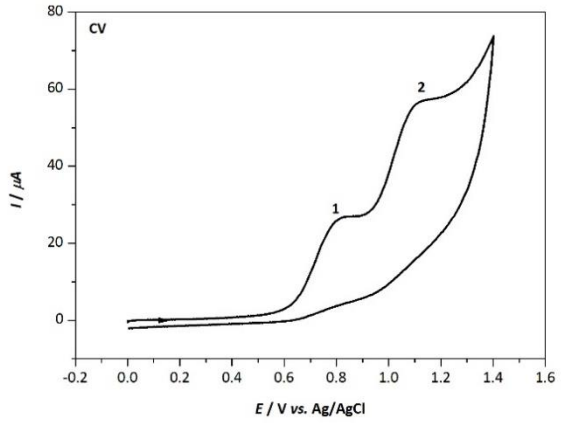
U radovima mnogih autora koji su istraživali utjecaj raznih tehnoloških parametara u cjelokupnom procesu proizvodnje kave na količinu CGAs i antioksidacijsku aktivnost kava, utvrđen je značajan utjecaj procesa branja zrna kave, procesa prerade i skladištenja zrna te naročito procesa prženja zrna kave i načina ekstrakcije klorogenskih kiselina iz kave. Utvrđeno je da stupanj prženja zrna kave (temperatura i vrijeme prženja) imaju snažan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata kava. Što je stupanj prženja zrna viši (viša temperatura i duže vrijeme prženja), to je niža antioksidacijska aktivnost dobivenog prženog zrna kave (Farah i sur., 2005.; Farah i Donangelo, 2006.; Duarte i sur., 2010.; Hečimović i sur., 2011.; Somporn i sur., 2011.; Perrone i sur., 2012.; Farah, 2012.; Vignoli i sur., 2014.). Prema radovima Trugo i Macrae (1986.), Bekedam i sur., (2008.), Wang i sur., (2011.), Daglia i sur., (2004.), Perrone i sur., (2012.) i Vignoli i sur., (2011.) tijekom procesa prženja zelenih zrna *C. robusta* i *C. arabica* u značajnoj mjeri se smanjuje sadržaj 5-CQA, zbog nastanka spojeva nositelja organoleptičkih svojstava prženih zrna kave te se jedan dio 5-CQA inkorporira u nastanak melanoidina tijekom Maillardove reakcije. Novonastali melanoidini tijekom procesa prženja zrna kave, prema literaturnim navodima, uvelike utječu na antioksidacijsku aktivnost pržene kave (Daglia i sur., 2004.; Liu i Kitts, 2011.; Perrone i sur., 2012.). Također prema Yanagimoto i sur., (2002.) neki lakohlapljivi spojevi nastali tijekom procesa prženja zelenih zrna vjerojatno imaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost. Stoga se čini da proces prženja zelenih zrna kave ima presudan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost i to upravo zbog prirodno prisutnih CGAs kao

glavnih nositelja antioksidacijske aktivnosti kava te zbog nastanka velikog broja novih spojeva-produkata nastalih prženjem zelenih zrna kave.

Usporedba vrijednosti rezultata primjenom DPPH i ABTS metoda dobivenih u ovoj disertaciji s rezultatima drugih autora, otežana je zbog nepostojanja standardizirane metode, metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava i različitog izražavanja vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u radovima drugih autora (Van den Berg i sur., 1999.; Arnao, 2000.; Frankel i Meyer, 2000.; Tirzitis i Bartosz, 2010.; Jezska-Skowron i sur., 2015.). Jedina relevantna usporedba dobivenih rezultata antioksidacijske aktivnosti spektroskopskim metodama u ovoj disertaciji i podataka iz literaturnih navoda, jeste usporedba tendencije porasta ili pada antioksidacijske aktivnosti ovisno o vrsti kave te usporedba antioksidacijske aktivnosti s količinom ukupnih CQAs u vodenim ekstraktima kava, što je u ovoj disertaciji i primijenjeno (**Slike 180, 181** i **182**).

5.6.2. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava

Uz standardne spektrofotometrijske metode analize antioksidacijske aktivnosti u ovoj disertaciji primijenjena je i elektrokemijska metoda DNA biosenzora uz primjenu tehnike cikličke voltametrije za analizu antioksidacijske aktivnosti CQAs, diCQAs, CFA i vodenih ekstrakata kava. Kao radna elektroda za mjerenje CV odziva u redoks-sustavu 0,1 mol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ korištena je DNA/SWCNT-COOH/SPCE elektroda (DNA biosenzor). Zbog potrebe veće osjetljivosti i poboljšanja transfera elektrona na površini radne elektrode, na ugljikovu ''*screen-printed*'' elektrodu (SPCE) nanesen je sloj karboksiliranih jednostjenčanih (jednoslojnih) ugljikovih nanocjevčica (engl. *Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes*, SWCNT-COOH). Tako je dobivena komercijalno dostupna SWCNT-COOH/SPCE elektroda (110SWCNT). Nanošenjem sloja dsDNA dobiven je elektrokemijski DNA/SWCNT-COOH/SPCE biosenzor (DNA biosenzor). Na **Slici 185** prikazan je CV odziv DNA molekule adsorbirane na površini SWCNT-COOH/SPC elektrode, ali bez uranjanja u neki redoks-sustav, npr. $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ili otopinu nekog elektrolita. Ciklički voltamogram snimljen je polarizacijom elektrode na zraku, pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Na cikličkom voltamogramu vidljiva su dva anodna strujna pika, prvi pik na potencijalu 0,8 V, koji pripada oksidaciji purinske baze gvanin, a drugi anodni strujni pik na 1,1 V, koji pripada oksidaciji purinske bazi adenin u dvostrukoj uzvojnici dsDNA molekule (Brett i sur., 1999.; Labuda i sur., 2010.).



Slika 185 Ciklički voltamogram dsDNA molekule adsorbirane na površini SWCNT-COOH/SPC elektrode. Eksperimentalni uvjeti prikazani u **Tablici 14**.

5.6.2.1. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina kafeoilkina kiselina i dikafeoilkina kiselina

Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina CQAs, diCQAs i CFA provedeno je metodom DNA biosenzora pomoću cikličke voltametrije na DNA/SWCNT-COOH/SPC elektrodi. Na **Slici 153** prikazani su ciklički voltamogrami redoks-sustava $[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 mjereni prije i nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala (H_2O_2+ Cu^{2+} ion) bez prisustva antioksidansa tj. klorogenskih kiselina. Na **Slikama** od **154** do **160** prikazani su ciklički voltamogrami redoks-sustava $[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 mjereni prije i nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala (H_2O_2+Cu^{2+} ion) u koju su dodane otopine CQAs, diCQAs ili CFA, koncentracije c=1·10^{-6} mol L^{-1}.

Oštećenje DNA strukture djelovanjem slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala

Općenito je poznata činjenica da do promjena u strukturi DNA molekule dolazi uslijed djelovanja različitih kemijskih tvari (npr. kancerogenih tvari), utjecaja iz okoline (npr. UV i radioaktivnog zračenja), uslijed djelovanja nekih nusprodukata (npr. slobodnih radikala tj. reaktivnih kisikovih specija (ROS) (Dizdaroglu i Jaruga, 2012.) koji nastaju tijekom normalnog metabolizma u živim organizmima, uslijed djelovanja nekih lijekova, itd. Oštećenja DNA strukture u ljudskom organizmu, prvo na molekularnom, a zatim na staničnoj razini, mogu

dovesti do niza ozbiljnih bolesnih stanja, uključujući i nastanak različitih vrsta tumora. Stoga je detekcija oštećenja DNA od velike važnosti za ljudsko zdravlje i njegovu zaštitu.

Ovaj princip oštećenja DNA strukture uslijed djelovanja slobodnih radikala, korišten je i u ovoj disertaciji za određivanje antioksidacijske aktivnosti klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava. Kao elektroda na kojoj je mjeren stupanj oštećenja DNA korištena je ranije spomenuta DNA/SWCNT-COOH/SPC elektroda (DNA biosenzor). Ona je odabrana zbog svoje osjetljivosti i dobrih električnih i elektronskih svojstava, npr. lake i brze izmjene elektrona na njenoj površini. Kao redoks sustav za mjerenje promjena elektrokemijskih parametara koji su poslužili za izračunavanje stupnja oštećenja DNA korišten je redoks-sustav $[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(CN)_6]^{4-}$ koji se u elektrokemiji često koristi zbog svoje vrlo dobre reproducibilnosti i reverzibilnosti elektrokemijskih reakcija u tom sustavu. Za stvaranje slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala poslužila je smjesa H_2O_2+Cu^{2+} iona (tzv. otopina Fentonovog tipa, engl. *Fenton-like solution*). Kao metoda mjerenja poslužila je ciklička voltametrija budući da je ona vrlo osjetljiva elektrokemijska metoda koja mjeri i vrlo male promjene elektrokemijskih parametara u redoks sustavu (npr. promjene struja u ovisnosti o potencijalu), a njome se mogu pratiti i anodni (oksidacijski) i katodni (redukcijski) procesi u nekom redoks sustavu. Sve su to razlozi zbog kojih je sustav: DNA biosenzor, redoks-sustav $[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(CN)_6]^{4-}$, smjesa H_2O_2+Cu^{2+} i ciklička voltametrija kao metoda, odabran za mjerenje oštećenja DNA uslijed djelovanja slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala kao i procjene antioksidacijskog efekta (djelovanja) klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava na stupanj oštećenja DNA .

Princip metode mjerenja stupnja oštećenja DNA strukture djelovanjem slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala prikazana je na **Slici 153**. Na **Slici 153** crno obojen voltamogram (e) predstavlja odziv SWCNT-COOH/SPC elektrode (bez sloja dsDNA) u redoks sustavu $[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. Voltamogram pokazuje vrlo jasno izražen oksidacijski pik koji odgovara oksidaciji $[Fe(CN)_6]^{4-}$u $[Fe(CN)_6]^{3-}$ i redukcijski pik koji odgovara suprotnom procesu tj. redukciji $[Fe(CN)_6]^{3-}$u $[Fe(CN)_6]^{4-}$ anion. Ovaj sustav pokazuju dosta dobar stupanj reverzibilnosti. Adsorpcijom DNA na površini SWNT-COOH/SPC elektrode tj. uspostavljanjem DNA biosenzora, dolazi do značajnih promjena u CV odzivu (crveno obojeni voltamogram (a)). Reverzibilnost sustava se znatno smanjuje tj. razlika između potencijala anodnog i katodnog pika značajno raste, a strujni odziv (struja anodnog i katodnog pika) značajno opada. S elektrokemijskog stanovišta to ukazuje na značajne promjene na površini radne elektrode tj. DNA biosenzora

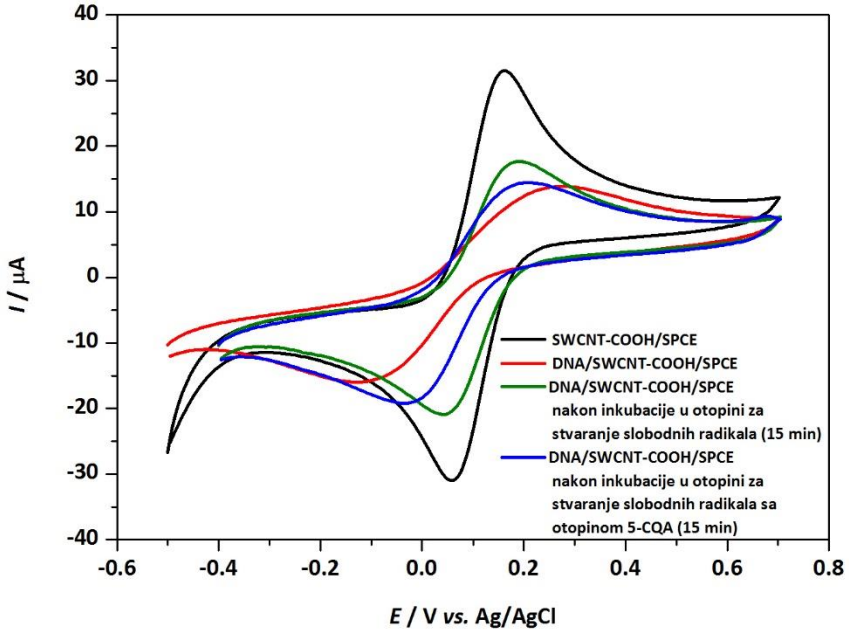
koje promjene ometaju izmjenu elektrona. Postoji nekoliko objašnjenja u literaturi o tome što je uzrok ovih promjena. U radovima Ovadekova i sur. (2006.) i Šimkova i sur. (2009.), smatra se da do smanjenja reverzibiliteta sustava i opadanja anodnih i katodnih struja dolazi uslijed odbojnih elektrostatskih sila između negativno nabijene molekule DNA na površini elektrode i negativno nabijenih aniona $[Fe(CN)_6]^{3-}$ i $[Fe(CN)_6]^{4-}$ u otopini pa je njihova difuzija do površine elektrode na kojoj se događaju reakcije oksidacije/redukcije otežana, što smanjuje struje pikova. Drugo moguće objašnjenje navodi se u radovima Ziyatdinova i sur. (2008.) i Ziyatdinova i Labuda (2011.), na osnovi impendancijskih mjerenja provedenih na različitim vrstama elektroda (DNA/SWCNT-COOH-CIT/SPCPE; DNA/MWCNT/SPCE; DNA/SPCE, itd.) u redoks-sustavu $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$. Autori zaključuju da do smanjenja struja i reverzibiliteta sustava dolazi uslijed adsorpcije sloja dsDNA na površini elektrode te da to blokira (otežava) izmjenu elektrona na površini elektrode, jer redoks specije (anioni) teško difundiraju kroz sloj DNA do površine elektrode na kojoj se odvijaju elektrokemijski procesi oksidacije odnosno redukcije.

Suprotan proces dešava se tijekom inkubacije DNA biosenzora u smjesi H_2O_2+Cu^{2+} u vremenskom periodu od 2 minute (voltamogram (b)-zeleni), 5 minuta (voltamogram (c)-tamnocrveni) i 15 minuta (voltamogram (d)-plavi), **Slika 153**. Struje anodnih i katodnih pikova rastu s vremenom inkubacije, a smanjuje se razlika između potencijala anodnog i katodnog pika tj. raste reverzibilitet sustava $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$. Za ove promjene nema nekog jedinstvenog i posve jasnog objašnjenja. Jedino u čemu se slažu autori koji su istraživali oštećenja DNA sloja na površini raznih biosenzor elektroda i u različitim otopinama za dobivanje različitih slobodnih radikala (Šimkova i sur., 2009.; Hlavata i sur., 2014.; Ziyatdinova i sur., 2008.; Ziyatdinova i Labuda, 2011.; Ziyatdinova i Labuda, 2012.) jeste zaključak da je porast struja i porast ireverzibiliteta redoks sustava rezultat djelovanja slobodnih radikala i djelomičnog ili dubokog (engl. *deep damage*) oštećenja strukture DNA sloja. Slobodni radikali, u ovom slučaju $OH^{\bullet}$ radikali izazivaju razna oštećenja u strukturi DNA: npr. oštećenje okosnice šećer-fosfatne skupine na vanjskom dijelu uzvojnice dsDNA, ''otapanje'' odnosno gubitak DNA baza uslijed pucanja vodikovih veza između njih i cijelog niza drugih oštećenja (engl. *damage*) u strukturi DNA. Moguće je da i na neki način dolazi do smanjenja negativnog naboja DNA molekule uslijed oštećenja pa to smanjuje odbojne elektrostatske sile i dovodi do porasta struja u CV tijekom inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala. U svakom slučaju

mnogi radovi u ovom području potvrdili su ovu činjenicu, ali za nju još nema posve jasnog objašnjenja.

Antioksidacijska aktivnost klorogenskih kiselina

Utjecaj dodatka klorogenskih kiselina i kafeinske kiseline, koncentracije c=1·10^{-6} mol L^{-1} u otopinu za stvaranje slobodnih OH$^{\bullet}$ radikala (smjesa H_2O_2+Cu^{2+} iona) na CV odziv DNA biosenzora prikazan je na **Slikama 154-160**. Usporede li se ovi dijagrami s dijagramom na **Slici 153** (CV odziv DNA biosenzora bez antioksidansa), tj. usporede li se vrijednosti struja anodnih pikova, vidljivo je da su vrijednosti struja anodnih pikova tijekom perioda inkubacije u otopinama koje sadrže pojedine CGAs manje u odnosu na one dobivene u ''čistoj''otopini za stvaranje slobodnih radikala tj. onoj koja ne sadrži klorogenske kiseline. To ukazuje na određeni antioksidacijski efekt, odnosno antioksidacijsko djelovanje klorogenskih kiselina. Na **Slici 186** detaljnije je objašnjeno ovo antioksidacijsko djelovanje klorogenskih kiselina na primjeru dodatka otopine 5-CQA u smjesu za stvaranje slobodnih OH$^{\bullet}$ radikala.



Slika 186 CV redoks sustava 1 mol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima (**Tablica 14**). Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala (bez antioksidansa i sa 1·10^{-6} mol L^{-1} 5-CQA).

Iz **Slike 186** je vidljivo da dodatak 5-CQA u otopinu za stvaranje slobodnih OH$^{\bullet}$ radikala u koncentraciji c=1·10^{-6} (plavi voltamogram) značajno smanjuje anodnu struju DNA biosenzora

u odnosu na ''čistu'' otopinu za stvaranje slobodnih radikala tj. otopinu bez dodatka antioksidansa (zeleni voltamogram), u istom vremenskom periodu inkubacije (15 minuta). To je sukladno ranijem objašnjenju o oštećenju DNA znači da je stupanj oštećenja DNA dodatkom 5-CQA znatno smanjen u odnosu na oštećenje koje izaziva ''čista'' otopina za stvaranje slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala. Pojednostavljeno, dodatak 5-CQA pokazuje određeni antioksidacijski (zaštitni) efekt u odnosu na oštećenu strukturu DNA. Na isti način bi se moglo pokazati ovo antioksidacijsko djelovanje i za ostale klorogenske kiseline i kafeinsku kiselinu. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja pojedinih klorogenskih kiselina (kao i antioksidansa općenito) na oštećenu DNA nije objašnjen u literaturi, a jedno od mogućih objašnjenja je da klorogenske kiseline ''hvatajući'' $OH^{\bullet}$ radikale smanjuju koncentraciju $OH^{\bullet}$ radikala, a time i njihov štetni učinak tj. oštećenje DNA, odnosno na taj način povećavaju postotak preživjele tj. neoštećene DNA. Ali za poznavanje točnog mehanizma djelovanja antioksidansa na stupanj oštećenja DNA potrebna su još dodatna temeljita fundamentalna istraživanja.

Da bi se izrazio stupanj antioksidacijskog djelovanja ispitivanih klorogenskih kiselina i kafeinske kiseline, na osnovi CV prikazanih na **Slikama 154-160** primjenom **Jednadžbe 1** izračunati su postotci relativnog smanjenjenja strujnog odziva anodnih pikova preživjele DNA na površini DNA biosenzora nakon 15 minuta inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala koja je sadržavala $1{\cdot}10^{-6}$ mol L^{-1} neke od klorogenskih kiselina ili kafeinsku kiselinu (ΔI_{rel}/%). Ovaj postotak ujedno označava i postotak preživjele DNA na površini DNA biosenzora (*surv*. DNA/%). Ovi podaci prikazani su u **Tablici 22.**

Iz vrijednosti prikazanih u **Tablici 22** uočava se da najveći postotak preživjele DNA (stupanj neoštećenja) nakon inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala pokazuje otopina kafeinske kiseline (94,40%), zatim slijede otopine CQAs (oko 90%) i naposljetku otopine diCQAs (oko 80%). Iz toga slijedi zaključak da CFA pokazuje najjače antioksidacijsko djelovanje od svih ispitivanih antioksidansa, zatim slijede CQAs, dok najmanji stupanj antioksidacijskog djelovanja pokazuju otopine diCQAs. Usporedbom postotka preživljavanja DNA (stupanj neoštećenja) u otopini za stvaranje slobodnih radikala s otopinom CFA, CQAs i diCQAs prikazanog u **Tablici 22** s postotkom preživljavanja DNA u otopini za stvaranje slobodnih radikala bez antioksidansa uočava se da je antioksidacijska aktivnost ispitanih CGAs i CFA visoka jer je postotak preživljavanja DNA blizu 100%. Dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti otopina CFA, CQAs i diCQAs u suglasju su sa provedenim elektrokemijskim

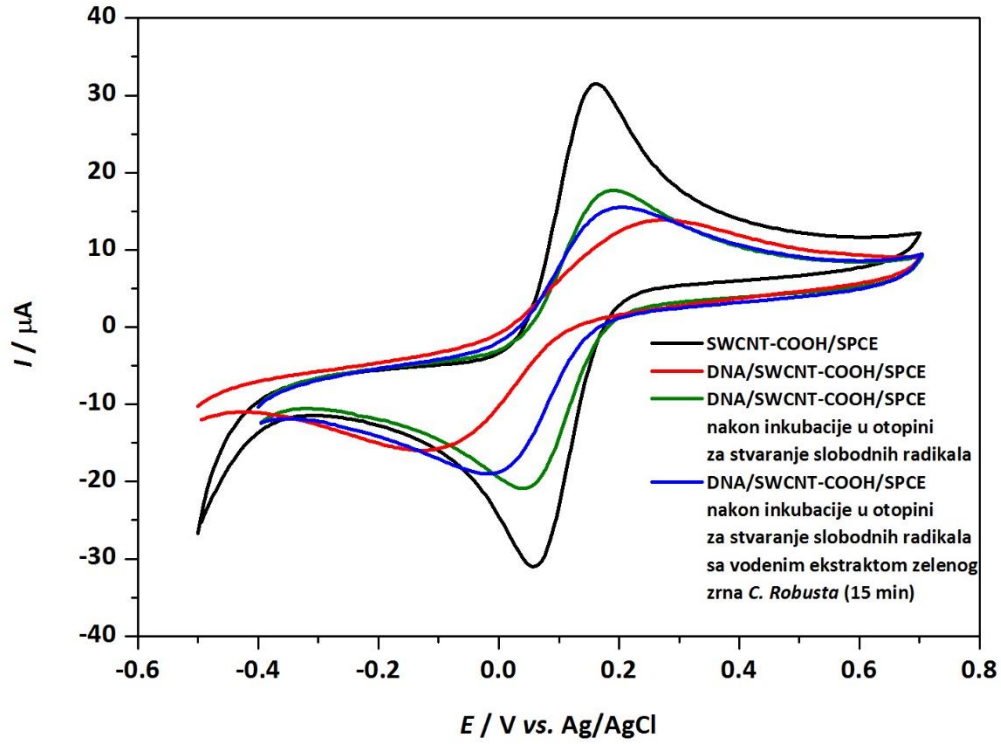
istraživanjima (DPV, SWV i FTSCP) tj. s dobivenim redoks potencijalima CFA, CQAs i diCQAs na osnovi kojih se zaključuje da što je redoks potencijal ispitane otopine niži, u ovom slučaju CFA, to je ona jači antioksidans, odnosno što je postotak preživljavanja DNA (stupanj neoštećenja) viši (bliži 100%) to je ispitana tvar bolji antioksidans. Šimkova i sur. (2009.) proveli su slično istraživanje antioksidacijske aktivnosti CFA i CQA (vjerojatno 3-CQA) pomoću DNA biosenzora na SPC elektrodi primjenom protočne *stripping* kronopotenciometrije. Vrijednosti dobivene u tom radu pokazuju visoki stupanj preživljavanja (neoštećenja) DNA u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja sadrži otopine CFA i CQA (3-CQA), uspoređene sa stupnjem preživljavanja DNA molekule u otopini za stvaranje slobodnih radikala bez prisustva antioksidansa. To je u skladu s rezultatima dobivenim u ovoj disertaciji.

5.6.2.2. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava

Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava, provedeno je na jednak način kao i elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina CGAs i CFA, a prema proceduri prikazanoj na **Slici 26,** pod eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**, a vrijednosti iz **Tablice 23** dobivene su pomoću **Jednadžbe 1**. Na **Slikama 161-170** prikazani su ciklički voltamogrami redoks-sustava $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (H_2O_2, Cu^{2+} ion) u koju je dodano određeno razrjeđenje kave ovisno o vodenom ekstraktu kava (zelenih zrna kava 1/100, pržena zrna, mljevene kave i *instant* kave 1/50). Iz **Slika 161-170** uočava se maksimum anodnog pika ($I_{p,a}$) pri potencijalu 0,19 V nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala s vodenim ekstraktima kava, dok je maksimum anodnog strujnog pika DNA biosenzora bez inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala na potencijalu od 0,27 V. Usporedbom CV na **Slikama 161-170** sa CV na **Slikama 154-160,** uočava se da su maksimumi anodnih strujnih pikova DNA biosenzora nakon inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala s otopinama CFA, CQAs i diCQAs te s vodenim ekstraktima kava na jednakim potencijalima od 0,19 V te se može zaključiti da je vjerojatno prisutan jednak mehanizam oštećenja sloja DNA na SWCNT-COOH/SPC elektrodi kao i u slučaju mjerenja s otopinama klorogenskih kiselina. Na **Slici 187** prikazani su ciklički voltamogrami redoks-sustava $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 prije i nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (H_2O_2, Cu^{2+} ion) u

vremenskom trajanju od 15 min, odnosno nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (H_2O_2, Cu^{2+} ion) s vodenim ekstraktom zelenog zrna kave *C. robusta* (1/100) u vremenskom trajanju od 15 minuta, kao primjer koji ilustrira ponašanje opaženo i kod ostalih uzoraka kave.

Iz **Slike 187** vidljivo je da dodatak vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *C. robusta* (1/100) u otopinu za stvaranje slobodnih OH radikala u (plavi voltamogram) smanjuje anodnu struju DNA biosenzora u odnosu na ''čistu'' otopinu za stvaranje slobodnih radikala tj. otopinu bez dodatka vodenog ekstrakta kave (zeleni voltamogram), u istom vremenskom periodu inkubacije (15 minuta). To sukladno ranijem objašnjenju o oštećenju DNA znači da je stupanj oštećenja DNA dodatkom vodenog ekstrakta zelenog zrna kave *C. robusta* smanjen u odnosu na oštećenje koje izaziva ''čista'' otopina za stvaranje slobodnih $OH^{\bullet}$ radikala. To znači, dodatak vodenog ekstrakta kave *C. robusta* pokazuje određeni antioksidacijski (zaštitni) efekt u odnosu na oštećenu strukturu DNA. Na isti način bi se moglo pokazati ovo antioksidacijsko djelovanje i za ostale ispitane vodene ekstrakte kava. Da bi se izrazio stupanj antioksidacijskog djelovanja ispitivanih vodenih ekstrakata kava, na osnovi CV prikazanih na **Slikama 161-170,** primjenom **Jednadžbe 1** izračunati su postotci relativnog smanjenjenja strujnog odziva anodnih pikova preživjele DNA na površini DNA biosenzora nakon 15 minuta inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala, koja je sadržavala vodene ekstrakte kava u određenom razrjeđenju (ΔI_{rel}/%). Ovaj postotak ujedno označava i postotak preživjele DNA na površini DNA biosenzora (*surv*. DNA/%). Ovi podaci prikazani su u **Tablici 23.**



Slika 187 CV redoks sustava 1 mol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ u PBS pH 7,0 pri eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 14**. Inkubacija u otopini za stvaranje slobodnih radikala (bez antioksidansa i s vodenim ekstraktom *C. robusta*, zeleno zrno DF=100).

Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava u **Tablici 23** prikazuje da najveći postotak preživjele DNA (stupanj neoštećene) nakon inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala s vodenim ekstraktima kava, imaju zelena zrna *C. arabice* i *C. robuste* (oko 81 %), zatim slijede mljevene i instant kave, a najmanje pržena zrna *C. arabice* i *C. robuste* (oko 52-53%), što je u skladu s ukupnom količinom CGAs u vodenim ekstraktima kava dobivenom primjenom elektrokemijskih metoda (DPV, SWV i FTSCP) te HPLC metodom (**Tablice 16-19**). Usporedbom antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava prikazanom u **Tablici 23** s antioksidacijskom aktivnosti CFA, CQAs i diCQAs prikazanom u **Tablici 22** te na osnovi DPV, SWV, FTSCP i HPLC mjerenja, može se zaključiti da se antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava može pripisati prisustvu CGAs u ekstraktima kava. Također, usporedbom antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava (**Tablica 23)** s antioksidacijskom aktivnosti DNA biosenzora koji je inkubiran u otopini za stvaranje slobodnih radikala bez prisustva antioksidanasa **(Tablica 22),** uočava se da što je viši postotak preživjele DNA to je vodeni

ekstrakt kava bolji antioksidans. Do danas je pronađen u literaturi samo jedan podatak o primjeni DNA biosenzora za određivanje antioksidacijske aktivnosti kava i to za samo jedan ispitivani uzorak prženog zrna kave (Hlavata i sur., 2014.). Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava dobivena primjenom DNA biosenzora u ovoj disertaciji za vodene ekstrakte prženih zrna *C. arabice* i *C. robuste* u suglasju je s literaturnim podatkom o vodenom ekstraktu prženog zrna kave nepoznate vrste (Hlavata i sur., 2014). Antioksidacijska aktivnost CGAs dobivena primjenom DNA biosenzora u ovoj disertaciji pokazuje da CGAs prirodno prisutne u zrnima kave (prije svega 5-CQA) imaju značaj utjecaj na zaštitu DNA od oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala.

U ovoj disertaciji uočena je određena mala razlika između antioksidacijske aktivnosti dobivene primjenom spektrofotometrijskih metoda i elektrokemijske metode DNA biosenzora. Ova razlika posljedica je primjene vrlo različitih eksperimentalnih uvjeta koji su korišteni u ovim metodama, kao npr. korištenje različitih slobodnih radikala-sintetski slobodni radikali $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$, odnosno $OH^{\bullet}$ radikal; korištenje različitih metoda za praćenje antioksidacijske aktivnosti (apsorbancija u DPPH i ABTS metodi, odnosno strujni odziv u DNA biosenzor metodi; različiti tip kemijskih ili elektrokemijskih reakcija koje se odvijaju tijekom mjerenja antioksidacijske aktivnosti, itd. Sve tri primijenjene metode (DNA biosenzor, ABTS i DPPH) pokazale su se pogodnim za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava. Ipak, elektrokemijska metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava primjenom DNA biosenzora (DNA/SWCNT-COOH/SPCE) pokazala je određenu prednost u određivanju antioksidacijske aktivnosti u odnosu na standardne spektrofotometrijske metode (ABTS i DPPH) određivanja antioksidacijske aktivnosti za vodene ekstrakte kava, zbog jednostavnosti i brzine metode, direktne uporabe uzoraka, *in situ* istraživanja te primjene jeftinog uređaja za analizu.

5.7. KORELACIJE SADRŽAJA UKUPNIH KLOROGENSKIH KISELINA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VODENIH EKSTRAKATA KAVA

U ovoj disertaciji istraživane su korelacije sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina i antioksidacije aktivnosti vodenih ekstrakata kava. Korelacije su prikazane u obliku korelacijskih dijagrama (**Slike 171-182**), i Pearsonovog koeficijenta korelacije na razini pogreške $p<0,05$ (**Tablica 24)**. Pearsonov koeficijent korelacije (r) matematička je i statistička veličina koja predstavlja mjeru (iznos) linearne povezanosti koja postoji između dviju mjernih varijabli (x i

y) mjerenih u istom istraživanju. Vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije kreće se od +1 (savršena pozitivna korelacija) do –1 (savršena negativna korelacija). Predznak koeficijenta upućuje na smjer korelacije, (+) je li ona pozitivna ili (-) je ona negativna, ali ne upućuje na snagu korelacije. Pearsonov koeficijent korelacije (*r*) temelji se na usporedbi stvarnog utjecaja promatranih varijabli jedne na drugu, u odnosu na maksimalni mogući međusobni utjecaj tih dviju varijabli.

5.7.1. Korelacije sadržaja klorogenskih kiselina mjerenih elektrokemijskim metodama i HPLC metodom

Na **Slikama 171-173** i u **Tablici 24** prikazane su korelacije sadržaja ukupnih CGAs u uzorcima kava dobivenih primjenom tri različite elektrokemijske metode (SWV, DPV i FTSCP). Iz korelacijskih dijagrama i vrijednosti Pearsonovog koeficijenta (*r*), na razini pogreške $p<0,05$, koji iznosi od 0,996 do 0,999, može se zaključiti da postoji vrlo visoka-izvrsna (skoro potpuna) pozitivna korelacija (povezanost) između rezultata mjerenja sadržaja ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava dobivenih primjenom triju različitih elektrokemijskih metoda. To znači da su se sve tri primijenjene elektrokemijske metode (SWV, DPV i FTSP) pokazale kao vrlo dobre-izvrsne elektroanalitičke metode za određivanje sadržaja ukupnih CGAs u kavama.

Korelacija sadržaja ukupnih CGAs u uzorcima kava određenih primjenom elektrokemijskih metoda (SWV, DPV i FTSCP) i HPLC metode prikazana je korelacijskim dijagramima na **Slikama 174-176** i u **Tablici 24**. Iz korelacijskih dijagrama i vrijednosti Pearsonovog koeficijenta (*r*) koji iznosi od 0.997 do 0.999 može se uočiti vrlo visoka-izvrsna korelacija između rezultata sadržaja ukupnih CGAs dobivenih elektrokemijskim metodama i HPLC metodom. To znači da sve tri elektrokemijske metode (SWV, DPV i FTSCP) primijenjene u ovoj disertaciji, predstavljaju izvrsnu alternativu kao analitičke metode u odnosu na HPLC metodu koja je znatno zahtjevnija u analitičkom smislu (u pogledu cijene HPLC analize, a posebno cijene samog HPLC uređaja).

5.7.2. Korelacije rezultata mjerenja antioksidacijske aktivnosti

Na **Slici 177** prikazana je korelacija rezultata antioksidacijskih aktivnosti ispitivanih uzoraka kava dobivenih primjenom dviju spektrofotometrijskih metoda (DPPH i ABTS) i rezultata dobivenih elektrokemijskom metodom cikličke voltametrije (CV) uz primjenu DNA biosenzora. U **Tablici 24** dane su odgovarajuće vrijednosti Pearsonovog koeficijenta (*r)*. Na temelju korelacijskog dijagrama i vrijednosti Pearsonovog koeficijenta (*r*), može se zaključiti da postoji

vrlo dobra do izvrsna korelacija (povezanost) između rezultata antioksidacijske aktivnosti određene primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora i ABTS i DPPH metode (*r*=0,896-0,978). Korelacija između rezultata dobivenih ABTS i DPPH metodama vrlo je dobra do izvrsna (*r*=0,929-0,696).

5.7.3. Korelacije između sadržaja ukupnih klorogenskih kiselina u uzorcima kava i antioksidacijske aktivnosti kava

Korelacije (povezanost) između sadržaja ukupnih CGAs u ispitivanim uzorcima kava i antioksidacijske aktivnosti kava prikazane su na **Slikama 178-180** i u **Tablici 24**. Moguće je uočiti da između antioksidacijske aktivnosti uzoraka kava mjerene pomoću elektrokemijskog DNA biosenzora i sadržaja ukupnih CGAs određenih primjenom sve tri elektrokemijske metode (SWV, DPV, FTSCP) te rezultata HPLC metode (**Slika 178**), postoji vrlo visoka do izvrsna povezanost (*r*=0,772-0,896). Ova korelacija u slučaju DPPH i ABTS metode prikazana je na **Slikama 179** i **180** također je vrlo dobra do izvrsna (*r*=0,776-0,794 za DPPH metodu i *r*=0,717-0,735 za ABTS metodu).

Na temelju svih prikazanih korelacijskih dijagrama (**Slike 171-180**) i vrijednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije (*r*) na razini pogreške p<0,05, prikazanih u **Tablici 24**, može se zaključiti da su sve tri elektrokemijske metode (SWV, DPV, FTSCP) primijenjene u ovoj disertaciji, bile vrlo dobre i pouzdane metode za određivanje sadržaja ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava. Zbog svoje jednostavnosti, brzine i jeftinih uređaja, elektrokemijske metode imaju određenu prednost pred HPLC metodom. Međutim, zbog selektivnosti (mogućnosti pojedinačnog identificiranja i kvantificiranja pojedinog izomera CGAs) prednost ima HPLC metoda, posebno ako se koristi u kombinaciji sa MS detektorom (HPLC-MS vezani sustavi). U istraživanjima koja su provedena u ovoj disertaciji, korištena je kombinacija HPLC metode (koja daje podatke o kemijskom profilu kave) i elektrokemijskih metoda (SWV, DPV, FTSCP) koje daju vrlo bitne podatke o elektrokemijskim i kemijskim svojstvima analiziranog sustava (u ovom slučaju klorogenskih kiselina i kava) te posebno o mehanizmu i kinetici kemijskih i elektrokemijskih reakcija koje se odvijaju u tako složenim sustavima kao što je kava. Ovakav pristup analizi uzoraka kave, primijenjen je u ovoj disertaciji i pokazao se vrlo učinkovitim.

Sve tri primijenjene metode za analizu antioksidacijske aktivnosti kave (DNA biosenzor, DPPH i ABTS) pokazale su se kao vrlo dobre metode. Navedeni rezultati ukazuju na određenu

prednost elektrokemijske metode DNA biosenzora u određivanju antioksidacijske aktivnosti u uzorcima kava u odnosu na standardne spektrofotometrijske metode (ABTS, DPPH) zbog jednostavne izvedbe, direktne uporabe uzoraka, osjetljivosti i selektivnosti metode te uporabe jeftinih uređaja. U literaturi do danas postoji samo jedan rad u kojem je primijenjena DNA biosenzor metoda za analizu antioksidacijske aktivnosti i to samo na jednom uzorku kave. Zbog te činjenice kao i zbog nepostojanja standardizirane metode analize antioksidacijske aktivnosti kava, primjena DNA biosenzor metode u ovoj disertaciji, predstavlja značajan znanstveni doprinos ove disertacije u području analize antioksidacijske aktivnosti realnih prehrambenih sustava kao što su uzorci kave.

6. ZAKLJUČCI

U ovoj disertaciji provedena je karakterizacija klorogenskih kiselina i analiza antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama kave primjenom elektrokemijskih metoda. Karakterizacija klorogenskih kiselina u različitim vrstama kave, provedena je primjenom triju elektrokemijskih metoda: pravokutnovalne voltametrije (SWV), diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) i protočne *stripping* kronopotenciometrije (FTSCP) te HPLC metode. Antioksidacijska aktivnost kave istraživana je primjenom dviju spektrofotometrijskih metoda (DPPH i ABTS metode) te primjenom elektrokemijskog biosenzora, DNA/SWCNT-COOH/SPCE (DNA biosenzora).

Istraživanja su provedena na deset različitih vrsta kave: zelenim zrnima *C. arabica* i *C. robusta*, prženim zrnima *C. arabica* i *C. robusta*, mljevenim kavama Franck Guatemala 100% *Arabica* i Flatcher Olympia 100% *Arabica* te instant kavama Nescafé Classic, Nescafé Espresso, Jacobs Monarch i Jacobs Intense.

Da bi se mogla provesti karakterizacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava, ispitana su elektrokemijska svojstva devet dominantnih izomera klorogenskih kiselina (CGAs) prisutnih u kavama i to: tri kafeoilkina kiseline (5-CQA, 4-CQA i 3-CQA), tri dikafeoilkina kiseline (3,5-diCQA, 3,4-diCQA i 4,5-diCQA) i tri feruloilkina kiseline (5-FQA, 4-FQA i 3-FQA). Također su ispitana elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava. Na temelju rezultata provedenih elektrokemijskih mjerenja i HPLC analize provedena je identifikacija i kvantifikacija sadržaja pojedinih i ukupnih klorogenskih kiselina prisutnih u svim uzorcima kava.

Procjena antioksidacijske aktivnosti klorogenskih kiselina i vodenih ekstrakata kava, provedena je na osnovi mjerenja DPPH i ABTS metodama te primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora. Antioksidacijska aktivnost izražena je kao postotak inhibicije DPPH i ABTS radikala ili kao Trolox i 5-CQA ekvivalenti, odnosno u slučaju DNA biosenzora kao postotak preživjele DNA.

Na temelju rezultata istraživanja provedenih u ovoj disertaciji, izvedeni su sljedeći zaključci:

- HPLC metodom identificirano je prisustvo osam izomera klorogenskih kiselina (5-CQA, 4-CQA, 3-CQA, 3,5-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA, 5-FQA i 4-FQA) u svih deset ispitivanih vodenih ekstrakata kava.

- Ustanovljeno je da su u svih deset vodenih ekstrakata kava najzastupljenije po sadržaju CQAs, dominantno 5-CQA, zatim slijede po sadržaju diCQAs, a najmanji sadržaj u kavama pokazuju FQAs.
- Sadržaj CQAs, diCQAs i ukupnih CGAs značajno je veći u vodenim ekstraktima zelenih zrna kava u odnosu na vodene ekstrakte mljevenih kava, instant kava i prženih zrna kava, zbog utjecaja procesiranja zelenog zrna kava tijekom prerade i prženja.
- Na osnovi istraživanja elektrokemijskih svojstava devet klorogenskih kiselina (5-CQA, 4-CQA, 3-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 5-FQA, 4-FQA i 3-FQA) te kafeinske kiseline i ferulične kiseline, kao strukturnih jedinica CQAs, diCQAs i FQAs, primjenom SWV, DPV i FTSCP metode, može se zaključiti da na njihova elektrokemijska svojstva značajno utječu različiti primijenjeni eksperimentalni uvjeti (kemijska struktura, višestruka uzastopna polarizacija, pH vrijednosti otopine, frekvencije pobudnog signala i koncentracije analita).
- Utjecaj kemijske strukture ispitivanih CQAs i diCQAs očituje se u pomaku oksidacijskih potencijala prema pozitivnijim vrijednostima i porastu struje oksidacijskog pika u nizu CFA, CQAs, diCQAs, na svim SW i DP voltamogramima te FTS kronopotenciogramima. To je posljedica esterifikacije tj. utjecaja ester grupe prisutne u kemijskoj strukturi CQAs i diCQAs u odnosu na kemijsku strukturu CFA. Isti utjecaj esterifikacije prisutan je i kod FQAs u odnosu na FA.
- Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije radne elektrode, očituje se u opadanju oksidacijskog strujnog odziva i u nekim slučajevima malom pomaku oksidacijskog potencijala prema pozitivnijim vrijednostima. Ovaj utjecaj uočen je u otopinama svih ispitivanih klorogenskih kiselina i primjenom svih triju elektrokemijskih metoda (SWV, DPV i FTSCP). Ova pojava vjerojatno je posljedica adsorpcije oksidacijskih produkata nastalih tijekom polarizacije na površini radne elektrode.
- Utjecaj pH vrijednosti otopine osnovnog elektrolita (0,1 mol L^{-1} PBS) na SW i DP voltamograme, ispitan je na primjeru otopine 5-CQA. Uočeno je da oksidacijski strujni odziv raste u području pH vrijednosti od 3,0 do 7,0, kada doseže svoj maksimum, a daljnjim povećanjem pH vrijednosti strujni odziv opada. Nagib linearne ovisnosti d(E)/d(pH) iznosi -59 mV/pH, što prema kriterijima reverzibilnosti, ukazuje na izmjenu jednakog broja

elektrona i protona tijekom procesa elektrokemijske oksidacije 5-CQA. Prema širini na polovici visine anodnog pika kod DP voltamograma 5-CQA od $W_{1/2}$~60 mV što odgovara izmjeni dva elektrona i nagibu linearne ovisnosti d(*E*)/d(*pH*) od -59 mV/pH, može se zaključiti da se oksidacija molekule 5-CQA na GC elektrodi odvija $2e^-$-$2H^+$ oksidacijskim mehanizmom.

- Ukupni strujni odziv pika na SW voltamogramu otopine 5-CQA, linearna je funkcija drugog korijena iz frekvencije pobudnog signala $(f/s^{-1})^{1/2}$. Potencijal pika (E_p) pomiče se prema pozitivnijim vrijednostima s porastom frekvencije pobudnog signala (ne više od 16 mV). Prema SWV kriterijima o reverzibilnosti procesa, ove dvije činjenice o ovisnosti E_p i I_p o frekvenciji pobudnog signala, ukazuju da se u otopini 5-CQA na površini GC elektrode odvija reverzibilna, difuzijski kontrolirana reakcija izmjene naboja tj. elektrona i protona tj. $2e^-$ -$2H^+$ oksidacijski mehanizam kontroliran difuzijom 5-CQA na površinu GC elektrode.
- SW i DP voltamogrami pokazali su linearnu ovisnost struje pika I_p o koncentraciji otopine 5-CQA u području koncentracije od 5-50 µmol L^{-1}, dok su FTS kronopotenciogrami linearni u širem koncentracijskom području od 5 do 100 µmol L^{-1}.
- Na osnovi elektrokemijskih svojstava CQAs i diCQAs istraživanih SWV, DPV i FTSCP metodama može se zaključiti se da se elektrokemijska oksidacija CQAs i diCQAs odvija na kateholnoj strukturnoj jedinici u molekulama CQAs i diCQAs.
- Mehanizam oksidacije CQAs i diCQAs, odvija se u dva stupnja. U prvom stupnju otpuštanjem jednog elektrona i jednog protona ,nastaje fenoksi radikal koji je nestabilan. Slijedi daljnja reakcija otpuštanja još jednog elektrona i protona te nastaje fenoksi diradikal koji je kemijski nestabilan te se stabilizira nastajanjem *o*-kinonske strukture. Svi stupnjevi u ovoj elektrokemijskoj reakciji reverzibilni su. Mehanizam elektrokemijske oksidacije CQAs i diCQAs odvija se reverzibilnim $2e^-$-$2H^+$ mehanizmom te uključuje oksidaciju dvije –OH skupine u *o*-položaju kod CQAs, odnosno četiri –OH skupine kod diCQAs u *ortho*-položajima u *ortho*-kinonsku strukturu.
- Istraživanja elektrokemijskih svojstava FQAs provedena primjenom SWV, DPV i FTSCP metode ukazuju na prisustvo jednog strujnog odziva u otopinama FQAs te dva strujna odziva u otopini FA. FQAs pokazuju pomak oksidacijskog potencijala prema pozitivnijim

vrijednostima u usporedbi s oksidacijskim potencijalom FA, zbog esterifikacije (slično kao i kod CQAs i diCQAs).

- Na osnovi SWV, DPV i FTSCP mjerenja FQAs može se zaključiti da se elektrokemijska oksidacija FQAs odvija na metoksi-fenolnoj strukturnoj jedinici tj. jednako kao i elektrokemijska oksidacija FA, koja je strukturna jedinica FQAs. Mehanizam oksidacije FQAs odvija se u dva stupnja. U prvom stupnju nastaje više strukturnih izomera fenoksi radikala koji su nestabilni. U drugom stupnju kemijskom reakcijom adicije molekule vode na fenoksi radikal, nastaje novi elektroaktivni spoj 5-hidroksiferulična kiseline. Ovaj spoj oksidira se na nižem potencijalu od FQAs.
- Elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava ispitana su pravokutnovalnom voltametrijom te se uočava iz SW voltamograma kava velika sličnost sa SW voltamogramima CQAs i diCQAs. Na temelju izgleda SW voltamograma vodenih ekstrakata kava i vrijednosti redoks potencijala, zaključeno je da je mehanizam oksidacije na radnoj elektrodi identičan kao i u model otopinama CQAs i diCQAs.
- Identifikacija klorogenskih kiselina SWV metodom u vodenim ekstraktima kava potvrdila je prisutnost CQAs i diCQAs u svim ispitivanim vodenim ekstraktima kava, ali se ovom metodom nije mogla identificirati prisutnost FQAs, uslijed velike brzine polarizacije u vrlo kratkom vremenskom periodu mjerenja.
- Kvantifikacija sadržaja ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava, provedena je na osnovi vrijednosti struja anodnih pikova SW voltamograma kava korištenjem kalibracijske krivulje 5-CQA (*LOD* = $7{,}7\cdot10^{-7}$ mol L^{-1}, *LOQ* = $2{,}5\cdot10^{-6}$ mol L^{-1}). Sadržaj ukupnih CGAs najveći je u vodenim ekstraktima zelenih zrna, zatim slijede mljevene kave, *instant* kave i najmanji sadržaj ukupnih CGAs je u vodenim ekstraktima prženih zrna. Značajan gubitak sadržaja ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima prženih zrna kava, posljedica je procesa prženja kave.
- Elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava ispitana su diferencijalnom pulsnom voltametrijom te se uočavaju na DP voltamogramima kava dva anodna oksidacijska pika. Prvi anodni oksidacijski pik uočen u DPV mjerenjima pripisuje se oksidaciji smjese CQAs i diCQAs, dok drugi anodni oksidacijski pik pripada oksidaciji FQAs.

- Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava DPV metodom potvrdila je prisutnost CQAs i diCQAs (prvi pik) i FQAs (drugi pik).
- Kvantifikacija sadržaja ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava, provedena je DPV metodom na osnovi zbrajanja strujnih odziva oba anodna oksidacijska pika te je korištena kalibracijska krivulja 5-CQA (*LOD* = $1{,}2\cdot10^{-6}$ mol L^{-1}, *LOQ* = $4{,}0\cdot10^{-6}$ mol L^{-1}). Sadržaj ukupnih CGAs u vodenim ekstraktima kava ima isti trend opadanja kao i kod SWV metode (zelena zrna, mljevene kave, *instant* kave, pržena zrna).
- Metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije ispitana su elektrokemijska svojstva vodenih ekstrakata kava te se na FTS kronopotenciogramima uočava prisustvo tri anodna oksidacijska pika.
- Identifikacija klorogenskih kiselina u vodenim ekstraktima kava, metodom protočne *stripping* kronopotenciometrije, potvrdila je oksidaciju otopina CQAs i diCQAs na potencijalu prvog oksidacijskog pika. Zatim na potencijalu drugog oksidacijskog pika oksidiraju se FQAs, dok identifikacija trećeg oksidacijskog pika na FTS kronopotenciogramima nije bila moguća na temelju provedenih FTSCP mjerenja.
- Metodom FTSCP kvantificiran je sadržaj ukupnih CGAs korištenjem kalibracijske krivulje otopine 5-CQA na temelju strujnog odziva prvog oksidacijskog pika (*LOD* = $5{,}7\cdot10^{-7}$ mol L^{-1}, *LOQ* = $1{,}9\cdot10^{-6}$ mol L^{-1}). Uočen je jednak trend smanjenja sadržaja ukupnih CGAs kao i kod SWV i DPV metoda (zelena zrna, mljevene kave, *instant* kave, pržena zrna).
- Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata kava ispitana je spektrofotometrijskim metodama, DPPH i ABTS metodama.
- DPPH metodom određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava, uočeno je da najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuju vodeni ekstrakti zelenih zrna kava, zatim mljevenih kava, i*nstant* kava, a najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazuju vodeni ekstrakti prženih zrna kava izražene kao Trolox ekvivalenti, 5-CQA ekvivalenti i % inhibicije $DPPH^{\bullet}$ radikala.
- Primjenom ABTS metode određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava, uočava se jednak trend opadanja antioksidacijske aktivnosti kao i kod DPPH metode (zelena zrna, mljevena zrna, *instant* kave, pržena zrna).

- Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti otopina klorogenskih kiselina (CQAs i diCQAs) provedeno je primjenom DNA biosenzora uz pomoć cikličke voltametrije (CV). Iz cikličkih voltamograma redoks-sustava $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ u 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 nakon inkubacije DNA biosenzora u otopini za stvaranje OH•radikala bez antioksidansa nakon 15 min uočava se porast anodne oksidacijske struje te se zaključuje da je OH•radikal oštetio DNA molekulu. Dodatkom CQAs i diCQAs u otopinu za stvaranje OH•radikala, anodna struja opada u odnosu na strujni odziv oštećene DNA te se zaključuje da dodatkom CQAs i diCQAs preživi veći postotak DNA molekule, što znači da CQAs i diCQAs imaju zaštitno djelovanje na DNA molekulu. Usporedbom postotka preživjele DNA provedenog metodom DNA biosenzora zaključuje se da otopina CFA ima veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na otopine CQAs i diCQAs, što je u skladu s nižom vrijednosti oksidacijskog potencijala CFA u odnosu na CQAs i diCQAs.
- Primjenom metode DNA biosenzora za određivanje antioskidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata kava uočava se da dodatkom ispitivanih vodenih ekstrakata kava u otopinu za stvaranje OH•radikala preživi veći postotak DNA-molekule nego bez dodatka ekstrakta kave. Najveći postotak preživljavanja DNA molekule primjenom metode DNA biosenzora pokazali su vodeni ekstrakti zelenih zrna kava, zatim mljevenih kava, instant kava i prženih zrna kava.

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovoj disertaciji, sve tri primijenjene elektrokemijske metode (SWV, DPV i FTSCP) pokazale su se kao vrlo dobre metode za brzu, pouzdanu, osjetljivu i selektivnu karakterizaciju (identifikaciju i kvantifikaciju) CGAs u vodenim ekstraktima različitih vrsta kava. Primjenom SWV i DPV metoda u ovoj disertaciji po prvi put provedena je ispravna identifikacija oksidacijskih pikova opaženih na SW i DP voltamogramima kava. FTSCP metoda po prvi put je primijenjena za karakterizaciju klorogenskih kiselina u kavama. Stoga rezultati dobiveni primjenom SWV, DPV i FTSCP metoda predstavljaju značajan doprinos istraživanjima karakterizacije klorogenskih kiselina u kavama.

Rezultati istraživanja elektrokemijskih svojstava devet izomera klorogenskih kiselina, koji su dominantni po sadržaju u kavama, provedeni SWV, DPV i FTSCP metodama također predstavljaju značajan znanstveni doprinos ove disertacije, budući da su do sada istraživana

samo elektrokemijska svojstva jednog od izomera CGAs (5-CQA). Poznavanje elektrokemijskih svojstava ovih izomera, nužno je za njihovu ispravnu karakterizaciju u kavama.

Elektrokemijska metoda DNA biosenzora pokazala se kao brza, selektivna, osjetljiva i precizna metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Do danas u literaturi postoji samo jedan znanstveni rad u kojem je korištena ova metoda u analizi jednog uzorka kave i jednog izomera CGAs (5-CQA). Stoga razvoj i primjena DNA biosenzora u analizi antioksidacijske aktivnosti kava i CGAs, provedeni u ovoj disertaciji, predstavljaju poseban znanstveni doprinos ove disertacije.

7. LITERATURA

Anissi J, El Hassouni M, Ouardoui A, Sendide K: A comparative study of the of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: A kinetic approach. *Food Chemistry*, 150:438-447, 2014.

Arnao MB: Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11:419-421, 2000.

Arsenault JC, McDonald PD: *Beginners Guide to Liquid Chromatography*. Waters Corporation, USA, 2007.

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

Bekedam EK, Loots MJ, Schols HA, van Boekel MAJS, Smit G: Roasting Effects on Formation Mechanisms of Coffee Brew Melanoidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56:7138-7145, 2008.

Belay A, Gholap AV: Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemsitry*, 11:234-240, 2009.

Belay A, Kim HK, Hwang YH: Binding of caffeine with caffeic acid and chlorogenic acid using fluorescence quenching, UV/Vis and FTIR spectroscopic techniques. *Luminescence*, 31:565-572, 2016. B

Belay A, Libnedengel E, Kim HK, Hwang YH: Effects of solvent polarity on the absorption and fluorescence spectra of chlorogenic acid and caffeic acid compounds: determination of the dipole moments. *Luminescence*, 31:118-126, 2016. A

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

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb, 2013.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH·. *Free Radical Method. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30:609-615, 1997.

Borrelli RC, Visconti A, Mennella C, Anese M, Fogliano V: Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:6527-6533, 2002.

Bott AW: Practical Problems in Voltammetry: 4. Preparation of Working Electrode. *Current Separations*, 16:79-83, 1997.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28:25-30, 1995.

Bravo J, Monente C, Pena IJP, Cid C: Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50:610-616, 2013.

Brett AMO, Ghica ME: Electrochemical Oxidation of Quercetin. *Electroanalysis*, 15:1745-1750, 2003.

Brett AMO, Piedade JAP, Silva LA, Diculescu VC: Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry*, 332:321-329, 2004.

Brett AMO,Diculescu V, Piedade JAP: Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochemistry*, 55:61-62, 2002.

Brett CMA, Brett AMO, Serrano SHP: An EIS study of DNA-modified electrodes. *Electrochemica Acta*, 44:4233-4239, 1999.

Brett CMA., Brett AMO: *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio, 1994.

Brezova V, Šlebodova A, Staško A: Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, 114:859-868, 2009.

Cämmerer B, Kroh LW: Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 223:469-474, 2006.

Carvalho ML, Santhiago M, Peralta RA, Neves A, Micke GA, Vieira IC: Determination of chlorogenic acid in coffee using a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper (II) complex. *Talanta*, 77:394-399, 2008.

Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N: Hierarchial Scheme for LC-MS^n Identification of Chlorogenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2900-2911, 2003.

Clifford MN, Marks S, Knight S, Kuhnert N: Characterization by LC-MS^n of Four New Classes of *p*-Coumaric Acid-Containing Diacyl Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4095-4101, 2006.

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

Compton RG, Banks CE: *Understanding Voltammetry*. Word Scientific, UK, 2007.

Cornard JP, Lapouge C, Dangleterre L, Allet-Bodelot C: Complexation of Lead(II) by Chlorogenic Acid: Experimental and Theoretical Study. *Journal of Physical Chemistry A*, 112:12475-12484, 2008.

Cornard JP, Lapouge C: Theoretical and Spectroscopic Investigations of a Complex of Al(III) with Caffeic Acid. *Journal of Physical Chemsitry A*, 108:4470-4478, 2004.

Crozier TWM, Stalmach A, Lean MEJ, Crozier A: Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. *Food & Function*, 3:30-33, 2012.

Cruz D, Barroso MF, Alves RC, Gonzalez-Garcia MB, Ramalhosa MJ, Duarte AJ, Oliveira MBPP, Delerue-Matos C: Assay of Total Antioxidants Capacity of Coffee: Use of a DNA-Based Biosensor. U *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 963-970, 2015.

Daglia M, Racchi M, Papetti A, Lanni C, Govoni S, Gazzani G: In Vitro and ex Vivo Antihydroxyl Radical Activity of Green and Roasted Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1700-1704, 2004.

Delgado-Andrade C, Rufian-Henares JA, Morales FJ: Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7832-7836, 2005.

Despande S, El-Abassy RM, Jaiswal R, Eravuchira P, von der Kammer B, Materny A, Kuhnert N: Which spectroscopic technique allows the best differentiation of coffee varieties: comparing principal component analysis using data derived from CD-, NMR- and IR-spectroscopies and LC-MS in the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans. *Analytical Methods*, 6:3268-3276, 2014.

Dizdaroglu M, Jaruga P: Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Reseach*, 46:382-419, 2012.

Dokli I, Navarini L, Hameršak Z: Synthesis of 3-, 4-, and 5-*O*-feruloylquinic acids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 24:785-790, 2013.

Dorea JG, da Costa THM: Is a coffee a functional food? *British Journal of Nutrition*, 93:773-782, 2005.

Drummond TG, Hill MG, Barton JK: Electrochemical DNA biosenzors. *Nature Biotechnology*, 21:1192-1199, 2003.

Duarte GS, Farah A: Effect of Simultaneous Consumption of Milk and Coffee on Chlorogenic Acids' Bioavailability in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:7925-7931, 2011.

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

Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM: Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using

DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1768-1774, 2009.

Enache TA, Amine A, Brett CMA, Brett AMO: Virgin olive oil *ortho*-phenols – electroanalytical quantification. *Talanta*, 105:179-186, 2013.

Enache TA, Brett AMO: Phenol and *para*-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 655:9-16, 2011.

Eravuchira PJ, El-Abassy RM, Deshpande S, Matei MF, Mishra S, Tandon P, Kuhnert N, Materny A: Raman spectroscopic characterization of different regioisomers of monoacyl and diacyl chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy*, 61:10-16, 2012.

Erdem SA, Senol FS, Budakoglu E, Orhan IE, Sener B: Exploring in vitro neurobiological effects and high-pressure liquid chromatography-assisted quantification of chlorogenic aci din 18 Turkish coffee brands. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24:112-120, 2015.

Eschwege KG, Conradie J: Redox Potentials of Ligands and Complexes – a DFT Approach. *South African Journal of Chemistry*, 64:203-209, 2011.

FAO: Fermentation of Coffee – Control of Operation. http://www.ico.org/projects/Good-Hygiene-Practices/cnt/cnt_en/sec_3/docs_3.3/fermentation.pdf [1. 2. 2015.]

Farah A, Donangelo CM: Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18:23-36, 2006.

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

Farah A, Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR: Chlorogenic acids and Lactones in Regular and Water-Decaffeinated Arabica Coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:374-381, 2006. A

Farah A, Paulis T, Trugo LC, Martin PR: Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1505-1513, 2005.

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

Ferancova A, Heilerova L, Korgova E, Šilhar S, Štepanek I, Labuda J: Anti/pro-oxidative properties of selected standard chemicals and tea extracts investigated by DNA-based electrochemical biosensor. *European Food Research and Technology*, 219:416-420, 2004.

Fernandes SC, Moccelini SK, Scheeren CW, Migowski P, Dupont J, Heller M, Micke GA, Vieira I: Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. *Talanta*, 79:222-228, 2009.

Fernandez-Gomez B, Ullate M, Picariello G, Ferranti P, Mesa AD, del Castillo MD: New knowledge on the antiglycoxidative mechanism of chlorogenic acid. *Food and Function*, 6:2081-2090, 2015.

Frankel EN, Meyer AS: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1925-1941, 2000.

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

Fukushima Y, Ohie T, Yonekawa Y, Yonemoto K, Aizawa H, Mori Y, Watanabe M, Takeuchi M, Hasegawa M, Taguchi C, Kondo K: Coffee and Green Tea As a Large Source of Antioxidant Polyphenols in the Japanese Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1253-1259, 2009.

Galandova J, Trnkova L, Mikelova R, Labuda J: Investigation of DNA-biosensor with Chitosan – Carbon Nanotubes Interface by Cyclic and Elimination Voltammetry. *Electroanalysis*, 21:563-572, 2009.

Garcia-Lomillo J, Gonzales-Sanjose ML: Total antioxidant capacity of decaffeinated beverages. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 25:43-46, 2014.

Gaspar A, Garrido EA, Esteves M, Quezada E, Milhazes N, Garrido J, Borges F: New insight into the antioxidant activity of hydroxycimmic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44:2092-2099, 2009.

Ghica ME, Brett AMO: Electrochemical Oxidation of Rutin. *Electroanalysis*, 17:313-318, 2005.

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

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

Hapiot P, Neudeck A, Pinson J, Fulcrand H, Neta P, Rolando C: Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 405:169-176, 1996.

Hatzold T: Introduction. U *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. IFT Press, A John Wiley and Sons, Ltd., 1-20, 2012.

Hečimović I, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Komes D: Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, 129:991-1000, 2011.

Higdon JV, Frei B: Coffee and Health: A review of recent Human Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 46:101-123, 2006.

Hlavata L, Vyskočil V, Benikova K, Borbelyova M, Labuda J: DNA-based biosensors with external Nafion and chitosan membranes for the evaluation of the antioxidant activity of beer, coffee and tea. *Central European Journal of Chemistry*, 12:604-611, 2014.

http://gourmetfarms.com.ph/the-dark-side-of-the-roast/ [1. 9.2015.]

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9799386#section=Chemical-and-Physical-Properties (01.09.2015.)

http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html

Igho O, Rohini T, Edzar E: The Use of Green Coffee Extract as a weight loss supplement: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Gastroenterology Research and Practice*, 2011:1-6, 2011.

Iveković D, Milardović S, Roboz M, Grabarić BS: Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *Analyst*, 130:708-714, 2005.

Jaiswal R, Kuhnert N: Hierarchial scheme for liquid chromatography/ multi-stage spectrometric identification of 3,4,5-triacyl chlorogenic acids in green Robusta coffee beans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24:2283-2294, 2010.

Jaiswal R, Matei MF, Subedi P, Kuhnert N: Does roasted coffee contain chlorogenic acid lactones or/ and cinnamoylshikimate esters? *Food Research International*, 61:214-227, 2014.

Jaiswal R, Patras MA, Eravuchira PJ, Kuhnert N: Profile and Characterization of the Chlorogenic Acids in Green Robusta Coffee Beans by LC-MS^n: Identification of Seven New Classes of Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:8722-8737, 2010.

Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidović-Kosanović M: Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103:369-378, 2007.

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

Jeszka-Skowron M., Zgola-Grzeskowiak A: Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *European Food Research and Technology*, 240:19-31, 2015.

Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM: Coffee acutely modifies gastrointestinal hormones secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78:782-733, 2003.

Kachoosangi RT, Wildgoose GG, Compton RG: Carbon nanotube-based electrochemical sensors for quantifying the ''heat'' of chilli peppers: the adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin. *Analyst*, 133:888-895, 2008.

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.

Kilmartin PA: Electrochemical detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3:941-955, 2001.

Komes D, Belščak-Cvitanović A: Effects of Preparation Techniques on the Antioxidant Capacity of Coffee Brews. U *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Elsevier, London, 87-97, 2014.

Komes D, Bušić A: Antioxidants in Coffee. U *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Elsevier, London, 25-31, 2014.

Komorsky-Lovrić Š, Lovrić M: *Voltametrija*. IRB, Zagreb, 2007.

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*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, 461-510, 2012.

Ky CL, Noirot M, Hamon S: Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:786-790, 1997.

Labuda J, Brett AMO, Evtigyn G, Fojta M, Mascini M, Ozsoz M, Palchetti I, Palček E, Wang J: Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts terms and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 82:1131-1187, 2010.

Labuda J, Bučkova M, Heilerova L, Šilhar S, Štepanek I: Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376:168-173, 2003.

Lau BBY, Panchompoo J, Aldous L: Extraction and electrochemical detection of capsaicin and ascorbic acid from fresh chilli using ionic liquids. *New Journal of Chemistry*, 39:860-867, 2015.

Lee PT, Hartfield JC, Crossley A, Pilgrim BS, Compton RG: Significant changes in pK_a between bulk aqueous solution and surface immobilized species: *ortho*-hydroquinones. *The Royal Society of Chemistry Advances*, 3:7347-7354, 2013.

Li K, Li Y, Yang L, Wang L, Ye B: The electrochemical characterizationn of curcumin and its selective detection in *Curcuma* using a graphene-modified electrode. *Analytical Methods*, 6:7801-7808, 2014.

Liang N, Kitts DD: Antioxidant Property of Coffee Components: Assesment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19:19180-19208, 2014.

Lin Q, Li Q, Batchelor-McAuley C, Compton RG: Two-Electron, Two-Proton oxidation of Catehol: Kinetics and Apparent Catalysis. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119:1489-1495, 2015.

Lin X, Ni Y, Kokot S: Electrochemical mechanism of eugenol at a Cu doped gold nanopracticles modified glassy carbon electrode and its analytical application in food samples. *Electrochimica Acta*, 133:484-491, 2014.

Liu L, Gou Y, Gao X, Zhang P, Chen W, Feng S, Hu F, Li Y: Electrochemically graphene oxide-based electrochemical sensor for the sensitive determination of ferulic aci din *A. sinensis* and biological samples. *Materials Science and Engineering C*, 42:227-233, 2014.

Liu Y, Kitts DD: Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International*, 44:2418-2424, 2011.

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

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

Mahesh V, Million-Rousseau R, Ullmann P, Chabrillange N, Bustamante J, Mondolot L, Morant M, Noirot M, Hamon S, de Kochko A, Werck-Reichhart D, Campa C: Functional characterization of two *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 64:145-159, 2007.

Manaia MAN, Diculescu VC, Gil ES, Brett AMO: Guaicolic spices curcumin and capsaicin electrochemical oxidation behaviour at glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 682:83-89, 2012.

Matei MF, Jaiswal R, Kuhnert N: Investigating the Chemical Changes of Chlorogenic Acids during Coffee Brewing: Conjugate Addition of Water to the Olefinic Moiety of Chlorogenic Acids and Their Quinides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60:12105-12115, 2012.

Mendez-Hernandez D.D., Tarakeshwar P, Gust D, Moore TA, Moore AL, Mujica V: Simple and accurate correlation of experimental redox potentials and DFT-calculated HOMO/LUMO energies of poycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Molecular Modeling*, 19:2845-2848, 2013.

Milardović S, Iveković D, Rumenjak V, Grabarić B: Use of DPPH$^{\cdot}$/ DPPH Redox Couple for Biamperometric Determination of Antioxidative Activity. *Electroanalysis*, 17:1847-1853, 2005.

Mills CE, Oruna-Concha MJ, Mottram DS, Gibson GR, Spencer JPE: The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, 141:3335-3340, 2013.

Mirčeski V, Komorsky-Lovrić Š, Lovrić M.: *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007.

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

Moccelini SK, Spinelli A, Vieira IC: Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 43:381-387, 2008.

Monteiro MC, Farah A: Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. *Food Chemistry*, 134:611-614, 2012.

Moreira ASP, Coimbra MA, Nunes FM, Passos CP, Santos SAO, Silvestre AJD, Silva AMN, Rangel M, Domingues MRM: Chlorogenic acid-arabinose hybride domains in coffee melanoidins: evidences from a model system. *Food Chemistry*, 185:135-144, 2015.

Naidu MM, Sulochanamma G, Sampathu SR, Srinivas P: Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, 107:377-384, 2008.

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

Niseteo T, Komes D, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Budeč M: Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, 134:1870-1877, 2012.

Novak I: Karakterizacija katehinskih spojeva u zelenim i crnim čajevima primjenom elektrokemijskih metoda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

Nunes FM, Cruz ACS, Coimbra MA: Insight into the Mechanism of Coffee Melanoidin Formation Using Modified "in Bean" Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:8710-8719, 2012.

Oliveira-Neto JR, Garcia Rezende S, Reis CdF, Rathinaraj Benjamin S, Lavorenti Rocha M, de Sousa Gil E: Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190:506-512, 2016.

Opitz SEW, Smrke S, Goodman BA, Yeretzian Ch: Methodology for Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant

Assays. U *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Elsevier, London, 253-264, 2014.

Ovadekova R, Jantova S, Latašiova S, Štepanek I, Labuda J: Nanostructured electrochemical DNA biosensors for detection of the effect of berberine on DNA from cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386:2055-2062, 2006.

Parras P, Martinez-Tome M, Jimenez AM, Murcia MA: Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*, 102:582-592, 2007.

Perez-Hernandez LM, Chavez-Quiroz K, Medina-Juarez LA, Meza NG: Phenolic Characterization, Melanoidins and Antioxidant Activity of Some Commercial Coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56:430-435, 2012.

Perrone D, Donangelo R, Donangelo CM, Farah A: Modelling Weight Loss and Chlorogenic Acids Content in Coffee during Roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:12238-12243, 2010.

Perrone D, Farah A, Donangelo CM, Paulis T, Martin PR: Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, 106:859-867, 2008.

Perrone D, Farah A, Donangelo CM: Influence of Coffee Roasting on the Incorporation of Phenolic Compounds into Melanoidins and Their Relationship with Antioxidant Activity of the Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:4265-4275, 2012.

Petrucci R, Astolfi P, Greci L, Firuzi O, Saso L, Marrosu G: A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of hydroxycinnamic acids in aprotic medium. *Electrochimica Acta*, 52:2461-2470, 2007.

Piljac I: *Elektroanalitičke metode: Teorijske osnove, mjerne naprave i primjena.* RMC, Zagreb, 1995.

Pisoschi AM, Cimpeanu C, Predoi G: Electrochemical methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review. *Open Chemistry*, 13:824-856, 2015.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1231-1237, 1999.

Riahi S, Ganjali MR, Khajehsharifi H, Norouzi P, Taghipoor S: theoretical and Experimental Studies on Some Anticancer derivates: Electrochemical investigation. *International Journal of Electrochemical Science*, 4:122-133, 2009.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20:933-956, 1996.

Roginsky V, Lissi EA: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92:235-254, 2005.

Sacchetti G, di Mattia C, Pittia P, Mastrocola D: Effectsof roasting degree, eqivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering*, 90:74-80, 2009.

Saewan N, Atisakul K, Mana T, Jimtaisong A, Kittigowittana K: Antioxidant capacity of different levels of ripeness and parts of *Coffea arabica* extracts. U *Pure and Applied Chemistry International Conference 2012*, 264-266, Faculty of Science, Thailand, 2012.

Sanchez-Gonzales I, Jimenez-Escrig A, Saura-Calixto F: In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90:133-139, 2005.

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

Scholz F: *Electroanalytical Methods*, Springer. Berlin, 2010.

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.

Sharma OP, Bhat TK: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113:1202-1205, 2009.

Shrivastava A, Gupta VB: Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientist*, 2:21-25, 2011.

Somporn C, Kamtuo A, Theerakulpisut S: Effect of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica L. cv. Catimor*). *International Journal of Food Science and Technology*, 46:2287-2296, 2011.

Stradins J, Hasanli B: Anodic voltammetry of phenol and benzenethiolderivatives. Part 1. Influence of pH on electro-oxidation potentials of substituted phenols and evaluation of pK_a from anodic voltammetry data. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 353:57-69, 1993.

Svitkova V, Steffelova L, Blaškivičova J, Labuda J: DNA-based biosensors with polyvinyl alcohol external membrane as a tool for the evaluation of antioxidant activity of white wines. *Acta Chimica Slovaca*, 8:197-202, 2015.

Swislocka R: Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman,UV absorption, ^{1}H and ^{13}C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G** level) studies on alkali metal salts of caffeic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 100:21-30, 2013.

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

Šimkova D, Beinrohr E, Labuda J: Flow-through electrochemical system with DNA-based biosensor for the evaluation of deep DNA damage by chemicals and effect of antioxidants. *Acta Chimica Slovaca*, 2:129-138, 2009.

Šimkova D., Labuda J: Electrochemical DNA Biosensors and Flow-Through Analysis. A Review. *Current Analytical Chemistry*, 7:2-7, 2011.

Šimunac D: *Knjiga o kavi.* Grafem, Zagreb, 2014.

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

Thevenot D, Toth K, Durst R, Wilson G: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry, International Union of Pure and Applied Chemistry*, 71:2333-2348, 1999.

Tirzitis G, Bartosz G: determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57:139-142, 2010.

Trabelsi SK, Tahar NB, Abdelhedi R: Electrochemical behaviour of caffeic acid. *Electrochimica Acta*, 49:1647-1654, 2004.

Trabelsi SK, Tahar NB, Trabelsi B, Abdelhedi R: Electrochemical oxidation of ferulic acid in aqueous solutions at gold oxide and lead dioxide electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 35:967-973, 2005.

Trugo LC, Macrae R: Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. *Analyst*, 109:263-266, 1984.

Van der Berg R, Haenen GRMM, van der Berg H, Bast A: Applicability o fan improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66:511-517, 1999.

Van der Werf R, Marcic C, Khalil A, Sigrist S: ABTS radical scanenging capacity in green and roasted coffee extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 58:77-85, 2014.

Vignoli JA, Bassoli DG, Benassi MT: Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124:863-868, 2011.

Vignoli JA, Viegas MC, Bassoli DG, Benassi MT: Rosating process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*, 61:279-285, 2014.

Vijayalakshmi G, Adinarayana M, Rao PJ: Kinetics and mechanisms of oxidation of some antioxidants with photochemically generated *tert*-butoxyl radicals. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 47:292-297, 2010.

Votavova L, Voldrich M, Ševčik R, Čižkova H, Mlejnecka J, Stolar M, Fleišman T: Changes of Antioxidant Capacity of Robusta Coffee during Roasting. *Czech Journal of Food Sciences*, 27:S49-S52, 2009.

Wang Y, Zhang X, Zhang Q, Yang Z: Oxidative damage to DNA by 1,10-phenanthroline/L-threonine copper (II) complexes with chlorogenic acid. *Biometals*, 23:265-273, 2010.

Yakovleva KE, Kurzeev SA, Stepanova EV, Fedorova TV, Kuznetsova BA, Koroleva OV: Characterization of Plant Phenolic Compounds by Cyclic Voltammetry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43:661-668, 2007.

Yanagimoto K, Lee K-G, Ochi H, Shibamoto T: Antioxidative Activity and Heterocyclic Compounds Found in Coffee Volatiles Produced by Maillard Reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:5480-5484, 2002.

Yang Z, Long H, Zhang X, Wang Y: Autooxidative Activity of Chlorogenic acid and Damage to DNA. *Electroanalysis*, 20:1968-1972, 2008.

Yardim Y, Keskin E, Sentürk Z: Voltammetric determination of mixtures of caffeine and chlorogenic acid in beverage samples using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, 116:1010-1017, 2013.

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.

Yashin A, Yashin Y, Wang JY, Nemzer B: Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants*, 2:230-245, 2013.

Zare HR, Nasirizadeh N, Ajamain H, Sahragard A: Preparation. Electrochemical behaviour and electrocatalytic activity of chlorogenic acid multi-wall carbon nanotubes as a hydroxylamine sensor. *Materials Science and Engineering C*, 31:975-982, 2011.

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.

Ziyatdinova G, Galandova J, Labuda J: Impedimetric Nanostructure Disposable DNA-based Biosensors for the Detection of Deep DNA Damage and Effect of Antioxidants. *International Journal of Electrochemical Science*, 3:223-235, 2008.

Ziyatdinova G, Labuda J: Biosensor with Protective Membrane for the Detection of DNA Damage and Antioxidant Properties of Fruit Juices. *Electroanalysis*, 24:2333-2340, 2012.

Ziyatdinova G, Labuda J: Complex electrochemical and impedimetric evaluation of DNA damage by using DNA biosensor based on a carbon screen-printed electrode. *Analytical Methods*, 3:2777-2782, 2011.