Određivanje elektrokinetičkog potencijala kafeinske kiseline, ß-glukana i modela kafeinske kiseline - ß-glukan

Ivkić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:508366

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek







SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ana Ivkić

ODREĐIVANJE ELEKTROKINETIČKOG POTENCIJALA KAFEINSKE KISELINE, *β* – GLUKANA I MODELA KAFEINSKE KISELINE - *β* – GLUKAN

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2020.

Ana Ivkić

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 18, 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 2019./2020. održanoj 25. lipnja 2020.
Mentor: *dr. sc. Ivana Tomac, znan.sur.*
Komentor: *prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron*

ODREĐIVANJE ELEKTROKINETIČKOG POTENCIJALA KAFEINSKE KISELINE, *β* – GLUKANA I MODELA KAFEINSKE KISELINE - *β* – GLUKAN

Ana Ivkić, 0113137902

Sažetak: Kafeinska kiselina je polifenolni spoj. Prema klasifikaciji polifenolnih spojeva ubraja se u hidroksicimetne kiseline. *β*-glukan je polisaharid koji se ubraja u skupinu topljivih vlakana. Elektrokinetički potencijal još se naziva i zeta-potencijal predstavlja fizikalno svojstvo na površini makromolekule ili materijala. Odnosno, zeta-potencijal je potencijal na udaljenosti plohe smicanja. Poznavanje zeta-potencijala omogućuje predviđanje dugoročnog najstabilnijeg ponašanja neke makromolekule. Stabilnost neke makromolekule ili materijala ovisi o zeta-potencijalu i naboju na površini te makromolekule ili materijala. Prema tome, zadatak ovog diplomskog rada je odrediti zeta-potencijal otopine kafeinske kiseline, otopine *β*-glukana i modela kafeinske kiseline i *β*-glukana kroz različiti koncentracijski raspon, a s ciljem predviđanja najstabilnijeg ponašanja modela kafeinske kiseline i *β*-glukana pri različitim pH vrijednostima. Najstabilnije ponašanje ispitanog modela kafeinske kiseline i *β*-glukana pokazalo se u pH 10.

Ključne riječi: kafeinska kiselina, zeta-potencijal, *β*-glukan, UV/Vis spektar

Rad sadrži: 30 stranica
12 slika
2 tablica
0 priloga
32 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

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

1.	doc. dr. sc. Valentina Bušić	predsjednik
2.	dr.sc. Ivana Tomac, znan. sur.	član-mentor
3.	prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron	član - komentor
4.	prof. dr. sc. Ivica Strelec	zamjena člana

Datum obrane:

Rad je tiskan i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnicu Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, 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 18, 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. 8 held on July 25, 2020.
Supervisor: *Ivana Tomac,* PhD
Co-supervisor: Lidija Jakobek Barron, PhD, prof.

Determination of Electrokinetic Potential of Caffeic Acid, *β* – Glucan and Caffeic Acid - *β* – Glucan Model

Ana Ivkić, 0113137902

Summary: Caffeic acid is a polyphenolic compound. According to the classification of polyphenolic compounds, it is considered a hydroxycinnamic acid. *β*-glucan is a polysaccharide that belongs to the group of soluble fibers. The electrokinetic potential is also called and the zeta potential represents a physical property on the surface of a macromolecule or material. That is, the zeta potential is the potential at the distance of the shear surface. Knowing the zeta potential makes it possible to predict the long-term most stable behavior of a macromolecule. The stability of a macromolecule or material depends on the zeta potential and charge on the surface of that macromolecule or material. Therefore, the task of this thesis is to determine the zeta potential of caffeic acid solution, *β*-glucan solution and caffeic acid and *β*-glucan models through different concentration range, with the aim of predicting the most stable behavior of caffeic acid and *β*-glucan models at different pH values. The most stable behaviour of the tested model of caffeic acid and β-glucan was shown in pH 10.

Keywords: caffeic acid, zeta potenctial, *β*-glucan, UV/Vis spectar

Thesis contains:
30 pages
12 Figures
2 Table
0 Supplements
32 Refrences

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis in deposited in Library of the Paculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhačića 18, Osijek.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. UV/Vis spektroskopija 4

2.2. Elektrokinetički potencijal 5

2.3. *β*-glukan 9

2.4. Kafeinska kiselina 10

3. EKSPERIMENTALNI DIO 12

3.1. Zadatak rada 13

3.2. Materijali i metode 13

3.2.1. Kemikalije 13

3.2.2. Priprema otopina 13

3.2.3. UV/Vis Spektar 14

3.2.4. Zeta-potencijal 14

4. REZULTATI 16

4.1. UV/Vis spektar 17

4.1.1. UV/Vis spektri kafeinske kiseline 17

4.1.2. UV/Vis spektri modela kafeinske kiseline i *β*-glukana 18

4.2. Zeta-potencijal otopine kafeinske kiseline, *β*-glukana i modela kafeinske kiseline i *β*-glukana 19

5. RASPRAVA 21

6. ZAKLJUČAK 25

7. LITERATURA 27

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

1. UVOD

Elektrokinetičke pojave su pojave koje se sastoje od dvije faze koje se jedna prema drugoj relativno gibaju. Posljedica gibanja je nastajanje električnog polja, odnosno nastaje relativno gibanje jedne faze prema drugoj. Elektrokinetičke pojave pojavljuju se u četiri oblika: potencijal strujanja, elektroforetski odnosno sedimentacijski ili Dornov potencijal, elektroosmoza i elektroforeza. Zeta-potencijal ili kinetički potencijal definira se kao potencijal na plohi smicanja odnosno jednak je ukupnom padu napona u difuznom dvosloju. Vrijednost zeta-potencijala daje informaciju o stabilnosti sustava, odnosno zeta-potencijal se može primijeniti na praćenje naboja površine, kao pokazatelj interakcije između otopljenih tvari sadržanih u vodenoj otopini i čvrste površine (Luxbacher i sur., 2016).

UV/Vis spektrofotometrija je metoda koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva. Apsorpcijski spektar daje informacije o spoju kao što su prisutne funkcionalne skupine unutar ispitane molekule te se upotrebljava kao pomoć pri identifikaciji spojeva.

β-glukan je dugolančani polisaharid izgrađen od više molekula glukoze, koje su međusobno povezane *β*-1,3-glikozidnim vezama ili *β*-1,4-glikozidnim vezama (Lazaridou i Biliaderis, 2007). Ubraja se u skupinu prehrambenih vlakana. Izvor *β*-glukana su žitarice kao što su zob, ječam, zatim gljive, biljke.

Kafeinska kiselina je (3,4 - dihidroksicimetna kiselina) je organski spoj iz skupine hidroksicimetnih kiselina. Izvori kafeinske kiseline su eukaliptus, slatkovodne paprati, gljive, kava, arganovo ulje, timijan, kadulja, metvica, cimet i slično.

Slijedom navedenog, zadatak ovog diplomskog rada je odrediti zeta-potencijal otopine kafeinske kiseline, otopine *β*-glukana i modela kafeinske kiseline i *β*-glukana kroz različiti koncentracijski raspon, a s ciljem predviđanja najstabilnijeg ponašanja modela kafeinske kiseline i *β*-glukana pri različitim pH vrijednostima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. UV/Vis spektroskopija

UV/Vis spektrofotometrija je metoda koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva. UV područje obuhvaća 100 do 380 nm, a Vis područje obuhvaća 380 do 800 nm. Različite molekule apsorbiraju zračenje različitih valnih duljina, pa tako organske molekule apsorbiraju u ultraljubičastom i vidljivom području što omogućuje njihovu kvalitativnu analizu. Pri kvantitativnoj analizi važan je odabir valne duljine, a mjerenje se provodi u apsorpcijskom maksimumu. Bira se valna duljina pri kojoj nema interferencija od drugih tvari koje su prisutne u uzorku. Otapalo u kojem je uzorak otopljen ne smije aporbirati jednako UV područje kao i uzorak. Moguće je primijeniti bilo koju valnu duljinu na koju spoj apsorbira, ali je najbolje odabrati onu koja pokazuje najstrmiju baždarnu krivulju. Koncentracija tvari prikazuje se u ovisnosti o apsorbanciji, *A* na odabranoj valnoj duljini pri čemu se dobije kalibracijska krivulja ili pravac.

Primjenom kvalitativne analize UV/VIS spektri ne pokazuju dovoljno finu strukturu pa se koriste zajedno s podatcima dobivenih od masenih spektara, IR spektara ili NMR (Jakobek, 2017; Skoog i sur. 1999).

Odnosno, apsorpcijski spektar pokazuje broj apsorpcijskih vrpci odgovornih za strukturne skupine u molekuli, UV/Vis spektar nastaje snimanjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini. UV/VIS spektar ima široke pikove.

UV/VIS spektar (apsorpcijski spektar) daje određene informacije o spoju kao što su vrste funkcionalnih skupina u molekuli. Primjenjuje se kao pomoć u identifikaciji, ali se za potpunu identifikaciju treba upotrijebiti u kombinaciji s drugom tehnikama (IR, MS).

Kromofor je jedinica u molekuli odgovorna za apsorpciju elektromagnetskog zračenja (najčešće C=C i C=O). Spektrofotometar je uređaj za analizu spektara elektromagnetskog zračenja, a sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora.

Primjenom UV/Vis spektroskopije je ograničena identifikacija spojeva, ali je tehnika pogodna za kvantitativnu analizu otopina. Također jedan od nedostataka su široki signali, te se teško razlučuju dva pika koja su blizu (Jakobek, 2017; Skoog i sur., 1999).

2.2. Elektrokinetički potencijal

Elektrokinetički potencijal ili zeta-potencijal je termin za pojavu u međupovršini na kliznoj plohi koja razdvaja pokretni dio električnoga međupovršinskog sloja i ostatka otopine (**Tablica 1**). Elektrokinetički potencijal sastoji se od dvije faze koje se jedna prema drugoj relativno gibaju uslijed čega se pojavljuje električno polje (Kirby, 2010). U električnom polju koje je paralelno između granica jedne i druge faze pojavljuje se relativno gibanje jedne faze prema drugoj. Elektrokinetički potencijal čestica određuje se eksperimentalno iz pokretljivosti čestica u vanjskome električnom polju ili iz razlike potencijala koji se pojavljuje uslijed strujanja otopine uz nabijene površine. Elektrokinetički efekti koji nastaju zbog električnog polja su:

1. potencijal strujanja,
2. elektroforetski odnosno sedimentacijski ili Dornov potencijal,
3. elektroosmoza i
4. elektroforeza (Potter, 1968).

Tablica 1. Zeta-potencijal u odnosu na stabilnost i ponašanje koloida (Kirby, 2010)

ZETA-POTENCIJAL [mV]	STABILNOST I PONAŠANJE
0 - ± 5	brza koagulacija ili flokulacija
± 10 - ± 30	početna nestabilnost
±30 - ± 40	srednja stabilnost
± 40 - ± 60	dobra stabilnost
Više od ± 61	odlična stabilnost

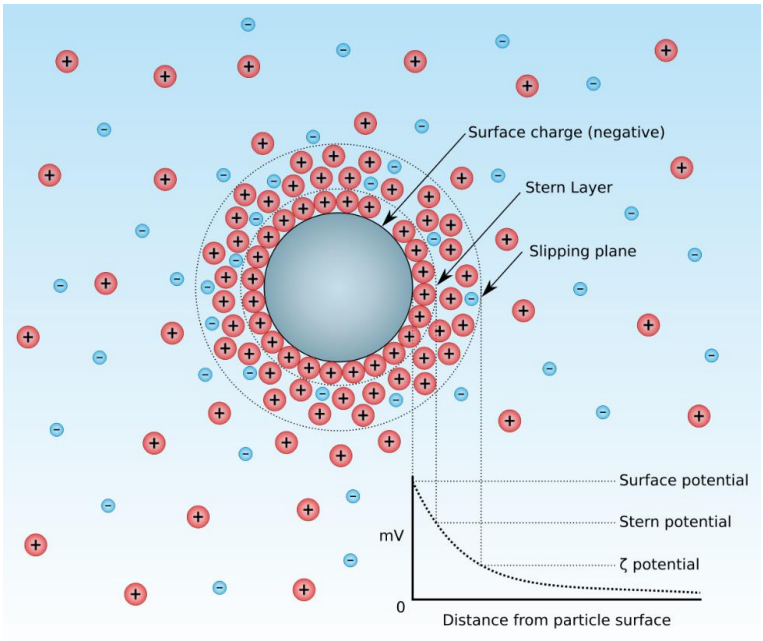
Potencijal strujanja je razlika potencijala između krajeva uske cijevi kroz koju struji elektrolit. Strujanje tekuće faze preko površine čvrste faze s formiranjem elektrokemijskog dvosloja rezultira nastankom električnog polja paralelnog smjera strujanja.

Elektroforetski potencijal još se naziva i sedimentacijski potencijal ili Dorov potencijal, a definira se kao razlika potencijala koji nastaje uslijed gibanja suspendiranih čvrstih čestica kroz tekuću fazu koja miruje i rezultira nastanku električnog polja paralelnog smjeru kretanja čestica.

Elektroosmoza nastaje ako se duž uske cijevi narine razlika potencijala te se pod djelovanjem električnog polja tekuća faza giba preko čvrste podloge.

Elektroforeza predstavlja putovanje čestica pod utjecajem električnog polja uspostavljenog duž mirujućeg tekućeg medija u koji su suspendirane čvrste čestice, rezultira nastajanjem dvosloja i mehaničke sile koja uzrokuje ovo gibanje (Jakobek Barron, 2017; Metkoš-Huković i Martinez, 2000; Piljac, 2006).

Drugi naziv za zeta-potencijal je elektrokinetički potencijal i označava se grčim slovom *ζ*. Zeta-potencijal definira se kao potencijal na plohi smicanja odnosno jednak je ukupnom padu napona u difuznom dijelu dvosloja. Na nastanak elektrokemijskog dvosloja između dvije vodljive faze utječe specifična adsorpcija kationa ili aniona iz otopine na čvrstu površinu, a višak naboja neutraliziran je difuznim slojem iona suprotnog naboja u elektrolitu. Isto tako, elektrokemijski dvosloj može nastati i kao posljedica adsorpcije iona nastalih slabom elektrolitičkom disocijacijom ili zbog orijentacije dipola polarnih molekula tekućeg medija uz čvrstu površinu. Zeta-potencijal je prikazan **Slikom 1.**



Slika 1. Prikaz zeta-potencijala (WEB 1)

Na **Slici 1.** prikazan je električni dvosloj (1) Helmhotz, (2) Gouy-Chapman i (x) Stern. Kod Sternovog modela nastanak elektrokemijskog dvosloja neposredno uz površinu čvrste faze nalazi se Helmholtzov ili Sternov sloj iona koje čvrsto uz površinu drže elektrostatičke privlačne sile i specifične adsorpcijske sile (Van der Waalsovo međudjelovanje i kemijska veza). Debljina tog sloja u kojem je razlika potencijala prema čvrstoj površini naglo linearna raste jednaka je ionskom radijusu adsorbiranih iona. Ovaj sloj se nadovezuje na Gouy-Chapmanov sloj u kojem na ione djeluju elektrostatičke sile i termičko gibanje molekula koje se u konačnici oblikuje difuznu atmosferu s nabojem suprotnim naboju električne površine. Pri relativnom gibanju tekućine uz čvrstu površinu Sternov sloj i do Gouy-Chapmanova sloja ostaju relativno nepomični na površini te se unutar Gouy-Chapamnova sloja javlja ploha smicanja molekula koja struji u odnosu na nepomične molekule, što predstavlja zeta-potencijal. Općenito elektrokinetičke pojave uključujući i zeta-potencijal ovise o debljini tog dvosloja i prikazan je **Jednadžbom 1:**

$$L = \left(\frac{\varepsilon \varepsilon_o R T}{2 C^o F^2 Z^2}\right)^{1/2}$$

gdje su:

L – debljina dvosloja (m),

C_o – koncentracija iona (mol m^{-3}),

F – Faradayeva konstanta (96500 C mol^{-1}),

R – opća plinska konstanta (8,314 J mol^{-1} K^{-1}),

T – termodinamička temperatura (K),

z- oksidacijski stupanj iona,

ε - dielektrična konstanta materijala između slojeva naboja i

ε_0 – dielektrična konstanta vakuuma (8,85 x 10^{12} F m^{-1}) (Hunter, 1981).

Iz **Jednadžbe 1.** uočava se kako je debljina dvosloja obrnuto proporcionalna korijenu koncentracije. Zeta-potencijal se može definirati kao potencijal na plohi smicanja (**Jednadžba 2**):

$$\zeta = \frac{4\pi\sigma x - 1}{\varepsilon}$$

gdje je:

σ – naboj po jedinici površine (Hunter, 1981; Sze i sur., 2003).

Razmak x^{-1} opada porastom koncentracije i valencije iona te s opadanjem udaljenosti x^{-1} i specifičnog naboja σ opada i zeta-potencijal. Porastom koncentracije otopine opada zeta-potencijal. Ako zeta-potencijal iznosi nula tada je došlo do nestanka Gouy-Chapmanova sloja. Ovaj sloj može ponovo nastati ako su u otopini prisutni ioni koji se specifično adsorbiraju na čvrstoj površini i porastom koncentracije elektrolita javlja se zeta-potencijal suprotnog predznaka (Jakobek Barron, 2017; Metikoš Huković i Martinez, 2000; Piljac, 2006).

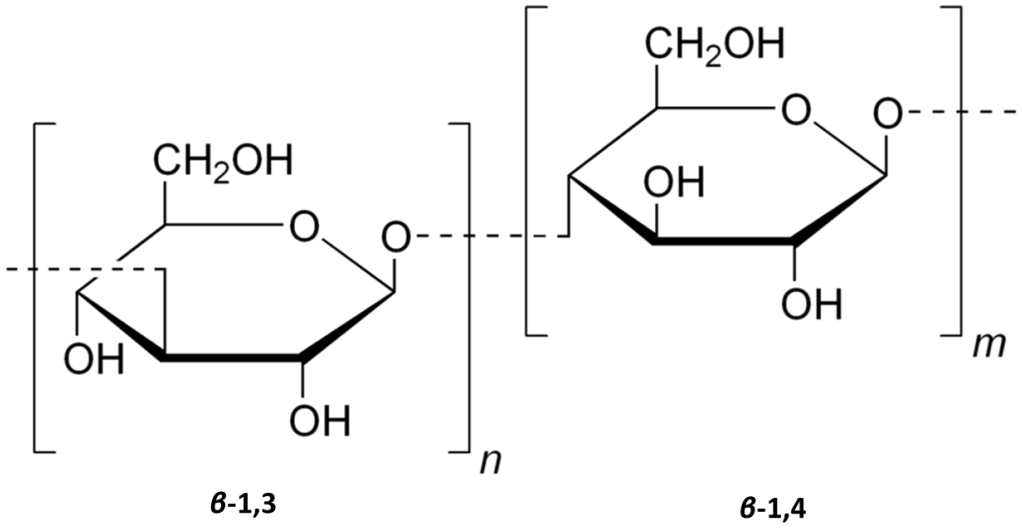
Raspon vrijednosti zeta-potencijala u odnosu na stabilnost i ponašanje koloida prikazan je **Tablicom 1.** Ove vrijednosti zeta-potencijala daju informacije o stabilnosti sustava odnosno zeta-potencijal se može primijeniti za praćenja naboja površine, kao pokazatelj interakcije između otopljenih tvari sadržanih u vodenoj otopini i čvrstih površina (Luxbacher i sur., 2016).

Faktori koji utječu na zeta-potencijal su:

1. pH vrijednost medija: u vodenom mediju, pH uzorka je jedan od najvažnijih faktora koji utječe na zeta-potencijal. Ukoliko se na molekulu koja ima negativan zeta-potencijal daje lužina, molekula će nastojati postići negativniji naboj i bit će negativna vrijednost zeta-potencijala. Međutim, ako se doda kiselina u otopinu, doći će do neutralizacije naboja molekule. Daljnjim dodavanjem kiseline povećat će se pozitivan naboj molekule i porast će vrijednost zeta-potencijala. Točka u kojoj je zeta-potencijal jednak nuli, naziva se izoelektrična točka i smatra se da je tada sustav najnestabilniji jer ima naboj nula (neutralan), odnosno molekula se može taložiti (Web 1).
2. Provodnost: debljina dvosloja makromolekule ovisi o koncentraciji iona u otopini i može se izračunati pomoću ionizacijske snage medija (Hunter, 1981).
3. Koncentracija: utječe na zeta-potencijal jer daje informacije kako kreirati model maksimalne stabilnosti (Hunter, 1981; Salopek i sur., 1992).

2.3. *β*-glukan

β-glukan je dugolančani polisaharid izgrađen od više jedinica glukoze, koje su međusobno povezane *β*-1,3 glikozidnim vezama ili *β*-1,4 vezama (Lazaridou i Biliaderis, 2007). Ubraja se u skupinu prehrambenih vlakana. Prehrambena vlakna su velika skupina spojeva koja se ne probavljaju niti apsorbiraju u tankom crijevu dok u debelom crijevu može doći do djelomične ili potpune fermentacije. Struktura *β*-glukana prikazna je **Slikom 2.**



Slika 2. Struktura *β*-glukana (WEB 1)

Izvor *β*-glukana su žitarice poput ječma, zobi i pšenice, a nalazi se u vanjskom sloju omotača zrna žitarica, odnosno u njegovom aleuronskom i subaleuronskom sloju. Ječam sadrži od 5 do 11% *β*-glukana, zob od 3 do 7% *β*-glukana dok pšenica sadrži svega 1% *β*-glukan (Bai i sur., 2019). Osim u žitaricama *β*-glukan može se pronaći i u različitim vrstama gljiva (Reiši gljiva, Maitake gljiva, Antrodia gljiva i Šitake gljiva), ali u pivskom kvascu, šećernoj trsci, raži, kukuruzu te nekim vrstama baterija, algama i plijesni (Krpan, 2010; Mason, 2001). *β*-glukan ulazi u interkaciju s polifenolima za koje je važna kemijska struktura polifenola, temperatura i pH vrijednost (Wang i sur., 2013).

Uporaba *β*-glukana je u biomedicinskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Značajna uloga *β*-glukana u prehrambenoj industriji odnosi se na korištenje *β*-glukana kao zgušnjivača, emulgatora te kao nadomjestak za masti (Krpan, 2010). Nadalje, *β*-glukan se može pronaći i u gotovim proizvodima odnosno u žitaricama za doručak,

pekarskim, mliječnim i mesnim proizvodima, desertima, umacima i slično (Havrlentova i sur, 2011). Hrana koja u svom sastavu sadrži *β*-glukan ubraja se u skupinu funkcionalne hrane jer njezin sastav i namjena imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje i smanjuju rizik od raznih bolesti (Limberger-Bayer i sur., 2014).

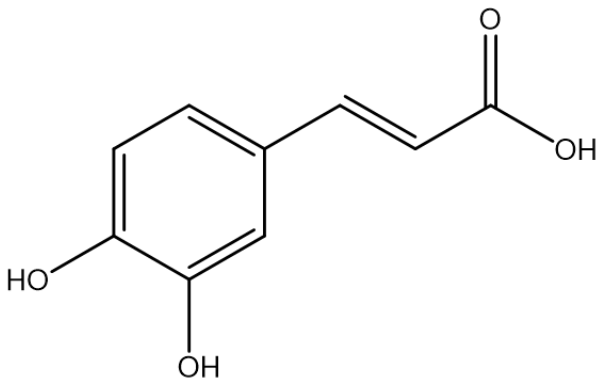
Epidemiološka istraživanja o *β*-glukanu koja su provedena s ciljem ispitivanja utjecaja *β*-glukana na zdravlje ljudi pokazala su pozitivan antibakterijski, antitumorni, imunomodulatorni i radioprotektivni utjecaj (Petravić i sur., 2010; Havrlentova i sur., 2011; Bai i sur., 2019).

Brojna istraživanja pokazala su da *β*-glukan pozitivno djeluje u kombinaciji s drugim komponentama hrane. Posebno se ističe sinergijsko djelovanje *β*-glukana s vitaminom C za kojeg se ustanovilo da stimulira iste imunosne odgovore kao i *β*-glukan (Vetvicka, 2011).

2.4. Kafeinska kiselina

Kafeinska kiselina (3,4 - dihidroksicimetna kiselina) je organski spoj iz skupine hidroksicimetnih i fenolnih kiselina molekularne formule $C_9H_8O_4$ prikazana **Slikom 3.** Kafeinska kiselina ima sljedeće karakteristike:

- žute je boje,
- tvar je u čvrstom stanju,
- sastoji se od dva fenola i akrilne funkcionalne skupine.



Slika 3. Struktura kafeinske kiseline

Široko je rasprostranjena u biljnim tkivima jer je njihov sekundarni metabolit. Prisutna je hrani, prvenstveno u kavi, borovnicama, jabukama i jabukovači i propolisu (Magnani i sur., 2014). Nadalje, pirodni izvori kafeinske kiseline su eukaliptus (lat. *Eucalyptus globulus*), slatkovodne paprati *(*lat. *Salvinia molesta*), gljive *(*lat. *Phellinus linteus),* kava, arganovo ulje, u nekim travama poput timjana, kadulje i metvice, u začinima poput cimeta, u sjemenkama suncokreta, u crvenom vinu, u soku od šljive, američka crna divlja trešnja, brusnice, ječam i raž. Izvori kafeinske kiseline prikazani su **Tablicom 2.**

Tablica 2. Izvori kafeinske kiseline (mg/100g) (WEB 3)

IZVOR KAFEINSKE KISELINE	**PRISUTNOST (mg/100g)**
Timjan, kadulja i metvica	20 mg/100 g
Cimet	22 mg/100 g
Sjemenke suncokreta	8 mg/100 g
Crveno vino	1,88 mg/100 ml
Sok od jabuke, marelice i šljive	oko 1 mg/100 ml
Američka crna divlja šljiva	141 mg/100 g
Brusnica	6 mg/100 g

Epidemiološka istraživanja o djelovanju kafeinske kiseline na ljudsko zdravlje pokazala su antibakterijski i antiradikalni učinak (Choudhary i sur, 2008). Također, pokazala su potencijalni antikancerogeni i antiupalni učinak (Touaibia i sur., 2011), potencijalnu zaštitu od ateroskleroze i drugih kardiovaskularnih bolesti (Magnani i sur., 2014).

Kafeinska kiselina je biološki aktivna sastavnica propolisa koja potencijalno pokazuje antioksidativna, protuupalna, antiproliferativna, citostatska, antiangiogena i antineoplastična svojstva (Choudhary i sur, 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadatak ovog diplomskog rada je bio:

- odrediti zeta-potencijal:

  a) otopine kafeinske kiseline,

  b) otopine *β*-glukana te

  c) modela kafeinske kiseline i *β*-glukana

  kroz različit koncentracijski raspon i

- odrediti najstabilnije ponašanje modela otopine kafeinske kiseline i *β*-glukana pri različitim pH vrijednostima.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kemikalije

Kafeinska kiselina, *β*-glukan, fosfatni pufer, karbonatni pufer, HCl/KCl pufer, ultračista voda.

3.2.2. Priprema otopina

Pripremila se otopina kafeinske kiseline koncentracije 1300 mg L^{-1} u 100 % metanolu. Radne koncentracije kafeinske kiseline bile su u rasponu od 25 do 150 mg L^{-1}, a pripremale su se razrjeđenjem u odgovarajućoj otopini pufera. Upotrijebljeni puferi bili su fosfatni puferi pH vrijednosti 5,5 i 7,5, zatim karbonatno-bikarbonatni puferi pH vrijednosti 10 i HCl/KCl pH vrijednosti 1,5. Svi puferi bili su koncentracije 0,1 mol L^{-1}.

Otopina *β*-glukana, koncentracije 190 mg L^{-1}, pripremljena u ultračistoj vodi. Upotrijebljena koncentracija otopine *β*-glukana za provođenje ispitivanja u ovom radu bila je 5 mg L^{-1}.

3.2.3. UV/Vis Spektar

UV-1280 spektrofotometar tvrtke Shimadzu, koristio se za snimanje UV/Vis spektra pripremljenih otopina kafeinske kiseline i beta glukana u rasponu valnih duljina od 200 nm do 700 nm (**Slika 4.).**



Slika 4. UV-1280 spektrofotometar

3.2.4. Zeta-potencijal

Određivanje zeta-potencijala provedeno je na uređaju Zetasizer 2000 (Malvern Instrument) na sobnoj temperaturi od 25 °C u kapilarnoj potočnoj ćeliji (**Slika 5**). Mjerenje zeta-potencijala provelo se tri puta za svaki pojedini uzorak. Vrijednost zeta-potencijala dobivene su pomoću Helmhotz-Smoluchowski relacije prikazane **Jednadžbom 3**:

$$\zeta = \frac{K\mu\Delta E}{\varepsilon o \varepsilon \Delta P}$$

gdje su ΔE potencijal strujanja; ΔP razlika u hidrodinamičkom tlaku; μ viskoznost otopine; ε,ε_0, K dielekrtička konstanta otopine, propusnost vakuuma i vodljivost otopine (Susanto i sur, 2009).

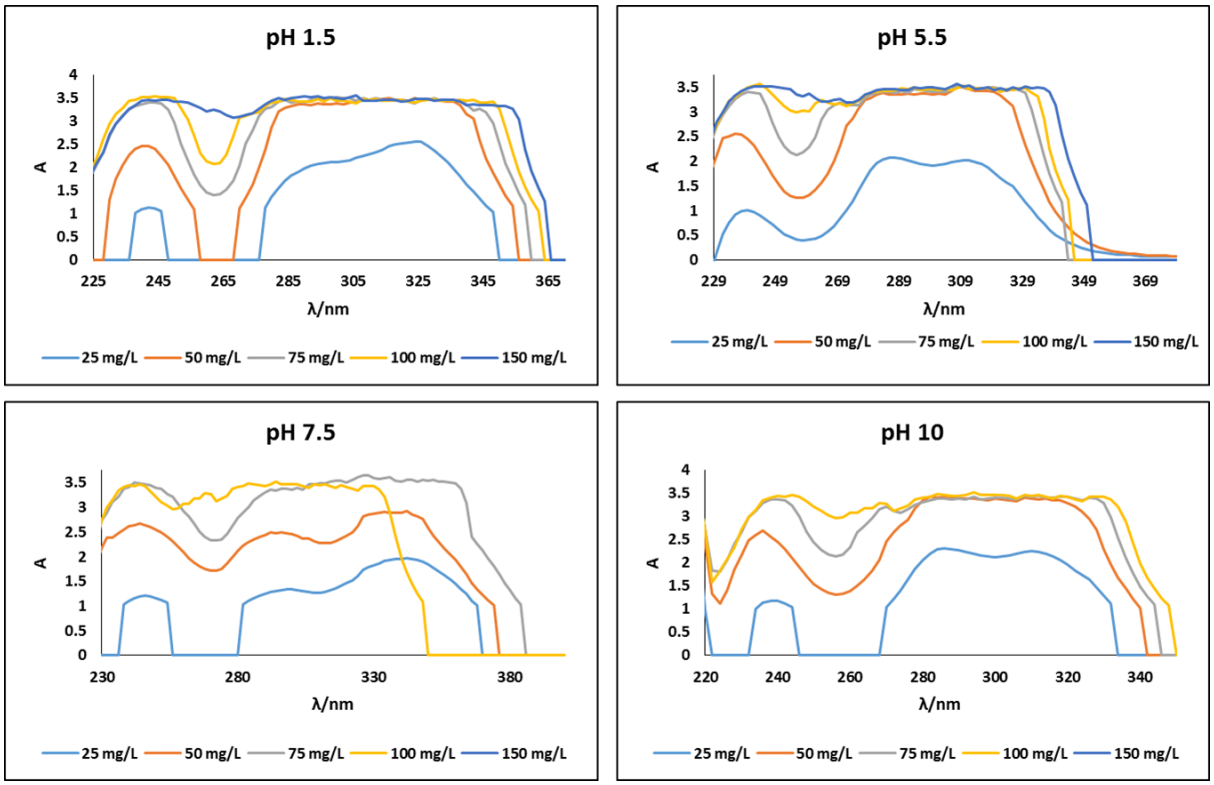


Slika 5. Zetasizer 2000 (Malvern Instrument)

4. REZULTATI

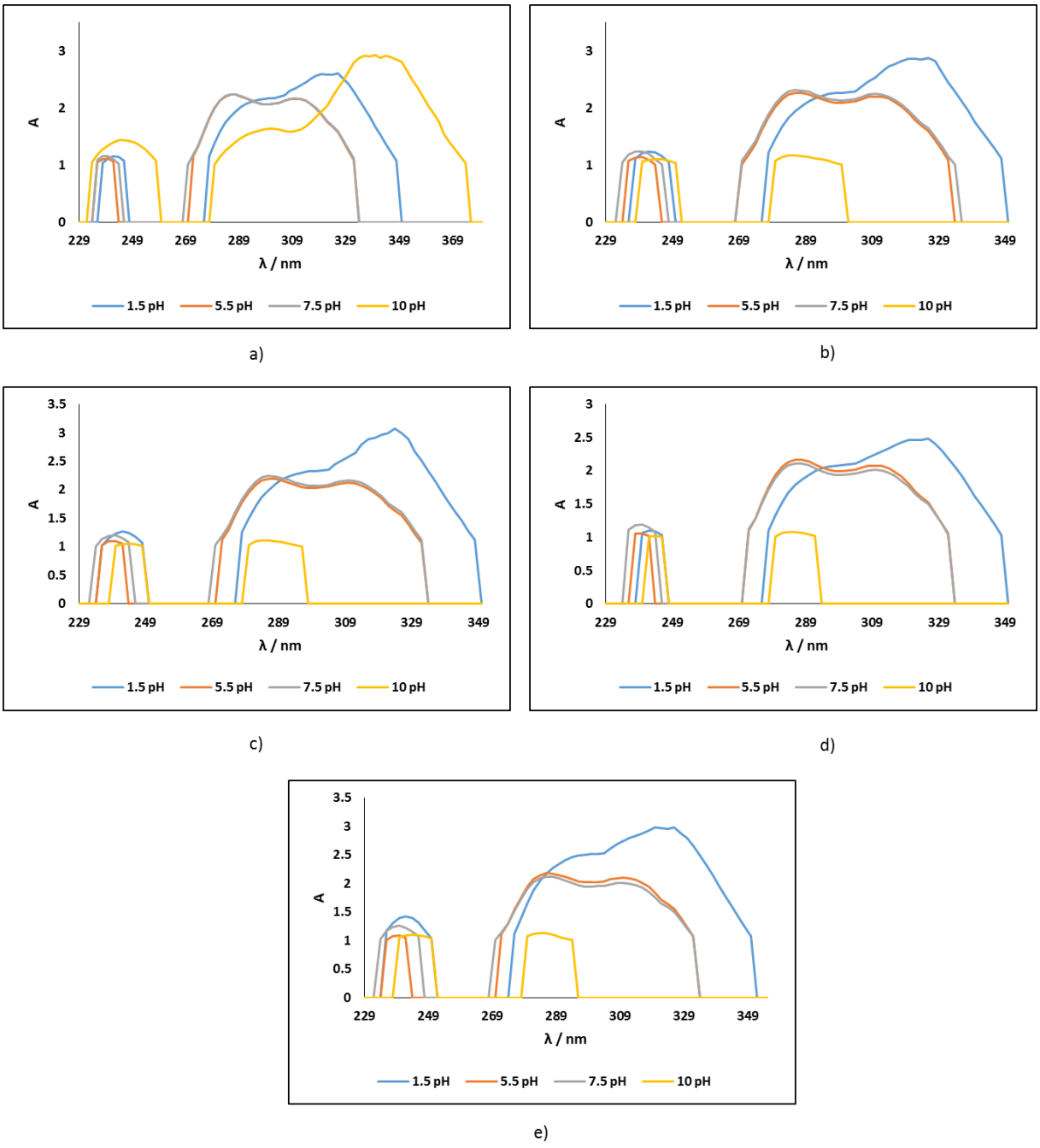
4.1. UV/Vis spektar

4.1.1. UV/Vis spektri kafeinske kiseline



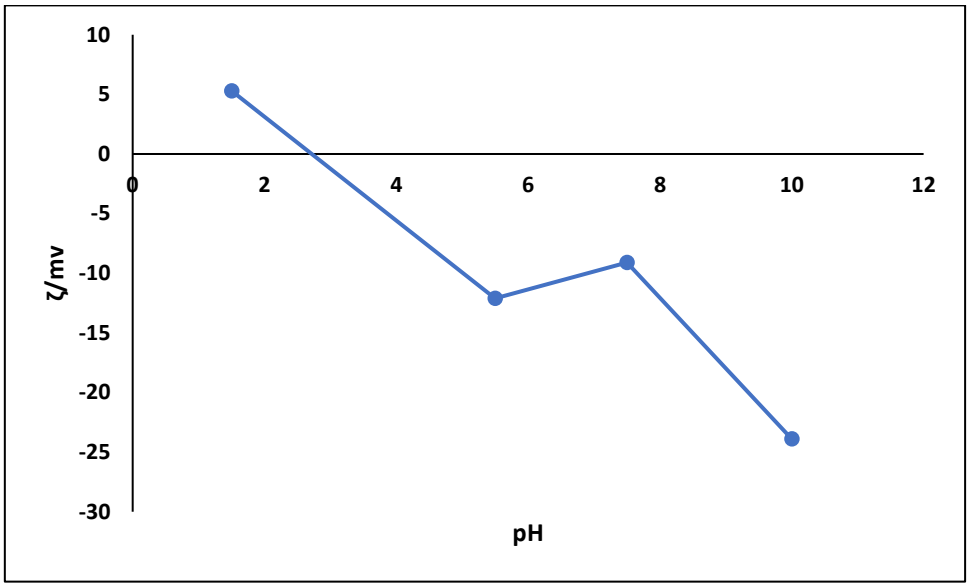
Slika 6. UV/Vis spektri kafeinske kiseline koncentracije 25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1} snimljeni u različitim pH vrijednostima

4.1.2. UV/Vis spektri modela kafeinske kiseline i *β*-glukana

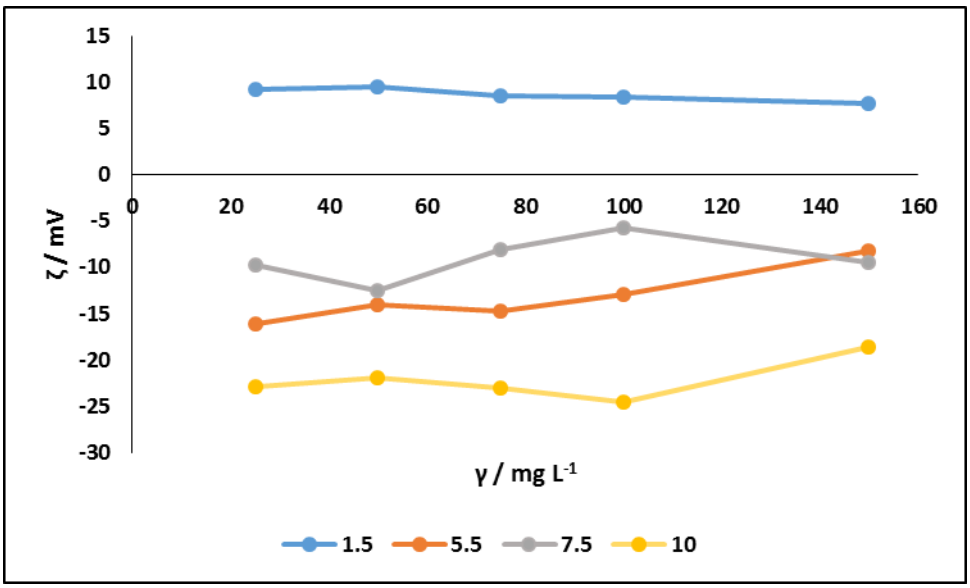


Slika 7. UV/Vis spektri modela kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) u različitim pH vrijednostima kroz vremenski period od a) 0h, b) 1h, c) 2h, d) 5h i e) 16h.

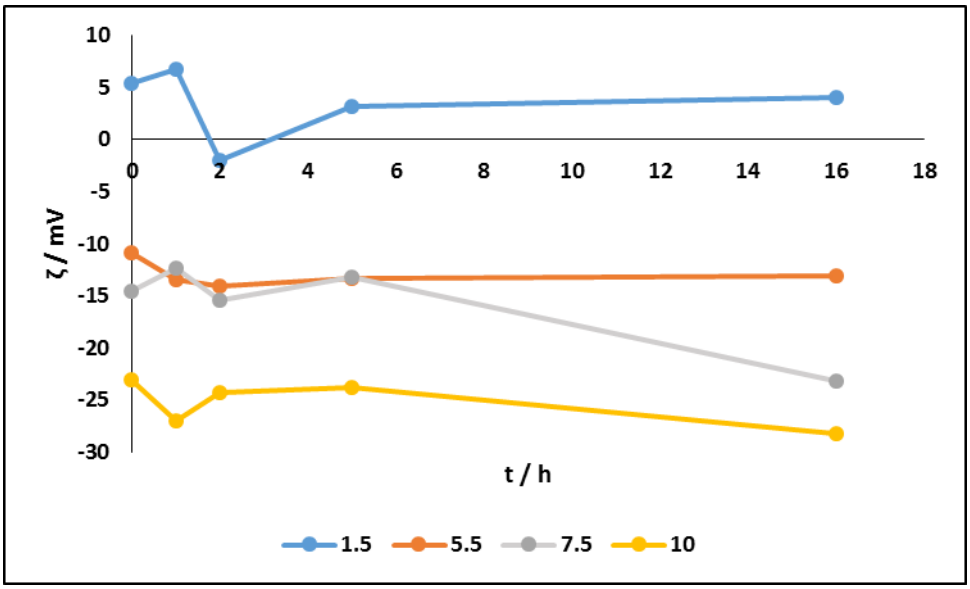
4.2. Zeta-potencijal otopine kafeinske kiseline, *β*-glukana i modela kafeinske kiseline i *β*-glukana



Slika 8. Ovisnost vrijednosti zeta-potencijala otopine *β*-glukana (5 mg L^{-1}) o pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10



Slika 9. Ovisnost vrijednosti zeta-potencijala otopine kafeinske kiseline koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1} o različitim pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10



Slika 10. Ovisnost vrijednosti zeta-potencijala modela otopine kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) kroz vremenski period od 0h, 1h, 2h, 5h i 16h o različitim pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10

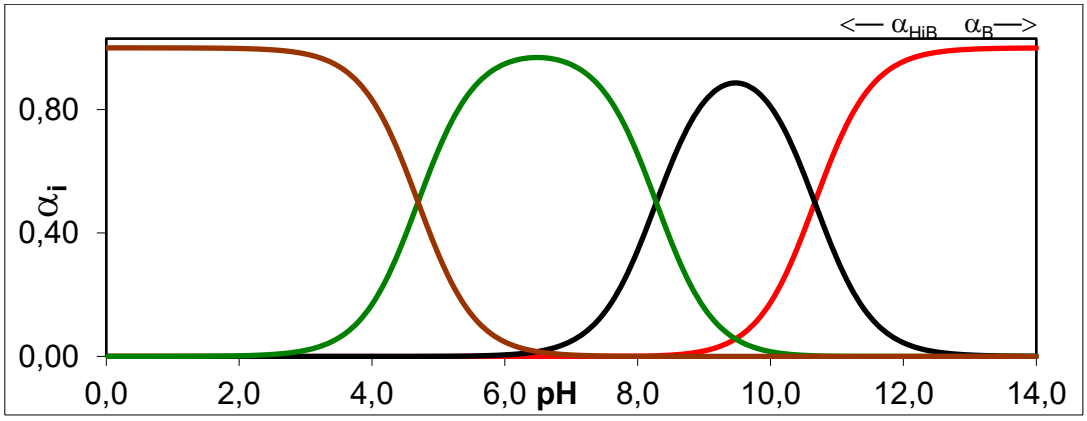
5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu istraženi su UV/Vis spektri kafeinske kiseline, *β*-glukana i modela kafeinske kiseline i *β*-glukana u području valnih duljina od 200 do 700 nm primjenom UV/Vis spektrofotometrije. UV/Vis spektar predstavlja grafički prikaz neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja. Snimljeni UV/Vis spektri prikazani su na **Slikama 6-7**. Na **Slikama 6-7** prikazani su snimljeni UV/Vis spektri kafeinske kiseline različitih koncentracija i modela kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) pri pH vrijednostima 1,5, 5,5, 7,5 i 10 snimljeni tijekom 1, 2, 5 i 16 sati.

UV/Vis spektri kafeinske kiseline snimljeni su za svaku pojedinu koncentraciju kafeinske kiseline (25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1}) u pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10. Iz UV/Vis spektara kafeinske kiseline uočavaju se tri apsorpcijska maksimuma pri valnim duljinama 240, 290 i 330 nm. Slične apsorpcijske maksimume kafeinske kiseline (λ = 217, 243, 295 i 327 nm) snimila je i grupa autora Wang i suradnici (2004). Također, snimljeni UV/Vis spektri modela kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) pokazuju slične apsorpcijske maksimume kao i kafeinska kiselina (**Slika 7**). Organski spojevi su spojevi s najviše prijelaza n ili π elektrona u π^* pobuđeno stanje, a za ove prijelaze potrebna je nezasićena skupina u molekuli s π elektronima (Cornard i Lapouge, 2006; Tošović, 2017).

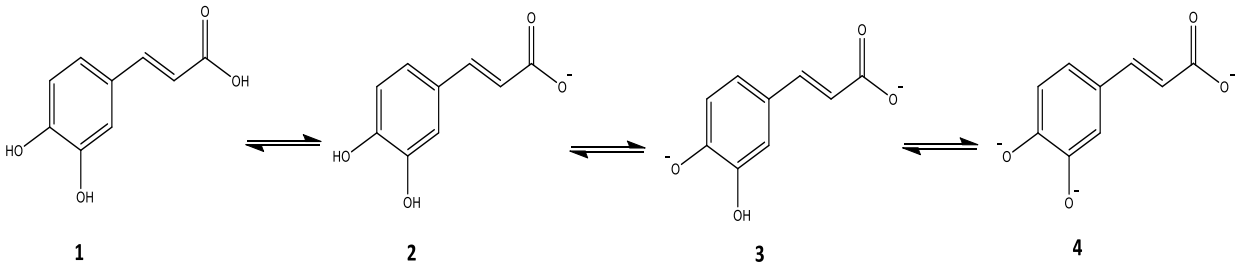
Nadalje, u ovom diplomskom radu istražen je i elektrokinetički potencijal *β*-glukana, kafeinske kiseline i modela kafeinske kiseline i *β*-glukana. Zeta-potencijal je dobar pokazatelj odbojnih interakcija između čestica i upotrebljava se za procjenu stabilnosti nekog modela. Visoka pozitivna ili negativna vrijednost zeta-potencijala ukazuje da je odbojnost između čestica velika odnosno model ima dobru stabilnost. Također, čestice s većim zeta-potencijalom pokazuju veću silu odbijanja što dovodi do veće stabilnosti modela protiv agregacije (Upadhyay i sur., 2017). Zeta-potencijal ispitane kafeinske kiseline u rasponu koncentracija od 25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1} u rasponu pH vrijednosti od 1,5, 5,5, 7,5 i 10 prikazan je na **Slici 9**. U kiselom mediju za sve ispitane koncentracije kafeinske kiseline vrijednosti zeta-potencijala su pozitivne. Povećanjem pH vrijednosti zeta-potencijal je negativan što govori da je u kiselom mediju prisutan kationski oblik molekule, a u neutralnom i lužnatom mediju anionski oblik. Maksimalna pozitivna vrijednost zeta-potencijala bila je oko 10 mV dok je maksimalna negativna vrijednost bila oko -25 mV i to u

pH 10. Dobivene vrijednosti odgovaraju pretpostavljenom modelu kafeinske kiseline simuliranom distribucijskim dijagramom.



Slika 11. Distribucijski dijagram kafeinske kiseline

Utjecaj pH vrijednosti povezan je s tri reaktivne hidroksilne skupine u kemijskoj strukturi kafeinske kiseline. Distribucijski dijagram kafeinske kiseline prikazan na **Slici 11** kreiran je na osnovi p*K*a vrijednosti (Genaro-Mattos i sur., 2015). Deprotonizacija kafeinske kiseline prikazana je **Slikom 12**.



Slika 12. Deprotoniranje kafeinske kiseline (Genaro-Mattos i sur., 2015)

Iz **Slike 12** uočava se da deprotoniranje nastaje karboksilatni ion (**2**) pri pH 5,5. Zatim se odvija deprotoniranje na *para* položaju (**3**) pri pH 7,2 i na *meta* položaju (**4**) pri pH 10. Stoga se može zaključiti da je anionski oblik molekule prisutan u području pH od 5,5 do 10 što su vrijednosti zeta-potencijala (**Slike 9** i **10**) potvrdile (negativan predznak iznosa zeta-potencijala predstavlja anionski oblik molekule) kao i simulirani distribucijski dijagram (**Slika 11**).

Nadalje, ispitan je utjecaj vremena (0, 1, 2, 5 i 16h) na vrijednost zeta-potencijala modela kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) u pH 1,5, 5,5, 7,5 i 10. U vremenskom

periodu od 2h do 16h vrijednost zeta-potencijala je slična ili jednaka, a najveća vrijednost zeta-potencijala postigla se u pH u 16h (oko -29 mV).

Stoga se može zaključiti da za ispitani model kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) pH 10 se pokazao kao medij u kojem je makromolekula prema teoriji stabilnosti najstabilnija i to u anionskom obliku (Metikoš-Huković i Martinez, 2000).

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi istraživanja provedenih u ovom diplomskom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- UV/Vis spektri otopine kafeinske kiseline koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mg L^{-1} ovisno o promjeni pH su slični i pokazuju apsorpcijske maksimume pri valnim duljinama od oko 240, 290 i 330 nm.
- Apsorpcijski spektri modela kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) pokazuju slične apsorpcijske maksimume kao i kafeinska kiselina.
- Zeta-potencijal otopine *β*-glukana pri koncentraciji 5 mg L^{-1} pokazuje pozitivne vrijednosti u kiselom mediju dok u neutralnom i u lužnatom mediju pokazuje negativnu vrijednost.
- Vrijednost zeta-potencijala ispitivane otopine kafeinske kiseline ima pozitivnu vrijednost u pH 1,5, dok ostale koncentracije pokazuju negativnu vrijednost zeta-potencijala te se pH 10 pokazao kao medij u kojem je makromolekula najstabilnija.
- Vrijednost zeta-potencijala ispitanog modela kafeinske kiseline (25 mg L^{-1}) i *β*-glukana (5 mg L^{-1}) s obzirom na vrijeme (0, 1, 2, 5 i 16h) pri različitim pH (1,5, 5,5, 7,5 i 10) pokazala je da je vrijednost zeta-potencijala slična ili jednaka u vremenskom periodu od 0h do 16h, a najveća vrijednost zeta-potencijala postigla se u pH u 16h (oko -29 mV).
- Prema teorijskim kriterijima stabilnosti, model se pokazao najstabilniji u pH 10 (-30 mV)
- Promjena pH vrijednosti pufera utječe na kemijsku strukturu otopine kafeinske kiseline kao i na vrijednost zeta-potencijala.

7. LITERATURA

Bai J, Ren Y, Li Y, Fan M, Qian H, Wang Li, Wu G, Zhang H, Qi X, Xu M, Rao Z: Physiological functionalities and mechanisms of β-glucans. *Trends in Food Science & Technology* 88: 57-66, 2019.

Choudhary, MI; Naheed, N, Abbaskhan, A, Musharraf, SG, Siddiqui, H, Atta-Ur-Rahman: Phenolic and other constituents of fresh water fern Salvinia molesta. *Phytochemistry*. 69 (4): 1018–23, 2008.

Cornard JP, Lapouge C: Absorption Spectra of Caffeic Acid, Caffeate and Their 1:1 Complex with Al(III): Density Functional Theory and Time-Dependent Density Functional Theory Investigations. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110, 7159-7166, 2006.

Genaro-Mattos TC, Maurício AQ, Rettori D, Alonso A, Hermes-Lima M: Antioxidant activity of caffeic acid against iron-induced free radical generation—a chemical approach. *PLOS ONE,* 10: e0142402, 2015.

Havrlentová M, Petruláková Z, Burgárová A, Gago F, Hlinková A, Šturdík E: Cereal β-glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods- A Review. *Czech journal of food sciences* 29: 1-14, 2011

Hunter RJ: Zeta potential in Colloid Science, Academic Press, NY, 1981.

Jakobek Barron L: Nastavni materijal iz kolegija Fizikalna kemija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2018.

Jakobek Barron L: Nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne metode II. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.

Kirby BJ: Micro- and nanoscale fluid mechanics: Transport in microfluidic devices. Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

Krpan V, Petravić-Tominac V, Gospodarić I, Sajli L, Đaković S, Filipović-Grčić J: Characterization of β-Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. *Prehrambena tehnologija i biotehnologija* 48: 189-197, 2010.

Lazaridou A, Biliaderis CG: Molecular aspcts ofcereal β-glucan functionality: Physicalproperties, technological applications and physiological effects *Journal of Cereal Science* 46: 101-118, 2007.

Limberger-Bayer VM, Francisco A, Chan A, Oro T, Ogliari PJ, Barreto PLM: Barley β-glucans extraction and partial characterization. *Food Chemistry*, 154:84-89, 2014.

Luxbacher T, Pušić T, Bukšek H, Petrinić I: U 8*th International textile, clothing & design conference*, str. (340-345), Magic World of Textiles, Dubrovnik, 2016.

Magnani, C, Isaac, VLB, Correa MA, Salgado HRN: Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical Methods*, 6, 3203, 2014.

Mason R: *What is Beta Glucan?.* Safe Goods, Sheffield, 2001.

Metikoš Huković M, Martinez S: Praktikum iz elektrokemije. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2004.

Petravić-Tominac V, Zechner-Krpan V, Grba S, Srečec S, Panjkota-Krbavčić I, Vidović L: Biological Effects of Yeast β-Glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 75: 149-158, 2010.

Piljac I: Elektroforeza. Media Print, Zagreb, 2006.

Potter CE: Elektrokemija, Osnove i primjena, Tehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 132-144, Zagreb, 1968.

Salopek B, Krasić D, Filipović S: Measurement and application of zeta-potential. U *Rudarsko geološko-naftni zbornik* 4: 147-151, 1992.

Skoog, DA, West, DM, Holler, FJ: Osnove analitičke kemije, 6. izdanje,. Školska knjiga, Zagreb, 1999.

Susanto H, Feng Y, Ulbricht M: Fouling behavior of aqueous solutions of polyphenolic compounds during ultrafiltration. *Journal of Food Engineering* 91: 333-340, 2009.

Sze A, Erickson D, Ren L, Li D: Zeta-potential Measurement Using the Smoluchowski Equation and the Slope of the Current-Time Relationship in Electroosmotic Flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 261: 402-10, 2003.

Tošović J: Spectroscopic Features Of Caffeic Acid: Theoretical Study. *Kragujevac Journal of Science*, 39, 99-108, 2017.

Touaibia, M, Jean-François J, Doiron J: Caffeic Acid, A Versatile Pharmacophore: An Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 695-713 695, 2011.

Upadhyay TK, Fatima N, Sharma D, Saravanakumar V, Sharma R: Preparation and characterization of beta-glucan particles containing a payload of nanoembedded rifabutin for enhanced targeted delivery to macrophages. *EXCLI Journal* 16: 210-228, 2017.

Vetvicka V: *Glucan-immun stimulant, adjuvant, potential drug*. World Journal of Clinical Oncology 2: 115, 2011.

Wang H, Provan GJ, Helliwell K: Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87, 307-311, 2004.

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.

WEB1:

https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/zeta-potential (pristupljeno 10.06.2020.)

WEB2:

https://bs.wikipedia.org/wiki/Kofeinska_kiselina#/media/Datoteka:Kaffees%C3%A4ure.svg (pristupljeno 11.06.2020.)

WEB3:

https://scialert.net/abstract/?doi=ajft.2007.679.683 (pristupljeno 12.06.2020.)