

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Kyselina chlorogenová a její změny při zpracování kávových zrn
Bakalářská práce

2023

Barbora Martincová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Martincová**
Osobní číslo: **C20083**
Studijní program: **B0531A130024 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Kyselina chlorogenová a její změny při zpracování kávových zrn**
Téma práce anglicky: **Chlorogenic acid and its changes during the processing of coffee beans**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Z dostupné literatury vypracujte rešerši shrnující informace o kyselině chlorogenové. Popište její strukturu, vlastnosti a biochemické vlastnosti. Shrňte informace o jejich benefitech při léčbě diabetes mellitus, snížení krevního tlaku apod.
2. V další části se zaměřte na jeho obsah v potravinách, zejména na obsah v kávových zrnech, a to zelených a pražených. Dále na možnostech jejího stanovení v potravinách.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní vědecká literatura, publikace z databáze WOS, PubMed, Sciencedirect apod.
Dále dle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Kyselina chlorogenová a její změny při zpracování kávových zrn jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práci jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 06. 2023

Barbora Martincová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí práce doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za cenné rady a ochotu pomoci. Také děkuji své sestře za podporu a pomoc.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá kyselinou chlorogenovou, antioxidantem z řad fenolických látek, obsaženým v rostlinných plodech. Popisuje strukturu kyseliny a její významné účinky. Dále se zabývá kávovými zrny a obsahem kyseliny chlorogenové v nich. V poslední části jsou uvedeny informace o způsobech jejího stanovení v pražených a nepražených kávových zrnech, kam patří zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie a UV/VIS spektrometrie.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina chlorogenová, kávová zrna, pražení kávy, antioxidační účinky, HPLC, spektrometrie

TITLE

Chlorogenic acid and its changes during the processing of coffee beans

ANNOTATION

This bachelor's thesis deals with chlorogenic acid, an antioxidant from among phenolic substances contained in plant fruits. It describes the structure of the acid and its significant effects. It also deals with coffee beans and their chlorogenic acid content. The thesis contains information about methods, which could be used for determination of chlorogenic acid in roasted and unroasted coffee beans, including mainly high-performance liquid chromatography and UV/VIS spectrometry.

KEYWORDS

chlorogenic acid, coffee beans, coffee roasting, antioxidant effects, HPLC, spectrometry

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	8
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD.....	12
1 STRUKTURA KYSELINY CHLORGENOVÉ	13
1.1 Polyfenoly	13
1.2 Fenolové kyseliny	13
1.3 Chlorgenové kyseliny.....	14
1.3.1 Nomenklatura kyseliny chlorgenové	15
2 VÝSKYT KYSELINY CHLORGENOVÉ V KÁVOVÝCH ZRNECH	16
2.1 Kávovník.....	16
2.2 Zpracování plodů kávovníku.....	17
2.3 Pražení kávových zrn	18
2.3.1 Změny složení kávového zrna při pražení	21
2.4 Antioxidační aktivita kyseliny chlorgenové stanovená v kávě	25
3 ÚČINKY KYSELINY CHLORGENOVÉ.....	27
3.1 Účinky kyseliny chlorgenové na krevní tlak.....	27
3.2 Účinky kyseliny chlorgenové v souvislosti s <i>diabetes mellitus</i> a obezitou	27
3.3 Protinádorové účinky kyseliny chlorgenové	28
3.4 Protizánětlivé účinky kyseliny chlorgenové	30
3.5 Účinky kyseliny chlorgenové v souvislosti s Alzheimerovou chorobou	31
4 VSTŘEBÁVÁNÍ KYSELINY CHLORGENOVÉ.....	31
5 STANOVENÍ KYSELINY CHLORGENOVÉ V KÁVĚ	34
5.1 Stanovení kyseliny chlorgenové pomocí UV/VIS spektrometrie	35
5.2 Stanovení kyseliny chlorgenové chemiluminiscenční analýzou.....	37
5.3 Stanovení kyseliny chlorgenové pomocí HPLC	38
ZÁVĚR	44
POUŽITÁ LITERATURA	45

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Rozdělení fenolických sloučenin.	14
Obrázek 2: Kyseliny chlorgenové v kávě.	15
Obrázek 3: Jednotlivé vrstvy plodu kávovníku.	17
Obrázek 4: Zelená kávová zrna.	18
Obrázek 5: Uspořádání pražicího systému.	19
Obrázek 6: Pražírna s přímým plynovým spalováním.	19
Obrázek 7: Tmavě, středně a lehce pražená kávová zrna.	20
Obrázek 8: Laktony v pražené kávě.	24
Obrázek 9: Chemické vzorce kyseliny kávové a dihydrokávové.	30
Obrázek 10: Metabolismus chlorgenových kyselin.	33
Obrázek 11: Resorpce CGA při průchodu lidským trávicím traktem.	34
Obrázek 12: Obsah kyseliny chlorgenové v zelených kávových zrnech <i>C. arabica</i> a <i>C. robusta</i>	36
Obrázek 13: Schéma temné komory CCD kamery používané pro stanovení CGA.	37
Obrázek 14: Vliv stupně pražení na koncentraci CGA v kávových zrnech z různých zdrojů.	39
Obrázek 15: Chromatografický profil chlorgenových kyselin v zelených kávových zrnech.	40
Obrázek 16: Obsah 5-CQA, 4-CQA, 3-CQA a kofeinu v zelených kávových zrnech.	43
Tabulka 1: Složení středně pražené kávy druhu <i>Coffea arabica</i> a <i>Coffea robusta</i>	21
Tabulka 2: Obsah hlavních esterů kafeoylchinové kyseliny v pražené kávě (<i>Coffea arabica</i>).	25
Tabulka 3: Molekulové hmotnosti kyseliny chlorgenové a strukturně příbuzných fenolických antioxidantů.	32
Tabulka 4: Střední hodnota ± směrodatná odchylka (n=3) kyseliny chlorgenové ve třech vzorcích zelené kávy A, B, a C získaných metodou UV/VIS spektrometrií.	35
Tabulka 5: Koncentrace obsahu CGA v zelených kávových zrnech stanovená UV/Vis spektrometrií.	37
Tabulka 6: Obsah CGA ve vzorcích zelené kávy metodou chemiluminiscenčního zobrazování.	38

Tabulka 7: Průměrné koncentrace kyseliny chlorgenové v kávových zrnech s různými stupni pražení získaná metodou HPLC-DAD.	39
Tabulka 8: Obsah chlorgenových kyselin ve vzorcích kávy získaných metodou HPLC/PDA.	41
Tabulka 9: Obsah CGA v suchém vzorku kávových zrn \pm SD (n = 3) získaný metodou SPE-HPLC.	42
Tabulka 10: Průměrný obsah CGA v kávových zrnech stanovený metodou HPLC.	43

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

3-CQA – 3-O-kafeoylchinová kyselina

4-CQA – 4-kafeoylchinová kyselina

5-CQA – 5-O-kafeoylchinová kyselina

ACE – angiotensin konvertující enzym

AChE – acetylcholinesteráza

ADA – adenosindeamináza

AMPK – adenosinmonofosfát -aktivovaná proteinkináza

A β – beta-amyloidní peptid

BCL2 – B-cell lymphoma

BMI – body mass index; index tělesné hmotnosti

CGA – kyselina chlorgenová

Co-A – koenzym A

COMT – katechol-O-methyltransferáza

CQA – kafeoylchinová kyselina

CQL – lakton kyseliny kafeoylchinové

diCQA – dikafeoylchinová kyselina

diCQL – lakton kyseliny dikafeoylchinové

ET – esteráza

FFA – volné mastné kyseliny

FQA – feruloylchinová kyselina

FQL – lakton kyseliny feruloylchinové

GT – UDP-glukuronyltransferáza

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC/PDA – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem fotodiodového pole

HPLC-DAD – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry; Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii

LPS – lipopolysacharid

MCT – transportér monokarboxylových kyselin

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát

NF- κ B – jaderný faktor kappa B

NO – oxid dusnatý

ODS – OktaDecylSilan

PCNA – proliferační buněčný jaderný antigen

pCoQL – lakton kyseliny p-kumaroylchinové

QA – kyselina chinová

RA – reduktáza

ROS – reaktivní forma kyslíku

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

SPE-HPLC-UV – extrakce na pevné fázi spojená s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s ultrafialovou detekcí

ST – sulfuryl-O-transferáza

TLR4 – Toll-like receptor 4

triCQA – trikafeoylchinová kyselina

UV/VIS – ultrafialové/viditelné záření

UVB – ultrafialové záření B

ÚVOD

Kyselina chlorgenová neboli CGA je polyfenolická látka tvořena kyselinou kávovou a kyselinou chinovou. Je obsažena v potravinách rostlinného původu. Významný je její výskyt především v zelených (nepražených) a pražených kávových zrnech, ale lze ji najít také například v ovoci, jako jsou jablka či hrušky.

Kyselina chlorgenová si získala pozornost především pro svou biologickou aktivitu. Bývá studována především pro své významné antioxidační vlastnosti. Dále mezi její nejvíce zkoumané vlastnosti patří účinky protinádorové, účinky v souvislosti s *diabetes mellitus* typu 2 a Alzheimerovou chorobou.

Káva je kofeinový nápoj, který si získává stále větší oblibu. Její příznivci u kávy vyzdvihují její pozitivní účinky na lidské zdraví, např. v souvislosti se snížením výskytu deprese či rakoviny. Zelená káva si také získala pozornost díky zkoumaným antiobezitním účinkům. Nejvýznamnějšími druhy kávy jsou *Coffea arabica* a *Coffea canephora* neboli *robusta*, ve které se vyskytuje největší množství kyseliny chlorgenové. O produkci kávy se nejvíce zasluhují především Brazílie, Etiopie či Indonésie. Káva jsou zrna, plody kávovníku, která jsou pro konzumaci upravována tak, že jsou pražena. Zpracováním těchto zrn se mění jejich složení včetně množství obsažené kyseliny chlorgenové. Obsah CGA je stanovován zejména pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo UV/VIS spektrometrie.

1 STRUKTURA KYSELINY CHLORGENOVÉ

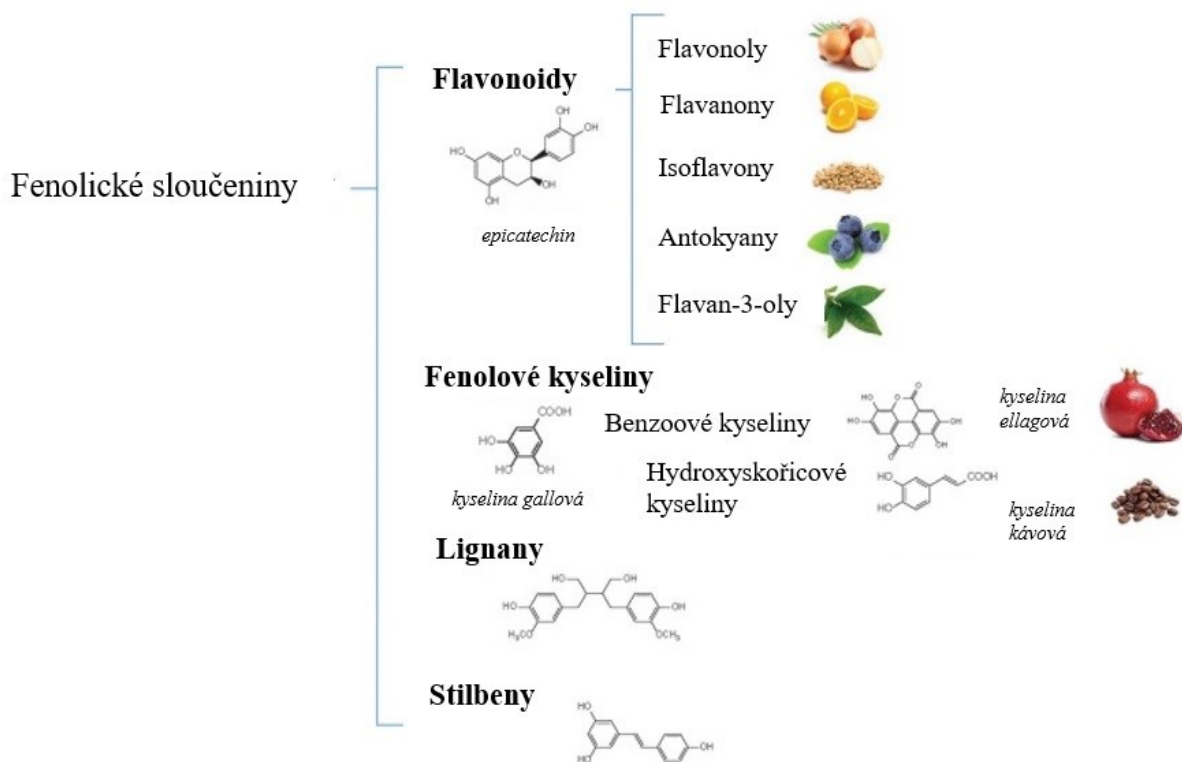
1.1 Polyfenoly

Kyselinu chlorgenovou (z angl. chlorogenic acid, CGA) řadíme mezi polyfenolické látky. Polyfenoly patří mezi biologicky aktivní sloučeniny v potravinách rostlinného původu. Jejich základním monomermem je fenolický kruh. V závislosti na síle tohoto fenolického kruhu lze polyfenoly dělit do několika tříd (viz Obrázek 1) [1]. Mezi hlavní polyfenoly patří flavonoidy, pod které spadají flavonoly, flavony, flavan-3-oly, flavanony, antokyany a isoflavony [2]. Dále pak fenolové kyseliny, stilbeny a lignany [1]. Polyfenoly z různých potravinových zdrojů, jako je kakao, čokoláda, čaj a víno mají různé zdravotní přínosy související se silnou antioxidační aktivitou. Vyznačují se řadou biochemických vlastností, jako jsou protizánětlivé, vasodilatační a antitrombotické [2].

1.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou fenolické sloučeniny, které mají skupinu karboxylové kyseliny. Většinou se vyskytují jako amidy, estery nebo glykosidy, a zřídka ve volné formě. Podle chemické struktury se mezi fenolové kyseliny řadí kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové [3].

Hydroxyskořicové kyseliny, které jsou odvozené od kyseliny skořicové, bývají přítomné v potravinách jako jednoduché estery s kyselinou chinovou nebo glukózou. Nejrozšířenější rozpustná vázaná kyselina hydroxyskořicová je kyselina chlorgenová. Další nejběžnější hydroxyskořicové kyseliny jsou kyselina ferulová, kávová, p-kumarová a sinapová [3].

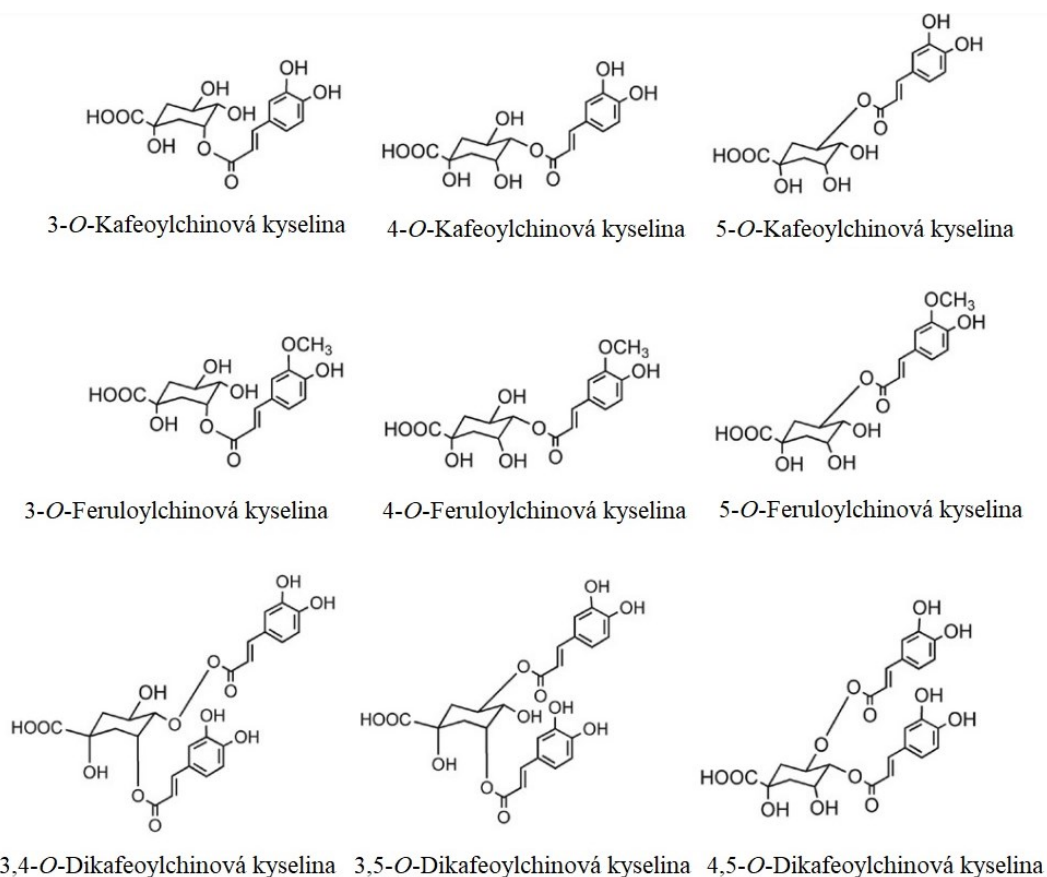


Obrázek 1: Rozdělení fenolických sloučenin. Převzato z: [4].

1.3 Chlorgenové kyseliny

Kyseliny chlorgenové řadíme do skupiny esterů, které jsou strukturními analogy kyseliny chinové (QA) nesoucí jeden nebo více derivátů, jako je kyselina kávová, ferulová a kyseliny p-kumarové. Nejběžnější chlorgenové kyseliny v kávě jsou uvedeny na Obrázku 2. QA obvykle tvoří esterovou vazbu v poloze 5, 3 a 4. Obecně se 5-CQA nazývá kyselina chlorgenová [5].

Tato kyselina vzniká esterifikací kyseliny kávové a kyseliny chinové [6, 3]. V chinové části se nacházejí směrované vodíkové vazby, kde karboxylový vodík není orientován ke karboxylovému kyslíku karboxylové skupiny, ale ke kyslíku blízké hydroxylové skupiny [7].



Obrázek 2: Kyseliny chlorgenové v kávě. Převzato z: [8].

1.3.1 Nomenklatura kyseliny chlorgenové

První kyselina acylchinová byla charakterizována v roce 1932, kdy Fischer a Dangschat navrhli, že látka izolovaná ze zelených kávových zrn se bude nazývat kyselina 3-*O*-kafeoylchinová (3-CQA). Tuto látku v roce 1846 popsal Payen jako kyselinu chlorgenovou. V roce 1950 byla zmíněna přítomnost izomeru kyseliny 5-*O*-kafeoylchinové (5-CQA) v kávě. Tomuto izomeru byl přiřazen triviální název kyselina neochlorgenová. Systém číslování použitý pro skupinu kyseliny chininové byl revidován IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) v doporučeních z roku 1976 pro číslování atomů uhlíku cyklistolů. V systému IUPAC se 3-CQA Fischera a Dangschata změnila na 5-CQA IUPAC a 5-CQA se změnila na 3-CQA IUPAC. Oba systémy číslování se stále používají, což bývá matoucí [9]. V této práci je využíváno číslování dle IUPAC.

2 VÝSKYT KYSELINY CHLORGENOVÉ V KÁVOVÝCH ZRNECH

Kyselina chlorgenová se vyskytuje v rostlinách, ovoci a zelenině, jako jsou jablka, hrušky, rajčata, borůvky, brambory, arašídý a lilky [10]. Jedním z nejdůležitějších zdrojů kyseliny chlorgenové jsou kávová zrna [5].

Káva je nápoj vyrábějící se z plodů kávovníku [11, 12]. Existuje například pražená káva zrnková, pražená káva mletá či rozpustná káva. Je rozlišována káva americká, africká, asijská a z Oceánie [12]. Mezi nejdůležitější produkční státy patří Brazílie, Kolumbie, Etiopie a Indonésie [12, 5]. Výživová hodnota kávy není významná, proto je řazena mezi pochutiny [12]. Často je zmiňována v souvislosti s účinky na snížení rizika výskytu rakoviny [13], onemocnění jater, cukrovky a také s ochranou před Parkinsonovou chorobou [13, 14]. Pití kávy v mírném množství (3–4 šálky denně zejména podle obsahu kofeinu) může mít ochranný účinek proti depresi [15]. V roce 2020 byla celosvětová produkce kávy 175,3 milionů tun [16]. Spotřeba kávy se zvyšuje [15, 16].

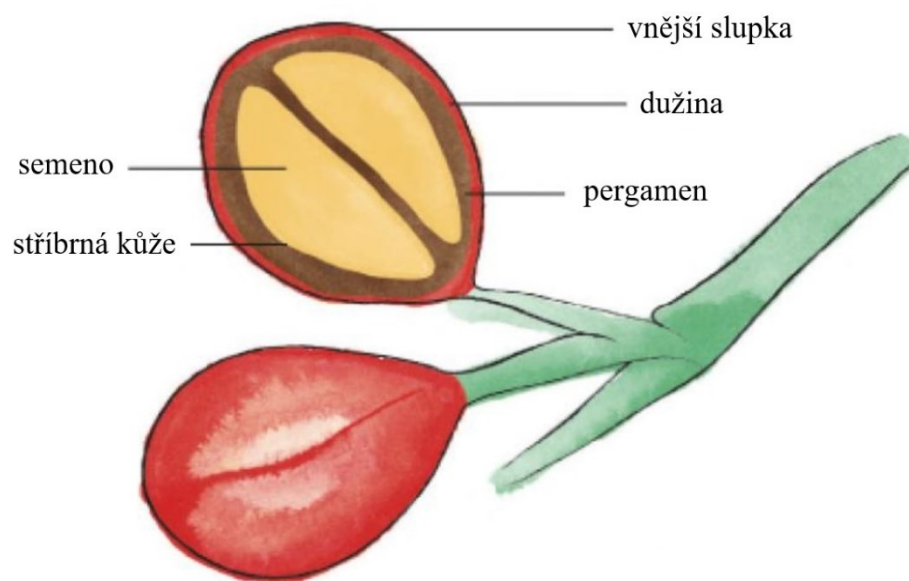
2.1 Kávovník

Kávovník rodu *Coffea L.* se řadí do čeledi mořenovitých (*Rubiaceae*), existuje více než 70 druhů [17]. Kávovník patří mezi stálezelené tropické až subtropické stromy či keře [12]. Pěstují se ve výšce 600-1200 m. n. m., plnou úrodu poskytují po šesti letech. Maximální výnos je zaznamenán 10-15 let po výsadbě [18]. Rody *Coffea arabica* a *Coffea canephora var. robusta* se řadí mezi nejdůležitější druhy kávovníku a tvoří 40-60 % světové produkce [13]. Mezi důležité patří i *Coffea liberica* [11].

Coffea arabica, také *C. vulgaris Moench*, kávovník arabský, má plody o vysoké kvalitě. Ty jsou ale často napadány kávovým broukem a listy kávovou rží. Je to nejdůležitější botanický druh kávovníku [12]. Pěstuje se v Kolumbii, Etiopii, Tanzanii, Keni a Brazílii. Produkovaná káva má nižší hořkost a jemnější aroma, a proto má vyšší cenu než jiné druhy [11]. *Coffea canephora*, také *C. robusta*, kávovník laurentský, je více odolný vůči chorobám [12]. Také je schopný snášet vyšší teploty, sucho a kávovou rzi ve srovnání s *C. arabica* [19]. Má menší semena než arabika a jedná se o kávu nižší jakosti. Používá se hojně na výrobu instantní kávy a jako součást směsi s arabikou [12]. Je pěstován převážně ve Vietnamu [11]. *Coffea liberica*, kávovník liberský, se příliš nepěstuje, protože káva z jeho semen je málo kvalitní, jelikož má hořkou a trpkou chuť. Hospodářsky významnější je kříženec liberiky a arabiky, který se vyznačuje velkými zrny „tzv. maragogipe“. *Coffea Dewevrei*, kávovník chari,

tzv. *excelsa* má výraznou ostrou vůni. Obsahuje vysoké množství kofeinu. Je to ale káva nízké kvality. *Coffea Stenophylla* je vysoce odolná proti listové rzi a má uspokojivé chuťové vlastnosti [12].

Plody kávovníku jsou kávová zrna. Tyto plody, tzv. kávové třešně, mají zprvu zelený povrch, poté se zráním zbarví do červena až červenofialova. Vnitřek se skládá ze dvou zploštělých semen [18]. Zrna jsou oválná. Mají tenkou slupku známou jako kávová stříbrná kůže, dále endokarpovou vrstvu tzv. pergamen, pektickou adhezivní vrstvu, dužinu a epikarp, což je vnější slupka (Obrázek 3) [5]. Někdy plod obsahuje pouze jedno celé zaoblené zrno, tzv. zrno perlové [12].



Obrázek 3: Jednotlivé vrstvy plodu kávovníku. Převzato z: [20].

2.2 Zpracování plodů kávovníku

V oblastech od rovníku na sever až k obratníku Raka probíhá sklizeň od prosince do února, naopak od rovníku směrem na jih k obratníku Kozorooha probíhá sklizeň od května do srpna. Po úpravě se kávová zrna nazývají surová nebo zelená káva (Obrázek 4) [12, 18]. Zpracování kávy začíná odstraněním dužiny a slupky kde se využívá buď mokrý, nebo suchý způsob následovaný dalšími kroky [17].

Suchým způsobem, tedy sušením, se zrna zpracovávají zejména v Brazílii, tzv. východoindickým způsobem. Rozprostřou se na slunečních terasách a čeká se, dokud se smrštěním neoddělí pergamenová vrstva. Během sušení se musí několikrát za den

přehazovat. Následně se odstraní suché slupky, pergamenová vrstva a stříbrná blanka na loupacích strojích. Zrna jsou nakonec roztríděna podle velikosti a jakosti a balena. Výsledkem je nepraná, přírodní káva [12, 18].

Zpracování plodů mokrým způsobem, tzv. západoindickým, bývá propracovanější a získává se z něj kvalitnější káva, jelikož jsou oddělovány nezralé a lehké plody. Využívá se pro zpracování arabiky v Kolumbii, Střední Evropě a Africe. Sklizené plody se očišťují plavením, poté jsou zpracovány v mačkáčím stroji, tzv. pulpovníku. V tomto zařízení dochází pomocí tření k oddělení slupky a dužiny bez poškození semene. Aby se odstranily pergamenová vrstva a stříbrná blanka, nechá se káva fermentovat ve fermentačních nádržích. Zrna jsou pak sušena buď na slunci, nebo v mechanických nádržích pomocí horkého vzduchu. Zbytky pergamenové slupky se odstraňují na loupacích strojích jako u suchého způsobu zpracování. Takto se získá praná káva [12, 18].

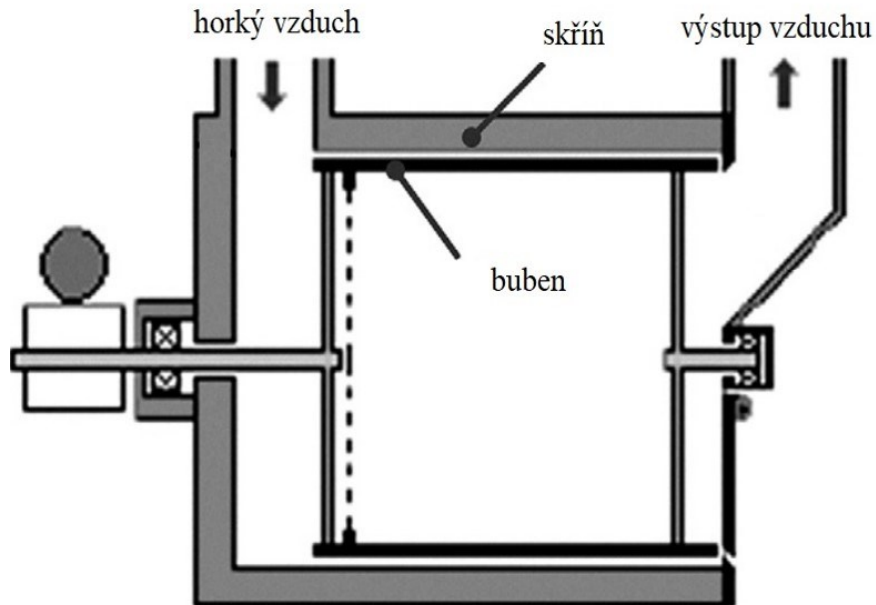


Obrázek 4: Zelená kávová zrna. Převzato z: [21].

2.3 Pražení kávových zrn

Pražení určuje konečnou kvalitu kávy. Proces způsobuje na kávě fyzikální, chemické a sensorické změny [22]. Mezi nejdůležitější faktory tohoto procesu patří čas a teplota [23]. Provádí se při teplotě okolo 200 °C [22, 24]. Doba se pohybuje od 12 do 20 minut podle požadovaných vlastností finálního produktu [22]. Existují dva hlavní typy strojů na pražení: kontinuální pražírna a dávková pražírna. V kontinuálním uspořádání proudí horký vzduch míchaným ložem, vrstvami kávy nebo kaskádovými či zavěšenými proudy zrn.

U dávkového typu (Obrázek 5) se praží pouze pevně stanovené množství kávy. Pro tento typ jsou využívány horizontální a rotační bubny [25]. Zrna se musí neustále míchat, aby se zajistil rovnoměrný ohřev [5, 25]. Příklad pražicího stroje lze vidět na Obrázku 6.



Obrázek 5: Uspořádání pražicího systému. Převzato z: [25].



Obrázek 6: Pražírna s přímým plynovým spalováním. Převzato z: [26].

Pražení se skládá ze čtyř fází, kterými jsou sušení, vývoj, rozklad a plné pražení. Při 50 °C dochází k denaturaci proteinu [18]. Jakmile se dosáhne teploty mezi 20 a 130 °C, začne se výrazně odpařovat voda, a to volná i chemicky vázaná až do 1 %. Při zvýšení teploty nad 130-140 °C lze pozorovat endotermické maximum, kdy začnou zrna bobtnat a měnit svou

strukturu a barvu v procesu neenzymatického hnědnutí. V další fázi ztrácí zrna během 140-160 °C svoji hmotu se současným zvětšením objemu, což má za následek vznik trhlin [27]. Zrna zvětší svůj objem o 50-80 %, praskání probíhá podél drážky [18]. Také v tomto exotermickém kroku začíná tvorba aromatických sloučenin a částečná degradace chlorgenových kyselin. Když se dosáhne teploty nad 180–190 °C, dojde k tvorbě nových sloučenin zodpovědných za vůni, chuť a barvu pražených kávových zrn. Při teplotě 190–220 °C se zrna stávají zevnitř porézní a dále se vyvíjejí aromatické sloučeniny a uvolňuje se voda a oxid uhličitý v důsledku Maillardovy reakce [27]. Proces je řízen elektronicky nebo pomocí vzorkování zrn [18]. Po pražení se provede chlazení prouděním vzduchu nebo rozprašováním vody [17]. Chlazením se zabrání ztrátě aroma a přepálení konečného produktu [18]. Komerčně balená pražená káva si udrží čerstvost 8 až 10 týdnů, na rozdíl od nepražených zrn, které se mohou skladovat až 3 roky [18].

Kvalita pražení je kontrolována a určuje se stupeň pražení kávy (Obrázek 7) podle sensorických vlastností (barva, aroma a příchutě) a fyzikálních parametrů (teplota vzduchu a doba zdržení procesu) [28]. Různé stupně pražení poskytují různé vlastnosti. Lehké pražení způsobuje kyselou, travnatou a nedostatečně vyvinutou chuť, díky střednímu pražení se dosáhne vyvážené chuti a aroma podobné citrusové chuti. Proces tmavého pražení pak činí kávu nízko kyselou. Mletá káva se praží do různých stupňů podle národní preference. V některých částech Evropy je například preferována tmavě pražená káva, zatímco v Turecku je tradiční střední pražení. Ve Spojeném království a Spojených státech je oblíbené světle střední až střední pražení [22]. Složení pražené kávy je uvedeno v Tabulce 1.



Obrázek 7: Tmavě, středně a lehce pražená kávová zrna. Převzato z: [29].

Tabulka 1: Složení středně pražené kávy druhu *Coffea arabica* a *Coffea robusta*. Převzato z: [18].

Látka	<i>Coffea arabica</i> [%]	<i>Coffea robusta</i> [%]
Kofein	1,3	2,4
Tuky	17,0	11,0
Bílkoviny	10,0	10,0
Sacharidy	38,0	41,5
Niacin a jeho metabolity	1,0	0,7
Alifatické kyseliny	2,4	2,5
Chlorgenové kyseliny	2,7	3,1
Těkavé sloučeniny	0,1	0,1
Minerální látky	4,5	4,7
Melanoidiny	23,0	23,0

2.3.1 Změny složení kávového zrna při pražení

Během pražicího procesu přechází zelené zbarvení kávových zrn přes žlutou a oranžovou barvu až na hnědou či tmavě hnědou jako důsledek tvorby především hnědých polymerů melanoidinů [30]. Ty vznikají díky Maillardovým reakcím kombinací cukrů a aminoskupinou aminokyselin a proteiny [31]. Jelikož dochází k úbytku hmotnosti a nárůstu objemu, hustota zrn se snižuje. Úbytek hmotnosti je v prvních stupních pražení následkem ztráty vody, od středně tmavého stupně jde především o tepelnou degradaci organické hmoty na plyn a těkavé sloučeniny [30]. V pražených kávových zrnech se vyskytuje více než 1200 těkavých sloučenin a mnoho netěkavých sloučenin, jako jsou chlorgenová kyselina a její laktony, kofein, trigonellin, nearomatické organické kyseliny a minerály [5].

Při pražení dochází, především díky Maillardovým reakcím, ke snížení obsahu proteinů, aminokyselin, sacharózy a vody [32]. Pokles aminokyselin činí zhruba 30 %. Reaktivní aminokyseliny jako například arginin, kyselina asparagová nebo cystin, jsou v pražené kávě sníženy, zatímco stabilní aminokyseliny, zejména alanin, kyselina glutamová a leucin, jsou zvýšeny. Volné aminokyseliny pražená káva obsahuje minimálně [18].

Polysacharidy se vyskytují v buněčné stěně kávových zrn jako součást nerozpustného polysacharidového komplexu. Pražením se rozpustnost zvyšuje uvolněním buněčné stěny při bobtnání a depolymerizací polysacharidů. Polysacharidy rozpustné ve vodě hrají důležitou

roli při zadržování těkavých látek a přispívají k viskozitě kávy [33]. Tmavě pražená káva obsahuje méně polysacharidů, což je důsledek jejich rozpadu na různé těkavé a netěkavé sloučeniny, jako jsou např. melanoidiny, což jsou prebiotické sloučeniny zodpovědné za hnědou barvu pražené kávy. Obsah polysacharidů v arabice i robustě bývá stejný. Nestravitelné polysacharidy tvoří 60–70 % sušiny kávy a jsou klasifikovány jako rozpustná vláknina [14].

Na lipidy pražení nemá velký vliv [18]. Celkový obsah lipidů je v kávě arabika kolem 13 % a zhruba 10 % v robustě. Téměř polovinu z těchto obsahů zastupuje kyselina linolová [34]. Vosky zelené kávy a hydroxytryptamidové estery mastných kyselin pocházejí z epikarpu kávového zrna. V pražené kávě jsou zastoupeny z 0,06-0,1 %. Diterpeny v kávě jsou cafestol, 16-O-methylcafestol a kahweol. Cafestol a kahweol se procesem pražení degradují. Vzhledem k tomu, že 16-O-methylcafestol se nachází pouze v robustě, je vhodným indikátorem pro detekci smíchání kávy arabika s kávou robusta [18].

Další složkou je kofein, jeden z hlavních alkaloidů v zelených a pražených kávových zrnech. Je to mírný stimulant centrálního nervového systému. Má vliv na srdce, ledviny, periferní a centrální cévní systém, gastrointestinální systém a dýchací systém. Větší množství se nachází v robustě než v arabice [15]. V zelených kávových zrnech tvoří komplex s CGA v poměru 1:1, který se tvoří díky fyzikálně-chemickým vlastnostem [35]. Pražením se obsah kofeinu sníží jen nepatrně, jelikož je to termostabilní sloučenina [14].

Druhý hlavní alkaloid v kávě, trigonellin (N-methyl nikotinová kyselina) je pyridinový alkaloid, vznikající methylováním atomu dusíku kyseliny nikotinové [15]. Je to prospěšný nutriční faktor [33]. Trigonellin je spojován s antidiabetickým účinkem [36] a inhibičním účinkem na růst buněk rakoviny jater [37]. Pražením dochází k tepelné degradaci trigonellinu a tvorbě řady těkavých sloučenin, jako jsou pyridinové a pyrrolové deriváty, kyselina nikotinová a methylester kyseliny nikotinové. Tyto sloučeniny jsou zodpovědné za charakteristickou chuť a aroma kávy. Jelikož nálevy kávy arabika obsahují o něco vyšší hladinu trigonellinu než nálevy robusta, tyto dvě kávy se vyznačují odlišnou chutí [15].

Co se týče minerálů, v kávovém popelu je dominantní draslík (1,1 %), následovaný vápníkem (0,2 %) a hořčíkem (0,2 %). Převládající anionty jsou fosforečnan (0,2 %) a síran (0,1 %). Mnoho dalších prvků je přítomno ve stopových množstvích [18].

V pražené kávě bylo identifikováno více než 1000 těkavých sloučenin [5, 38]. Jejich složení v kávě je ovlivněno mnoha faktory, jako je odrůda, klima, půda, nadmořská výška, procesy

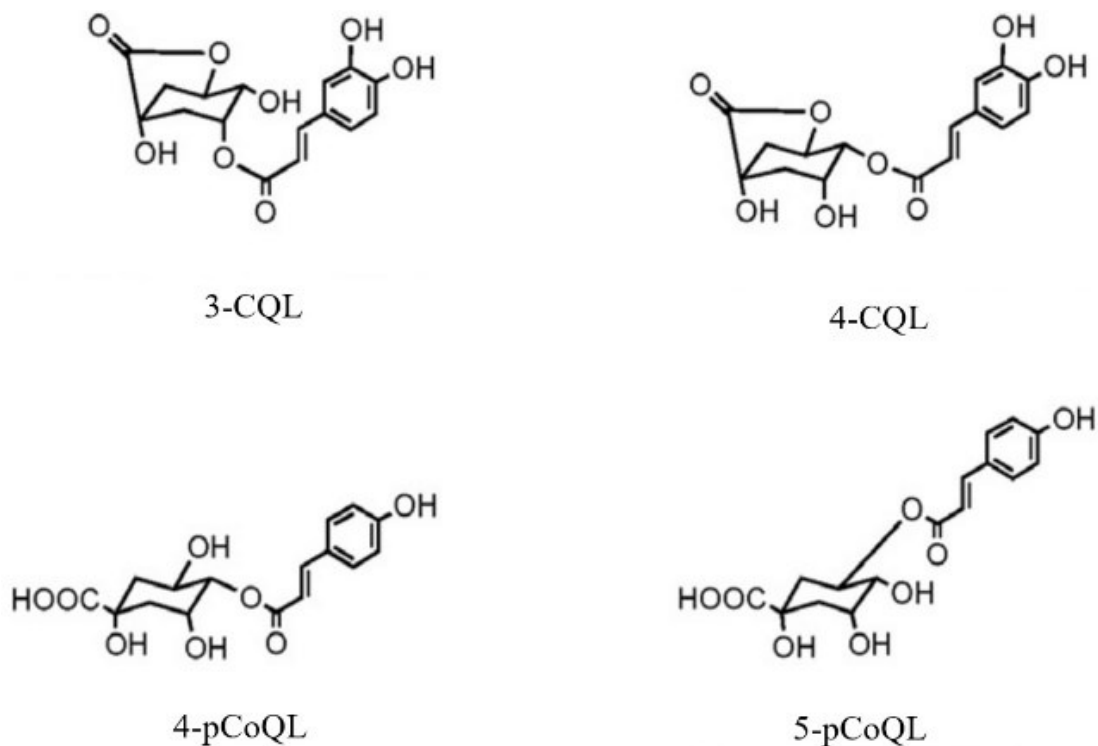
po sklizni (např. sušení) apod. Pouze zhruba 5 % z přítomných těkavých látek hraje významnou roli v aroma kávy [38]. To je popisováno jako sladké/karamelové, zemité, sirné/pražené a kouřové/fenolické. K této charakteristice lze přiřadit většinu odorantů. Zbývající odoranty mají ovocnou nebo kořenitou vůni. Nejdůležitější podíl na vůni kávy má 2-furfurylthiol. Robusta obsahuje ve výrazně vyšších koncentracích než arabika alkylypyraziny a fenoly. Díky tomu jsou zemité a kouřové/fenolické tóny ve vůni intenzivnější. Arabika je obvykle bohatší na vonné látky tzv. sladké/karamelové skupiny. 3-alkyl-2-methoxypyraziny způsobují hrachovo-bramborovou vůni syrové kávy. Jelikož jsou velice stabilní, tak přežívají pražení [18].

Kyselina chlorgenová

Nejvíce kyseliny chlorgenové je obsaženo v zelených kávových zrnech, tzn. před pražením [5, 13, 14]. Obsah CGA v těchto zrnech je různý, ovlivňuje ho druh kávy, klima, ve kterém je pěstována, živiny v půdě, proces zpracování, jako je dekofeinizace, a stupeň zralosti [5]. Celkově zrna obsahují 4-12 % chlorgenových kyselin. Pražením se obsah značně snižuje v důsledku probíhající hydrolyzy, kdy se uvolňuje kyselina chinová a další látky. Obecně se CGA vyskytuje více v robustě než v arabice [6]. Příjem kyseliny chlorgenové může být velmi vysoký, odhaduje se, že člověk, který běžně pije kávu, přijme až 0,8 g denně [39].

Kyselina chlorgenová je nejvíce se vyskytující fenolovou kyselinou v zelených kávových zrnech [23]. Chlorgenové kyseliny mohou být podřazeny do jiných sloučenin: 1) monoestery kyseliny kávové, které zahrnují kyseliny kafeoylchinové (CQA), kyseliny p-kumaroylchinové a kyseliny feruloylchinové; 2) diestery a triestery, které zahrnují dikafeoylchinovou kyselinu (diCQA) a kyselinu trikafeoylchinovou (triCQA); 3) smíšené diestery mezi kyselinou kávovou a kyselinou železitou, tj. kyseliny feruloylkafeoylchinové, které se nacházejí hlavně v kávě robusta [35]. Nejvíce se vyskytují 3 estery kyseliny kafeoylchinové (3-, 4-, 5-CQA), 3 dikafeoylchinové (3,4-, 3,5- a 4,5-diCQA) a 3 feruloylchinové (3-, 4- a 5-FQA) [5]. Obsah hlavních esterů kafeoylchinové kyseliny v kávě je uveden v Tabulce 2.

Při redukci chlorgenových kyselin během pražení jsou produkovány dva laktony kyseliny kafeoylchinové (CQL) a to 3-CQL a 4-CQL (Obrázek 8); dva laktony kyseliny feruloylchinové (FQL): 3-FQL a 4-FQL; diCQA lakton (3,4-diCQL) a dva laktony kyseliny p-kumaroylchinové (pCoQL). Tvorba laktonů je nejvyšší při lehkém až středním pražení a poté se s délkou pražení snižuje. Tyto laktony přispívají k hořké chuti kávy. 4-CQL se navíc přisuzují antiopioidní vlastnosti [5].



Obrázek 8: Laktony v pražené kávě. Převzato z: [8].

Kyselina chlorgenová v dekofeinizované kávě

Pro potlačení účinku kofeinu může být káva zpracována tak, že se jeho obsah sníží pod 0,1 % [18]. Tento proces se nazývá dekofeinizace. Existují tři různé techniky, kterými se toto snižování provádí: extrakcí organickým rozpouštědlem (dichlormethanem, chloroformem, uhlíkových filtrů a superkritickou extrakcí CO₂ [40]. Provádí se před pražením [13, 40], a to obvykle u kávy arabika [13].

Podle Farah a kol. (2006) dochází ke ztrátě 3-9 % obsahu chlorgenových kyselin ve vzorcích bezkofeinové pražené kávy Arabika ve srovnání se vzorky s kofeinem praženými za stejných podmínek. Dekofeinizací dochází ke zvýšení 3-CQA a 4-CQA [41]. Klikarová a kol. (2022) sledovali pokles chlorgenové kyseliny při extrakci dichlormethanem a ethylacetátem o 30-45 %, zatímco obsah 3-CQA a 4-CQA se téměř nezměnil [40]. Podle Limy a kol. (2013), bylo sníženo během dekofeinizace dichlormethanem dokonce 60 % 5-CQA v zelených kávových zrnech [42]. Snížení CGA zaznamenali i Muchtaridi a kol. (2021), kteří provedli opakovanou dekofeinizaci pomocí extrakce kapalina-kapalina smícháním kávového prášku v dichlormethanu v poměru 1:1 [43].

Při napařování kávových zrn horkou vodou dochází k výraznému snížení hladiny hlavní kyseliny chlorgenové, zatímco koncentrace 4-CQA a 3-CQA se mírně zvyšuje. Degradace

chlorgenových kyselin během paření zelených zrn je důsledkem zvýšeného příjmu vody. Díky degradaci lze také usuzovat, že vysoká teplota ovlivňuje 5-CQA v kávových zrnech [13].

Tabulka 2: Obsah hlavních esterů kafeoylchinové kyseliny v pražené kávě (*Coffea arabica*). Převzato z: [44].

Kyselina	koncentrace [g.kg⁻¹]
5-kafeoylchinová (chlorgenová)	20
4-kafeoylchinová (kryptochlorgenová)	2
3-kafeoylchinová (neochlorgenová)	1

2.4 Antioxidační aktivita kyseliny chlorgenové stanovená v kávě

Antioxidační aktivita je schopnost bioaktivních sloučenin chránit biologické systémy před oxidačním stresem [45]. Káva patří mezi nápoje s velkým obsahem účinných rostlinných antioxidačních látek, srovnatelným např. s červeným vínem či zeleným čajem [46].

Mezi antioxidačně působící složky kávy patří polyfenoly a alkaloidy [46]. Antioxidační aktivita závisí na vlastnostech těchto fenolických sloučenin v kávě [13]. Aktivita fenolových kyselin a jejich derivátů, které vykazují účinky primárních antioxidantů, je ovlivněna počtem hydroxylových skupin v molekule. Mezi aktivnější antioxidanty patří skořicové kyseliny a *o*-difenoly, jako je právě kávová kyselina a její depsid kyselina chlorgenová [44].

Pavlica a kol. (2005) zkoumali působení CGA proti vznikajícím různým druhům reaktivních forem kyslíku (ROS) po vystavení diferencovaných neuronálních buněk PC12 buď peroxidu vodíku (H₂O₂) nebo FeSO₄. Vznik ROS vede k oxidačnímu poškození. CGA prokázaly eliminaci ROS indukovaných všemi stresory [47].

Kim a kol. (2012) sledovali účinky kávy s kofeinem, dekofeinizované kávy a kyseliny chlorgenové na oxidativní smrt neuronů. Neurodegenerativní poruchy jsou silně spojeny s oxidačním stresem, který je vyvolán reaktivními formami kyslíku jako je peroxid vodíku (H₂O₂). Všechny zkoumané látky indukovaly expresi nikotinamidadeninukleotidfosfát:chinin (NADPH:chinin) oxidoreduktázy 1 v neuronových buňkách, což naznačuje, že tyto látky chrání neurony před apoptózou vyvolanou H₂O₂ zvýšením regulace tohoto antioxidačního enzymu [48].

Cha a kol. (2014) studovali ochranné účinky kyseliny chlorgenové proti oxidačnímu poškození vyvolanému ultrafialovým zářením B (UVB) na kultivované lidské keratinocytové buňky. UVB indukuje buněčnou smrt prostřednictvím tvorby ROS. Bylo prokázáno na buněčných liniích *in vitro*, že oxidační stres indukuje poškození DNA, a to včetně fragmentace DNA, vedoucí k apoptóze. CGA měla zlepšující či zabraňující účinky proti změnám související s apoptózou v buňkách vystavených UVB, včetně tvorby apoptotických tělísek, narušení mitochondriálního membránového potenciálu a změn v hladinách některých proteinů. Studie uvádí, že CGA je schopna vychytávat ROS jako jsou hydroxylové radikály, superoxidové anionty a peroxid vodíku a naznačují, že CGA chrání buňky před oxidačním stresem vyvolaným UVB zářením [49].

Zelená kávová zrna robusty vykazují vyšší antioxidační aktivitu než zrna arabiky [13, 50]. Pražením se stavební kameny kyseliny chlorgenové začleňují do melanoidinů, což jsou látky o vysoké molekulové hmotnosti s vysokou antioxidační kapacitou. Vznikají díky Maillardovým reakcím kombinací cukrů a aminoskupinou aminokyselin a proteinů [18, 31]. Mechanismus antioxidačního účinku melanoidinů je důsledkem jejich schopnosti zachycovat kladně nabitě elektrofilní látky, chelátovat kovy za vzniku neaktivních komplexů nebo vychytávat kyslíkové radikály [51]. Většina melanoidinů se tvoří již v rané fázi procesu pražení a jejich relativní podíl na celkové antioxidační aktivitě se, zejména kvůli degradaci CGA během tepelného procesu, zvyšuje směrem k tmavšímu stupni pražení [30]. Produkce akrylamidu, který je nežádoucím vedlejším produktem Maillardovy reakce, bývá při zvýšení stupně pražení potlačena, tento proces však vede ke ztrátě antioxidační kapacity [46].

Antioxidační aktivita pražených kávových zrn je větší než zelených zrn [30, 46]. Její variabilita souvisí s rovnováhou mezi degradací a tvorbou antioxidačních sloučenin. Nejvyšší aktivitu vykazuje středně pražená káva, jelikož se uvolňují nízkomolekulární fenoly ze složek zelené kávy a tvoří se produkty Maillardových reakcí během procesu pražení. Na konci pražení dochází k poklesu aktivity, jelikož degradace antioxidačních sloučenin není plně kompenzována tvorbou nových. Vyšší antioxidační aktivita pražené kávy robusta je pravděpodobně způsobená jejím vyšším obsahem kofeinu [30].

Instantní káva vykazuje asi 3-4krát větší antioxidační kapacitu než káva mletá. Pokud se však vezme v úvahu obvyklá příprava těchto druhů kávy, kdy se při stejném objemu vody použije asi čtyřikrát větší množství mleté kávy než instantní, jsou antioxidační kapacity obou druhů srovnatelné [46].

3 ÚČINKY KYSELINY CHLORGENOVÉ

Mezi nejdůležitější účinky kyseliny chlorgenové patří antioxidační aktivita [52, 53], dále antibakteriální, protizánětlivá, či kardioprotektivní aktivita. Také má vliv na snížení rizika vzniku diabetu 2. typu a Alzheimerovy choroby [53]. O negativních účincích kyseliny chlorgenové na lidi neexistuje příliš studií [54].

3.1 Účinky kyseliny chlorgenové na krevní tlak

Hypertenze, neboli dlouhodobě vysoká hodnota krevního tlaku, přispívá především k patogenezi kardiovaskulárních onemocnění a souvisejících komplikací, jako je poškození ledvin a srdeční infarkt, které postihují velkou populaci dospělých. Na její patogenезi se podílí působení řady enzymů [55].

Léčba hypertenze zahrnuje inhibici důležitých enzymů spojených s patologií, jimiž jsou např. angiotensin konvertující enzym (ACE), argináza, acetylcholinesteráza (AChE) a systém purinergních enzymů. Kyselina chlorgenová má inhibiční účinky na systém purinergních enzymů (narušením metabolismu purinových nukleotidů), 5'-ektonukleotidázy a adenosindeaminázu (ADA) [55]. Enzym ADA se podílí se na přeměně adenosinu na inosin a hraje důležitou roli v regulaci adenosinu. Jelikož přispívá k udržení fyziologických hladin extracelulárního adenosintrifosfátu a adenosinu, mohl by představovat důležitý bod v regulaci průtoku krve při hypertenzi [56]. Během hypertenze jsou zvýšené hladiny AChE [57]. Oboh a kol. (2013) při *in vitro* studii prokázali inhibici tohoto enzymu kyselinou chlorgenovou [58]. Kyselina chlorgenová má také ACE inhibiční účinek. Ten by mohl být výsledkem interakcí mezi fenolickými hydroxylovými skupinami a aminokyselinami aktivního místa enzymu prostřednictvím vodíkových vazeb, které omezují vstup substrátu a rychlost katalýzy [55].

3.2 Účinky kyseliny chlorgenové v souvislosti s *diabetes mellitus* a obezitou

Zelená kávová zrna získávají pozornost taky díky příznivým účinkům proti metabolickým poruchám, jako je diabetes 2. typu [59]. *Diabetes mellitus* je chronické, progresivní onemocnění charakterizované zvýšenou hladinou glukózy v krvi. Konkrétně diabetes 2. typu je důsledkem neefektivního využívání inzulínu tělem [60]. Nejběžnější forma rezistence na inzulín souvisí se zvýšeným hromaděním viscerálního tuku [10]. CGA bývá spojována s regulací metabolismu glukózy a lipidů a zlepšení citlivosti na inzulín [59].

Kyselina chlorgenová vykazuje možné účinky k zabránění hyperglykémii a následně oxidačnímu stresu, který může hrát roli při iniciaci rozvoje diabetu II. Jedním z nich je inhibice glukózových transportérů (Na⁺-dependentní glukózový transportér) [61]. Dalším je schopnost snížit nebo inhibovat hydrolyzu glukózo-6-fosfatázy, což může snížit výdej glukózy v plazmě z jater, a to vede ke snížení koncentrace glukózy v plazmě [62]. CGA ovlivňuje transport glukózy aktivací adenosinmonofosfát-aktivované proteinkinázy (AMPK), která hraje klíčovou roli v intracelulárním metabolismu lipidů [59]. Existuje spojení mezi hromaděním viscerálního tuku a metabolickými abnormalitami přispívajícími k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění [63]. Hromadění lipidů v orgánech, jako jsou kosterní svaly, ledviny, slinivka a srdce, může přispět k rozvoji poruch, které souvisí s obezitou [10].

Studie Cho a kol. (2010) ukazuje, že kyselina chlorgenová by mohla být spojována se snížením tělesné hmotnosti, viscerálního tuku, koncentrací triglyceridů (v plazmě, játrech a srdci), cholesterolu (v plazmě, tukové tkáni a srdci) a inzulínu v plazmě. CGA také zvyšuje plazmatickou koncentraci adiponektinu, což je protein, který se podílí na metabolismu lipidů [10]. Dle studie Roshan a kol. (2018) byly při užívání extraktu ze zelených kávových zrn hladiny inzulínu významně nižší než u osob, kterým extrakt podáván nebyl. Průměrná hmotnost a BMI (body mass index; index tělesné hmotnosti) pacientů se významně snížily oproti hodnotám před zahájením studie [64]. Sudeep a kol. (2016) po studování jater hyperlipidemických potkanů došli k závěru, že komplex chlorgenových kyselin významně zvyšuje expresi karnitin palmitoyltransferázy 1, která hraje důležitou roli při β -oxidaci volných mastných kyselin (FFA) a hladinu fosforylace acetyl-CoA karboxylázy, což je životně důležitý enzym potřebný pro syntézu FFA v játrech. To naznačuje, že chlorgenové kyseliny podporují vychytávání a oxidaci FFA a inhibují akumulaci FFA modulací exprese životně důležitých enzymů v játrech. FFA hrají zásadní roli v regulaci metabolismu triglyceridů (tukových částic). Zvýšené hladiny plazmatických FFA vedou ke ztučnění jater [59].

3.3 Protinádorové účinky kyseliny chlorgenové

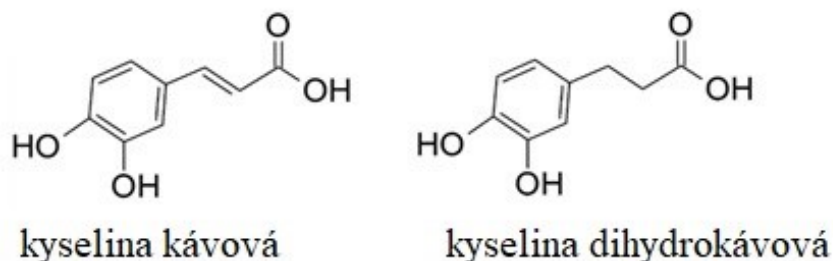
Rakovina je velká skupina nemocí, které mohou začít téměř v jakémkoli orgánu nebo tkáni těla, když abnormální buňky nekontrolovatelně rostou, překračují své obvyklé hranice a napadají přilehlé části těla a/nebo se šíří do jiných orgánů. Poslední proces se nazývá metastázování a je hlavní příčinou úmrtí na rakovinu [65]. Rakovina je považována za jednu z hlavních příčin úmrtí na celém světě [66].

Potraviny a nápoje bohaté na polyfenoly pomáhají předcházet různým druhům onemocnění spojených s oxidačním stresem, včetně různých typů rakoviny. Léčiva extrahovaná z rostlinných zdrojů jsou velmi důležitá a mnoho sloučenin pocházejících z rostlin, jako jsou polyfenoly, flavanoidy a terpenoidy, má obrovskou nutriční a léčivou hodnotu a je komplexně studováno pro svůj potenciál jako příznivých účinků na lidské zdraví. Při konzumaci rostlinných potravin může biologická dostupnost sloučenin rostlinného původu vyvolat řadu důležitých biologických aktivit [66].

Protirakovinné účinky CGA jsou založeny na regulaci proliferace, apoptózy a buněčného cyklu, což vede k potlačení růstu buněk [67]. Kyselina chlorgenová snižuje buněčnou proliferaci u lidských buněk rakoviny plic a reguluje expresi genů souvisejících s apoptózou, jako jsou BCL2 (B-cell lymphoma) a BAX i genů kódujících markery kmenových buněk, které jsou spojené se sebeobnovou rakovinných buněk. CGA zvyšuje expresi genu BAX a snižuje BCL2. Protein BAX tvoří heterodimer s genem BCL2 a indukuje apoptózu. Zvýšení poměru BCL2/BAX je zásadním faktorem při potlačování apoptózy [68]. Podle studie Hou a kol. (2017) způsobuje CGA zástavu S fáze cyklu buněk a inaktivaci kinázy a indukuje tvorbu reaktivních forem kyslíku, což vede k inhibici životaschopnosti lidských buněk rakoviny tlustého střeva [69]. Také významně inhibuje expresi proliferačního markerového proteinu PCNA (proliferační buněčný jaderný antigen), čímž potlačuje proliferaci buněk osteosarkomu [67].

Zjištěné vlastnosti mohou patřit nejenom samotné kyselině, ale i jejím metabolitům [70]. Studie cytotoxicity v různých rakovinných buněčných liniích ukazují, že komplex chlorgenových kyselin potenciálně ovlivňuje životaschopnost buněk narušením mitochondriální struktury a metabolismu [66].

Jedním z hlavních metabolitů kyseliny chlorgenové je kyselina dihydrokávová, neboli kyselina 3,4-dihydroxyhydrokávová. 5-CQA je po metabolizaci na kyselinu kávovou přeměňována na právě kyselinu dihydrokávovou a jiné katabolity. Chemické struktury kyseliny kávové a dihydrokávové (Obrázek 9) se příliš neliší, jediný rozdíl je v tom, že kyselina kávová má dvojnou vazbu, zatímco kyselina dihydrokávová má tuto vazbu nasycenou dvěma atomy vodíku, proto má v názvu dihydro-. Tato kyselina má mnoho zdravích prospěšných účinků, mimo jiné např. antioxidační, kardioprotektivní a neuroprotektivní. Santana-Gálvez a kol. (2020) provedli studii na protirakovinné účinky. Dle této studie je více cytotoxická pro několik rakovinných buněčných linií než pro zdravé buňky a je vhodným potenciálním kandidátem na prevenci a léčbu rakoviny. Mechanismus účinku uplatňování toxicity není zcela známý [70].



Obrázek 9: Chemické vzorce kyseliny kávové a dihydrokávové. Převzato z: [70].

3.4 Protizánětlivé účinky kyseliny chlorgenové

Zánět je ochranná reakce těla na různé etiologické faktory, jako jsou infekční agens, imunologická agens, inertní materiály, fyzikální změny a chemické změny. Zánět má především ochranný charakter, ale může také způsobit značné poškození těla [71]. Lze ho rozdělit na akutní a chronický. Akutní zánět je běžná ochranná reakce těla na zranění, podráždění nebo chirurgický zákrok. Chronický zánět však vyvolává různá chronická onemocnění včetně rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, Alzheimerovy choroby, a cukrovky typu II. Během zánětlivého procesu interleukiny nebo růstové faktory indukují proliferaci a aktivaci leukocytů. Aktivované leukocyty pak zprostředkovávají zánět a programovanou buněčnou smrt [72]. Fenolové sloučeniny jsou schopny inhibovat buď produkci, nebo působení prozánětlivých mediátorů, což má za následek protizánětlivý účinek [71].

Během zánětlivého procesu jsou různé zánětlivé mediátory, včetně oxidu dusnatého (NO), úzce spojeny s klasickými příznaky zánětu, jako je bolest, teplo, zarudnutí, otok a ztráta funkce. Hwang a kol. (2014) provedli studii v myších makrofágových buňkách zanícených lipopolysacharidem (LPS), který je součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií. Výsledky tvrdí sníženou produkci NO díky CGA a potlačení prozánětlivých reakcí prostřednictvím down regulace jaderného faktoru kappa B (NF-κB) [72]. Studie Shi a kol. (2013) ukázala, že CGA zmírňuje histologické změny včetně tvorby zánětu. CGA způsobuje inhibici aktivace signální dráhy Toll-like receptoru 4 (TLR4) [73]. Na TLR4 se váže LPS, což vede k aktivaci NF-κB. Když je aktivována signální dráha NF-κB, dochází k vylučování NO a prozánětlivých cytokinů [72]. Stejně tak Chen a kol. (2019) potvrzují, že CGA zmírňuje LPS-indukovanou infiltraci zánětlivých buněk a degeneraci hepatocytů u potkanů [74]. Zvýšení aktivity antioxidantních enzymů superoxid dismutázy a katalázy kyselinou chlorgenovou chrání před oxidačním stresem, se kterým je úzce spojena zánětlivá reakce. Výsledky studie Wang a kol. (2020)

ukázaly, že by CGA mohla napomáhat odolnosti vůči srdeční dysfunkci způsobené zánětem snižováním uvolňování prozánětlivých faktorů a zvýšením uvolňování protizánětlivých faktorů [75].

3.5 Účinky kyseliny chlorgenové v souvislosti s Alzheimerovou chorobou

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění charakterizované ztrátou paměti, kognitivní dysfunkcí, změnami osobnosti a sníženou pohyblivostí [76]. Za jednu z hlavních příčin Alzheimerovy choroby je považován beta-amyloidní peptid (A β), což je protein, který je produkován v nadměrném množství a hromadí se ve formě senilního plaku [76, 77]. Podle hypotézy kaskády A β , mutace v amyloidovém prekurzorovém proteinu, jako jsou presenilin-1 a presenilin-2, upregulují sekreci A β , což vede k akumulaci A β tvořící oligomery, které se ukládají za vzniku extracelulárních senilních plaků. Tyto plaky indukují oxidační stres a vedou k poškození mnoha biologických makromolekul, včetně proteinů, nukleových kyselin a lipidů, což vede ke změnám struktury a funkce neuronů a potenciální ztrátě neuronů [76, 78].

CGA prokázala významné ochranné účinky vůči A β -indukovanému poškození neuronů [79]. Ishida a kol. (2020) pozorovali snížení množství A β plaku v hipokampu kávovými polyfenoly. Ke snížení ukládání plaku docházelo prostřednictvím desagregace A β . Ta se zvyšovala s dávkou CGA [80]. Miyamae a kol. (2012) uvedli, že kyselina chlorgenová zabraňuje agregaci A β [81].

4 VSTŘEBÁVÁNÍ KYSELINY CHLORGENOVÉ

K absorpci polyfenolických látek z potravy dochází v tenkém střevě. Účinnost vstřebávání se pohybuje okolo 15-20 %. Účinnost absorpce fenolických látek závisí na podobě, tedy zda se jedná o volnou formu, polymery nebo vázanou formu (např. glykosylované formy). Pokud jsou v polymerní či vázané podobě, musí být před vstřebáním hydrolyzovány střevními enzymy [82].

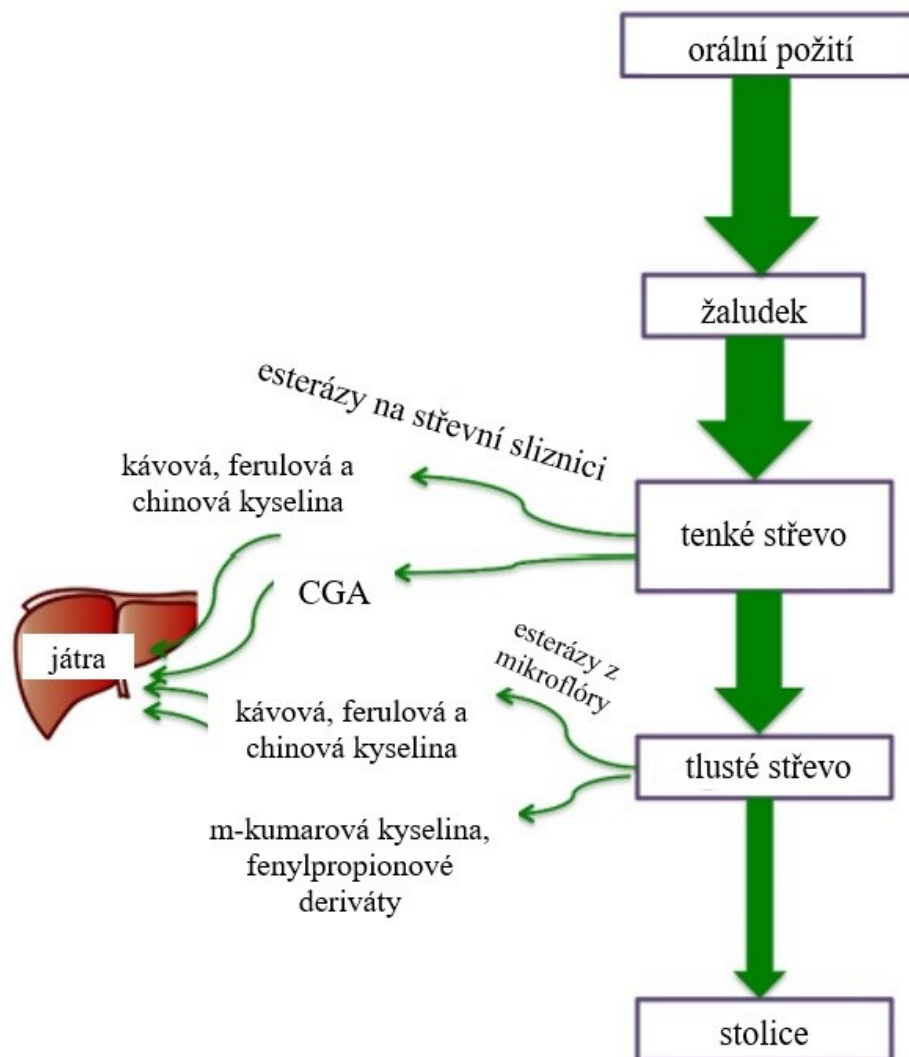
Při absorpci hydrofilních antioxidantů se předpokládá, že důležitou roli hraje molekulová hmotnost [82]. Molekulové hmotnosti kyseliny chlorgenové a příbuzných antioxidantů jsou uvedeny v Tabulce 3. Například molekulová hmotnost kyseliny kávové je menší než hmotnost kyseliny chlorgenové, její absorpce je o dost lepší než absorpce CGA [82, 83]. U fenolových kyselin ovlivňuje absorpci i velikost molekuly [83]. Kyseliny chlorgenové podléhají rozsáhlému metabolismu [84]. Rychlost metabolismu kyseliny chlorgenové je pomalá. K vstřebávání dochází nejen v tenkém střevě, ale i v žaludku. Přes vrstvy střevních epitelálních

buněk její absorpci zlepšuje kyselina linolová, polynenasycená mastná kyselina s dlouhým řetězcem a kyselina laurová, nasycená mastná kyselina se středně dlouhým řetězcem [82].

Tabulka 3: Molekulové hmotnosti kyseliny chlorgenové a strukturně příbuzných fenolických antioxidantů. Převzato z: [82].

Antioxidant	Molekulová hmotnost [g.mol⁻¹]
Kyselina chlorgenová	353, 31
Kyselina ferulová	194, 18
Kyselina kávová	180, 16
Kyselina chinová	192, 17

Tenké střevo je s největší pravděpodobností místem pro odštěpení kyseliny chinové z CGA a FQA [8]. Dochází ke konverzi CGA na kyselinu kávovou [85, 8] a kyselinu dihydrokávovou, což je zprostředkováno střevní mikroflórou, a ke konverzi feruloylchinové kyseliny na kyselinu ferulovou a kyselinu dihydrokávovou a poté k sulfatáci. Přeměna kyseliny kávové na její 3- a 4-O-sulfáty je spojována nejen s tenkým střevem, ale i s játry. Díky katechol-O-methyltransferáze probíhá přeměna kyseliny kávové a CGA na kyselinu ferulovou a FQA. Konverze kyseliny kávové a kyseliny ferulové na jejich příslušné dihydroderiváty je doprovázena bakteriální reduktázou tlustého střeva [8]. Schéma metabolismu chlorgenových kyselin lze vidět na Obrázku 10.



Obrázek 11: Resorpce CGA při průchodu lidským trávicím traktem. Převzato z: [85].

Minoritní chlorogenové kyseliny v kávových zrnech mají vyšší maximální koncentraci v plazmě než majoritní. Souvisí s tím vyšší citlivost k reakci s chlorogenát esterázou 5-CQA oproti 3-CQA a 4-CQA. Ty jsou odolnější vůči enzymatické hydrolyze [88]. Biologická dostupnost CGA z kávových nápojů bývá ovlivněna různými faktory. Například přidání mléčného tuku může vést k jejímu zvýšení [89].

5 STANOVENÍ KYSELINY CHLORGENOVÉ V KÁVĚ

Jelikož mají kofein, trigonellin a kyselina chlorogenová podstatný vliv na celkovou kvalitu zelených kávových zrn a kávových produktů, je individuální či simultánní stanovení dvou nebo tří těchto látek pro kávový průmysl velmi důležité [90]. Nejčastěji se pro kvantitativní stanovení kyseliny chlorogenové v zelených a pražených kávových zrnech využívá

vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [5]. Tato metoda bývá citlivá a přesná, ale zároveň drahá a časově i technicky náročná. Existuje levnější alternativa založená na UV/VIS (ultrafialové/ viditelné záření) spektrometrii, která je jednodušší [90, 91].

5.1 Stanovení kyseliny chlorgenové pomocí UV/VIS spektrometrie

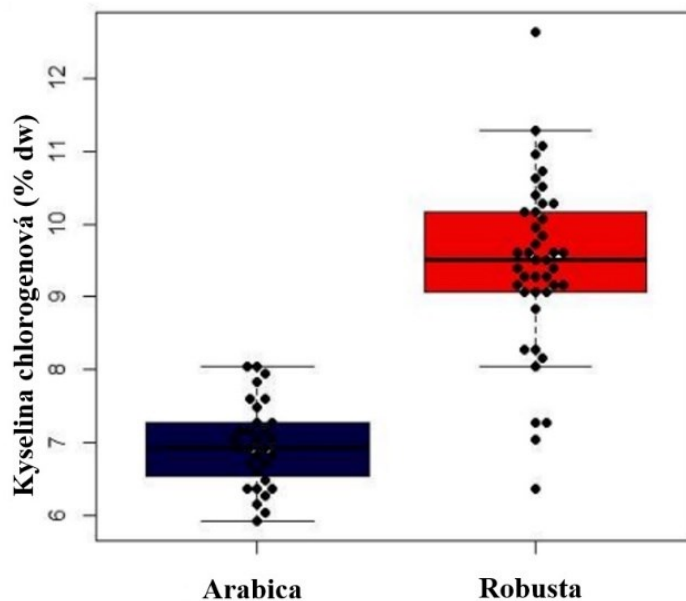
Atlabachew a kol. (2021) provedli současné stanovení trigonellinu, kofeinu a kyseliny chlorgenové z extraktu zelených kávových zrn. Pracovali se třemi vzorky zelených kávových zrn ze tří podokresů v Etiopii (A, B, C v Tab. 6). Vzorky byly rozdrceny, prosety a uloženy ve vzduchotěsném obalu. Pro extrakci analytů z kávového prášku byl vzorek extrahován 1% kyselinou octovou (5:1) v ultrazvukovém extraktoru s vodní lázní při laboratorní teplotě. Poté byl extrakt centrifugován, dekantován a zbytek byl opakovaně extrahován. Po odstředění byly filtráty spojeny a uchovávány při 4 °C až do analýzy. Pro analýzu byl extrakt vzorku kávy zředěn 1% kyselinou octovou a byla provedena extrakce ve třech fázích do směsi acetonitril/voda (1:1 v/v). Během extrakce byla CGA rozdělena s kofeinem do acetonitrilové fáze. Metoda zahrnovala použití soli QuEChERS a acetonitrilu pro extrakci kapalina-kapalina s následným stanovením UV/VIS spektrometrií. Kvantifikace CGA proběhla z absorbance při 325 nm, jelikož kofein má nižší absorpční maximum. Celkový obsah kyseliny chlorgenové v této studii byl 8,50 %–8,92 %, jak lze vidět v Tabulce 4 [90].

Tabulka 4: Střední hodnota ± směrodatná odchylka (n=3) kyseliny chlorgenové ve třech vzorcích zelené kávy A, B, a C získaných metodou UV/VIS spektrometrií. Převzato z: [90].

Vzorek	Obsah kyseliny chlorgenové [% w/w]
A	8,50 ± 0,26
B	8,59 ± 0,59
C	8,92 ± 0,54

Adnan a kol. (2020) zkoumali obsah CGA v 74 vzorcích zelených káv z různých míst na ostrově Jáva v Indonésii, z nichž 32 bylo z rodu arabika a 42 rodu robusta. Vzorky byly nejprve lyofilizovány a rozemlety na prášek pomocí kulového mlýnu. Poté byl prášek proset přes 0,355 mm síto. 10 mg prosetého kávového prášku bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Roztoky byly míchány (550 ot./min., 35 °C, 1 h) za použití míchadla a poté převedeny přes papírový filtr (MN 615 1/4, Macherey-Nagel, Duren, Německo). Kofein byl extrahován dichlormethanem. 1 mg proseté kávy byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody. Tyto roztoky

pak byly míchány po dobu jedné minuty a filtrovány. Kyselina chlorogenová byla měřena pomocí UV/VIS spektrometrie při vlnové délce 324 nm [91]. Výsledné hodnoty ukazuje Obr. 12.



Obrázek 12: Obsah kyseliny chlorogenové v zelených kávových zrnech *C. arabica* a *C. robusta*. Převzato z: [91].

Průměrná hodnota obsahu kyseliny chlorogenové v arabice byla 7,0 % a v robustě byla 9,5 % [91].

Dado a kol. (2019) stanovovali chlorogenovou kyselinu v pěti vzorcích zelených kávových zrn z Etiopie. Vzorky byly rozemlety a prosety. Poté byly rozpuštěny v deionizované vodě. Roztoky byly půl hodiny míchány a mírně zahřívány, aby došlo ke zvýšení rozpustnosti CGA v roztoku. Roztoky byly filtrovány. Poté byla provedena extrakce kapalina-kapalina dichlormethanem, aby se zabránilo překrývání spekter kofeinu a CGA. Roztoky vzorků byly smíchány s dichlormethanem (1:1). Tento roztok byl míchán po dobu 10 minut, horní vrstvu pak tvořil kofein a spodní CGA. Po extrakci kofeinu z roztoku byl proces třikrát opakován, aby došlo k jeho úplné extrakci. Následně byla měřena absorbance CGA pomocí UV/VIS spektrofotometru při 324 nm [92].

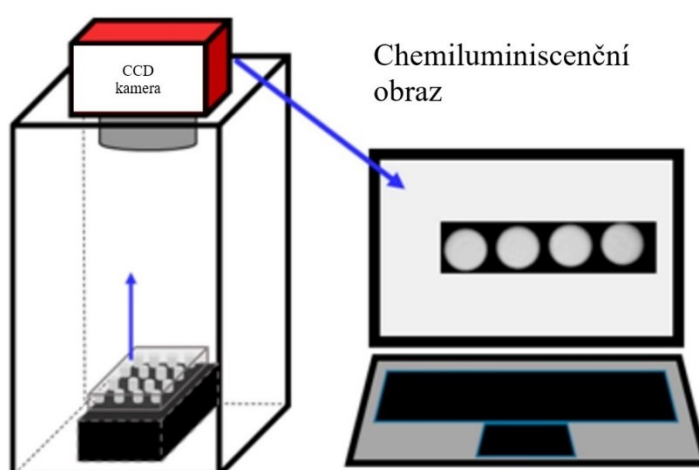
Obsah CGA v kávových zrnech z pěti různých oblastí se pohyboval mezi 64,04 mg/g a 59,58 mg/g, jak ukazuje Tabulka 5. Procentuální obsah byl 5,96 až 6,40 %. Průměrný obsah pak vycházel na 6,23 % [92]. Tyto výsledky jsou podobné jako zjištění Atlabachewa a kol. (2021), kteří stanovili obsah CGA v zelených kávových zrnech na 8,50 %–8,92 % a Adnana a kol. (2020), jejichž výsledek byl 7-9,5 %.

Tabulka 5: Koncentrace obsahu CGA v zelených kávových zrnech stanovená UV/Vis spektrometrií. Převzato z: [92].

Vzorek zelených kávových zrn	Obsah CGA [mg/g]	Obsah CGA [%]
1	62,10 ± 0,13	6,21 ± 0,01
2	59,58 ± 0,12	5,96 ± 0,01
3	63,25 ± 0,09	6,33 ± 0,01
4	62,33 ± 0,15	6,23 ± 0,02
5	64,04 ± 0,17	6,40 ± 0,02

5.2 Stanovení kyseliny chlorgenové chemiluminiscenční analýzou

Mallorca-Cebria a kol. (2023) stanovovali CGA pomocí metody založené na chemiluminiscenčním zobrazování ve třech vzorcích komerční zelené kávy (1, 2 a 3 v Tab. 7). Kapsle každého vzorku byla rozpuštěna v ultračisté vodě a sonikována po dobu 5 minut, aby se extrahovala CGA. Následně byl extrakt zředěn uhličitanovým puforem (0,3 M, pH 10,8). Chemiluminiscenční analýza byla provedena měřením intenzity luminiscence při 0 °C. Odezva byla získána po luminolpersulfátové reakci při pH 10,8, po které následovalo zachycení obrazu CCD kamerou jako čtecím systémem. Reakce mezi luminolem a oxidantem (persulfátem) indukuje generování luminiscenčního signálu a přítomnost antioxidantů (CGA) může signál inhibovat. Signál je úměrný koncentraci kyseliny chlorgenové [93]. Schéma zařízení lze vidět na Obrázku 13.



Obrázek 13: Schéma temné komory CCD kamery používané pro stanovení CGA. Převzato z: [93].

Vypočtené obsahy CGA jsou uvedeny v Tabulce 6. Tyto výsledky byly porovnány s etiketami komerčních produktů. Statistické srovnání s kvantitativní analýzou provedenou navrženou

metodikou neodhalilo žádné statistické rozdíly, a proto byla prokázána přesnost. V případě vzorku 3 nebyl obsah CGA uveden. Analýza vzorku však stanovila 207 mg/kapsli, vyjádřeno jako CGA. Hodnoty výtěžnosti byly v rozmezí 93 ± 8 a 94 ± 9 %. Tyto výsledky ukázaly, že navrhovaná metodika může být relevantní pro hodnocení obsahu CGA v analyzovaných vzorcích [93].

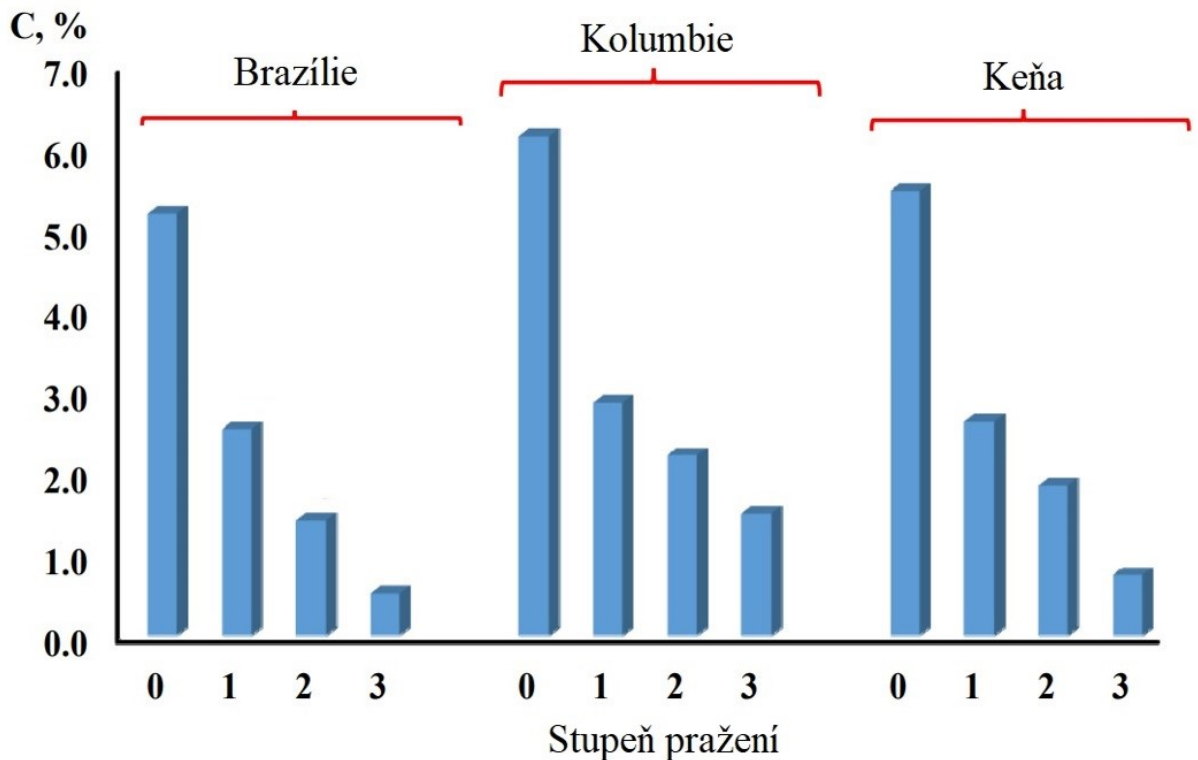
Tabulka 6: Obsah CGA ve vzorcích zelené kávy metodou chemiluminiscenčního zobrazování. Převzato z: [93].

Vzorky zelené kávy	Koncentrace CGA [mg/kapsli]	Obsah na etiketě produktu [mg/kapsli]
1	145 ± 10	157
2	220 ± 12	234
3	204	neoznačen

5.3 Stanovení kyseliny chlorgenové pomocí HPLC

Cílem Awwada a kol. (2021) bylo stanovit obsah kyseliny chlorgenové a kofeinu v 52 vzorcích kávy *Coffea arabica* různého původu a různým stupněm pražení, a to pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem s diodovým polem (HPLC-DAD). Všechny vzorky kávy byly extrahovány vodou o teplotě $75\text{--}85$ °C v poměru 1:100 (káva:rozpouštědlo). Vzorky byly homogenizovány sonikací. Následně byly vzorky kávy centrifugovány a filtrovány. Nakonec byly kávové extrakty uchovány při teplotě -20 °C až do analýzy. Hladiny CGA byly kvantifikovány pomocí HPLC s UV/VIS detektorem s diodovým polem, systémem reverzní fáze a ODS (OktaDecylSilan) kolonou. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (85:15 v/v) [94].

Hladiny CGA extrahované ze vzorků kávy byly ovlivněny stupněm pražení, jak lze vidět na Obrázku 14. Obsah CGA se snižoval se zvyšujícím se stupněm pražení ve všech vzorcích. V této studii byla pozorována velká variabilita v obsahu CGA ve vzorcích kávy (Tabulka 7), který se pohyboval mezi 5,43 až 0,91 % (543,23 až 90,53 mg/l), od zelených zrn až po tmavá pražená zrna, což představuje přibližně šestinásobné snížení. Tato čísla ukazují, že kávová zrna byla pražena za vysokých teplot a vlhkých podmínek [94].



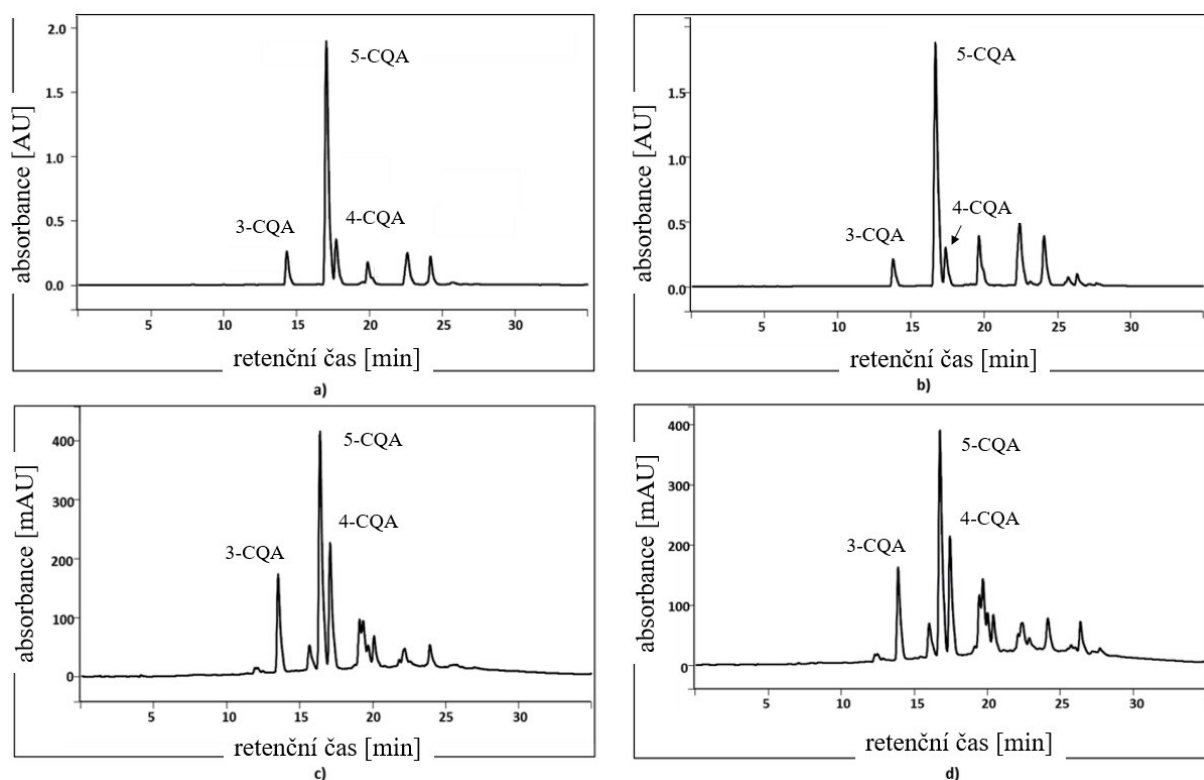
Obrázek 14: Vliv stupně pražení na koncentraci CGA v kávových zrnech z různých zdrojů. (0 = zelená, 1 = světlé pražení, 2 = střední pražení, 3 = tmavé pražení). Převzato z: [94].

Tabulka 7: Průměrné koncentrace kyseliny chlorogenové v kávových zrnech s různými stupni pražení získaná metodou HPLC-DAD. Převzato z: [94].

Stupeň pražení	Teplota pražení [°C]	Obsah CGA	
		[mg/l]	[%]
Nepražená	-	543,23 ± 8,916	5,43 ± 0,089
Lehce pražená	155-165	270,93 ± 10,759	2,71 ± 0,108
Středně pražená	175-185	187,45 ± 9,05	1,87 ± 0,091
Tmavě pražená	205-215	90,53 ± 12,97	0,91 ± 12,97

Tomac a kol. (2018) provedli stanovení osmi izomerů chlorgenových kyselin: kyselin kofeoylchinových (5-CQA, 4-CQA, 3-CQA), kyselin dikafeoylchinových (3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3,4-diCQA) a kyseliny feruloylchinové (5-FQA, 4-FQA) v různých značkách kávy. Dva druhy zelených a pražených zrn *C. arabica* a *C. robusta* byly namlety. Vzorek byl zředěn ultračistou vodou, zahřát na 80 °C a promíchán. Před analýzou byl přefiltrován. Po ochlazení

vzorků na laboratorní teplotu proběhla filtrace. Separace chlorogenových kyselin proběhla pomocí HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) za použití dvou mobilních fází: 0,1 % kyseliny fosforečné a 100 % methanolu. Následně proběhlo zaznamenání UV spekter vodných kávových extraktů. Vzorky byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem fotodiodového pole HPLC/PDA. Výsledné chromatogramy chlorogenových kyselin ukazuje Obrázek 15 [95].



Obrázek 15: Chromatografický profil chlorogenových kyselin v zelených kávových zrnech a) *Coffea arabica*, b) *Coffea robusta* a pražených zrnech c) *Coffea arabica*, d) *Coffea robusta*. Převzato z: [95].

Jak lze vidět v Tabulce 8, průměrný obsah kyseliny chlorogenové v zelených kávových zrnech byl 3933 mg/100 g v *Coffea arabica* a 4130 mg/100 g v *Coffea robusta*. V pražených zrnech se vyskytovalo 908 mg/100 g CGA u *Coffea arabica* a 890 mg/100 g v *Coffea robusta* [95]. Množství CGA se pražením snížilo průměrně 4,5krát.

Tabulka 8: Obsah chlorgenových kyselin ve vzorcích kávy získaných metodou HPLC/PDA. Převzato z: [95].

	Obsah CGA [mg/100 g]	
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea robusta</i>
Zelená kávová zrna	3933 ± 94	4130 ± 264
Pražená kávová zrna	908 ± 33	890 ± 11

Yılmaz a kol. (2017) se zabývali mimo jiné stanovením tří chlorgenových kyselin (5-*O*-kafeoylchinové, 3-*O*-kafeoylchinové a 4-*O*-kafeoylchinové) v jednom vzorku zelených kávových zrn *Coffea arabica* z Brazílie (C-1) a šesti vzorcích pražených kávových zrn *Coffea arabica* z Brazílie (C-2), Etiopie (C-3), Kilimandžára (C-4), Kolumbie (C-5), Kostariky (C-6) a Ugandy (C-7) pomocí extrakce na pevné fázi spojené s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s ultrafialovou detekcí (SPE-HPLC-UV). Extrakce byla provedena pomocí hydrofilně-lipofilních balančních patron. Roztok kyseliny o-fosforečné (0,08 %) a roztok methanol/voda/acetonitril (85:10:5) byly použity jako mobilní fáze s gradientovým systémem [96].

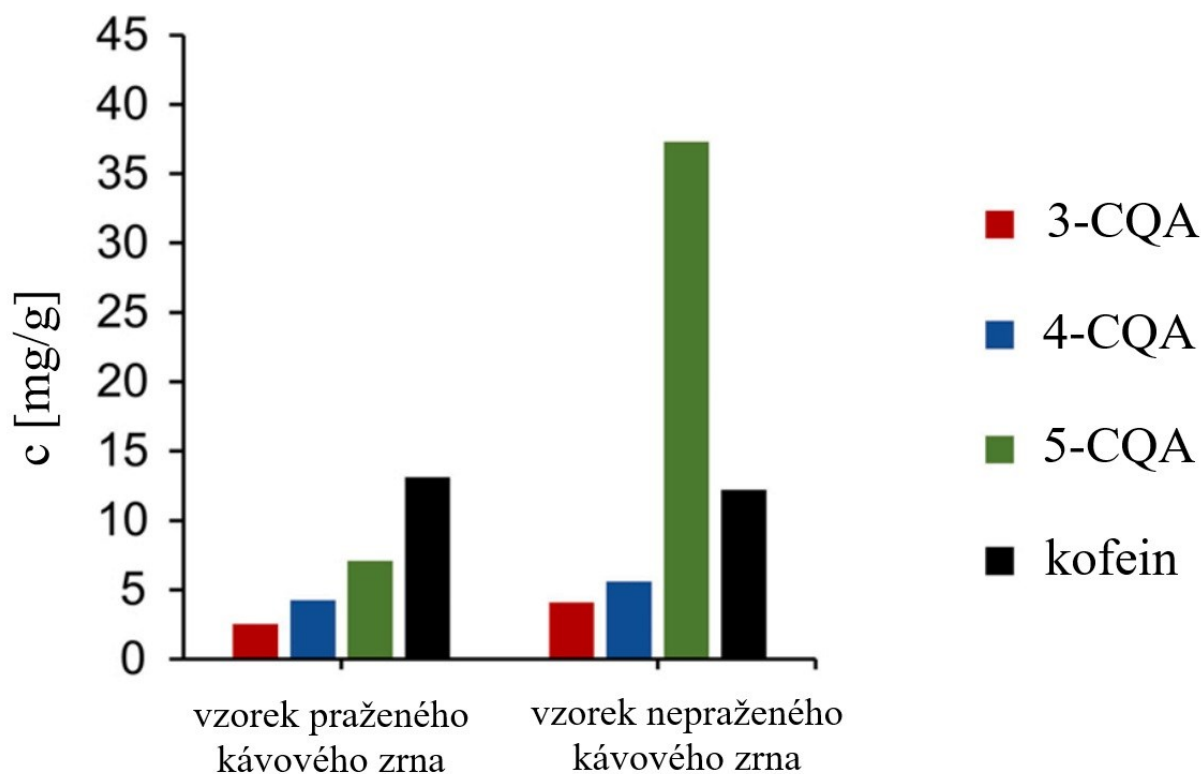
Zelená i pražená kávová zrna byla rozemleta. Vzorky byly připraveny z 10 g mletého kávového zrna a 300 ml deionizované vody pomocí kávovaru. Poté byly filtrovány a zředěny 0,1% roztokem kyseliny o-fosforečné (50:50 v/v). Dále byla použita extrakce na pevné fázi, aby se předešlo interferencím a koncentrovaly se fenolické sloučeniny. Obrázek 15 ukazuje chromatogram vzorku C-2 [96].

Byly stanoveny obsahy CGA v jednom vzorku zelených kávových zrn a v šesti vzorcích pražených kávových zrn, viz Tabulka 9. Hodnoty CGA se pohybovaly od 132,55 mg/g u nepražené kávy po 23,20 mg/g u praženého vzorku. Obsah kyseliny chlorgenové se pražením snížil průměrně 4,5krát [96].

Tabulka 9: Obsah CGA v suchém vzorku kávových zrn \pm SD (n = 3) získaný metodou SPE-HPLC. Převzato z: [96].

Vzorek zrn	Obsah CGA [mg/g]
C-1 (nepražená)	132,55 \pm 0,20
C-2 (pražená)	30,09 \pm 0,65
C-3 (pražená)	39,47 \pm 0,09
C-4 (pražená)	23,20 \pm 0,11
C-5 (pražená)	38,54 \pm 0,27
C-6 (pražená)	34,09 \pm 0,26
C-7 (pražená)	33,90 \pm 0,19

Klikarová a kol. (2022) stanovili obsah 5-CQA spolu s obsahy 4-CQA, 3-CQA a kofeinu v nepražených a pražených vzorcích kávových zrn, z nichž většina byla *Coffea arabica* (příklad na Obr. 16). Vzorky pražených kávových zrn byly rozemlety. Vzorky nepražených zrn před mletím prošly sušením v sušárně po dobu 12 hodin při 40 °C. Poté proběhla extrakce 7 g vzorku kávy vodou (50 ml). Po 5 minutách byly vzorky zfiltrány a vzorek byl zředěn 40x destilovanou vodou. Extrakty byly před analýzou filtrovány přes PTFE injekční filtr. Obsah byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi se spektrofotometrickou detekcí [40].



Obrázek 16: Obsah 5-CQA, 4-CQA, 3-CQA a kofeinu v zelených kávových zrnech. Převzato z: [40].

Tabulka 10 shrnuje průměrné obsahy v nepražených a lehce, středně, a tmavě pražených kávových zrnech. Nepražená kávová zrna průměrně obsahovala 42,61 mg/g CGA, v lehce pražených zrnech se nacházelo 11,83 mg/g, ve středně pražených bylo 8,85 mg/g a v tmavě pražených 4,77 mg/g CGA [40]. V lehce pražených zrnech byl obsah snížen 3,6krát, ve středně pražených bylo 4,8krát a v tmavě 8,9krát. Snížení obsahu ve středně pražených zrnech souhlasí se stanoveními, které provedli Yilmaz a kol. (2017) a Tomac a kol. (2018), tzn. 4,5krát. Awwad a kol. (2021) uvedli snížení 6krát, což odpovídá hodnotě snížení obsahu mezi středním a tmavým pražením.

Tabulka 10: Průměrný obsah CGA v kávových zrnech stanovený metodou HPLC. Převzato z: [40].

Stupeň pražení	Obsah CGA [mg/g]
Nepražená	42,61
Lehce pražená	11,83
Středně pražená	8,85
Tmavě pražená	4,77

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše o kyselině chlorgenové, s uvedením jejích vlastností a případných pozitivních účinků na lidské zdraví. Kyselina chlorgenová, neboli 5-kafeoylchinová kyselina, je polyfenolová kyselina patřící mezi hydroxyskořicové kyseliny. Bývají jí přisuzovány účinky v souvislosti s některými onemocněními, včetně rakoviny, Alzheimerovy choroby a *diabetes melitus* typu 2. Také je studována pro své antioxidační a protizánětlivé účinky. Nejvíce se vyskytuje v kávových zrnech, proto je spojována především s kávou.

Kyselina chlorgenová je nejvíce zastoupenou fenolovou kyselinou v zelených kávových zrnech. V nich je zodpovědná za jejich antioxidační aktivitu. Kávová zrna prochází několika úpravami, než vznikne kávový nápoj. Nejprve probíhá sklizení, mokré či suché zpracování a poté pražení. Nejdůležitějším krokem, který ovlivňuje obsah látek v kávovém zrně, je právě pražení. Během pražicího procesu dochází ke hnědnutí zrn, úbytku hmotnosti a nárůstu objemu zrna. Pražení doprovází změny ve složení obsažených látek, a to včetně změn obsahu kyseliny chlorgenové.

Obsah kyseliny chlorgenové se mění tak, že se pražením snižuje, a to přibližně 4-8krát, v závislosti na stupni pražení. Ke snížení obsahu CGA dochází také dekofeinizací kávy. Množství CGA se u nepražených i pražených kávových zrn stanovuje nejčastěji pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spektrometrie v UV/VIS oblasti, ale také existují i jiné metody, například pomocí měření intenzity luminiscence v závislosti na koncentraci CGA.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ABBAS M., SAEED F., ANJUM F. M., et al., Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*. **20**(8), 2017, 1689-1699. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>.
- [2] HOLLMAN P. C. H., GEELEN A., KROMHOUT D., Dietary Flavonol Intake May Lower Stroke Risk in Men and Women. *The Journal of Nutrition*. **140**(3), 2010, 600-604. DOI: <https://doi.org/10.3945/jn.109.116632>.
- [3] KUMAR N., GOEL N., Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. **24**, 2019, e00370. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.
- [4] FRAGA C.G., CROFT K. D., KENNEDY D. O., et al., The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*. **10**(2), 2019, 514-528. DOI: [10.1039/C8FO01997E](https://doi.org/10.1039/C8FO01997E).
- [5] NARITA Y., INOUE K., Chapter 21 - Chlorogenic Acids from Coffee. *Coffee in Health and Disease Prevention*. 2015, 189-199. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00021-8>.
- [6] TUNNICLIFFE J. M., COWAN T., SHEARER J., Chapter 86 - Chlorogenic Acid in Whole Body and Tissue-Specific Glucose Regulation. *Coffee in Health and Disease Prevention*. 2015, 777-785. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00086-3>.
- [7] TOŠOVIĆ J., MARKOVIĆ S., Structural and Antioxidative Features of Chlorogenic Acid. *CROATICA CHEMICA ACTA*. **89**(4), 2016, 535-541. DOI: [10.5562/cca3026](https://doi.org/10.5562/cca3026).
- [8] STALMACH A., STEILING H., WILLIAMSON G., CROZIER A., Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **501**(1), 2010, 98-105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.005>.
- [9] ABRANKÓ L., CLIFFORD M. N., An Unambiguous Nomenclature for the Acyl-quinic Acids Commonly Known as Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **65**(18), 2017, 3602-3608. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00729>.
- [10] CHO A.-S., JEON S.-M., KIM M.-J. et al., Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*. **48**(3), 2010, 937-943. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>.

- [11] KIM W., KIM S.-Y., KIM D.-O., et al., Puffing, a novel coffee bean processing technique for the enhancement of extract yield and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. **240**, 2018, 594-600. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.161>.
- [12] KADLEC P. a kol., *Technologie potravin II*. Vyd. 1., VŠCHT, Praha, 2002, ISBN 80-7080-510-2.
- [13] JESZKA-SKOWRON M., SENTKOWSKA A., PYRZYŃSKA K., et al. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*. **242**, 2016, 1403-1409. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2643-y>.
- [14] SALES A. L., DEPAULA J., MELLINGER SILVA C., et al., Effects of regular and decaffeinated roasted coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) extracts and bioactive compounds on *in vitro* probiotic bacterial growth. *Food & Function*. **11**, 2020, 1410-1424. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9FO02589H>.
- [15] JESZKA-SKOWRON M., FRANKOWSKI R., ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK A., Comparison of methylxantines, trigonelline, nicotinic acid and nicotinamide contents in brews of green and processed Arabica and Robusta coffee beans – Influence of steaming, decaffeination and roasting processes on coffee beans. *LWT - Food Science and Technology*. **125**, 2020, 109344. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109344>.
- [16] MELLIYANTI S. N., AFANDI F. A., GIRIWONO P. E., et al., A meta analysis: the effects of types, roasting degrees and origin on antioxidant properties of coffee. *International Journal of Food Science and Technology*. **58**(6), 2023, 2857–2865. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16431>.
- [17] DA SILVA, C. Q., FERNANDES, A. D. S., TEIXEIRA, G. F., et al., Risk assessment of coffees of different qualities and degrees of roasting. *Food Research International*. **141**, 2021, 110089. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110089>.
- [18] BELITZ H.-D., GROSCH W., SCHIEBERLE P., Coffee, Tea, Cocoa. *Food chemistry*. 4th, rev. and extended ed., Springer, Berlin, 2009, 938-970, ISBN 978-3-540-69933-0.
- [19] DONG X., YANG Y., ZHANG Z., et al., Genome-Wide Identification of WRKY Genes and Their Response to Cold Stress in *Coffea canephora*. *Forests*. **10**(4), 2019, 335. DOI: <https://doi.org/10.3390/f10040335>.
- [20] HOFFMANN J., The World Atlas of Coffee: From beans to brewing - coffees explored, explained and enjoyed [online]. Vyd. 2., Octopus, 2018 [cit. 2023-06-20]. ISBN 9781784725716. Dostupné z: https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=The+World+Atlas+of+Coffee+by+James+Hoffmann&btnG=
- [21] HUANG N.-F., CHOU D.-L., LEE C.-A., et al., Smart agriculture: real-time classification of green coffee beans by using a convolutional neural network. *IET Smart Cities*. **2**(4), 2020, 167-172. DOI: <https://doi.org/10.1049/iet-smc.2020.0068>.

- [22] NAKILCIOĞLU-TAŞ E., ÖTLEŞ S., Physical characterization of Arabica ground coffee with different roasting degrees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **91**(2), 2019, e20180191. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180191>.
- [23] MEHAYA F. M., MOHAMMAD A. A., Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans. *Heliyon*, **6**(11), 2020, E05508. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05508>.
- [24] SANTOS J. R., VIEGAS O., PÁSCOA R. N. M. J., et al., In-line monitoring of the coffee roasting process with near infrared spectroscopy: Measurement of sucrose and colour. *Food Chemistry*. **208**, 2016, 103-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.114>.
- [25] BOTTAZZI D., FARINA S., MILANI M., et al., A numerical approach for the analysis of the coffee roasting process. *Journal of Food Engineering*. **112**(3), 2012, 243-252. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.04.009>.
- [26] BUSTOS-VANEGAS J. D., CORRÊA P. C., MARTINS M. A. et al., Developing predictive models for determining physical properties of coffee beans during the roasting process. *Industrial Crops & Products*. **112**, 2018, 839-845. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.015>.
- [27] GRZELCZYK J., FIURASEK P., KAKKAR A. et al., Evaluation of the thermal stability of bioactive compounds in coffee beans and their fractions modified in the roasting process. *Food Chemistry*. **387**, 2022, 132888. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132888>.
- [28] PIRES F. D. C., PEREIRA R. G. F. A., BAQUETA M. R., et al., Near-infrared spectroscopy and multivariate calibration as an alternative to the Agtron to predict roasting degrees in coffee beans and ground coffees. *Food Chemistry*. **365**, 2021, 130471. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130471>.
- [29] SAJJACHOLAPUNT P., SUPRATAK A., TUAROB S., Automatic measurement of acidity from roasted coffee beans images using efficient deep learning. *Journal of Food Process Engineering*. **45**(11), 2022, e14147. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.14147>.
- [30] SCHOUTEN M. A., TAPPI S., ANGELONI S., et al., Acrylamide formation and antioxidant activity in coffee during roasting – A systematic study. *Food Chemistry*. **343**, 2021, 128514. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128514>.
- [31] DELGADO-ANDRADE C., MORALES F. J., Unraveling the Contribution of Melanoidins to the Antioxidant Activity of Coffee Brews. *J. Agric. Food Chem.* **53**(5), 2005, 1403-1407. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf048500p>.
- [32] DEL CASTILLO M. D., AMES J. M., GORDON M. H., Effect of Roasting on the Antioxidant Activity of Coffee Brews. *J. Agric. Food Chem.* **50**(13), 2002, 3698-3703. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf011702q>.

- [33] WEI F., FURIHATA K., KODA M., et al., Roasting Process of Coffee Beans as Studied by Nuclear Magnetic Resonance: Time Course of Changes in Composition. *J. Agric. Food Chem.* **60**(4), 2012, 1005-1012. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf205315r>.
- [34] DIPPONG T., DAN M., KOVACS M. H., et al., Analysis of Volatile Compounds, Composition, and Thermal Behavior of Coffee Beans According to Variety and Roasting Intensity. *Foods*. **11**(19), 2022, 3146. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11193146>.
- [35] STEFANELLO N., SPANEVELLO R. M., PASSAMONTI S., et al., Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. *Food and Chemical Toxicology*. **123**, 2019, 298-313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.005>.
- [36] ZHOU J., ZHOU S., & ZENG S., Experimental diabetes treated with trigonelline: Effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **27**(3), 2013, 279–287. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.01022.x>.
- [37] HIRAKAWA N., OKAUCHI R., MIURA Y., et al., Anti-Invasive Activity of Niacin and Trigonelline against Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **69**(3), 2005, 653-658. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.69.653>.
- [38] VEZZULLI F., LAMBRI M., BERTUZZI T., Volatile Compounds in Green and Roasted Arabica Specialty Coffee: Discrimination of Origins, Post-Harvesting Processes, and Roasting Level. *Foods*. **12**(3), 2023, 489. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12030489>.
- [39] DI LORENZO C., COLOMBO F., BIELLA S., et al., Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. **13**(1), 2021, 273. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13010273>.
- [40] KLIKAROVÁ J., ŘEHÁKOVÁ B., ČESLOVÁ L., Evaluation of regular and decaffeinated (un)roasted coffee beans using HPLC and multivariate statistical methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. **114**, 2022, 104841. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104841>.
- [41] FARAH A., DE PAULIS T., MOREIRA D. P., et al., Chlorogenic Acids and Lactones in Regular and Water-Decaffeinated Arabica Coffees. *J. Agric. Food Chem.* **54**(2), 2006, 374-381. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0518305>.
- [42] LIMA A. R., PEREIRA R. G. F. A., ABRAHÃO S. A., et al., Effect of decaffeination of green and roasted coffees on the *in vivo* antioxidant activity and prevention of liver injury in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **23**(3), 2013, 506-512. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000036>.
- [43] MUCHTARIDI M., LESTARI D., KHAIRUL IKRAM N. K., et al., Decaffeination and Neuraminidase Inhibitory Activity of Arabica Green Coffee (*Coffea arabica*) Beans: Chlorogenic Acid as a Potential Bioactive Compound. *Molecules*. **26**(11), 2021, 3402. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26113402>.
- [44] VELÍŠEK J., *Chemie Potravín 3. Vyd. 1.*, OSSIS, Tábor, 1999, ISBN 80-902391-5-3.

- [45] ALI A., ZAHID H. F., COTTRELL J. J., et al., A Comparative Study for Nutritional and Phytochemical Profiling of *Coffea arabica* (*C. arabica*) from Different Origins and Their Antioxidant Potential and Molecular Docking. *Molecules*. **27**(16), 2022, 5126. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27165126>.
- [46] BREZOVÁ V., ŠLEBODOVÁ A., STAŠKO A., Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*. **114**(3), 2009, 859-868. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.025>.
- [47] PAVLICA S., GEBHARDT R., Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. *Free Radical Research*. **39**(12), 2005, 1377-1390. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670260500197660>.
- [48] KIM J., LEE S., SHIM J., et al., Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons. *Neurochemistry International*. **60**(5), 2012, 466-474. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.02.004>.
- [49] CHA J. W., PIAO M. J., KIM K. C., et al., The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Biomolecules & Therapeutics*. **22**(2), 2014, 136-142. DOI: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.006>.
- [50] BABOVA O., OCCHIPINTI A., MAFFEI M. E., Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry*. **123**, 2016, 33-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.016>.
- [51] BARRIOS-RODRÍGUEZ Y. F., GUTIÉRREZ-GUZMÁN N., AMOROCHO-CRUZ C. M., et al., Integrated effect of yeast inoculation and roasting process conditions on the neo formed contaminants and bioactive compounds of Colombian roasted coffee (*Coffea arabica*). *Food Research International*. **164**, 2023, 112380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112380>.
- [52] NASO L. G., VALCARCEL M., ROURA-FERRER M. et al., Promising antioxidant and anticancer (human breast cancer) oxidovanadium(IV) complex of chlorogenic acid. Synthesis, characterization and spectroscopic examination on the transport mechanism with bovine serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **135**, 2014, 86-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.02.013>.
- [53] FARAH A., MONTEIRO M., DONANGELO C. M., et al., Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *The Journal of Nutrition*. **138**(12), 2008, 2309-2315. DOI: <https://doi.org/10.3945/jn.108.095554>.
- [54] RODRIGO R., LAIZ J. Y., Beneficial Effects of Chlorogenic Acids on Essential Hypertension. *International Journal of Food and Nutritional Science*. **3**(1), 2016, 213-217. DOI: 10.15436/2377-0619.16.893.

- [55] AGUNLOYE O. M., OBOH G., Caffeic acid and chlorogenic acid: Evaluation of antioxidant effect and inhibition of key enzymes linked with hypertension. *JOURNAL OF FOOD BIOCHEMISTRY*. **42**(4), 2018, e12541. DOI: 10.1111/jfbc.12541.
- [56] AKINYEMI A. J., THOME G. R., MORSCH V. M., et al., Effect of dietary supplementation of ginger and turmeric rhizomes on ectonucleotidases, adenosine deaminase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of hypertensive rats. *Journal of Applied Biomedicine*. **14**(1), 2016, 59-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.06.001>.
- [57] SCACCHI R., RUGGERI M., CORBO R. M., Variation of the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) genes in coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*. **412**(15-16), 2011, 1341-1344. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.03.033>.
- [58] OBOH G., AGUNLOYE O. M., AKINYEMI A. J., et al., Comparative Study on the Inhibitory Effect of Caffeic and Chlorogenic Acids on Key Enzymes Linked to Alzheimer's Disease and Some Pro-oxidant Induced Oxidative Stress in Rats' Brain-In Vitro. *Neurochemical Research*. **38**, 2013, 413-419. DOI: 10.1007/s11064-012-0935-6.
- [59] H. V. S., K V., Patel D., et al., Biomechanism of chlorogenic acid complex mediated plasma free fatty acid metabolism in rat liver. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **16**, 2016, 274. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1258-y>.
- [60] Global report on diabetes. World Health Organization, 2016, ISBN: 9789241565257. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257> [online]. [cit. 2023-05-20].
- [61] KOBAYASHI Y., SUZUKI M., SATSU H., et al., Green Tea Polyphenols Inhibit the Sodium-Dependent Glucose Transporter of Intestinal Epithelial Cells by a Competitive Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **48**(11), 2000, 5618-5623. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0006832>.
- [62] BIDEL S., SILVENTOINEN K., HU G., et al. Coffee consumption, serum γ -glutamyltransferase and risk of type II diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*. **62**, 2008, 178-185. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602712.
- [63] MATHIEU P., PIBAROT P., LAROSE É., et al., Visceral obesity and the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **40**(5), 2008, 821-836. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.001>.
- [64] ROSHAN H., NIKPAYAM O., SEDAGHAT M., et al., Effects of green coffee extract supplementation on anthropometric indices, glycaemic control, blood pressure, lipid profile, insulin resistance and appetite in patients with the metabolic syndrome: a randomised clinical trial. *British Journal of Nutrition*. **119**(3), 2018, 250-258. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114517003439>.

- [65] Cancer. World Health Organization. 2022. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [online]. [cit. 2023-05-20].
- [66] GOUTHAMCHANDRA K., SUDEEP H. V., VENKATESH B. J., et al., Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. *Food Science and Human Wellness*. **6**(3), 2017, 147-153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.001>.
- [67] ZHANG F., YIN G., HAN X., et al., Chlorogenic acid inhibits osteosarcoma carcinogenesis via suppressing the STAT3/Snail pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. **120**(6), 2019, 10342 - 10350. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.28318>.
- [68] YAMAGATA K., IZAWA Y., ONODERA D., et al., Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **441**, 2018, 9-19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3171-1>.
- [69] HOU N., LIU N., HAN J., et al., Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*. **28**(1), 2017, 59-65(7). DOI: <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000430>.
- [70] SANTANA-GÁLVEZ J., CASTREJÓN J. V., SERNA-SALDÍVAR S. O., et al., Anticancer potential of dihydrocaffeic acid: a chlorogenic acid metabolite. *CyTA - Journal of Food*. **18**(1), 2020, 245 - 248. DOI: <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1743762>.
- [71] JAISANKAR, A. I., ARIVARASU L., Free Radical Scavenging and Anti-Inflammatory Activity of Chlorogenic Acid Mediated Silver Nanoparticle. *Journal of Pharmaceutical Research International*. **32**(19), 2020, 106-112. DOI: [10.9734/jpri/2020/v32i1930715](https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i1930715).
- [72] HWANG S. J., KIM YW., PARK Y., et al., Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*. **63**, 2014, 81-90. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0674-4>.
- [73] SHI H., DONG L., JIANG J., et al., Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Toxicology*. **303**, 2013, 107-114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.10.025>.
- [74] CHEN Z., YANG Y., MI S., et al., Hepatoprotective effect of chlorogenic acid against chronic liver injury in inflammatory rats. *Journal of Functional Foods*. **62**, 2019, 103540. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103540>.
- [75] WANG D., TIAN L., LV H., et al., Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **132**, 2020, 110773. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110773>.
- [76] GAO L., DAI Y., LI X., MENG S. et al, Chlorogenic acid enhances autophagy by upregulating lysosomal function to protect against SH-SY5Y cell injury induced by H₂O₂.

- Experimental and Therapeutic Medicine*. **21**(5), 2021, 426. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9843>.
- [77] LEE C. W., WON T. J., KIM H. R. et al., Protective Effect of Chlorogenic Acid against A β -Induced Neurotoxicity. *Biomolecules & Therapeutics*, **19**(2), 2011, 181-186. DOI: [10.4062/biomolther.2011.19.2.181](https://doi.org/10.4062/biomolther.2011.19.2.181).
- [78] LI Z., ZHENG G., WANG N., et al., A Flower-like Brain Targeted Selenium Nanocluster Lowers the Chlorogenic Acid Dose for Ameliorating Cognitive Impairment in APP/PS1 Mice. *J. Agric. Food Chem.* **71**(6), 2023, 2883-2897. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06809>.
- [79] GAO L., LI X., MENG S., et al., Chlorogenic Acid Alleviates A β 25-35-Induced Autophagy and Cognitive Impairment via the mTOR/TFEB Signaling Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. **14**, 2020, 1705-1716. DOI: [10.2147/DDDT.S235969](https://doi.org/10.2147/DDDT.S235969).
- [80] ISHIDA K., YAMAMOTO M., MISAWA K., et al., Coffee polyphenols prevent cognitive dysfunction and suppress amyloid β plaques in APP/PS2 transgenic mouse. *Neuroscience Research*. **154**, 2020, 35-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.05.001>.
- [81] MIYAMAE Y., KURISU M., MURAKAMI K., et al., Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid β -protein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **20**(19), 2012, 5844-5849. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.001>.
- [82] WEERAKOON W. N. M. T. D. N., ANJALI N. V. P., JAYATHILAKA N., et al., Soybean oil and coconut oil enhance the absorption of chlorogenic acid in humans. *JOURNAL OF FOOD BIOCHEMISTRY*. **45**(8), 2021, e13823. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13823>.
- [83] SCHERBL D., MUENTNICH S., RICHLING E., *In vitro* absorption studies of chlorogenic acids from coffee using the Ussing chamber model. *Food Research International*. **63**(C), 2014, 456-463. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.031>.
- [84] STALMACH A, MULLEN W., BARRON D., et al., Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**(8), 2009, 1749-1758. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.109.028019>.
- [85] LIANG N., KITTS D. D., Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients*. **8**(1), 2016, 16. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu8010016>.
- [86] LAFAY S., GIL-IZQUIERDO A., MANACH C., et al., Chlorogenic Acid Is Absorbed in Its Intact Form in the Stomach of Rats. *The Journal of Nutrition*. **136**(5), 2006, 1192-1197. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/136.5.1192>.

- [87] KONISHI Y., KOBAYASHI S., Transepithelial Transport of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Their Colonic Metabolites in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **52**(9), 2004, 2518-2526. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf035407c>.
- [88] MACHEINER L., SCHMIDT A., SCHREINER M., et al., Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. *Journal of Food Composition and Analysis.* **84**, 2019, 103307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103307>.
- [89] TAGLIAZUCCHI D., HELAL A., VERZELLONI E., et al., The Type and Concentration of Milk Increase the *in Vitro* Bioaccessibility of Coffee Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **60**(44), 2012, 11056-11064. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf302694a>.
- [90] ATLABACHEW M., ABEBE A., ALEMNEH WUBIENEH T., et al., Rapid and simultaneous determination of trigonelline, caffeine, and chlorogenic acid in green coffee bean extract. *Food Science & Nutrition.* **9**(9), 2021, 5028–5035. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2456>.
- [91] ADNAN A., NAUMANN M., MÖRLEIN D., et al., Reliable Discrimination of Green Coffee Beans Species: A Comparison of UV-Vis-Based Determination of Caffeine and Chlorogenic Acid with Non-Targeted Near-Infrared Spectroscopy. *Foods.* **9**(6), 2020, 788. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9060788>.
- [92] DADO A., ASRESAHEGN Y.A., GOROYA K. G., Determination of chlorogenic acid content in beans and leaves of *coffea arabica* using UV/Vis spectrometer. *African Journal of Pure and Applied Chemistry.* **13**(5), 2019, 58-63. DOI: 10.5897/AJPAC2018. 0780.
- [93] MALLORCA-CEBRIA S., MOLINER-MARTINEZ Y., MOLINS-LEGUA C., et al., On-Site Multisample Determination of Chlorogenic Acid in Green Coffee by Chemiluminiscent Imaging. *Methods and protocols.* **6**(1), 2023, 20. DOI: <https://doi.org/10.3390/mps6010020>.
- [94] AWWAD S., ISSA R., ALNSOUR L., et al., Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Green and Roasted Coffee Samples Using HPLC-DAD and Evaluation of the Effect of Degree of Roasting on Their Levels. *Molecules.* **26**(24), 2021, 7502. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26247502>.
- [95] TOMAC I., JAKOBEK L., ŠERUGA M., Chromatographic and Voltammetric Characterization of Chlorogenic Acids in Coffee Samples. *CROATICA CHEMICA ACTA.* **91**(4), 2018, 501-511. DOI: 10.5562/cca3439.
- [96] YILMAZ P. K., KOLAK U., SPE-HPLC Determination of Chlorogenic and Phenolic Acids in Coffee. *Journal of Chromatographic Science.* **55**(7), 2017, 712-718. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx025>.