

Kinetika adsorpcije polifenola jabuke na β -glukanu

Perković, Gabriela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:171291>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

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



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Gabriela Perković

Kinetika adsorpcije polifenola jabuke na β -glukanu

Diplomski rad

Osijek, lipanj 2019.

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Fizikalna kemija**Tema rada** je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 27. svibnja 2019.**Mentor:** prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron**Pomoć pri izradi:****Kinetika adsorpcije polifenola jabuke na β -glukanu**

Gabriela Perković, MB 3946/14

Sažetak: Zadatak ovog rada bio je provesti kinetičko istraživanje procesa adsorpcije polifenola iz kore i mesa jabuke na β -glukanu. Polifenoli su ekstrahirani iz mesa i kore jabuke pomoću ultrazvučne ekstrakcije, a identificirani reverzno-faznom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (RP-HPLC). Proveden je proces adsorpcije unutar različitih vremenskih perioda, a koncentracija polifenola prije (c_0) i nakon adsorpcije određena je RP-HPLC metodom (c_e). Izračunata je količina adsorbiranih polifenola po masi adsorbensa u svakom vremenskom periodu (q_t) te ravnoteži ($q_{e,eksperimentalno}$). Dobiveni eksperimentalni podaci ($q_{e,eksperimentalno}$, q_t , t) modelirani su linearnim jednadžbama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda i dobivene su konstante brzine reakcije (k_1 i k_2) te q_e modela ($q_{e,model}$). Prema r^2 , kinetika adsorpcije polifenola iz kore jabuke može se općenito bolje opisati reakcijama pseudo-drugog reda. Izuzetak su dihidrokalkoni i (-)-epikatehin. Osim toga, u usporedbi vrijednosti $q_{e,eksperimentalno}$ i $q_{e,model}$, može se vidjeti da vrijednosti q_e pseudo-drugog reda bolje odgovaraju $q_{e,eksperimentalno}$. Za opisivanje kinetike adsorpcije polifenola mesa jabuke (fenolne kiseline) na β -glukanu, jednadžbe pseudo-prvog i pseudo-drugog reda nisu bile zadovoljavajuće.

Ključne riječi: Polifenoli, jabuka, β -glukan, adsorpcija, kinetika, pseudo-prvi red, pseudo-drugi red**Rad sadrži:** 33 stranice
28 slika
2 tablice
o prilogu
14 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|---|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Valentina Bušić</i> | član |
| 4. dr. sc. <i>Ivana Tomac</i> , znan. sur. | zamjena člana |

Datum obrane: 11. lipnja 2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Physical chemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII. held on May 27, 2019.

Mentor: Lidija Jakobek Barron, PhD, full prof.

Technical assistance:

Kinetics of Adsorption of Apple Polyphenols onto β -glucan

Gabriela Perković, MB 3946/14

Summary: The purpose of this work was to conduct the kinetic study of adsorption process between β -glucan and polyphenols from apple peel and flesh. Polyphenols were extracted from peel and flesh by ultrasonic extraction and identified by the use of reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The adsorption process was conducted in different time periods and polyphenol concentration before (c_0) and after (c_e) adsorption was determined by the use of RP-HPLC. The amount of adsorbed polyphenols per adsorbens mass in each time period (q_t) and in equilibrium ($q_{e, \text{experiment}}$) was calculated. Obtained experimental data ($q_{e, \text{experiment}}$, q_t , t) were modelled using linear pseudo-first and pseudo-second order equations which enabled the determination of first and second order rate constants (k_1 and k_2) and q_e of a model ($q_{e, \text{model}}$). According to r^2 , kinetics of adsorption of apple peel polyphenols can be better described with pseudo second-order reaction. Exceptions are dihydrochalcone and (-)-epicatechin. Besides, in comparison of values $q_{e, \text{model}}$ and $q_{e, \text{experiment}}$, it can be seen that q_e of a pseudo second-order models are in better agreement with $q_{e, \text{experiment}}$. For describing kinetics of adsorption of polyphenols from apple flesh (phenolic acids) on β -glucan, pseudo-first and pseudo-second order equations are not satisfactory solution.

Key words: Polyphenols, apple, β -glucan, adsorption, kinetics, pseudo-first order, pseudo-second order

Thesis contains: 33 pages
28 figures
2 tables
0 supplements
14 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Ivica Strelac, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Lidija Jakobek Barron, PhD, full prof. | supervisor |
| 3. Valentina Bušić, PhD, assistant prof. | member |
| 4. Ivana Tomac, PhD | stand-in |

Defense date: June 11., 2019.

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

Najveće hvala mojim roditeljima Ružici i Marku koji su mi ovo omogućili. Hvala vam za svaku ohrabrujuću riječ te pohvalu i kritiku, svako rame za plakanje i beskrajnu ljubav.

Također se zahvaljujem svim prijateljima, posebno mojoj Ivani R., koji su iskustvo studiranja učinili jednostavno nezaboravnim.

Veliko hvala i mojoj mentorici Lidiji Jakobek Barron na strpljenju, pomoći i svim sugestijama pri izradi ovog diplomskog rada.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2016-06-6777.

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Polifenoli.....	2
2.2. Prehrambena vlakna	3
2.2.1. β -glukan.....	3
2.3. Interakcije između polifenola i prehrambenih vlakana.....	4
2.3.1. Interakcije između polifenola i β -glukana	5
2.4. Adsorpcija kao proces za istraživanje interakcija između polifenola i prehrambenih vlakana....	6
2.4.1. Kinetika procesa adsorpcije.....	7
2.5. Interakcije između polifenola iz jabuke i β -glukana	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Zadatak rada.....	11
3.2. Materijali i metode.....	11
3.2.1. Kemikalije	11
3.2.2. Priprema uzoraka jabuka	12
3.2.3. Priprema ekstrakta.....	12
3.2.4. Adsorpcija.....	12
3.2.5. Određivanje pojedinačnih polifenola RP-HPLC metodom	13
3.2.6. Računanje adsorpcijskog kapaciteta	13
3.2.7. Kinetika.....	14
3.2.8. Statistička obrada podataka.....	15
4. REZULTATI	16
4.1. Polifenoli u jabukama.....	16
4.2. Kinetika procesa adsorpcije	20
4.3. Modeliranje jednadžbama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda	22
5. RASPRAVA	28
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. LITERATURA.....	32

Popis oznaka, kratica i simbola

q_e ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})

q_t ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1})

t vrijeme (h)

k_1 konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda (h^{-1})

k_2 konstanta brzine reakcije pseudo-drugog reda ($\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)

c_0 početna koncentracija polifenola (mg l^{-1})

c_e količina neadsorbiranih polifenola (mg l^{-1})

V_m ukupan volumen modelne otopine (l)

Y_a masena koncentracija β -glukana (g l^{-1})

V_a volumen dodanog β -glukana u model otopinu (l)

R^2 koeficijent determinacije

RP-HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)

1. UVOD

Danas se velika važnost pridaje polifenolnim spojevima, koji ne samo da imaju važnu ulogu u biljnom svijetu – kao zaštita od vanjskih štetočina i jakog ultraljubičastog zračenja (Quiros-Suaceda i sur., 2014), već su od velike važnosti i za ljudski organizam. U ljudskom organizmu imaju potencijal za različite pozitivne bioaktivnosti (Jakobek, 2007). Koliko jako će biti izražena pozitivna svojstva polifenolnih spojeva, ovisi o količini polifenolnih spojeva koji su dostupni za apsorpciju.

U ljudskom probavnom sustavu polifenolni spojevi ulaze u interakciju s prehrambenim vlaknima, koja mogu utjecati na biodostupnost i bioraspoloživost polifenolnih spojeva. Koja će veza nastati između polifenola i prehrambenih vlakana, odnosno da li će doći do interakcije između njih, ovisi o nizu čimbenika kao što su: pH, temperatura i ionska jakost okoline. Prehrambena vlakna mogu smanjiti količinu polifenolnih spojeva koji se oslobađaju u gornjem dijelu probavnog sustava, a povećati količinu oslobođenih polifenola u donjem dijelu probavnog sustava. Moguće je da na taj način utječu na bioraspoloživost i biodostupnost polifenolnih spojeva (Jakobek i Matić, 2019).

U istraživanju interakcija između polifenolnih spojeva i prehrambenih vlakana, može se upotrijebiti proces adsorpcije. Adsorpcija je proces u kojem se prikazuje sposobnost čvrste tvari da na svojoj površini adsorbira molekule plina ili otopljene tvari iz otopine (Brdička, 1969). Prehrambena vlakna mogu biti adsorbens jer se na površini vlakana odvija proces adsorpcije, a polifenoli mogu imati ulogu adsorbanta. Kada se proces adsorpcije privede kraju, eksperimentalni podaci (q_e ; količina adsorbiranih polifenolnih spojeva po masi prehrambenih vlakana u ravnoteži; c_e – koncentracija neadsorbiranih polifenolnih spojeva u ravnoteži) se modeliraju jednadžbama koje se nazivaju adsorpcijske izoterme. Osim toga, proces adsorpcije može se pratiti u različitim vremenskim intervalima da bi se dobili podaci za kinetička istraživanja. Eksperimentalni podaci obrađuju se jednadžbama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda. Ovakva kinetička istraživanja pružaju dodatan uvid u mehanizam interakcija između polifenolnih spojeva i prehrambenih vlakana.

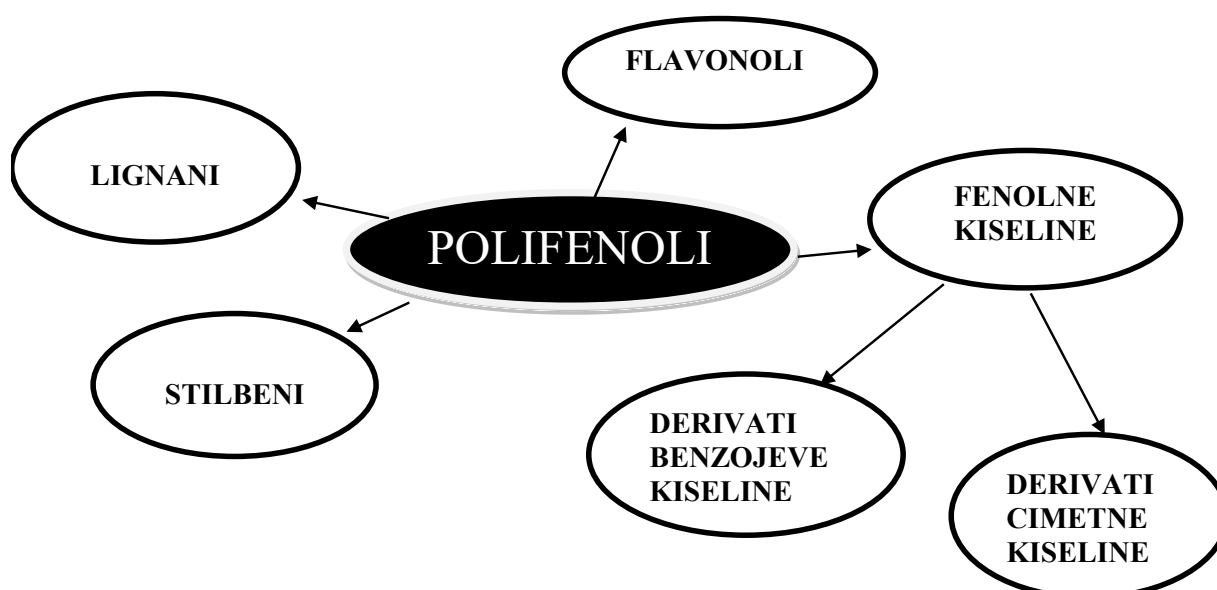
U ovom radu cilj je bio ekstrahirati polifenolne spojeve iz kore i mesa jabuke te provesti adsorpciju polifenolnih spojeva na β -glukanu, jednom od prehrambenih vlakana koji se može naći u žitaricama. Proces adsorpcije proveden je u različitim vremenskim intervalima, a podaci su obrađeni jednadžbama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Polifenoli

Polifenoli se nalaze u biljkama. Obuhvaćaju široku skupinu spojeva, čija je glavna karakteristika aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Glavna funkcija polifenola u biljci je zaštita biljke od nepovoljnih vanjskih utjecaja -poput djelovanja štetočina i jakog ultraljubičastog zračenja (Quiros - Suaceda i sur., 2014). Još neke od funkcija polifenola u biljkama jesu: utjecaj na aromu, boju te okus voća i povrća, povećanje intenziteta obojenja ploda i cvijeta -koje je bitno kod oprašivanja jer će se privući puno više kukaca. Manji dio polifenola ulazi u sastav stanične stijenke biljke i to u obliku različitih vrsta lignina. Iako nisu od esencijalne važnosti, skupina polifenola pokazuje širok spektar pozitivnih utjecaja na ljudski organizam. Upravo se zbog još uvijek nedovoljno ispitanih pozitivnih svojstava polifenoli i dalje istražuju (Jakobek, 2007).

Glavna podjela polifenolnih spojeva (**Slika 1**) je podjela na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane. Podjela se zasniva na razlici u strukturalnoj građi (Quiros - Suaceda i sur., 2014). Fenolne kiseline se još granaju na dvije skupine, a to su derivati benzojeve kiseline i derivati cimetine kiseline (Jakobek, 2007). Razlike u strukturalnoj građi između pojedinih skupina polifenola utječu na njihovo ponašanje, odnosno utječu na metabolizam, apsorpciju i izlučivanje (Wang i sur., 2013).



Slika 1 Osnovna podjela polifenola

2.2. Prehrambena vlakna

Prehrambena vlakna su velika skupina spojeva, a zapravo predstavljaju ugljikohidratne polimere. Ne probavljaju se niti apsorbiraju u tankom crijevu, a mogu biti u potpunosti ili djelomično fermentirana u debelom crijevu. Fermentacija se događa uz prisustvo endogene mikroflore debelog crijeva te nastaju produkti: kratkolančane masne kiseline, plinovi i voda. Uobičajeno je da ugljikohidratni polimeri imaju deset ili više gradivnih jedinica. S obzirom na topljivost, prehrambena vlakna se dijele u dvije skupine - topljiva i netopljiva. Skupini topljivih prehrambenih vlakana pripadaju: pektini, β -glukan, oligosaharidi i inulin. Neki od predstavnika skupine netopljivih prehrambenih vlakana jesu: celuloza, hemiceluloza i rezistentni škrob. Prehrana bogata prehrambenim vlaknima može imati povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje - poboljšavanje crijevne mikroflore (Jakobek i Matić, 2019).

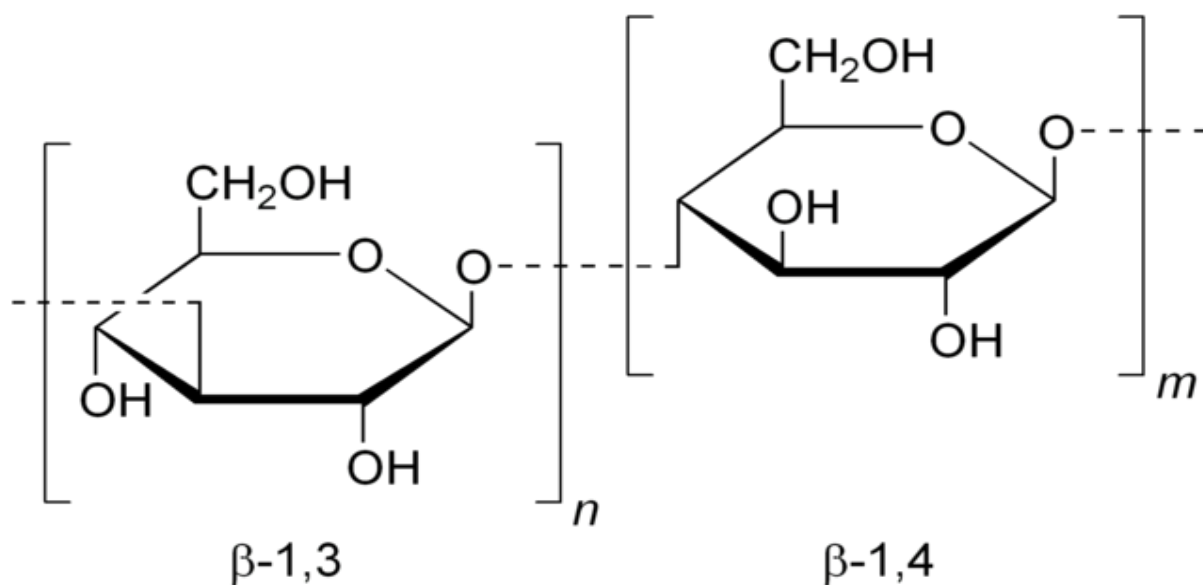
2.2.1. β -glukan

β -glukan je polisaharid koji pripada skupini prehrambenih vlakana. Sastoji se od jedinica D-glukoze glavninom povezanih β -(1-4)-glikozidnom vezom, pri čemu se nakon svake dvije do tri glukoze jedinice pronalazi se i β -(1-3)-glikozidna veza (Wang i sur., 2013). S druge strane, na mjestima grananja moguće je i povezivanje β -(1-6)-glikozidnom vezom (El Khoury i sur., 2011).

Slika 2 prikazuje kemijsku strukturu β -glukana. U ovisnosti o porijeklu, ovo prehrambeno vlakno može biti topljivo u vodi. β -glukan privlači pažnju znanstvenika zbog svojih potencijalnih pozitivnih svojstva, kao što su poticanje aktivnosti imunološkog sustava, smanjenje LDL kolesterola (engl. low density lipoprotein, „loš“ kolesterol) te razine glukoze u krvi (Wang i sur., 2013).

Budući da se β -glukan nalazi u skupini prehrambenih vlakana, otporan je na apsorpciju i probavu u tankom crijevu čovjeka, dok u debelom crijevu može doći do potpune ili djelomične fermentacije (Quiros - Suaceda i sur., 2014).

Najčešće izvori u prehrani koje služe kao izvor β -glukana jesu žitarice zob i ječam. Međutim, može ga se pronaći i u pekarskom kvascu, određenim vrstama gljiva te algi (Laroche i Michaud, 2007).



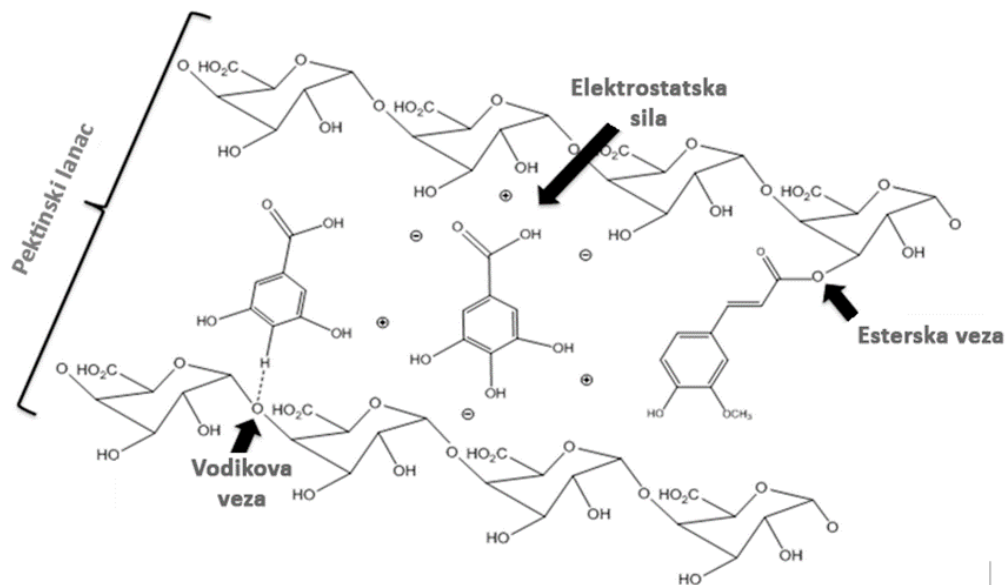
Slika 2 Kemijska struktura β -glukana (web 1)

2.3. Interakcije između polifenola i prehrambenih vlakana

Polifenoli mogu doći u kontakt s prehrambenim vlaknima te se vezati za njihovu površinu (Jakobek i Matić, 2019). Ovakve interakcije mogu imati utjecaja na raspoloživost polifenola za apsorpciju u probavnom sustavu (bioraspoloživost) te za količinu polifenola koja se zapravo apsorbira (biodostupnost). S druge strane, prehrambena vlakna mogu „nositi“ polifenole do donjih dijelova probavnog sustava gdje se polifenoli mogu otpustiti te imaju potencijal za pozitivno djelovanje (Palafox-Carlos i sur., 2011). Ove interakcije nisu još do kraja istražene.

Za vezanje na prehrambena vlakna važna je kemijska struktura polifenola. Polifenolni spojevi u svojoj strukturi sadrže hidrofobni aromatski prsten i hidrofilne hidroksilne grupe koje sudjeluju u stvaranju veza. Moguće vrste veza su:

- Vodikove veze: javljaju se između parcijalno pozitivnog vodika jedne grupe i parcijalno negativnog kisika druge grupe,
- Ionske veze: nastaju između pozitivno i negativno nabijenih skupina na polifenolima i prehrambenim vlaknima
- Kovalentne veze: pri čemu su najčešći primjer esterske veze između prehrambenih vlakana i polifenola (Quiros-Sauceda i sur., 2014) (Slika 3).



Slika 3 Veze između prehrambenih vlakana i fenolnih kiselina (Quiros-Sauceda i sur., 2014)

Na sam nastanak pojedine veze, utjecaj imaju različiti faktori poput: pH, okoline, veličine čestica, sastava i svojstva površinskog sloja, ionske jakosti (Quiros-Sauceda i sur., 2014; Wang i sur., 2013).

2.3.1. Interakcije između polifenola i β -glukana

Ranija istraživanja fokusirana na specifičnu skupinu prehrambenih vlakana – β -glukane - pokazala su da polifenoli mogu ulaziti u interakcije s β -glukanom, a sama interakcija istraživana je procesom adsorpcije polifenola na β -glukan (Wang i sur., 2013). Pri tome se pokazalo kako je za interakcije važna kemijska struktura polifenola. Naime, hidrosilacija poboljšava adsorpciju flavonola koji sadrže maksimalno tri OH skupine. Ukoliko sadrže četiri ili više OH skupine, adsorpcija flavonola na β -glukan se smanjuje. Adsorpcijski kapacitet između različitih flavonoida se povećava idućim redoslijedom: flavonoli > flavoni > flavononi > izoflavoni. Nije utvrđeno kako glikozilacija osnovnog fenolnog prstena utječe na adsorpcijski kapacitet polifenola. Zna se da glikolizacija uzrokuje mnoštvo kompliciranih efekata. Metilacijom i metoksilacijom fenolnih kiselina se, u većini slučajeva, smanjuje njihov adsorpcijski kapacitet (Wang i sur., 2013).

2.4. Adsorpcija kao proces za istraživanje interakcija između polifenola i prehrambenih vlakana

Jedan od načina ispitivanja interakcija polifenoli – prehrambena vlakna, je istraživanje procesa adsorpcije *in vitro*.

Prema definiciji, adsorpcija je proces pri kojem se iskazuje sposobnost čvrste tvari da na svojoj površini adsorbira molekule plina ili otopljene tvari iz otopine. Adsorpcija nastupa kad se na dodirnom području između dvije faze stvori granično područje faza. Većinom se radi o egzotermnom procesu, što znači da se oslobađa određena količina topline u okolinu. Tri su osnovne vrste adsorpcije:

- fizikalna,
- kemijska i
- ionska adsorpcija.

Podjela se temelji na vrsti sila koje vežu adsorbant na površinu adsorbensa (Brdička, 1969).

1. Fizikalna (van der Waalsova) adsorpcija: kao što i sam naziv kaže, između adsorbanta i adsorbensa vladaju van der Waalsove sile. Odvija se na temperaturama koje su niže od temperature ključanja adsorbanta. Oslobađa se manja količina topline ($< 15 \text{ kcal mol}^{-1}$).
2. Kemijska adsorpcija (kemisorpcija): nastanak kemijske kovalentne veze između adsorbensa i adsorbanta. Može se odvijati pri višim temperaturama. Tijekom ove vrste adsorpcije oslobađa se do $150 \text{ kcal mol}^{-1}$ topline.
3. Ionska adsorpcija: vrijedi za pozitivno i negativno nabijene koloide koji će na svojoj površini adsorbirati čestice suprotnog naboja - anione ili katione (Brdička, 1969).

Za proces adsorpcije je navedeno da se odvija kroz iduće faze:

- faza u kojoj se adsorbant transportira iz otopine,
- faza u kojoj adsorbant difundira preko sloja koji okružuje adsorbens,
- faza međučestične difuzije i
- faza adsorpcije i desorpcije adsorbanta s površine adsorbensa (Plazinski i sur., 2009).

Po završetku adsorpcijskog procesa, najčešće slijedi određivanje adsorpcijskog kapaciteta adsorbensa, odnosno određivanje količine adsorbanta adsorbiranog po gramu adsorbensa.

Koliko će se adsorbanta adsorbirati, ovisi o raznim čimbenicima npr. vremenu, pH i temperaturi otopine te upotrijebljenom adsorbensu (Marsal i sur., 2012).

2.4.1. Kinetika procesa adsorpcije

Eksperimentalni podaci adsorpcije adsorbanta na adsorbens u različitim vremenskim intervalima mogu se obraditi kinetičkim jednadžbama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda.

2.4.1.1. Model pseudo-prvog reda

Model pseudo-prvog reda je jedan od najstarijih i najčešće korištenih modela koji opisuje brzinu adsorpcije u tekućinama. Jednadžba pseudo-prvog reda, pri $q_e=0$ kada je $t=0$ i $q_t=q_e$ kada je $t=t_e$, dana je **formulom (1)**:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (1)$$

gdje je: q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),
 q_t – ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1}),
 t – vrijeme (h),
 k_1 – konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda (h^{-1}).

Vrijednosti parametara q_e i k_1 mogu se odrediti linearnom regresijom preko dijagrama ovisnosti $\ln(q_e - q_t)$ o t koji daje nagib pravca $-k_1$ i odsječak na y -osi $\ln q_e$ (Alshameri i sur., 2018).

2.4.1.2. Model pseudo-drugog reda

Model pseudo-drugog reda najčešće se temelji na pretpostavci da brzinu adsorpcijske kinetike određuje brzina procesa adsorpcije i desorpcije. Jednadžba pseudo-drugog reda u diferencijalnom obliku dana je **formulom (2)**:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad (2)$$

gdje je: q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),
 q_t – ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1}),
 t – vrijeme (h),
 k_2 – konstanta brzine reakcije pseudo-drugog reda ($\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Integriranjem **formule (2)** pri graničnim uvjetima $q_t=q_t$ pri $t=t$ i $q_t=0$ pri $t=0$ dobije se linearni oblik jednadžbe pseudo-drugog modela prema **formuli (3)**:

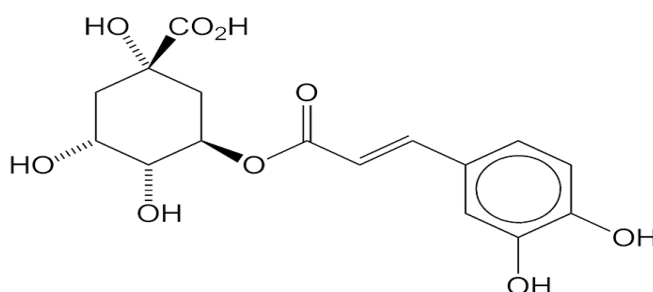
$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e} t + \frac{1}{k_2 q_e^2} \quad (3)$$

Vrijednosti parametara q_e i k_2 mogu se odrediti linearnom regresijom preko dijagrama ovisnosti t/q_t o t koji daje nagib pravca $1/q_e$ i odsječak na y-osi $1/k_2 q_e^2$ (Alshameri i sur., 2018). Istraživanje kinetike procesa adsorpcije može se primijeniti i na adsorpciju između polifenola i prehrambenih vlakana. Kinetička istraživanja mogu pružiti dodatan podatak o adsorpciji polifenola na prehrambena vlakna tj. o interakciji između polifenola i prehrambenih vlakana.

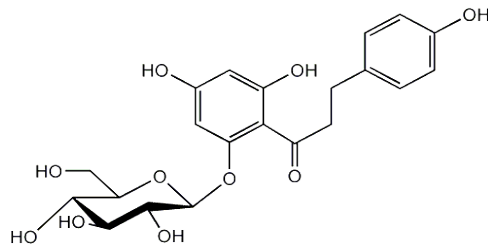
2.5. Interakcije između polifenola iz jabuke i β -glukana

Koristeći visokotlačnu tekućinsku kromatografiju u jabukama su pronađene sljedeće skupine polifenola: proantocijanidini, flavonoli, dihidrokalkoni, fenolne kiseline, antocijani te skupina neidentificiranih spojeva (Jakobek i sur., 2013).

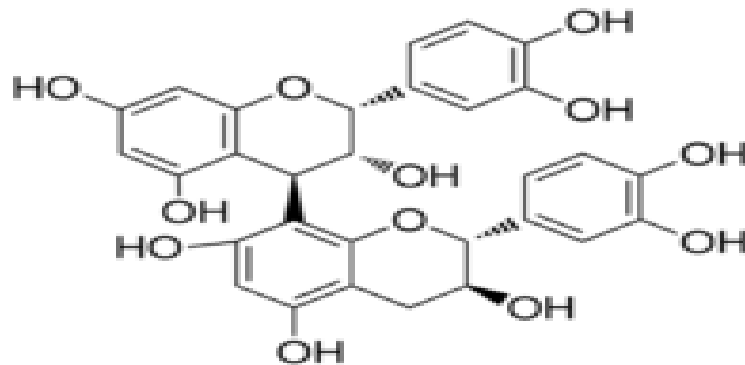
Meso jabuke je bogato klorogenskom kiselinom i izomerom klorogenske kiseline. Kemijska struktura klorogenske kiseline je prikazana na **Slici 4**. U kori jabuke su postojane tri različite skupine polifenolnih spojeva - dihidrokalkoni, flavan-3-oli te flavonoli. Iz skupine dihidrokalkona identificiran je floretin-2-glukozid, čija je kemijska struktura prikazana na **Slici 5**. Skupini flavan-3-ola pripadaju procijanidin B2 i (-)-epikatehin. Njihova kemijska struktura vidljiva je iz **slike 6**. i **slike 7**.



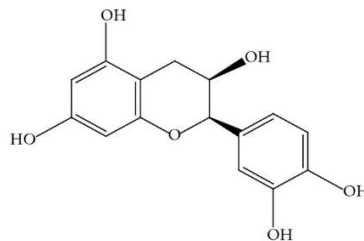
Slika 4 Kemijska struktura klorogenske kiseline (web 2)



Slika 5 Kemijska struktura floretin-2-glukozi (web 3)

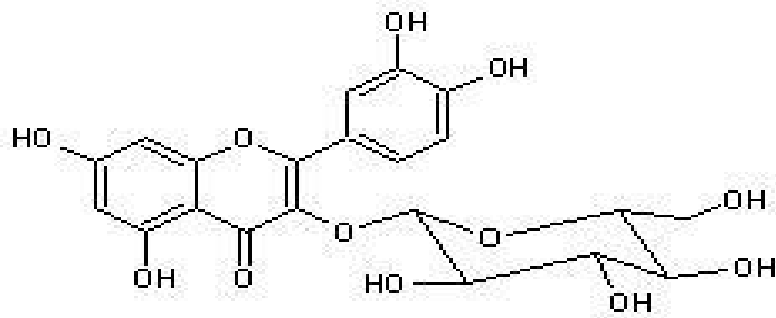


Slika 6 Kemijska struktura procijanidina B2 (web 4)



Slika 7 Kemijska struktura (-)-epikatehina (web 5)

U skupinu flavonola ubrajaju se: kvercetin-3-glukozid (**Slika 8**), kvercetin-3-galaktozid, derivati kvercetina 1 i 2, kvercetin-3-ramnozid te kvercetin-3-ksilozid.



Slika 8 Kemijska struktura kvercetin-3-glukozida (web 6)

Zamjetna je razlika između polifenola koji se pronalaze u mesu jabuke te polifenola iz kore jabuke. Teoretski će veći adsorpcijski kapacitet imati polifenoli iz kore jabuke. Različit kemijski sastav kore i mesa jabuke objašnjava različito ponašanje prilikom adsorpcije i različitost adsorpcijskog kapaciteta. Kora je bogatija flavonolima, a meso jabuke je bogato fenolnim kiselinama. Istraživanja su pokazala da je moguća adsorpcija polifenola iz jabuke na β -glukanu te da polifenolni sastav može utjecati na odvijanje procesa adsorpcije (Jakobek i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadatak rada bio je:

- ekstrahirati polifenolne spojeve iz kore jabuke pomoću ultrazvučne ekstrakcije,
- ekstrahirati polifenolne spojeve iz mesa jabuke pomoću ultrazvučne ekstrakcije,
- provesti adsorpciju polifenola iz kore jabuke na β -glukanu u različitim vremenskim periodima
- provesti adsorpciju polifenola iz mesa jabuke na β -glukanu u različitim vremenskim periodima
- identificirati i kvantificirati polifenole prije i nakon adsorpcije reverzno-faznom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (RP-HPLC, engl. reversed phase high-performance liquid chromatography),
- izračunati adsorpcijski kapacitet pojedinih polifenola u različitim vremenskim periodima (q_t) i u ravnoteži ($q_{e,eksperimentalno}$)
- modelirati eksperimentalne podatke ($q_{e,eksperimentalno}$, q_t , t) jednadžbama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda
- odrediti konstante brzine reakcije pseudo-prvog i pseudo-drugog reda (k_1 i k_2) te vrijednosti $q_{e,model}$ za pojedinačne polifenole iz kore i mesa jabuke

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kemikalije

Polifenolni standardi ((-)-epikatehin (E1753), Kvercetin-3-rutinozid hidrate (R5143), kvercetin-3-glukozid (17793), klorogenska kiselina (C3878), β -D-glukan iz ječma (G6513)) dobavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) te tvrtke Extrasynthese (Genay, France) (procijanidin B2 (0984), kvercetin-3-O-galaktozid (1027 S), kvercetin-3-O-ramnozid (1236 S), floretin-2'-O-glukozid (1361 S)). Natrijev hidrogen fosfat, natrijev dihidrogen fosfat dobavljeni

su od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska). Orto-fosfatna kiselina (85 % HPLC-grade) dobavljena je od tvrtke Fluka (Švicarska).

3.2.2. Priprema uzoraka jabuka

Jabuke su kupljene na lokalnoj tržnici (oko 1 kg). Jabukama je uklonjena kora. Svaka oguljena jabuka je podijeljena na 4 dijela, te svaki dio očišćen od sjemenki. Za homogenizaciju kore jabuke korišten je mlin za kavu, a za meso jabuke štapni mikser. Homogenizirani uzorci mesa i kore jabuka su uskladišteni u hladnjaku na temperaturi -18 °C. Pripremljeni uzorci su analizirani unutar 8 dana od skladištenja.

3.2.3. Priprema ekstrakta

Iz kore i mesa jabuke pripravljen je ekstrakt. Ukratko, 0,2 g kore odvagano je i dodano u plastičnu kivetu sa 1,5 ml 80 % metanola. Kiveta je stavljena u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Njemačka) tijekom 15 minuta, a nakon toga je ekstrakt centrifugiran (Eppendorf Minispin centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) tijekom 10 minuta na 10 000 o/min. Ekstrakt je odvojen od ostatka. Ovaj postupak ponovljen je na ukupno četiri odvage kore jabuka. Četiri ekstrakta su spojena tako da je dobiven ukupan volumen ekstrakta 6 ml. Ekstrakt mesa jabuke napravljen je na isti način. Ekstrakti su filtrirani kroz PTFE syringe filtere 0.45 µm prije HPLC analize.

3.2.4. Adsorpcija

U plastične kivete stavljeno je ukupno 500 µl reakcijske otopine: otopina polifenola, fosfatni pufer (pH 5.5) i β-glukan (konačna koncentracija 5 mg l⁻¹). Kivete su postavljene u tresilicu pri sobnoj temperaturi tijekom različitih vremenskih perioda unutar 2 sata (0,33; 0,66; 1; 1,66; 2 h) (prvi eksperiment) te unutar 16 h (0,33; 0,66; 2; 4; 6; 7; 16 h polifenoli kore jabuke; 2; 4; 6; 7; 16 h polifenoli mesa jabuke) (drugi eksperiment). Za svaki vremenski period koji je praćen, korištena je zasebna kiveta s reakcijskom otopinom. Nakon vremenskog isteka inkubacije, reakcijske otopine otpipetirane su u centrifugalne filtere s polietersulfonskom membranom

(Sartorius, Vivaspin 500). centrifugalni filteri su centrifugirani (10000 rpm, 10-20 min) (Eppendorf minispin, Hamburg, Germany). Polifenoli adsorbirani na β -glukanu zaostali su na membrani, dok su neadsorbirani prošli kroz pore membrane. Količina neadsorbiranih polifenola (c_e , mg l⁻¹) određena je RP-HPLC metodom.

Da bi se odredila količina polifenola prije adsorpcije pripremljene su iste otopine samo bez β -glukana. I ove otopine analizirane su RP-HPLC metodom. Određena je početna koncentracija polifenola (c_0 , mg l⁻¹).

3.2.5. Određivanje pojedinačnih polifenola RP-HPLC metodom

Za analize je korišten HPLC sustav 1260 Infinity II (Agilent technology, Santa Clara, CA, USA) s kvarternom pumpom, PDA detektorom, kolonom Poroshell 120 EC C-18, 4.6 x 100 mm, 2.7 μ m te Poroshell 120 pretkolonom EC-C18 4,6 mm. Injektirano je 10 μ l ekstrakta jabuka uz protok otapala A 0,1 % H₃PO₄ i otapala B 100 % metanol od 0.8 ml min⁻¹. Za razdijeljivanje je upotrijebljen gradijent kako slijedi: 0 min 5% B, 5 min 25% B, 14 min 34% B, 25 min 37% B, 30 min 40 % B, 34 min 49% B, 35 min 50% B, 58 min 51% B, 60 min 55% B, 62 min 80% B, 65 min 80% B, 67 min 5% B, 72 min 5%B.

Metoda je validirana ranije u našem laboratoriju. Spojevi su ranije identificirani dodavanjem autentičnih standarda te poklapanjem spektra i vremena zadržavanja standarda i spojeva iz ekstrakta jabuke. No i za ovaj eksperiment u ekstrakte su dodani standardi polifenola te analizirani RP-HPLC metodom da bi se potvrdila identifikacija polifenola.

3.2.6. Računanje adsorpcijskog kapaciteta

Za računanje adsorpcijskog kapaciteta u ravnoteži (q_e (mg g⁻¹)) te u svim vremenskim periodima (q_t (mg g⁻¹)) upotrijebljena je formula 4:

$$q_e(\text{ili } q_t) = \frac{(c_0 - c_e)V_m}{\gamma_a V_a} \quad (4)$$

gdje je:

c_0 početna koncentracija polifenola (mg l⁻¹),

c_e koncentracija neadsorbiranih polifenola (mg l^{-1}),

V_m ukupan volumen model otopine (l),

γ_a masena koncentracija β -glukana (g l^{-1})

V_a volumen dodanog β -glukana u model otopini (l).

3.2.7. Kinetika

Kinetika procesa adsorpcije ispitana je modeliranjem eksperimentalnih podataka (q_e , q_t , t) iz dva zasebna eksperimenta (16 h i 2 h) jednadžbom pseudo-prvog reda:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (5)$$

gdje je: q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),
 q_t – ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1}),
 t – vrijeme (h),
 k_1 – konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda (h^{-1}).

Vrijednosti parametara q_e i k_1 iz modela određeni su linearnom regresijom preko dijagrama ovisnosti $\ln(q_e - q_t)$ o t koji daje nagib pravca $-k_1$ i odsječak na y-osi $\ln q_e$ (Alshameri i sur., 2018). Eksperimentalni podaci (q_e , q_t , t) modelirani su i jednadžbom pseudo-drugog reda:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e} t + \frac{1}{k_2 q_e^2} \quad (6)$$

gdje je: q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}),
 q_t – ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1}),
 t – vrijeme (h),
 k_2 – konstanta brzine reakcije pseudo-drugog reda ($\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$).

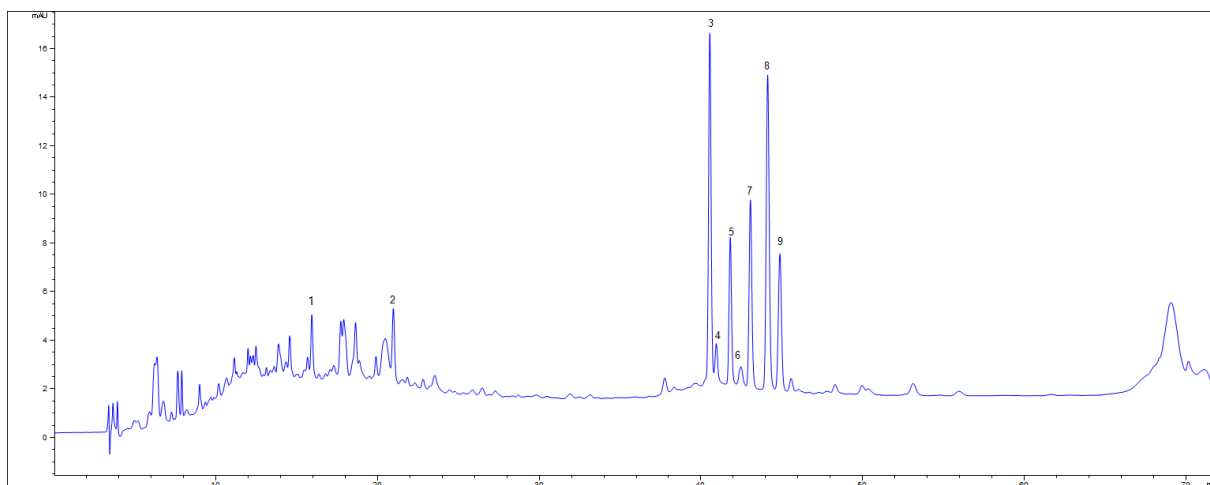
Vrijednosti parametara q_e i k_2 određeni su linearnom regresijom preko dijagrama ovisnosti t/q_t o t koji daje nagib pravca $1/q_e$ i odsječak na y-osi $1/k_2 q_e^2$ (Alshameri i sur., 2018).

3.2.8. Statistička obrada podataka

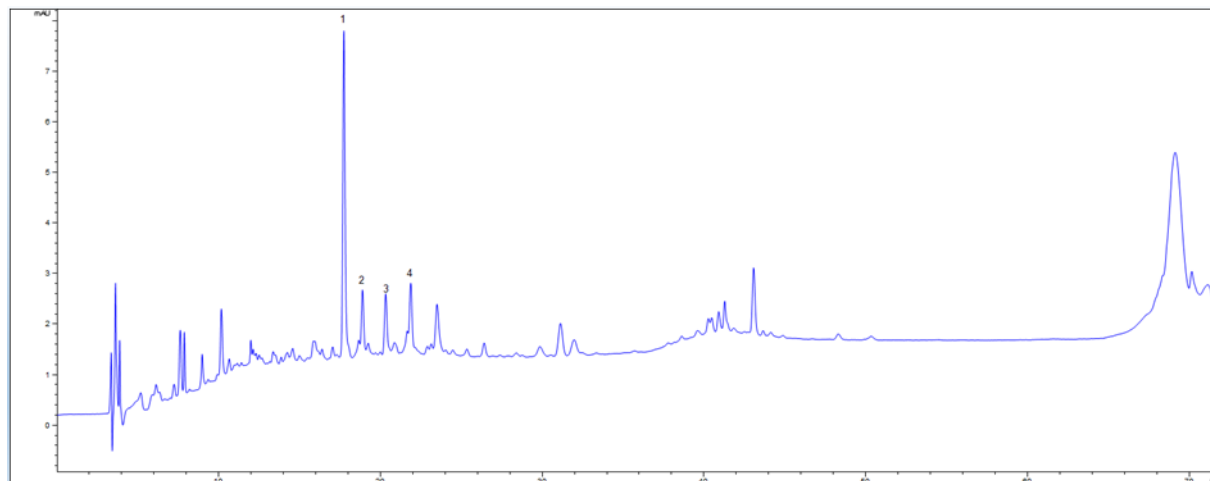
U obradi eksperimentalnih podataka adsorpcije kinetičkim modelima pseudo prvog i pseudo-drugog reda korištena je linearna regresija te je izračunat koeficijent determinacije r^2 . Za statističku obradu korišten je program MS excel.

4. REZULTATI

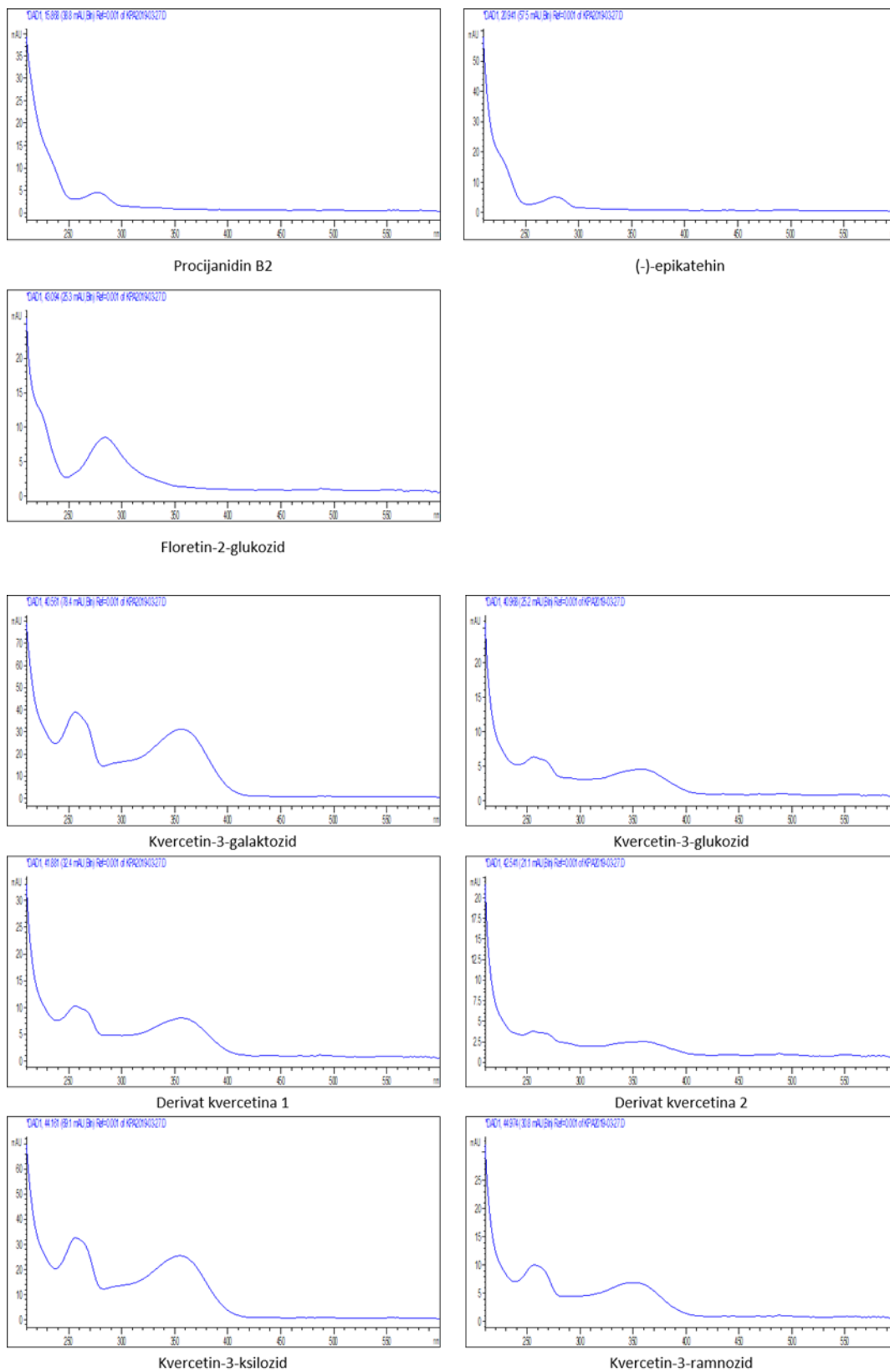
4.1. Polifenoli u jabukama



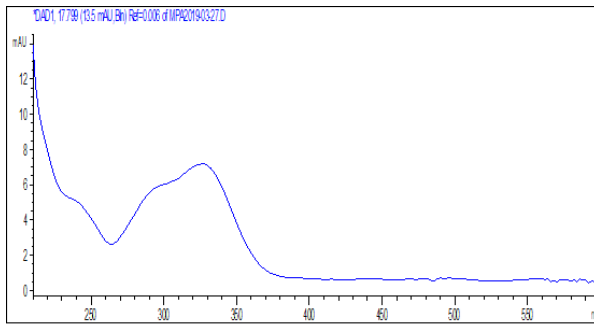
Slika 9 Kromatogram kore jabuke sniman na 280 nm. Polifenolni spojevi: 1 – procijanidin B2, 2 – (-)-epikatehin, 3 – kvercetin-3-galaktozid, 4 – kvercetin-3-glukozid, 5 – derivat kvercetina 1, 6 – derivat kvercetina 2, 7 – floretin-2-glukozid, 8 – kvercetin-3-ksilozid, 9- kvercetin-3-ramnozid



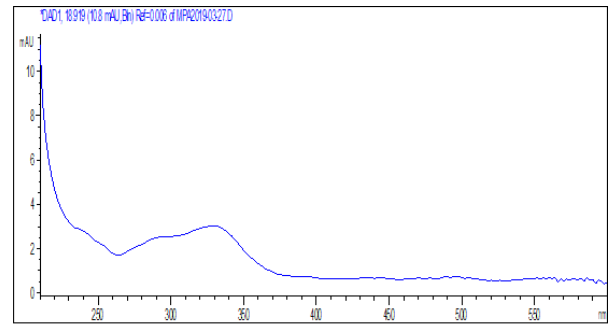
Slika 10 Kromatogram mesa jabuke snimljen na 280 nm. Polifenolni spojevi: 1 – klorogenska kiselina, 2 - izomer klorogenske kiseline, 3 – fenolna kiselina 1, 4 – fenolna kiselina 2



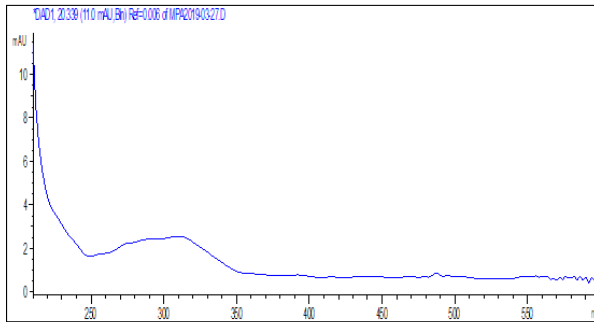
Slika 11 UV-VIS spektri polifenolnih spojeva iz kore jabuke



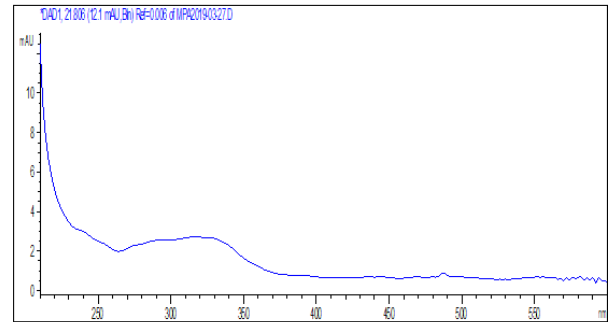
Klorogenska kiselina



Izomer klorogenske kiseline

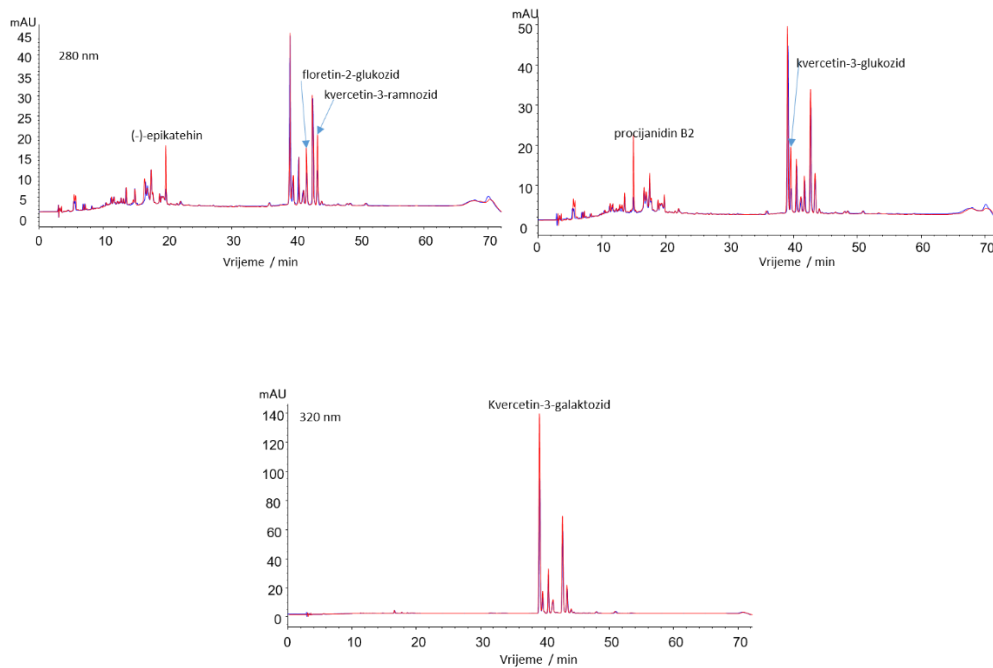


Fenolna kiselina 1

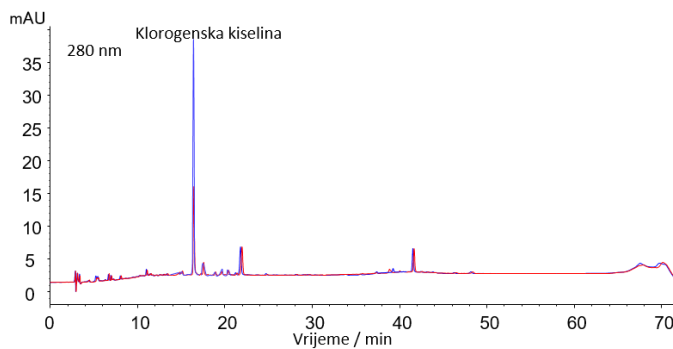


Fenolna kiselina 2

Slika 12 UV-VIS spektri polifenolnih spojeva iz mesa jabuke

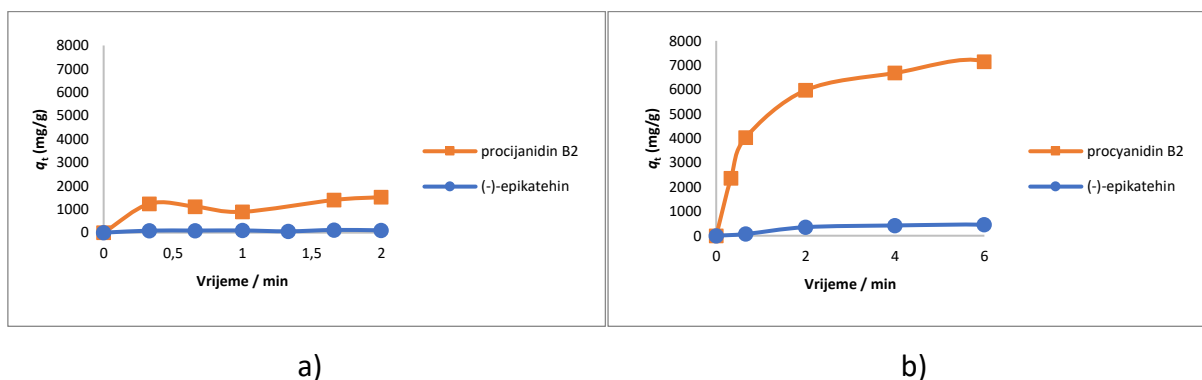


Slika 13 Preklopljeni kromatogrami ekstrakta kore jabuke i ekstrakta kore jabuke s dodanim standardom (-)-epikatehinom, floretin-2-glukozidom, kvercetin-3-ramnozidom, procijanidinom B2, kvercetin-3-glukozidom, kvercetin-3-galaktozidom, snimani na 280 nm

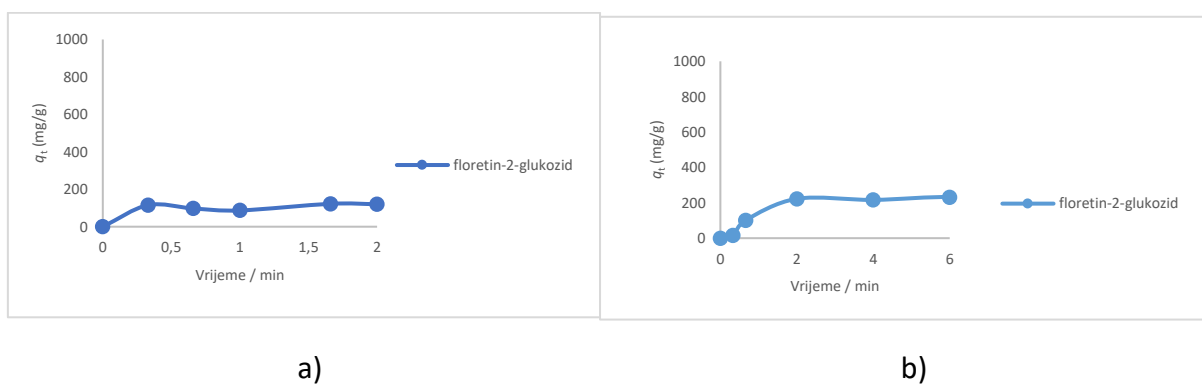


Slika 14 Preklopljeni kromatogrami ekstrakta mesa jabuke i ekstrakta mesa jabuke s dodanim standardom klorogenskom kiselinom, snimani na 280 nm

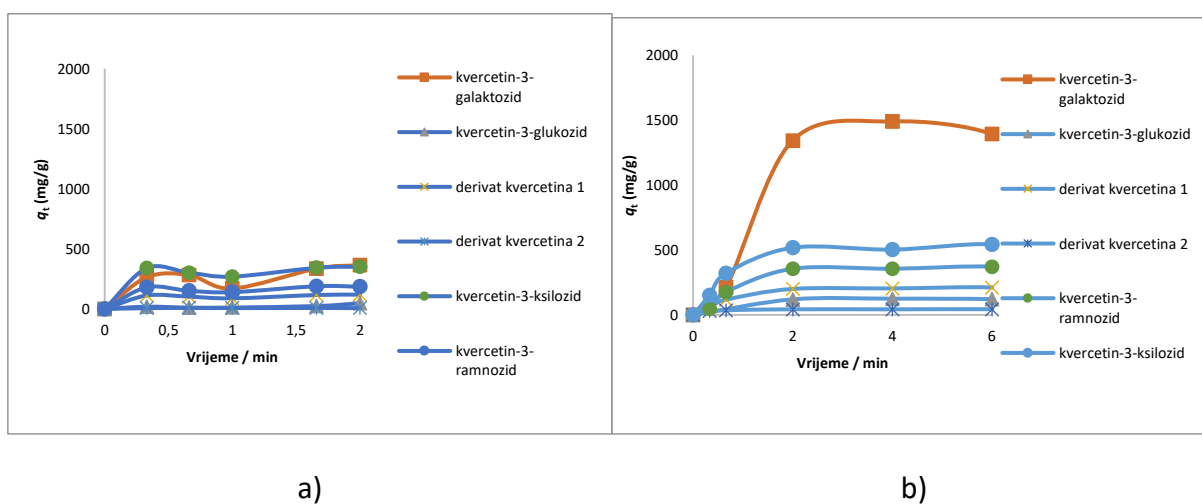
4.2. Kinetika procesa adsorpcije



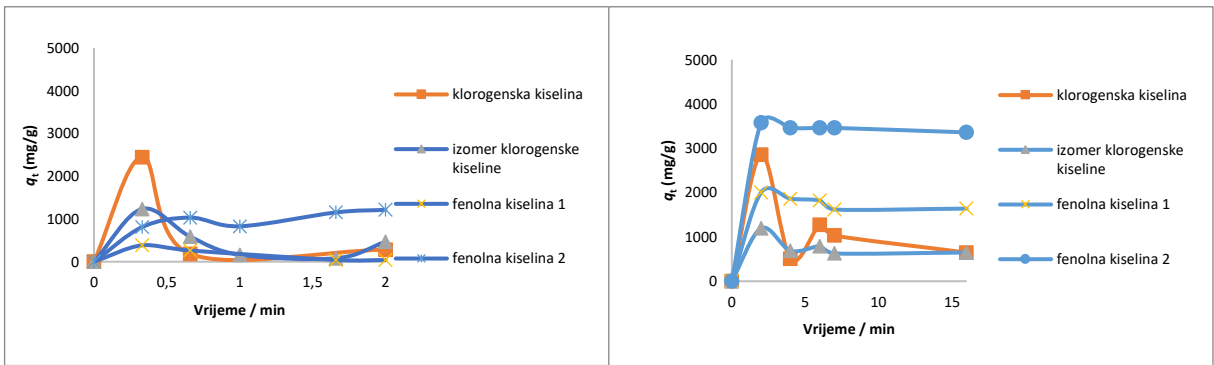
Slika 15 Ovisnost adsorpcijskog kapaciteta (q_t) o vremenu adsorpcije za procijanidin B2 i (-)-epikatehin iz kore jabuke. a) mjerenje unutar 2 h i b) mjerenje unutar 6 h



Slika16 Ovisnost adsorpcijskog kapaciteta (q_t) o vremenu adsorpcije za floretin-2-glukozid iz kore jabuke. a) mjerenje unutar 2 h i b) mjerenje unutar 6 h



Slika 17 Ovisnost adsorpcijskog kapaciteta (q_t) o vremenu adsorpcije za derivate kvercetina iz kore jabuke. a) mjerenje unutar 2 h i b) mjerenje unutar 6 h

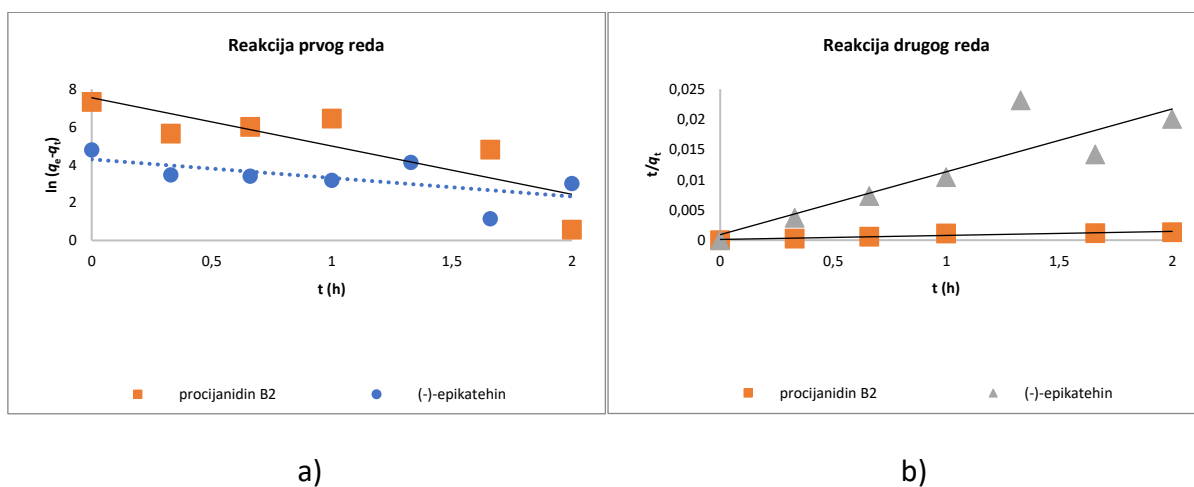


a)

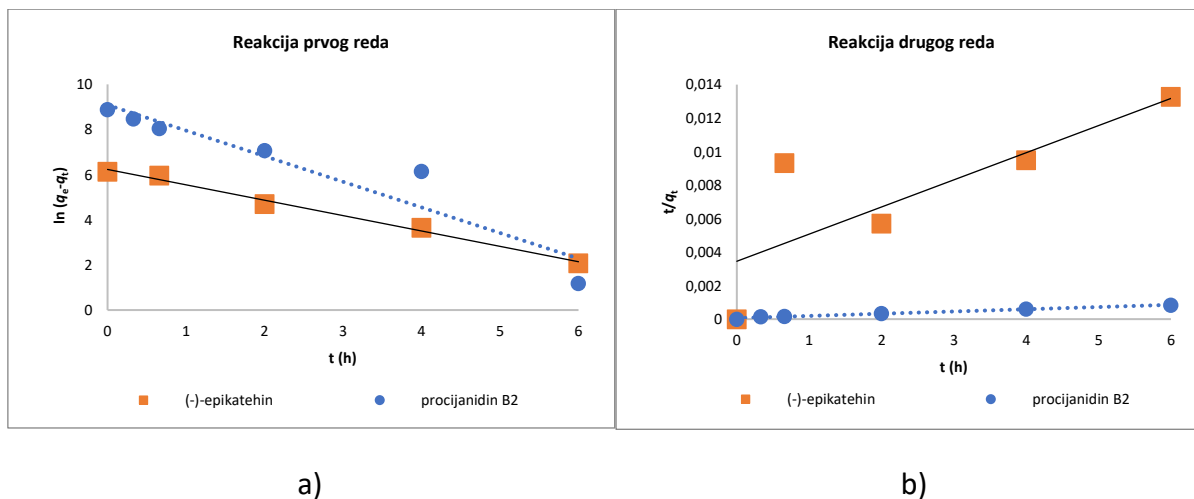
b)

Slika 18 Ovisnost adsorpcijskog kapaciteta (q_t) o vremenu adsorpcije za fenolne kiseline iz mesa jabuke a) mjerenje unutar 2 h i b) mjerenje unutar 16 h

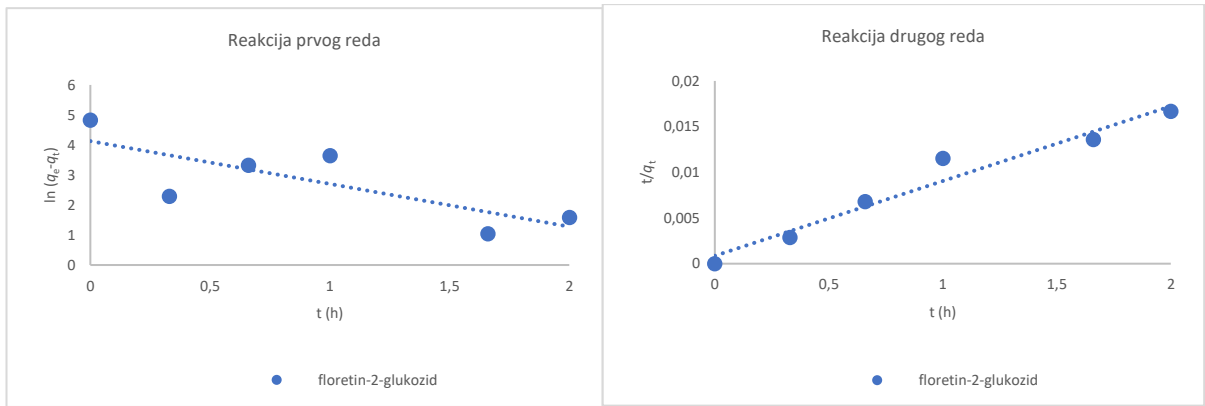
4.3. Modeliranje jednačbama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda



Slika 19 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike drugog reda za procijanidin B2 i (-)-epikatehin iz kore jabuke (mjerjenje unutar 2 h)



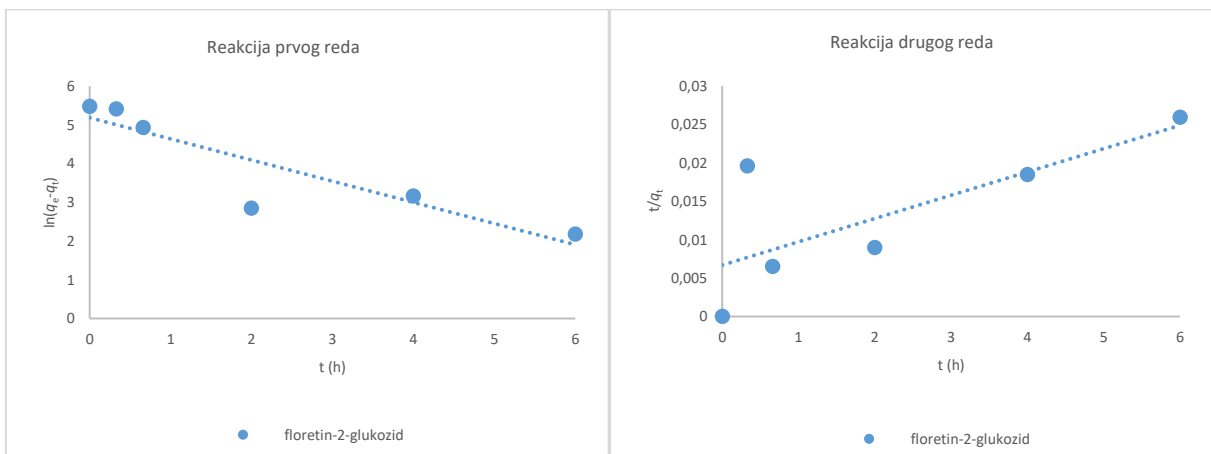
Slika 20 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike drugog reda za procijanidin B2 i (-)-epikatehin iz kore jabuke (mjerjenje unutar 6 h)



a)

b)

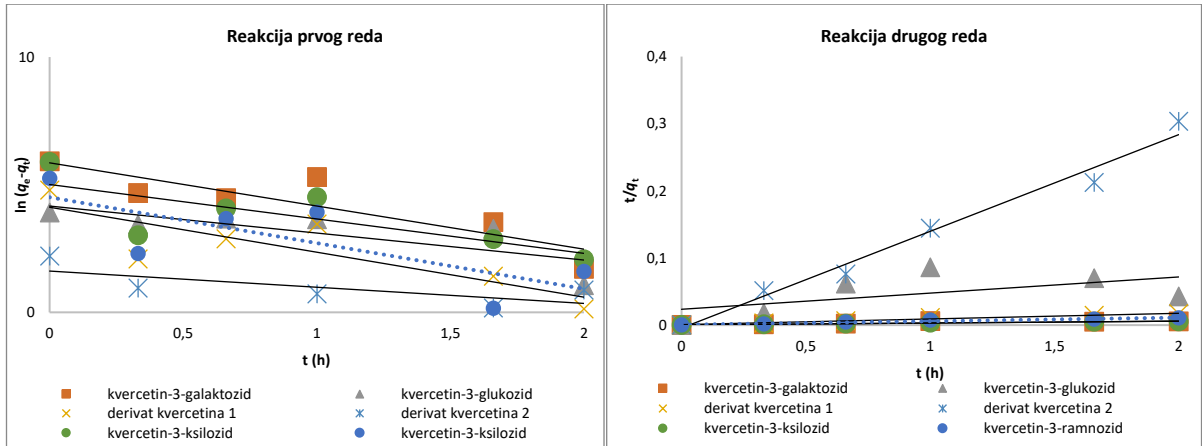
Slika 21 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike dugog reda za floretin-2-glukozid iz kore jabuke (mjerjenje unutar 2 h)



a)

b)

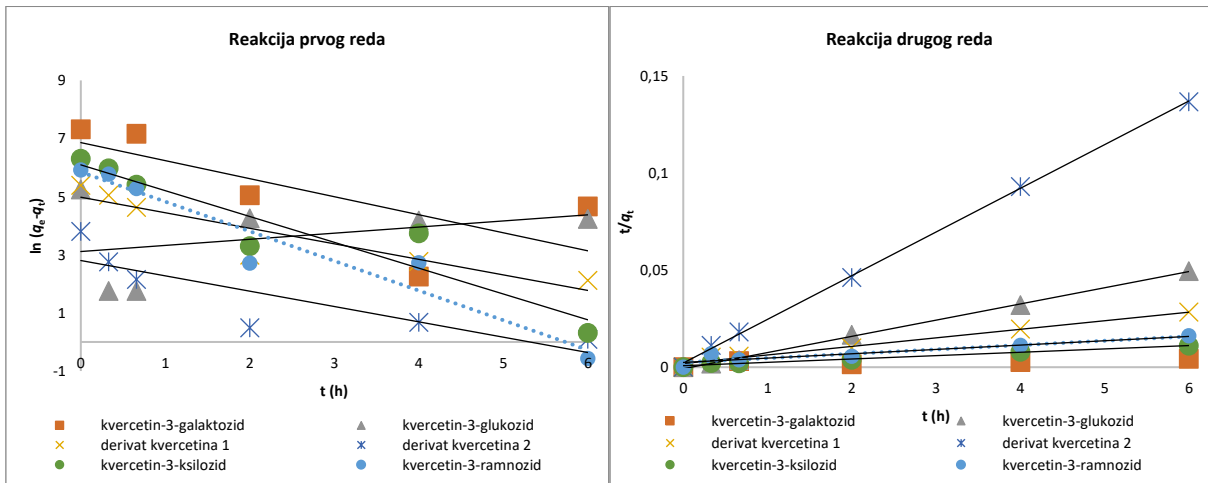
Slika 22 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike dugog reda za floretin-2-glukozid iz kore jabuke (mjerjenje unutar 6 h)



a)

b)

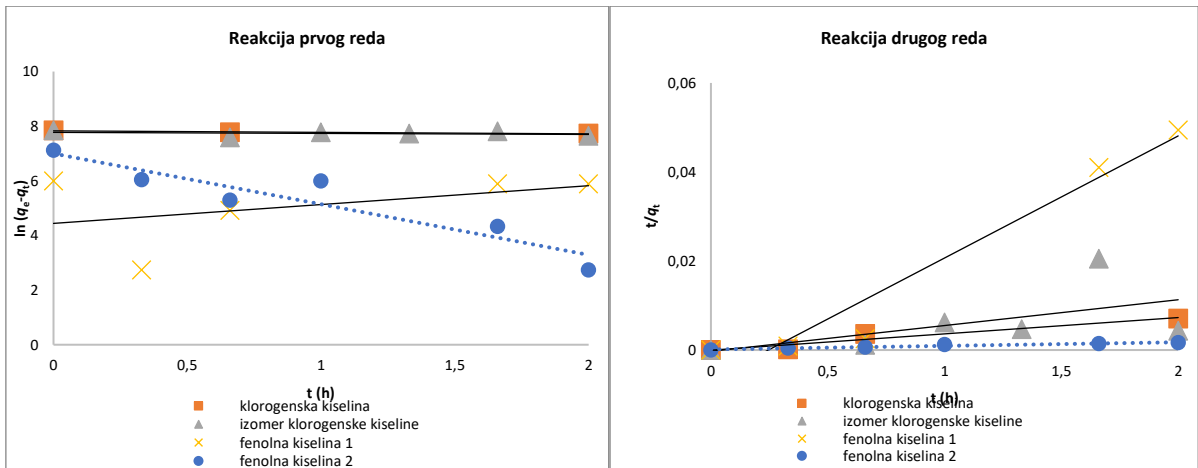
Slika 23 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike dugog reda za derivate kvercetina iz kore jabuke (mjerjenje unutar 2 h)



a)

b)

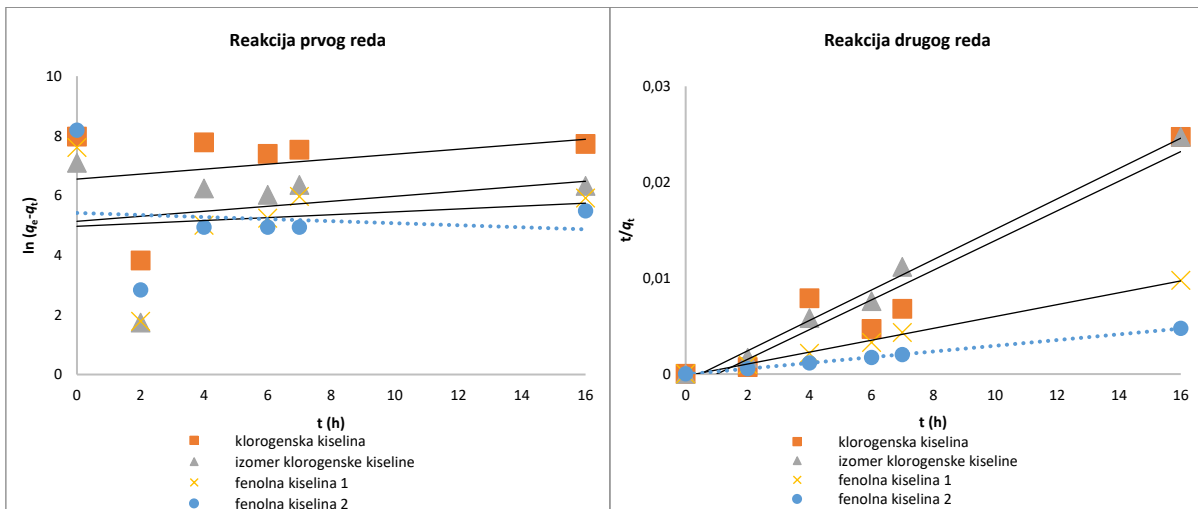
Slika 24 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike dugog reda za derivate kvercetina iz kore jabuke (mjerjenje unutar 6 h)



a)

b)

Slika 25 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike dugog reda za fenolne kiseline iz mesa jabuke (mjerjenje unutar 2 h)



a)

b)

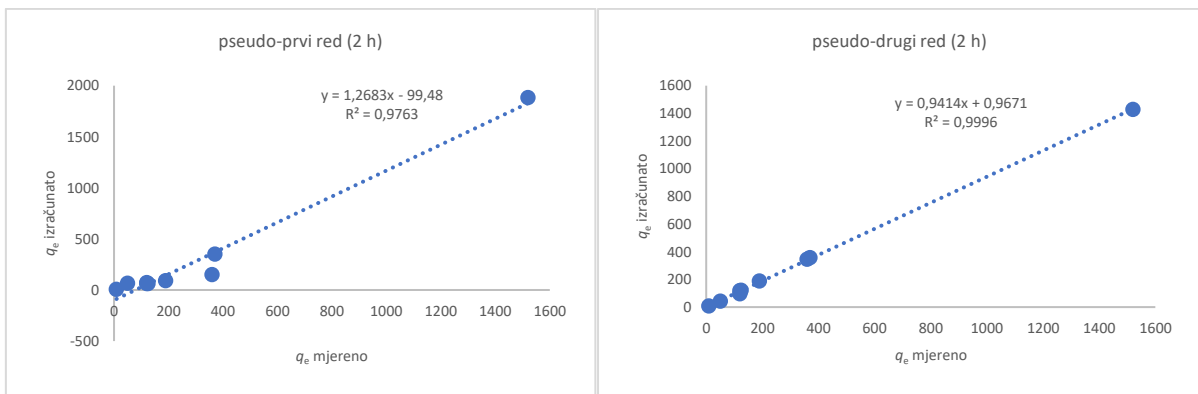
Slika 26 a) ovisnost $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike prvog reda te b) ovisnost t/q_t o vremenu adsorpcije za reakciju kinetike dugog reda za fenolne kiseline iz mesa jabuke (mjerjenje unutar 16 h)

Tablica 1. Konstante brzine reakcije I i II reda za proces adsorpcije polifenola iz jabuke na β -glukanu (mjerjenje 2 h)

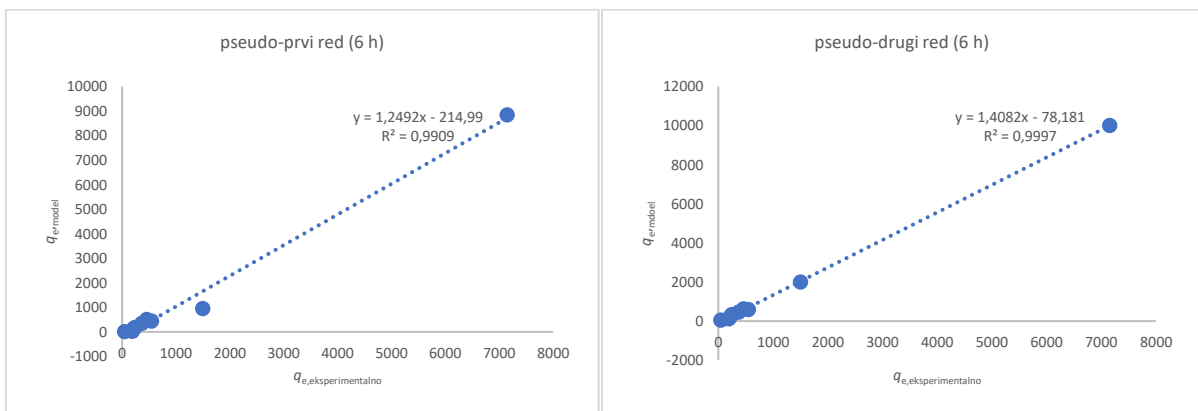
Polifenoli	Reakcija prvog reda				Reakcija drugog reda		
	r^2	k_1 (h^{-1})	$q_{e,model}$ $mg\ g^{-1}$	$q_{e,eksperimentalno}$ $mg\ g^{-1}$	r^2	k_2 $g\ h^{-1}mg^{-1}$	$q_{e,model}$ $mg\ g^{-1}$
Kora jabuke							
procijanidin B2	0,68	2,55	1882,5	1520	0,90	0,0049	1428,6
(-)-epikatehin	0,39	0,98	72,7	120	0,79	0,1202	96,2
floretin-2-glukozid	0,61	1,43	62,1	125	0,96	0,0747	121,9
kvercetin-3-galaktozid	0,77	1,69	349,1	370	0,76	0,0112	357,1
kvercetin-3-glukozid	0,60	1,06	64,2	50	0,32	0,0246	41,5
derivat kvercetina 1	0,70	1,76	61,3	120	0,97	0,1008	119,0
derivat kvercetina 2	0,53	0,64	5,0	9	0,98	-4,72	6,9
kvercetin-3-ksilozid	0,58	1,35	149,5	360	0,98	0,04205	344,8
kvercetin-3-ramnozid	0,58	1,79	90,6	190	0,97	0,05618	188,7
Meso jabuke							
klorogenska kiselina	0,89	0,06	2511,7	2550	0,92	-0,34225	270,3
izomer klorogenske kiseline	0,06	0,08	1037,2	1234	0,32	-0,11	172,4
fenolna kiselina 1	0,18	-0,7	84,9	400	0,94	-0,11	36,5
fenolna kiselina 2	0,87	1,85	1093,2	1230	0,95	-0,0064	1250,0

Tablica 2. Konstante brzine reakcije I i II reda za proces adsorpcije polifenola iz jabuke na β -glukanu (mjerjenje 6 h za polifenole kore, 16 h za polifenole mesa jabuke)

Polifenoli	Reakcija prvog reda				Reakcija drugog reda		
	r^2	k_1 (h^{-1})	$q_{e,model}$ $mg\ g^{-1}$	$q_{e,eksperimentalno}$	r^2	k_2 $g\ h^{-1}mg^{-1}$	$q_{e,model}$ $mg\ g^{-1}$
Kora jabuke							
procijanidin B2	0,90	1,13	8844,9	7150	0,99	0,00017	10000
(-)-epikatehin	0,99	0,68	507,9	460	0,64	0,00073	625,0
floretin-2-glukozid	0,82	0,55	178,4	240	0,56	0,00134	333,3
kvercetin-3-galaktozid	0,54	0,62	952,6	1500	0,57	0,00025	2000
kvercetin-3-glukozid	0,11	-0,21	22,5	190	0,99	-0,086	119,0
derivat kvercetina 1	0,87	0,53	145,5	220	0,99	0,01019	227,3
derivat kvercetina 2	0,73	0,53	16,5	45	0,99	0,23011	44,4
kvercetin-3-ksilozid	0,89	0,89	442,9	545	0,98	0,00361	588,2
kvercetin-3-ramnozid	0,93	1,02	346,1	371	0,87	0,00202	454,5
Meso jabuke							
klorogenska kiselina	0,09	-0,08	699,6	2900	0,93	-0,0010	666,7
izomer klorogenske kiseline	0,06	-0,08	169,8	1200	0,99	-0,00563	625,0
fenolna kiselina 1	0,02	0,06	566,6	2010	0,99	-0,0018	1666,7
fenolna kiselina 2	0,01	0,03	224,9	3600	0,99	-0,00225	3333,3



Slika 27 Ovisnost q_e mjenog eksperimentalno o q_e određenog modelima a) pseudo prvog i b) pseudo drugog reda za eksperiment od 2 h (za sve polifenolne spojeve, osim fenolnih kiselina)



Slika 28 Ovisnost q_e mjenog eksperimentalno o q_e određeno modelima a) pseudo prvog i b) pseudo drugog reda za eksperiment od 6 h (za sve polifenolne spojeve, osim fenolnih kiselina)

5. RASPRAVA

U ovom radu provedena je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kore i mesa jabuke. Polifenolni spojevi identificirani su RP-HPLC metodom. Potom je provedena adsorpcija polifenola kore i mesa jabuke na β -glukanu u različitim vremenskim periodima unutar 2 h i 16 h (prvi i drugi eksperiment). Prije i nakon procesa adsorpcije polifenoli iz mesa i kore jabuke su identificirani i kvantificirani pomoću RP-HPLC metode. U eksperimentu procesa adsorpcije polifenola iz kore jabuke, primijećena je desorpcija nakon 6 h te su za modeliranje procesa adsorpcije uzeti u obzir samo rezultati unutar 6 h. U eksperimentu adsorpcije polifenola iz mesa jabuke, za modeliranje su uzeti podaci unutar 16 h. Eksperimentalni podaci dobiveni adsorpcijom modelirani su jednadžbama pseudo-prvo i pseudo-drugog reda.

Na **Slikama 9 i 10** su prikazani kromatogrami ekstrakta mesa i kore jabuke snimljenih na 280 nm s prikazom djelomično identificiranih polifenolnih spojeva, na **Slikama 11 i 12** njihovi spektri te na **Slikama 13 i 14** kromatogrami mesa i kore jabuke s dodanim polifenolnim standardima (spikiranje). U kori jabuke (**Slika 9**) su, prema vremenu zadržavanja, identificirani flavan-3-oli (procijanidin B2 i (-)-epikatehin), dihidrokalkon (florelin-2-glukozid) te flavonoli (kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-ramnozid). Spektri flavan-3-ola pokazuju karakterističan maksimum na 280 nm, a spektri dihidrokalkona na 285 nm (**Slika 11**). Spektri flavonola pokazuju dva karakteristična maksimuma na 250 – 260 nm te na 360 nm (**Slika 11**). Spektri ovih identificiranih spojeva odgovaraju spektrima standardnih spojeva. Nadalje, da bi se potvrdila točna identifikacija, provedeno je dodavanje standarda polifenola u ekstrakt kore (**Slika 13**). Vidljivo je preklapanje pikova standarda (vrhova standarda) s pikovima (vrhovima) u ekstraktima kore što potvrđuje identifikaciju spojeva. Dodatno, dva spoja (derivati kvercetina 1 i 2) prepoznati su kao flavonoli prema karakterističnom spektru (maksimuma na 250 – 260 nm te na 360 nm), ali su ostali neidentificirani. Spoj kvercetin-3-ksilozid djelomično je identificiran u usporedbi s literaturnim podacima (Jakobek i sur., 2013) i prema obliku spektra. Svi spomenuti polifenoli identificirani su u našem laboratoriju ranije prema vremenu zadržavanja, spektrima autentičnih standarda te spikiranjem s autentičnim standardima (Jakobek i sur., 2017). Identifikacija odgovara ranijim literaturnim podacima (Iacopini i sur., 2010).

U ekstraktu mesa jabuke identificirana je, prema vremenu zadržavanja, jedna fenolna kiselina: klorogenska kiselina (**Slika 10**). Spektar ove fenolne kiseline pokazuje maksimum apsorpcije na oko 330 nm te *vrh manjeg intenziteta* na 290 nm (**Slika 12**) i odgovara spektru standarda.

Dodatna potvrda identifikacije dobivena je dodavanjem standarda klorogenske kiseline u ekstrakt (spikiranje) (**Slika 14**). Dodatno su tri spoja prepoznata kao fenolne kiseline (izomer klorogenske kiseline te fenolna kiselina 1 i fenolna kiselina 2). Izomer klorogenske kiseline pokazuje spektar sličan spektru klorogenske kiseline s maksimumom apsorpcije na oko 330 nm te vrhom manjeg intenziteta na 290 nm (**Slika 12**) te je zbog toga prepoznat kao izomer, a spektri ostale dvije fenolne kiseline pokazuju maksimum apsorpcije na 310 do 320 nm što je karakteristika fenolnih kiselina (Jakobek i sur., 2013). Ove dvije kiseline su ostale neidentificirane. Identifikacija odgovara ranijim istraživanjima provedenim na jabukama (Iacopini i sur., 2010).

Slika 15, Slika 16, Slika 17 i Slika 18 prikazuju ovisnost adsorpcijskog kapaciteta o vremenu adsorpcije (q_t o t) za polifenolne spojeve iz kore i mesa jabuke. Prvi eksperiment uključivao je praćenje adsorpcije unutar perioda od 2 h (**Slika 15 a**), (**Slika 16 a**), (**Slika 17 a**) i (**Slika 18 a**)). Postoji razlika u adsorpciji polifenolnih spojeva jabuke unutar 2h. U skupini flavan-3-ola procijanidin B2 pokazuje veći adsorpcijski kapacitet u odnosu na (-)-epikatehin. Redoslijed adsorpcijskog kapaciteta za skupinu flavonola je sljedeći: kvercetin-3-galaktozid > kvercetin-3-ksilozid > kvercetin-3-ramnozid > derivat kvercetina 1 > kvercetin-3-glukozid > derivat kvercetina 2. Adsorpcija dihidrokalkona floretin-2-glukozida slična je adsorpciji nekih flavonola. Kod polifenola mesa jabuke, najveća adsorpcija na početku procesa je zabilježena za klorogensku kiselinu i izomer klorogenske kiseline, a onda ih slijede neidentificirani spojevi-fenolna kiselina 1 i fenolna kiselina 2. No nakon početne adsorpcije, adsorpcijski kapacitet opada te ulazi u ravnotežu unutar 2 h. Nakon 2 h, redoslijed adsorpcijskog kapaciteta β -glukana za fenolne kiseline je sljedeći: fenolna kiselina 2 > klorogenska kiselina, izomer klorogenske kiseline, fenolna kiselina 1.

Drugi eksperiment adsorpcije proveden je u različitim vremenskim periodima unutar 16 h. Za polifenole kore jabuke primijećena je desorpcija nakon 6 h te su stoga rezultati ovisnosti q_t o t prikazani samo unutar 6 h jer je u tom periodu postignuto ravnotežno stanje (**Slike 15 b**), (**16 b**), (**17 b**)). Između flavan-3-ola, procijanidin B2 ponovo je pokazao veći adsorpcijski kapacitet od (-)-epikatehina, a između flavonola redoslijed adsorpcijskog kapaciteta bio je: kvercetin-3-galaktozid > kvercetin-3-ksilozid > kvercetin-3 ramnozid > derivat kvercetina 1 > kvercetin-3-glukozid > derivat kvercetina 2. Adsorpcija dihidrokalkona floretin-2-glukozida slična je adsorpciji nekih flavonola. Adsorpcija polifenola mesa jabuke prikazana je unutar 16 h jer u

tom vremenu nije primijećena desorpcija i adsorpcija polifenola postigla je ravnotežno stanje (**Slika 18 b**)). Između fenolnih kiselina u najvećoj količini se adsorbira fenolna kiselina 2, a slijede ju fenolna kiselina 1, klorogenska kiselina i izomer klorogenske kiseline. Najbrža adsorpcija dogodila se unutar 2 h.

Slike 19 a) do 26 a) prikazuju dijagrame linearne ovisnosti $\ln(q_e - q_t)$ o vremenu t za reakcije pseudo-prvog reda, a **Slike 19 b) do 26 b)** dijagrame linearne ovisnosti t/q_t o t za reakcije pseudo-drugog reda. Slaganje eksperimentalnih podataka s modelima prikazano je izračunavanjem koeficijenta determinacije r^2 , izračunate su konstante brzine reakcije prvog i drugog reda (k_1 i k_2) te maksimalni adsorpcijski kapaciteti prema linearnim modelima ($q_{e,model}$). Ovi podaci (r^2 , k_1 , k_2 te $q_{e,model}$ modela) prikazani su u **Tablici 1** i **Tablici 2**.

U eksperimentu provedenom unutar 2 h, vidljiva je razlika u koeficijentu determinacije (r^2) koji opisuje slaganje modela s eksperimentalnim vrijednostima (**Tablica 1**). R^2 je općenito manji za reakcije pseudo-prvog reda (flavan-3-oli 0,39 – 0,68; dihidrokalkon 0,61; flavonoli 0,53 – 0,77; fenolne kiseline 0,06 – 0,89) nego za reakcije drugog reda (flavan-3-oli 0,79 – 0,90; dihidrokalkon 0,96; flavonoli 0,79 – 0,98 izuzetak je kvercetin-3-glukozid za kojeg je r^2 bio 0,32; fenolne kiseline 0,32 – 0,95). Sličan rezultat vidljiv je i u eksperimentu provedenom 6 h (16 za fenolne kiseline) (**Tablica 2**). R^2 je općenito manji za reakcije pseudo-prvog reda (flavonoli 0,11 – 0,93; fenolne kiseline 0,01 – 0,09) nego za reakcije pseudo-drugog reda (flavonoli 0,57 – 0,99; fenolne kiseline 0,93 – 0,99). Dihidrokalkonu floretin-2-glukozidu i flavan-3-olu (-)-epikatehinu bolje odgovara reakcija pseudo-prvog reda (r^2 redosljedom 0,82 i 0,99) nego pseudo-drugog reda (r^2 redosljedom 0,56 i 0,64). Prema tome, može se reći da se kinetika adsorpcije polifenola iz jabuke može općenito bolje opisati reakcijama pseudo-drugog reda. Izuzetak mogu biti dihidrokalkoni i (-)-epikatehin. Kinetika pseudo-drugog reda potvrđena je i ranijim istraživanjem (Marsal i sur., 2012).

Nadalje, vidljiv je vrlo nizak r^2 za fenolne kiseline, posebno za reakcije pseudo-prvog reda (**Tablica 2**) što bi moglo značiti da za kinetiku fenolnih kiselina na β -glukan ne odgovaraju jednadžbe pseudo-prvog niti pseudo-drugog reda.

Uspoređene su i vrijednosti q_e dobivene eksperimentalno i q_e izračunate modelima za sve polifenole, osim fenolnih kiselina. Rezultati za q_e vrijednosti dobivene modelima pseudo-drugog reda bolje odgovaraju q_e vrijednostima dobivenim eksperimentalno što također potvrđuje bolje opisivanje adsorpcije pseudo-drugim redom (**Tablica 1** i **Tablica 2**). Ovisnost

$q_{e,eksperimentalno}$ o $q_{e,model}$ prikazana je i na **Slici 27** i **Slici 28**. Vidljiva je bolja korelacija $q_{e,eksperimentalno}$ s $q_{e,model}$ za model pseudo-drugog reda.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi provedenog kinetičkog ispitivanja procesa adsorpcije polifenola iz mesa i kore jabuke na β -glukanu, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Djelomično su identificirani sljedeći polifenoli:
 - U kori: flavan-3-oli (procijanidin B2 i (-)-epikatehin), dihidrokalkon (florelin-2-glukozid), flavonoli (kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-ramnozid, derivat kvercetina 1, derivat kvercetina 2, kvercetin-3-ksilozid)
 - U mesu: fenolne kiseline (klorogenska kiselina, izomer klorogenske kiseline, fenolna kiselina 1 i fenolna kiselina 2).
- U eksperimentu adsorpcije polifenola kore jabuke, primijećena je desorpcija nakon 6 h reakcije. Polifenoli mesa jabuke postigli su ravnotežu nakon 16 h.
- Adsorpcijski kapaciteti polifenola iz kore jabuke razlikovali su se. Između flavan-3-ola, procijanidin B2 je pokazao veći adsorpcijski kapacitet od (-)-epikatehina. Redoslijed adsorpcijskog kapaciteta za skupinu flavonola bio je sljedeći: kvercetin-3-galaktozid > kvercetin-3-ksilozid > kvercetin-3-ramnozid > derivat kvercetina 1 > kvercetin-3-glukozid > derivat kvercetina 2. Adsorpcija dihidrokalkona florelin-2-glukozida slična je adsorpciji nekih flavonola.
- Adsorpcijski kapaciteti polifenola iz mesa jabuke također su se razlikovali. Redoslijed adsorpcijskog kapaciteta β -glukana za polifenole mesa (fenolne kiseline) bio je sljedeći: fenolna kiselina 2 > klorogenska kiselina, izomer klorogenske kiseline, fenolna kiselina 1.
- Prema r^2 kinetičkog modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, može se reći da se kinetika adsorpcije polifenola iz kore jabuke može općenito bolje opisati reakcijama pseudo-drugog reda. Izuzetak mogu biti dihidrokalkoni i (-)-epikatehin. Rezultati za q_e vrijednosti dobivene modelima pseudo-drugog reda bolje odgovaraju q_e vrijednostima dobivenim eksperimentalno
- Vidljiv je vrlo nizak r^2 za fenolne kiseline, posebno za reakcije pseudo-prvog reda što bi moglo značiti da za kinetiku fenolnih kiselina na β -glukan ne odgovaraju jednadžbe pseudo-prvog niti pseudo-drugog reda.

7. LITERATURA

Alshameri A, Hongping H, Jianxi Z, Yunfei X, Runliang Z, Lingya M, Tao Q: Adsorption of ammonium by different natural clay minerals: Characterization, kinetics and adsorption isotherms. *Applied Clay Science* 159:83-93, 2018.

Brdička R: *Osnove fizikalne kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1969.

El Khoury D, Cuda C, Luhovyy BL, Anderson GH: Beta Glucan: Health benefits in obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*: 1-28, 2012.

Iacopini P, Camangi F, Stefani A, Sebastiani L: Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus x domestica* Borkh. In a peroxynitrite-induced oxidative process. *Journal of Food Composition and Analysis* 23:518-524, 2010.

Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2007.

Jakobek L, Matić P: Non-covalent dietary fiber-polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology* 83: 235-247, 2019.

Jakobek L, Matić P, Krešić V, Barron AR: Adsorption of Apple Polyphenols onto β -Glucan. *Czech Journal of Food Science* 35: 476-482, 2017.

Jakobek L, Garcia-Villalba R, Tomas-Barberan FA: Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *Journal of Food Composition and Analysis* 31:199-211, 2013.

Laroche C, Michaud P: New developments and prospective applications for β (1,3) glucans. *Recent Patents on Biotechnology* 1: 59 - 73, 2007.

Marsal A, Maldonado F, Cuadros S, Bautista ME, Manich AM: Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of polyphenols onto tannery shavings. *Chemical Engineering Journal* 183: 21 - 29, 2012.

Plazinski W, Rudzinski W, Plazinska A: Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: a review. *Advances in Colloid and Interface Science* 152: 2 - 13, 2009.

Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar G. A: The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76:R6-R15, 2011.

Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi SG, Ayala-Zavala JF, Bello-Perez LA, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa LA, González-Córdova AF, González-Aguilar GA: Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food Function*, 5: 1063 – 1072, 2014.

Wang Y, Liu J, Chen F, Zhao G: Effects of Molecular Structure of Polyphenols on Their Noncovalent Interactions with Oat β -glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 4533-4538, 2013.

Web 1: <https://supplementsinreview.com/immune/beta-glucan-immune/> (24.03.2019)

Web 2: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/c/chloroqenic-acid.html> (30.04.2019)

Web 3: http://www.knapsackfamily.com/knapsack_jsp/information.jsp?word=C00000990 (30.04.2019)

Web 4: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-epicatechin_fig1_225187187 (30.04.2019)

Web 5: <https://www.jyi.org/2009-april/2017/10/15/a-review-of-quercetin-chemistry-antioxidant-properties-and-bioavailability> (30.04.2019)

Web 6 : https://en.wikipedia.org/wiki/Procyanidin_B2 (03.06.2019)