

Ravnotežna i kinetička istraživanja adsorpcije polifenolnih spojeva na β -glukanu

Matić, Petra

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:721050>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE

Petra Matić

**RAVNOTEŽNA I KINETIČKA
ISTRAŽIVANJA ADSORPCIJE
POLIFENOLNIH SPOJEVA NA
 β -GLUKANU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND
TECHNOLOGY

Petra Matic

**EQUILIBRIUM AND KINETIC STUDY OF
POLYPHENOLIC COMPOUND
ADSORPTION ONTO β -GLUCAN**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE

Petra Matić

**RAVNOTEŽNA I KINETIČKA
ISTRAŽIVANJA ADSORPCIJE
POLIFENOLNIH SPOJEVA NA
 β -GLUKANU**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron
izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND
TECHNOLOGY

Petra Matic

**EQUILIBRIUM AND KINETIC STUDY OF
POLYPHENOLIC COMPOUND
ADSORPTION ONTO β -GLUCAN**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Lidija Jakobek Barron, PhD, Full professor

Šime Ukić, PhD, Associate professor

Zagreb, 2021.

UDK:	544.723:547.56:664(043.3)
Znanstveno područje:	Prirodne znanosti
Znanstveno polje:	Kemija
Znanstvena grana:	Fizikalna kemija
Institucija:	Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki Fakultet Osijek, Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju, Istraživački laboratorij Katedre za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode.
Voditelji rada:	prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron izv. prof. dr. sc. Šime Ukić
Broj stranica:	109
Broj slika:	53
Broj tablica:	29
Broj priloga:	5
Broj literaturnih referenci:	110
Datum obrane:	2. lipnja 2021.
Sastav povjerenstva za obranu:	1. prof. dr. sc. Marko Rogošić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 2. prof. dr. sc. Tomislav Bolanča, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 3. prof. dr. sc. Ana Mornar Turk, Farmaceutsko- biokemijski fakultet

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORIMA

Lidija Jakobek Barron [REDACTED] Diplomirala je 2001. na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, gdje se iste godine i zapošljava na fakultetu kao mlađi asistent. Doktorirala je 2007. na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku. Usavršavala se na Institutu za vina u Eisenstadtu (Austrija), CEBAS-CSIC Institutu u Murciji (Španjolska), Sveučilištu u Helsinkiju (Finska) te Sveučilištu Yale (SAD). Istraživački interesi usmjereni su na identifikaciju i kvantifikaciju polifenola u namirnicama, na objašnjenje njihove bioaktivnosti, interakcije s prehrambenim vlaknima te utjecaj interakcija na bioraspoloživost polifenola. Objavila je 43 rada (od toga 28 radova u časopisima citiranim u bazi Current Contents). Sudjelovala je na brojnim međunarodnim i nacionalnim skupovima. Bila je voditelj četiri projekta, a na četiri nacionalna projekta i jednom međunarodnom projektu sudjelovala je kao istraživač.

Šime Ukić [REDACTED] Diplomirao je 2004. na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, a na istom fakultetu je i doktorirao 2009. u području prirodnih znanosti. Tijekom svojeg znanstvenog djelovanja usmjerio se na analitičku kemiju i kemometriju, a u novije vrijeme fokusiran je na ekološku problematiku, u prvom redu tzv. nova onečišćivala u okolišu. Do sada je kao suradnik sudjelovao na jednom međunarodnom i četiri nacionalna znanstvena projekta. Tijekom svojeg rada objavio je dvije knjige, dva poglavlja u knjizi, 45 radova u znanstvenim časopisima (42 citirana u bazi Current Contents) te 18 radova u zbornicima skupova. Sudjelovao je na brojnim međunarodnim i nacionalnim znanstvenim i stručnim skupovima. Također, sudjelovao je u organizaciji više znanstvenih skupova i tečajeva, te je urednik deset knjiga sažetaka sa simpozija.

Tema rada prihvaćena je na 193. sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj 25. siječnja 2016., te odobrena na 9. sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj 19. travnja 2016. u 347. akademskoj godini 2015./2016.

Ovaj doktorski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Utjecaj prehrambenih vlakana na bioraspoloživost polifenola istraživanjem adsorpcije i simuliranih probavnih procesa, *in vitro*“, voditeljice prof. dr. sc. Lidije Jakobek Barron; broj projekta: IP-2016-06-6777.

SAŽETAK

U sklopu doktorskoga rada provedena su ravnotežna istraživanja adsorpcije fenolnih kiselina (galna, *p*-kumarinska, kafeinska, klorogenska kiselina), flavan-3-ola (procijanidin B1 i B2), dihidrokalkona (floretil, floretin-2-glukozid) te antocijanina (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid) na prehrambenom vlaknu (β -glukan) pri različitim temperaturama i pH vrijednostima medija. Rezultati su modelirani jednadžbama adsorpcijskih izoterma nelinearnom regresijom. U svrhu kinetičkog istraživanja adsorpcija je ispitana u različitim vremenskim periodima, a podaci su analizirani kinetičkim modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda. Galna kiselina pokazala je veći adsorpcijski kapacitet od *p*-kumarinske, kafeinske i klorogenske kiseline što može biti uzrokovano većim brojem OH-skupina na molekuli. Procijanidin B1 i B2 imali su slične adsorpcijske kapacitete. Cijanidin-3-glukozid pokazao je nešto veći adsorpcijski kapacitet od cijanidin-3-galaktozida, a floretin-2-glukozid od floretina, na što je mogla utjecati glikozilacija molekule. Adsorpcija je spontan i egzoterman proces te vjerojatno slijedi kinetiku pseudo-drugog reda s vremenom polureakcije 0,76 do 7,22 h. Snimljeni UV/Vis-spektri potvrdili su postojanje interakcija između polifenola i β -glukana. Postojanje razlika u adsorpcijskim kapacitetima na različitim pH može se objasniti različitim formama polifenola. Za fenolne kiseline važan je udio neprotoniranih/protoniranih skupina, za dihidrokalkone glikozilacija, a za antocijanine njihova različita struktura pri različitom pH. Parametri adsorpcijskih izoterma ukazuju na fizikalnu adsorpciju s H vezama i van der Waalsovima silama između polifenola i β -glukana s negativnom kooperacijom u vezanju na svim temperaturama i pH vrijednostima. Provedena je i adsorpcija polifenola iz ekstrakta mesa i kože jabuke, a u takvom realnom sustavu koji se sastojao od više različitih polifenola, adsorpcija je bila ovisna o koncentraciji (viša koncentracija, veći adsorpcijski kapacitet) s predloženim vodikovim vezama ili van der Waalsovima silama između polifenola i β -glukana. Provedena istraživanja dala su bolji uvid u interakcije između polifenolnih spojeva i prehrambenih vlakana koje su važne za objašnjenje bioaktivnosti polifenolnih spojeva.

Ključne riječi: adsorpcija, kinetika, ravnotežni modeli, polifenoli, β -glukan

SUMMARY

In this dissertation, equilibrium studies of adsorption of phenolic acids (gallic, *p*-coumaric, caffeic, chlorogenic acid), flavan-3-ols (procyanidin B1 and B2), dihydrocalcones (florethin, floretin-2-glucoside) and anthocyanins (cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside) onto dietary fiber (β -glucan) at different temperatures and pH values of the medium are carried out. The results are modeled with adsorption isotherm equations by nonlinear regression. For the purpose of the kinetic research, adsorption was examined in different time periods, and the data were analyzed with kinetic models of pseudo-first and pseudo-second order. Gallic acid showed a higher adsorption capacity than *p*-coumaric, caffeic and chlorogenic acids which can be caused by a larger number of OH groups on the molecule. Procyanidin B1 and B2 showed similar adsorption capacity. Cyanidin-3-glucoside had a slightly higher adsorption capacity than cyanidin-3-galactoside, and floretin-2-glucoside than floretin, which may have been affected by glycosylation of the molecule. Adsorption was a spontaneous and exothermic process and probably follows pseudo-second order kinetics and the half-life is between 0.76 and 7.22 h. Scanned UV/Vis spectra confirmed the existence of interactions between polyphenols and β -glucan. The existence of differences in adsorption capacities at different pH can be explained by different forms of polyphenols. The proportion of non-protonated and protonated functional groups is important for phenolic acids, glycosylation is important for dihydrocalcones, and structural differences at different pH for anthocyanins. The parameters of the adsorption isotherms indicate physical adsorption with H-bonds and van der Waals forces between polyphenols and β -glucans, with negative cooperation in binding at all temperatures and pH values. Adsorption of polyphenols from the flesh and peel of apples was also performed, and in such a real system consisting of several different polyphenols, adsorption was concentration dependent (higher concentration yielding higher adsorption capacity), with hydrogen bonds or van der Waals forces between polyphenols and β -glucan again indicated. The conducted studies provided a better insight into the interactions between polyphenolic compounds and dietary fiber which are important for explaining the bioactivity of polyphenolic compounds.

Key words: adsorption, kinetics, equilibrium models, polyphenols, β -glucan

Zahvaljujem se mojim mentorima, prof. dr. sc. Lidiji Jakobek Barron i izv. prof. dr. sc. Šimi Ukiću, na velikoj pomoći, stručnim savjetima i uloženom vremenu pri izradi ovog doktorskog rada. Mojem suprugu veliko hvala na ljubavi i ogromnoj podršci. Hvala mojim roditeljima koji su mi sve ovo omogućili.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Polifenolni spojevi	3
2.1.1. Fenolne kiseline	3
2.1.2. Flavonoidi	4
2.2. Polifenolni spojevi u jabukama.....	7
2.3. Bioaktivnosti polifenolnih spojeva.....	8
2.3.1. Interakcije polifenola s prehrambenim vlaknima	10
2.3.1.1. β -D-glukan	10
2.4. Adsorpcija.....	12
2.4.1. Adsorpcijske izoterme	13
2.4.1.2. Langmuirova izoterma	14
2.4.1.3. Dubinjin-Raduškjevičeva izoterma	15
2.4.1.4. Tjomkinova izoterma	16
2.4.1.5. Hillova izoterma.....	17
2.4.2. Adsorpcijska termodinamika	17
2.5. Adsorpcijska kinetika	18
2.5.1. Model pseudo-prvog reda	18
2.5.2. Model pseudo-drugog reda	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Zadatak rada	20
3.2. Materijali i metode.....	21
3.2.1. Kemikalije	21
3.2.2. Priprema otopina i standarda	21
3.2.3. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih polifenola.....	22
3.2.4. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih antocijanina	23
3.2.5. Validacija analitičkih metoda za određivanje polifenola.....	23
3.2.6. Adsorpcija standarda polifenola na β -glukanu	24
3.2.7. Snimanje UV/Vis-spektara	25
3.2.8. Kinetika adsorpcije polifenola na β -glukanu	26
3.2.9. Ekstrakcija polifenola iz mesa i kože jabuka	26

3.2.10. Gel-filtracijsko razdvajanje polifenola iz jabuka.....	27
3.2.1. Kromatografija obrnutih faza za određivanje polifenola u ekstraktu kože i mesa jabuke.....	28
3.2.2. Adsorpcija polifenola iz ekstrakta mesa i kože jabuke na β -glukanu	29
3.2.3. Statistička obrada podataka	30
4. REZULTATI	31
4.1. Validacije analitičkih metoda	31
4.1.1. Validacija spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola	31
4.1.2. Validacija spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih antocijanina	32
4.1.3. Validacija kromatografije obrnutih faza za određivanje polifenolnih spojeva	33
4.2. Adsorpcija polifenola na β-glukan na različitim temperaturama	34
4.2.1. Termodinamika adsorpcije polifenola na β -glukan	43
4.3. Kinetika adsorpcije polifenola na β-glukanu.....	44
4.4. UV/Vis-spektri u procesu adsorpcije.....	49
4.5. Adsorpcija polifenola na β-glukan na različitim pH-vrijednostima.....	53
4.6. Adsorpcija polifenola iz jabuke na β-glukan.....	62
4.6.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenola u jabukama	62
5. RASPRAVA.....	72
5.1. Validacija primijenjenih analitičkih metoda.....	72
5.1.1. Validacija spektroskopskih metoda	72
5.1.2. Validacija kromatografije obrnutih faza.....	74
5.2. Adsorpcija polifenola na β-glukanu na različitim temperaturama	74
5.2.1. Adsorpcijske izoterme na tri različite temperature	77
5.2.2. Termodinamika adsorpcije polifenola na β -glukanu	79
5.3. Kinetika adsorpcije polifenola na β-glukan.....	79
5.4. UV/Vis-spektri polifenola	80
5.5. Adsorpcija polifenola na β-glukanu na različitim pH-vrijednostima	81
5.5.1. Adsorpcijske izoterme na tri različite pH-vrijednosti	84
5.6. Adsorpcija polifenola iz jabuka na β-glukan.....	84
5.6.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenola iz jabuke	84
5.6.2. Adsorpcija polifenola iz jabuke	85
6. ZAKLJUČCI	88

7. LITERATURA	91
----------------------------	-----------

8. PRILOZI	105
-------------------------	------------

Prilog I. Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukan pri pH 5,5 i 25 °C

Prilog II. Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukan pri pH 5,5 i 37 °C

Prilog III. Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukan pri pH 5,5 i 45 °C

Prilog IV. Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukan pri pH 1,5 i 37 °C

Prilog V. Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukan pri pH 10,0 i 37 °C

Popis oznaka, kratica i simbola

q_e	Ravnotežni kapacitet adsorbata na adsorbensu (mol/g)
c_o	Početna koncentracija adsorbata u otopini (mol/L)
c_e	Ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (mol/L)
c_s	Koncentracija otopljene tvari u zasićenoj otopinu (mol/L)
K_F	Konstanta relativnog adsorpcijskog kapaciteta (mol/g) (L/mol) ^{1/n}
$1/n$	Konstanta intenziteta adsorpcije
K_L	Konstanta slobodne energije adsorpcije ili konstanta afiniteta (L/mol)
q_m	Teorijski adsorpcijski kapacitet adsorbata na adsorbensu (mol/g)
β	Konstanta povezana s adsorpcijskim kapacitetom (mol ² /J ²)
ε	Polanyijev potencijal (J/mol)
E	Srednja slobodna energija adsorpcije (J/mol)
b_T	Toplina adsorpcije (J/mol)
A	Tjomkinov adsorpcijski potencijal (L/g)
n_H	Hillov kooperativni koeficijent vezanja
K_D	Hillova konstanta (mol/L)
q_t	Ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mol/g)
k_1	Konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda (h ⁻¹)
k_2	Konstanta brzine reakcije pseudo-drugog reda (g/mol h)
ΔG	Gibbsova energija (J/mol)
K_A	Termodinamička ravnotežna konstanta bez jedinice
ΔH	Standardna entalpija procesa adsorpcije (J/mol)
ΔS	Standardna entropija procesa adsorpcije (J/mol K)
LOD	Granica detekcije
LOQ	Granica kvantifikacije
KV	Koeficijent varijacije (%)
R^2	Koeficijent determinacije
S	Standardna pogreška nelinearne regresije
UV/Vis	Spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području
RP-HPLC	Kromatografija obrnutih faza

1. UVOD

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji se prema razlikama u kemijskoj strukturi mogu podijeliti na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane. Utvrđen je širok spektar njihove potencijalno pozitivne bioaktivnosti (Camouse i sur., 2005; Kampa i sur., 2007; Pandey i sur., 2009; Scalbert i sur., 2005). Intenzitet njihova bioaktivnog djelovanja može ovisiti o interakcijama s makromolekulama iz hrane te lipidima u probavnom traktu (Gorelik i sur., 2008; Jakobek, 2015; Le Bourvellec i Renard, 2012). Naime, makromolekule prisutne u hrani, poput ugljikohidrata i proteina, mogu ulaziti u interakcije s polifenolima, „uhvatiti“ ih u svoju kompleksnu strukturu i prenositi do donjih dijelova probavnog trakta. Time one utječu na brojnost molekula polifenola koje se mogu apsorbirati u probavnom traktu (bioraspoloživost) te samim time i na količinu apsorbiranih polifenola u organizmu (biodostupnost) (Gorelik i sur., 2008; Jakobek, 2015; Jakobek i Matić, 2019). Interakcije između prehrambenih vlakana i polifenola treba posebno istaknuti. Naime, prehrambena vlakna su otporna na probavu i adsorpciju u tankom crijevu; stoga imaju mogućnost interakcije s polifenolima te njihova prenošenja do donjih dijelova probavnog trakta (Quirós-Sauceda i sur., 2014). Tamo polifenoli imaju mogućnost u svojoj neizmijenjenoj formi iskazati potencijalno pozitivnu bioaktivnost (Gorelik i sur., 2008; Kanner i sur., 2012). Jedno od interesantnijih prehrambenih vlakana je β -glukan. To se prehrambeno vlakno može naći u žitaricama, gljivama, kvascu i algama (Laroche i sur., 2007), a budući da je utvrđeno kako može ulaziti u interakcije s polifenolima (Wang i sur., 2013) intenzivno se istražuju njegove interakcije s polifenolima.

Interakcije polifenola i prehrambenih vlakana mogu se interpretirati kroz proces adsorpcije. Taj proces uključuje difuziju otopljene tvari do površine adsorbensa te adsorpciju na samu površinu adsorbensa (Plazinski i sur., 2009). Proučava se provođenjem eksperimenata pri konstantnoj temperaturi tijekom kojih se otopljena tvar adsorbira na adsorbens, do postizanja ravnotežnog stanja. Tijekom eksperimenta upotrebljava se više otopina različitih koncentracija ispitivane tvari. Grafički odnos između količine tvari adsorbirane na površinu adsorbensa (ravnotežni kapacitet adsorbata na adsorbensu, q_e) i koncentracije tvari preostale u otopini (ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini, c_e) naziva se adsorpcijska izoterma (Giles i sur., 1974; Limousin i sur., 2007). Eksperimentalni podaci (q_e i c_e) mogu se modelirati na temelju raznih ravnotežnih modela adsorpcijskih izoterma kao što su Freundlichova, Langmuirova, Dubinjin-Raduškjevičeva, Tjomkinova, Hillova izoterma i druge (Foo i Hameed, 2010; Phan i sur., 2015; Phan i sur., 2017; Zhang i sur., 2017). Na osnovi dobivenih parametara ravnotežnih

adsorpcijskih izoterma, može se doći do teorijskih informacija o procesu adsorpcije između spojeva kao što su polifenoli i prehrambena vlakna te njihovim interakcijama.

Istraživanja su pokazala da na proces adsorpcije mogu utjecati različiti parametri poput pH-vrijednosti medija (Marsal i sur., 2012; Phan i sur. 2016), temperature (Phan i sur. 2015; Soto i sur., 2011; Wu i sur., 2011) i vremena kontakta (Plazinski i sur., 2009). Provođenjem adsorpcije na različitim temperaturama može se odrediti standardna entalpija procesa adsorpcije ΔH , Gibbsova energija ΔG te standardna entropija procesa adsorpcije ΔS . Na temelju tih termodinamičkih veličina vidi se je li proces egzoterman ili endoterman, spontan ili nespontan te koja je vjerojatnost interakcija adsorbensa i adsorbata.

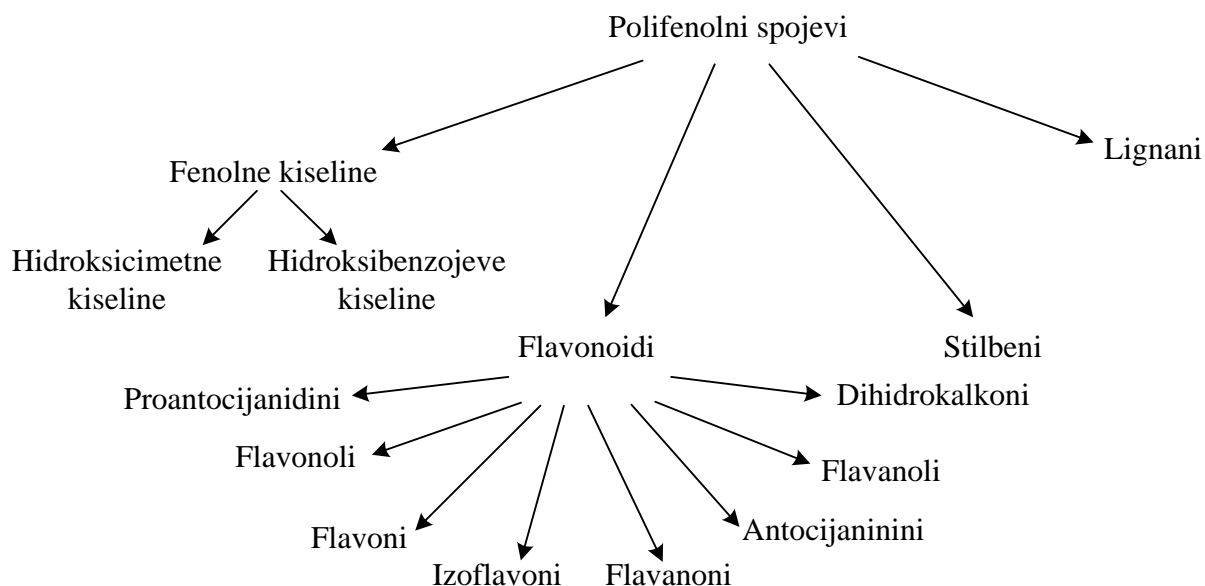
Interakcije polifenola i prehrambenih vlakana ovise i o vremenu. Podaci dobiveni provođenjem adsorpcije u različitim vremenskim intervalima mogu se opisati različitim kinetičkim modelima (pseudo-prvi red, pseudo-drugi red i ostali). Podudaranje modela s eksperimentalnim podacima može ukazati na red reakcije (Marsal i sur., 2012; Plazinski i sur., 2009).

U sklopu doktorskoga rada provedena su ravnotežna istraživanja procesa adsorpcije polifenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavan-3-ola, dihidrokalkona te antocijanina) na prehrambenom vlaknu β -glukanu iz ječma za različite temperature te pri različitim pH-vrijednostima. Istražena je i termodinamika i kinetika procesa adsorpcije te adsorpcije polifenola iz jabuka na β -glukanu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti čija je glavna funkcija zaštititi biljku od ultraljubičastog zračenja ili patogena. Najviše su prisutni u biljkama (povrće, voće, žitarice, leguminoze i druge) i piću (primjerice vino, pivo, čaj i kakao). Do sada je poznato preko 8000 različitih struktura polifenola. Prema razlikama u svojoj strukturi, polifenoli se mogu podijeliti na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (slika 1). U podgrupu flavonoida spadaju proantocijanidini, flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini, flavanoli (flava-3-oli) te dihidrokalkoni (Bravo, 1998; Manach i sur., 2004).



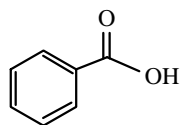
Slika 1 Podjela polifenolnih spojeva prema razlikama u njihovoj kemijskoj strukturi

2.1.1. Fenolne kiseline

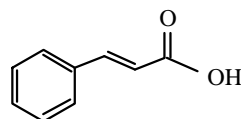
Fenolne kiseline su spojevi male molarne mase. Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (slika 2) (Bravo, 1998). Hidroksibenzojeve kiseline imaju općenitu strukturu C_6-C_1 koja potječe od benzojeve kiseline, dok hidroksicimetne kiseline imaju strukturu C_6-C_3 (Bravo, 1998).

Hidroksicimetne kiseline rijetko su prisutne u slobodnom obliku. Najčešće se pojavljuju u glikoziliranom ili esterificiranom obliku. Galna kiselina je predstavnik hidroksibenzojevih kiselina, a u hidroksicimetne kiseline pripadaju *p*-kumarinska, kafeinska, klorogenska i druge kiseline (slika 3) (Manach i sur., 2004). Galna kiselina na benzenskom prstenu sadrži tri –OH

skupine, *p*-kumarinska kiselina jednu, kafeinska kiselina dvije, dok je klorogenska kiselina ester kafeinske i kinske kiseline (Manach i sur., 2004).

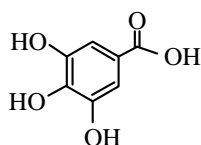


Hidroksibenzojeve kiseline

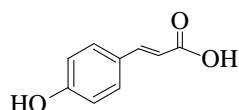
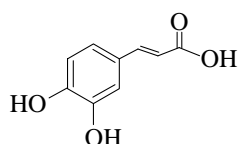


Hidroksicimetne kiseline

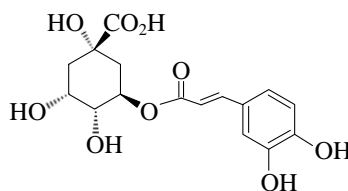
Slika 2 Osnovna struktura podgrupa fenolnih kiselina (Bravo, 1998)



Galna kiselina

*p*-kumarinska kiselina

Kafeinska kiselina



Klorogenska kiselina

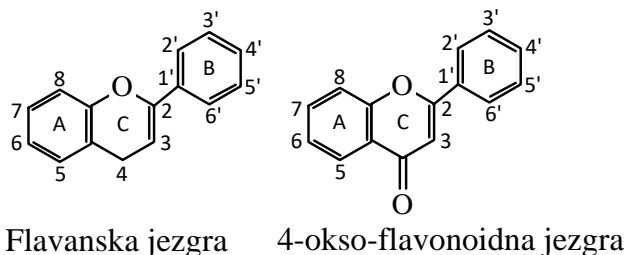
Slika 3 Kemijska struktura nekih fenolnih kiselina

Sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u biljkama manji je od sadržaja hidroksicimetnih kiselina. Hidroksicimetne kiseline prisutne su u svim dijelovima voća, a tijekom dozrijevanja količina im se smanjuje. Pronađeno je da galne kiseline najviše ima u čaju, dok je klorogenska prisutna u većini voća i povrća te kavi (Manach i sur., 2004).

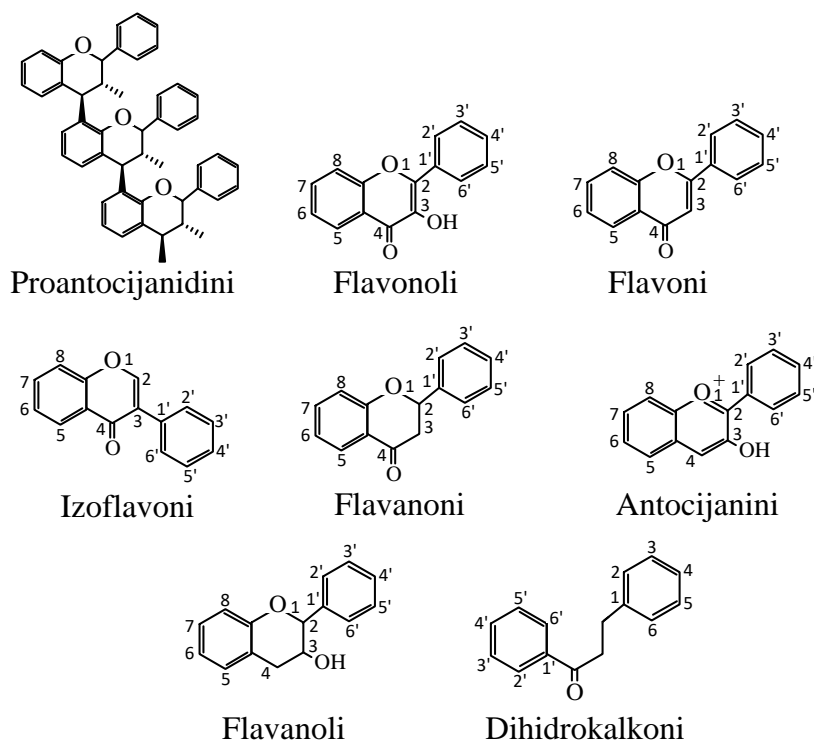
2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najrasprostranjenija grupa polifenolnih spojeva. Struktura im se izvodi od difenilpropana (C₆-C₃-C₆) te imaju dva aromatska prstena (A i B) pri čemu je aromatski prsten A konjugiran s oksigeniranim prstenom C. Pojam 4-okso-flavonoidi često se upotrebljava za flavonoide kao što su flavanoli, flavanoni, flavonoli i flavoni koji na položaju C-4 imaju karbonilnu skupinu (slika 4) (Aherne i O'Brien, 2002; Bravo, 1998; Heim sur., 2002).

U skupinu flavonoida spadaju proantocijanidini, flavanoli (flavan-3-oli), flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanini, flavonoli te dihidrokalkoni, a njihova struktura prikazana je na slici 5.



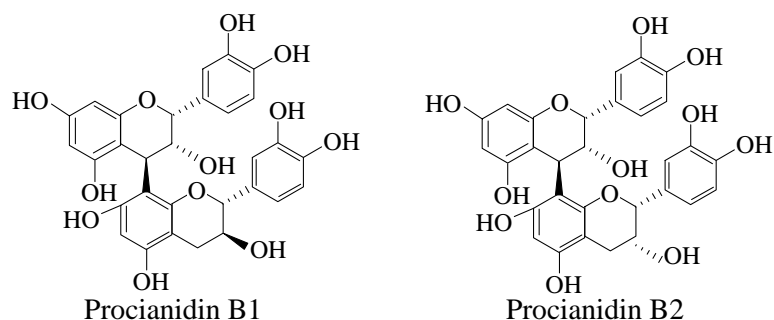
Slika 4 Osnovna struktura flavonoida (flavanska jezgra i 4-okso-flavonoidna jezgra) (Aherne i O'Brien, 2002; Bravo, 1998; Heim i sur., 2002)



Slika 5 Osnovne strukture podgrupa flavonoida (Bravo, 1998; Heim i sur., 2002; Thomás-Barberán i sur., 2000)

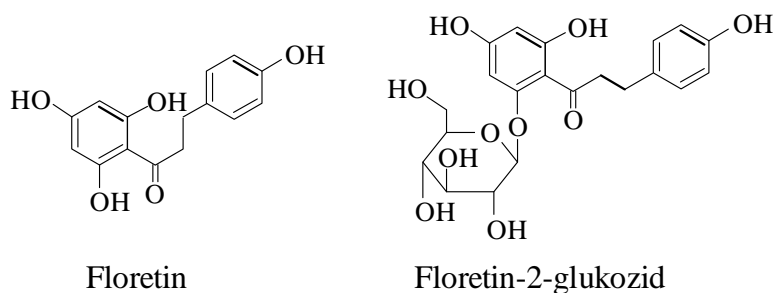
Flavan-3-oli (flavanoli ili katehini) se mogu naći u hrani u monomernom obliku (katehini) i polimernom obliku (proantocijanidini). U usporedbi s ostalim flavonoidima, flavan-3-oli se ne nalaze u glikoziliranom obliku u hrani (Manach i sur., 2004). Flavan-3-oli se razlikuju po strukturi od ostalih podgrupa flavonoida po tome što nemaju kisikovu skupinu na položaju C-4. Također, na položaju 2-3 nemaju dvostruku vezu. Flavan-3-oli su široko rasprostranjeni u biljkama kao što su čaj, voće i leguminoze. Najzastupljeniji flavan-3-oli u hrani su (+)-katehin,

(-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin te njihovi esteri s galnom kiselinom: (-)-epikatehin-galat i (-)-epigalokatehin-galat (Hollman i Arts, 2000). Neki od flavan-3-ola kao što su procijanidin B1 i procijanidin B2 prikazani su na slici 6.



Slika 6 Kemijske strukture procijanidina B1 i procijanidina B2

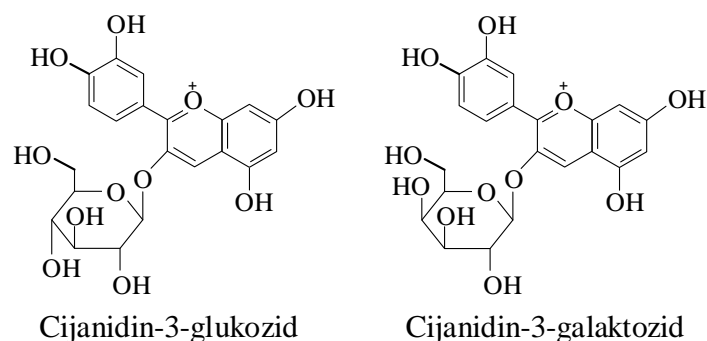
Dihidrochalkoni, flavanoni i flavanonoli su flavonoidi koji su najmanje zastupljeni u hrani. Dihidrochalkoni su najviše zastupljeni u jabukama, a od njih najviše ima floretina i floretin-2-glukozida (slika 7). Kemijska struktura dihidrochalkona je otvorena, a broj ugljikovih atoma je manji nego kod ostalih flavonoida (Tomás-Barberán i Clifford, 2000).



Slika 7 Kemijske strukture floretina i floretin-2-glukozida

Antocijanini su najvažnija skupina flavonoida topljivih u vodi. Biljkama daju plavu, ružičastu i crvenu boju. Otvorena struktura antocijanidina je $C_6-C_3-C_6$. Pronađeno je šest osnovnih antocijanidina, a to su: cijanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin i malvidin. Vežanjem šećera na osnovne antocijanidine nastaju molekule antocijanina (Clifford, 2000). Vežanjem šećera na molekulu antocijanidina i esterifikacijom antocijanina s različitim organskim kiselinama (limunska i jabučna kiselina) sprječava se degradacija antocijanina (Manach i sur., 2004). Najčešći šećeri vezani na strukturu antocijanina su glukoza, galaktoza, ramnoza i arabinoza koji su najčešće vezani na položaj C-3 (Clifford, 2000). Neki od

antocijanina s oblikom cijanidina kao što su cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-galaktozid prikazani su na slici 8.



Slika 8 Kemijske strukture cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-galaktozida

Antocijanini se mogu naći u crvenom vinu, u nekim žitaricama i povrću, a najviše ih ima u voću. Od svih antocijanidina, cijanidin je najzastupljeniji u hrani (Manach i sur., 2004).

Struktura antocijanina ovisi o pH-vrijednosti otopine u kojoj se nalaze. U vakuoli biljne stanice, antocijanini su prisutni u četiri oblika koja su međusobno u ravnoteži, a to su obojeni oblik flavilijeva kationa, kinoidni oblik, karbinolna pseudobaza te kalkonska pseudobaza (Clifford, 2000).

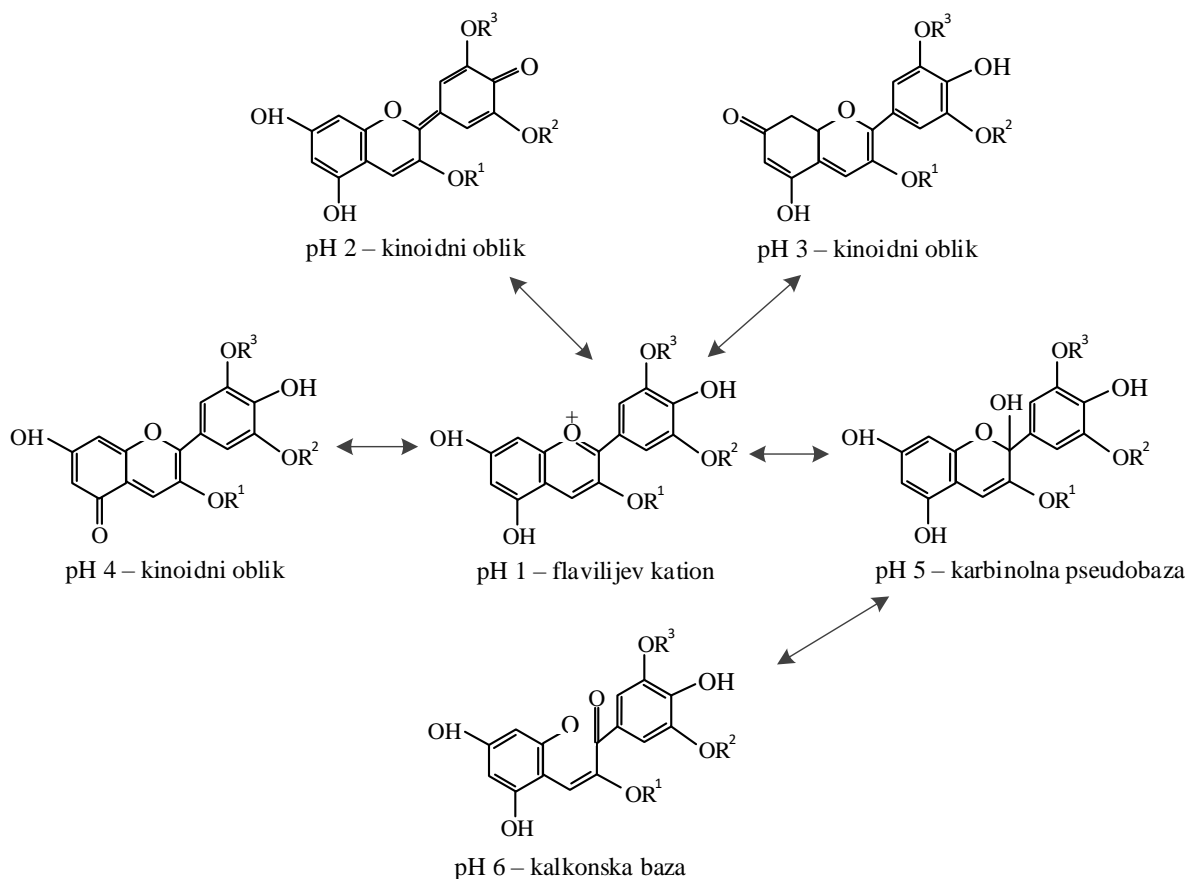
Različiti oblici antocijanina pokazuju različitu boju u ovisnosti o pH otopine u kojoj se nalaze (slika 9) (Da Costa i sur., 1998). Tako pri pH 1 prevladava flavilijev kation koji je crven. Između pH 2 i 4 prevladava plava boja kinoidnoga oblika. Kod pH-vrijednosti 5 nastaje bezbojni oblik karbinolne pseudobaze, a pri pH-vrijednosti 6 također bezbojni oblik kalkonske baze.

2.2. Polifenolni spojevi u jabukama

Jabuke su najrasprostranjenije voće koje pripada porodici *Rosaceae*, a budući da su dostupne tijekom cijele godine, važan su izvor polifenolnih spojeva (Ceymann i sur., 2012; Jakobek i sur., 2013). Najzastupljeniju skupinu polifenola u jabukama čine proantocijanidini, a zatim fenolne kiseline (Jakobek i sur., 2013; Khanizadeh i sur., 2008).

Koncentracija polifenola u kožici veća je nego u mesu jabuka (Escarpa i González, 1998). U mesu jabuka najzastupljenije su fenolne kiseline, a u kožici flavonoli i dihidrokalkoni (Jakobek i Barron, 2016; Jakobek i sur., 2013).

Polifenoli iz jabuka pokazali su mnoga potencijalno pozitivna svojstva za ljudski organizam kao što su zaštita crijeva od kroničnih upalnih bolesti (Jung i sur., 2009), aktivnost u borbi protiv raka (McCann i sur., 2007), antiviralna aktivnost (Boyer i Liu, 2004; Suárez i sur., 2010), smanjenje rizika od ateroskleroze (Zhao i sur., 2013) i drugo.

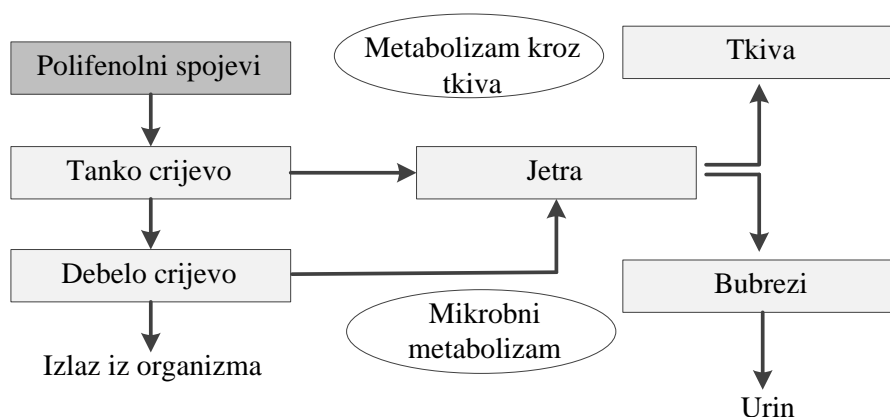


Slika 9 Ravnotežna raspodjela antocijanina u ovisnosti o pH otopine (Da Costa i sur., 1998)

2.3. Bioaktivnosti polifenolnih spojeva

Polifenolni spojevi pokazali su mnoge potencijalno pozitivne bioaktivnosti kao što su smanjenje rizika od nastanka raka, dijabetesa, raznih infekcija (Camouse i sur., 2005; Di Domenico i sur., 2012; Pandey i Rizvi, 2009; Stoner i Mukhtar, 1995). Mnoge od tih bioaktivnosti još se uvijek istražuju. Da bi polifenoli pokazali puni potencijal svoje bioaktivnosti u organizmu, bitna je njihova bioraspodjelivost i biodostupnost. Bioraspodjelivost se definira kao količina probavljenih tvari koje postaju raspoložive za apsorpciju u tankom crijevu, a biodostupnost kao brzina i opseg u kojem se tvari apsorbiraju i postaju dostupne na mjestu djelovanja u ljudskom organizmu (Parada i Aquilera, 2007). Prijašnja su istraživanja pokazala da je apsorpcija polifenola u ljudskom organizmu niska (Felgines i sur., 2003), no

neka novija istraživanja pokazala su njihovu veću apsorpciju u organizmu (Borges i sur., 2013). Polifenolni spojevi za koje se pokazalo da se najviše apsorbiraju u organizmu su izoflavoni i galna kiselina, zatim katehini, flavanoni te glikozidi kvercetina. Najmanje se apsorbiraju proantocijanidini, katehini s galoilnom skupinom i antocijanini. Vrlo se malo zna o metabolizmu i apsorpciji hidroksibenzojevih kiselina u organizmu. Kod hidroksicimetnih kiselina nađeno je da esterifikacija kafeinske kiseline, kao što je klorogenska kiselina, smanjuje apsorpciju u organizmu (Manach i sur., 2005). Metabolizam polifenola prikazan je na slici 10.



Slika 10 Metabolizam polifenola u organizmu

Polifenoli se mogu metabolizirati u organizmu kroz tkiva ili putem crijevne mikroflore (Scalbert i sur., 2002). Istraživanja su pokazala da na bioraspoloživost i biodostupnost polifenola mogu utjecati makromolekule kao što su proteini, ugljikohidrati (prehrambena vlakna) i lipidi koji okružuju polifenole u probavnom traktu (Jakobek, 2015), a jedna od bioaktivnosti polifenola koja nije u potpunosti istražena je upravo interakcija sa spomenutim tvarima u probavnom traktu (Jakobek, 2015; Le Bourvellec i Renard, 2012; Scalbert i sur., 2002).

Interakcije između polifenola i makromolekula iz hrane su uglavnom nekovalentne hidrofobne intrakcije (Quideau i sur., 2011) koje se ostvaruju preko hidrofobnog benzenskog prstena, ali polifenoli mogu interferirati s drugim molekulama putem vodikove veza ili van der Waalsovih interakcijama preko hidrofilnih grupa.

2.3.1. Interakcije polifenola s prehrambenim vlaknima

Interakcije polifenola i prehrambenih vlakana se sve više istražuju jer se prehrambena vlakna ne razgrađuju u tankom crijevu, a mogu djelomično ili potpuno fermentirati u debelom crijevu (Quirós-Sauceda i sur., 2014). Na taj način prehrambena vlakna imaju mogućnost prenošenja polifenola u njihovom neizmijenjenom obliku do nižih dijelova probavnog trakta gdje potom takvi polifenoli mogu pokazati svoju bioaktivnost (Jakobek, 2015; Quirós-Sauceda i sur., 2014).

Prijenos polifenola prehrambenim vlaknima do debelog crijeva može dovesti do povećane bioraspoloživosti polifenola u debelom crijevu, zatim polifenoli i prehrambena vlakna mogu pozitivno utjecati na razvoj mikroflore debelog crijeva, mikroorganizmi u probavnom traktu mogu metabolizirati polifenole koji su oslobođeni od prehrambenih vlakana, a metaboliti i polifenoli mogu djelovati kao antioksidansi u debelom crijevu (Jakobek, 2015).

Također, interakcije polifenola i prehrambenih vlakana mogu utjecati na funkcionalnu i senzorsku kvalitetu hrane (Gao i sur., 2012b). Zbog toga se provode istraživanja interakcija polifenola i prehrambenih vlakana kao što su celuloza, ksilan (Costa i sur., 2015) i β -glukan (Gao i sur., 2012a; Gao i sur., 2012b; Simonsen i sur., 2009). Pokazalo se da prehrambena vlakna mogu ulaziti u interakcije s polifenolima vodikovim vezama između OH-skupina polifenola i prehrambenog vlakna, zatim hidrofobnim interakcijama te kovalentnim vezama između fenolnih kiselina i prehrambenih vlakana (Jakobek, 2015).

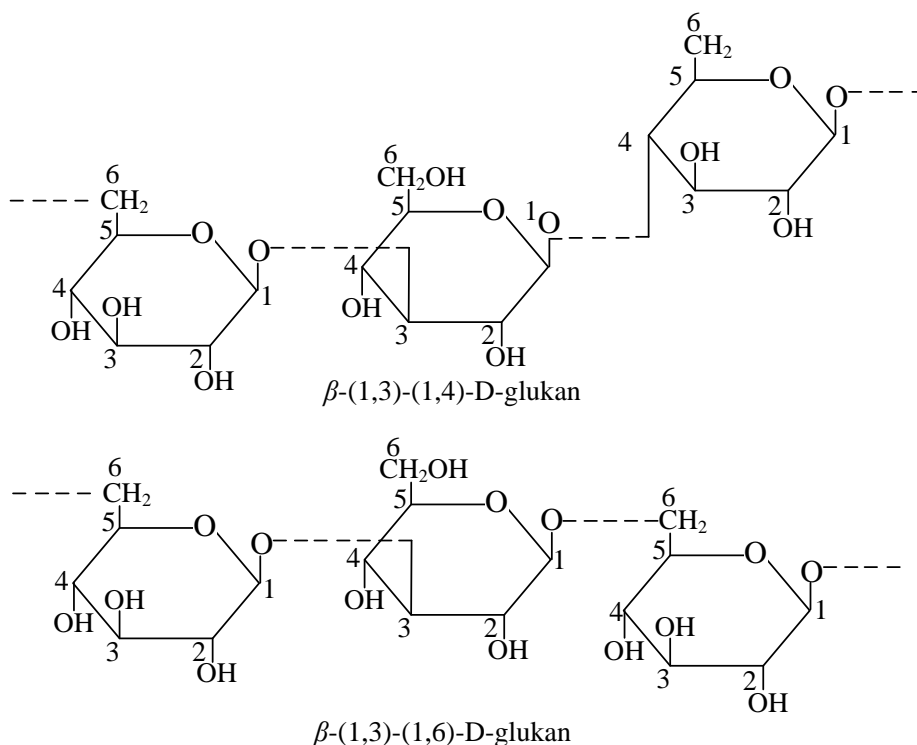
Prehrambena vlakna mogu se dijeliti na netopljiva vlakna (celuloza, hemiceluloza, hitin) i topljiva vlakna (pektini, β -glukani, oligosaharidi, inulin, gumiarabika) (Quirós-Sauceda i sur., 2014).

2.3.1.1. β -D-glukan

β -glukani su prehrambena vlakna, neškrobni polisaharidi koji se mogu naći u žitaricama, gljivama, kvascu te algama. β -glukani iz žitarica građeni su od molekula glukoze koje mogu biti međusobno povezane β -(1,3)-(1,4)-glikozidnim vezama, a β -glukani iz gljiva β -(1,3)-(1,6)-glikozidnim vezama (slika 11) (Johansson i sur., 2008; Laroche i Michaud, 2007). Kod ječma, β -glukan je linearan te udio (1,3)-veza iznosi oko 30, a udio (1,4)-veza oko 70 % (Laroche i Michaud, 2007).

β -(1,3)-(1,4)-D-glukani nalaze se u staničnim stjenkama endosperma i aleuronskog sloja zrna žitarica kao što su ječam i zob (Laroche i Michaud, 2007). Nađeno je da u ječmu udio β -glukana iznosi 2,5 do 11,3 %, dok u zobi iznosi 2,2 do 7,8 % (Izydorczyk i Dexter, 2008). Molarna masa β -glukana iz ječma kreće se od 0,15 do $2,50 \cdot 10^6$ g/mol (Laroche i Michaud, 2007). Karakteristike β -glukana kao što su omjer β -(1,3) i β -(1,4) veza u molekuli te sama veličina molekule utječu na fizikalna svojstva β -glukana kao što su topljivost u vodi, viskoznost, mogućnost geliranja te fiziološke funkcije u gastrointestinalnom traktu (Izydorczyk i Dexter, 2008; Lazaridou i Biliaderis, 2007).

Pronađena su mnoga potencijalno pozitivna djelovanja β -glukana na ljudski organizam kao što su antioksidacijska aktivnost, sniženje kolesterola, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti i drugo (Chen i Raymond, 2008; Kofuji i sur., 2011; Queenan i sur., 2007). Također, pokazalo se da β -glukan može ulaziti u interakcije s polifenolima, no te interakcije nisu istražene u potpunosti (Gao et al., 2012b; Simonsen et al., 2009; Veverka et al., 2014; Wu et al., 2011). Interakcije polifenola i β -glukana mogu se pratiti i interpretirati kroz proces adsorpcije gdje je polifenol adsorbat, a β -glukan adsorbens.



Slika 11 Kemijske strukture β -(1,3)-(1,4)-D-glukana i β -(1,3)-(1,6)-D-glukana

2.4. Adsorpcija

Proces vezanja molekula iz otopine na površinu neke čvrste tvari naziva se adsorpcija. Molekula koja se veže na površinu naziva se adsorbirana tvar ili adsorbat, a tvar na čiju je površinu vezana molekula adsorbata naziva se adsorbens (Đorđević i Dražić, 1987).

Tijekom procesa adsorpcije, u otopini se nalazi određena koncentracija adsorbata koji se adsorbira na adsorbens. Prilikom procesa adsorpcije usporedno se odvija i proces desorpcije, a nakon određenog vremena dolazi do uspostavljanja ravnoteže između tih dvaju procesa. U stanju ravnoteže brzina adsorpcije i desorpcije su iste.

Proces adsorpcije može se odvijati u četiri stupnja (Plazinski i sur., 2009): transport adsorbata iz otopine prema adsorbensu, difuzija adsorbata kroz Nernstov difuzijski sloj koji okružuje česticu adsorbensa, unutarčestična difuzija te adsorpcija i desorpcija adsorbata s površine adsorbensa.

U stanju ravnoteže može se odrediti adsorpcijski kapacitet adsorbensa. Adsorpcijski kapacitet, q_e , definira se kao množina adsorbiranoga adsorbata po jedničnoj masi adsorbensa u stanju ravnoteže (mol/g), a računa se prema jednadžbi (1):

$$q_e = \frac{(c_0 - c_e) \cdot V_m}{\gamma_a \cdot V_a} \quad (1)$$

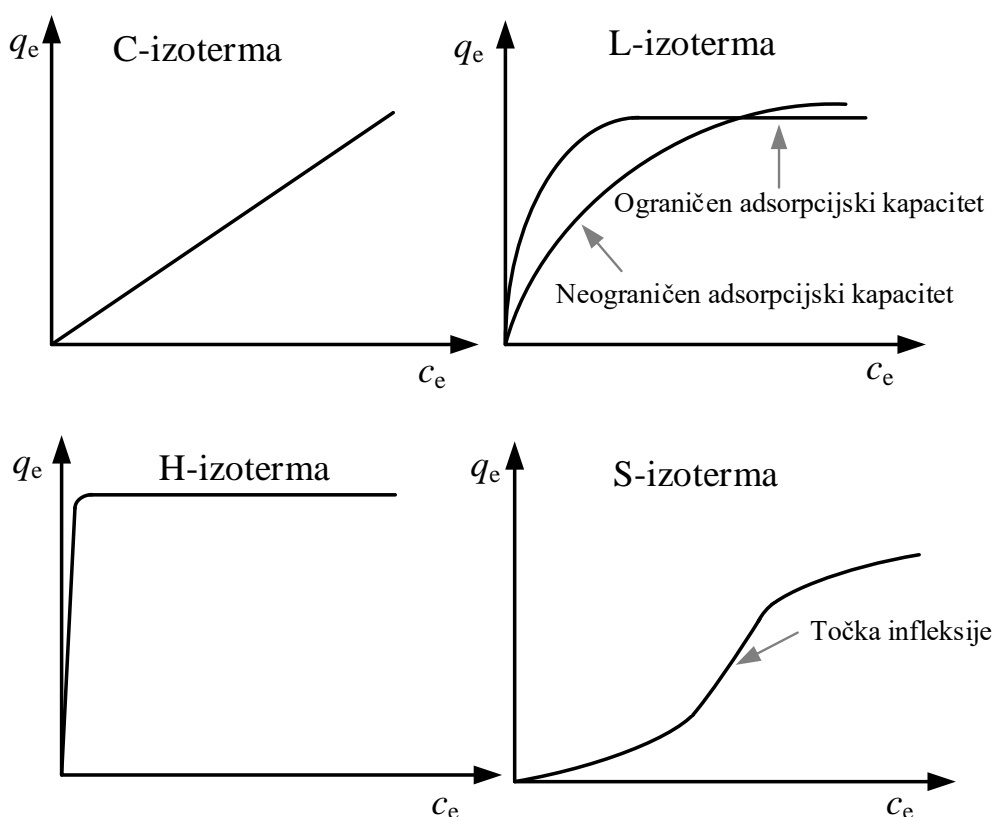
gdje je c_0 (mol/L) početna, a c_e (mol/L) ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini, γ_a predstavlja masenu koncentraciju adsorbensa u koncentriranoj otopini (g/L), a V_a volumen otopine adsorbensa (L) u ukupnom volumenu otopine u kojoj se odvija adsorpcija V_m (L).

Na adsorpcijski kapacitet mogu utjecati različiti faktori (Soto i sur., 2011) kao što su svojstva adsorbensa (poroznost, veličina čestica, veličina površine adsorbensa), svojstva adsorbata (struktura, topljivost u vodi, naboj, funkcionalne skupine, polarnost, konstanta ionizacije, veličina molekule), svojstva otopine (vrsta otapala, pH, temperatura, ionska jakost, koncentracija otapala) i vrsta eksperimenta koja se provodi.

Adsorbat se može adsorbirati na površinu adsorbensa različitim privlačnim silama. S obzirom na prirodu privlačnih sila, adsorpcija može biti fizikalna i kemijska. Kod fizikalne adsorpcije, molekule adsorbata i adsorbensa mogu se povezati slabim van der Waalsovima, hidrofobnim i vodikovim vezama, a kod kemijske adsorpcije kemijskim vezama (Soto i sur., 2011). U stanju ravnoteže na eksperimentalno određene vrijednosti q_e i c_e mogu se povezati adsorpcijskim izotermama (Limousin i sur., 2007).

2.4.1. Adsorpcijske izoterme

Adsorpcijska izoterma predstavlja odnos između adsorbirane količine adsorbata q_e i njegove ravnotežne koncentracije u otopini c_e (neadsorbirana koncentracija), naravno pri konstantnoj temperaturi (Limousin i sur., 2007). Adsorpcijske izoterme mogu se podijeliti na četiri općenita oblika pa tako postoje tzv. C-, L-, H- i S-izoterma (slika 12) (Giles i sur., 1974; Limousin i sur., 2007). Kod C-tipa izoterme odnos između c_e i q_e jednak je neovisno o vrijednosti početne koncentracije adsorbata pa izoterma ima oblik pravca. Kod L-tipa izoterme, s porastom početne koncentracije adsorbata odnos između c_e i q_e u otopini raste (konveksni oblik krivulje), no nakon određene početne koncentracije adsorbata počinje opadati pa krivulja poprima konkavni oblik. L-izoterme mogu se podijeliti na dvije podvrste: prvu u kojoj se nalaze izoterme koje pokazuju da adsorbens ima ograničen kapacitet prema adsorbatu te drugu koja to ne pokazuje (slika 12). H-tip izoterme sličan je L-tipu; razlikuju se po tome što je početni nagib H-izoterme znatno strmiji. Takav nagib ukazuje na vrlo velik afinitet adsorbata prema adsorbensu. S-tip izoterme ima sigmoidni oblik (slika 12). Do točke infleksije adsorbat ima nizak afinitet prema adsorbensu. Nakon što se površina adsorbensa zasiti molekulama adsorbata, daljnja adsorpcija odvija se brže. Ta pojava naziva se kooperativna adsorpcija (Limousin i sur., 2007).



Slika 12 Tipovi izotermi kod adsorpcije kruto-tekuće (q_e je adsorpcijski kapacitet adsorbensa, a c_e ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini) (Giles i sur., 1974; Limousin i sur., 2007)

Da bi se bolje opisao proces adsorpcije, na eksperimentalne podatke (q_e i c_e) primjenjuju se različiti adsorpcijski modeli kao što su Freundlichov, Langmuirov, Dubinjin-Raduškjevičev, Tjomkinov, Hillov i drugi. Iz iznosa konstanti tih modela može se doći do informacija o samom procesu adsorpcije (Foo i Hameed, 2010; Limousin i sur., 2007; Soto i sur., 2011).

2.4.1.1. Freundlichova izoterma

Freundlichova adsorpcijska izoterma opisuje neidealnu reverzibilnu adsorpciju na heterogenoj površini. Adsorpcija nije ograničena na stvaranje monosloja već ukazuje na stvaranje više slojeva adsorbata na površini adsorbensa. Freundlichova izoterma temelji se na pretpostavci da svako mjesto na površini adsorbensa ima svoju energiju uslijed čega se mjesta s većom energijom popunjavaju prva (Babaeiveli i sur., 2013; Foo i Hameed, 2010; Marsal i sur., 2012) Freundlichova izoterma dana je jednadžbom (2) (Babaeiveli i sur., 2013; Foo and Hameed, 2010; Marsal i sur., 2012; Soto i sur., 2011).

$$q_e = K_F c_e^{1/n} \quad (2)$$

gdje je q_e ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mol/g), K_F konstanta relativnog adsorpcijskog kapaciteta (mol/g) $(L/mol)^{1/n}$, c_e ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (mol/L) i $1/n$ konstanta intenziteta adsorpcije. Za određivanje vrijednosti konstanti modela ($1/n$ i K_F) potrebno je provesti nelinearnu regresiju. No, izoterma se može logaritmirati čime prelazi u linearan oblik (jednadžba (3)). Linearizacijom izoterme stvari postaju znatno jednostavnije jer nagib pravca u dijagramu ovisnosti $\log q_e$ o $\log c_e$ odgovara koeficijentu $1/n$, a odsječak na ordinati je $\log K_F$.

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log c_e \quad (3)$$

2.4.1.2. Langmuirova izoterma

Langmuirova adsorpcijska izoterma predviđa monoslojnu adsorpciju na homogenoj površini. Kad molekula adsorbata zauzme mjesto na površini adsorbensa, daljnja adsorpcija na isto mjesto nije moguća. Također, tva izoterma uzima u obzir pretpostavku da između molekula adsorbiranih na adsorbensu ne dolazi do interakcija i steričkih smetnji (Babaeiveli i sur., 2013; Foo and Hameed, 2010; Marsal i sur., 2012.).

Langmuirova izoterma (Babaeiveli i sur., 2013; Foo and Hameed, 2010; Marsal i sur., 2012; Soto i sur., 2011) dana je jednadžbom:

$$q_e = \frac{q_m K_L c_e}{1 + K_L c_e} \quad (4)$$

K_L predstavlja konstantu slobodne energije adsorpcije ili konstantu afiniteta (L/mol), a q_m maksimalni teorijski adsorpcijski kapacitet (mol/g). Za određivanje vrijednosti konstanti modela (q_m i K_L) potrebno je provesti nelinearnu regresiju. No i u tom slučaju, da bi se izbjegla provedba nelinearne regresije, model se obično linearizira:

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_m} + \frac{c_e}{q_m} \quad (5)$$

Nagib pravca u prikazu ovisnosti c_e/q_e o c_e daje $1/q_m$ dok se iz odsjeka na ordinati iščitava vrijednost $1/(K_L q_m)$.

2.4.1.3. Dubinjin-Raduškjevičeva izoterma

Dubinjin-Raduškjevičeva izoterma primjenjuje se za razlikovanje kemijske od fizikalne adsorpcije. Ona je slična Langmuirovoj izotermi, ali ne pretpostavlja da se radi o homogenoj već heterogenoj površini adsorbensa (Foo i Hameed, 2010; Marsal i sur., 2012; Soto i sur., 2011).

Nelinearni oblik Dubinjin-Raduškjevičeve izoterme dan je jednadžbom (6), a linearni jednadžbom (7) (Babaeiveli i sur., 2013; Foo i Hameed, 2010; Marsal i sur., 2012; Soto i sur., 2011).

$$q_e = q_m \exp\left(-\beta R^2 T^2 \left(\ln \frac{c_s}{c_e}\right)^2\right) \quad (6)$$

$$\ln q_e = \ln q_m - \beta \varepsilon^2 \quad (7)$$

Oznaka q_m predstavlja teorijski kapacitet zasićenja (mol/g), β je konstanta povezana s adsorpcijskim kapacitetom (mol^2/J^2), R opća plinska konstanta (8,314 J/mol K), T apsolutna temperatura (K), c_s koncentracija otopljene tvari u zasićenoj otopini (mol/L), a ε Polanyijev potencijal (J/mol).

Polanyijev potencijal može se izračunati primjenom jednadžbe (8) (Urano i sur., 1980).

$$\varepsilon = RT \ln \left(\frac{c_s}{c_e} \right) \quad (8)$$

Primjenom linearnog oblika Dubinjin-Raduškjevičeve jednadžbe lako se dođe do konstanti modela (q_m i β): dijagram ovisnosti $\ln q_e$ o ε^2 daje pravac čiji nagib odgovara β , a odsječak na ordinati $\ln q_s$.

Srednja slobodna energija adsorpcije, E , može biti pokazatelj radi li se o fizikalnoj ili kemijskoj adsorpciji. Adsorpcija je fizikalna ukoliko E iznosi manje od 8 kJ/mol, a kemijska ukoliko je iznad 8 kJ/mol (Marsal i sur., 2012). E se može izračunati preko jednadžbe (Babaeivni i sur., 2013):

$$E = \frac{1}{\sqrt{2\beta}} \quad (9)$$

2.4.1.4. Tjomkinova izoterma

Kod Tjomkinova adsorpcijske izoterme pretpostavlja se da dolazi do linearnog pada adsorpcijske entalpije sa zasićenjem površine adsorbensa (Babaeivni i sur., 2013; Foo i Hameed, 2010; Soto i sur., 2011).

Nelinearni oblik Tjomkinove izoterme dan je jednadžbom (10), a linearni jednadžbom (11) (Babaeivni i sur., 2013; Foo and Hameed, 2010; Soto i sur., 2011).

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln (A c_e) \quad (10)$$

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln c_e + \frac{RT}{b_T} \ln A \quad (11)$$

Konstanta modela b_T predstavlja adsorpcijsku entalpiju (J/mol), a A Tjomkinov adsorpcijski potencijal (L/g).

Prilikom određivanja konstanti modela (b_T i A) iz njegove linearnog oblika, dijagram ovisnosti q_e o $\ln c_e$ daje pravac s nagibom RT/b_T , dok odsječak na ordinati odgovara $(RT/b_T) \ln A$.

2.4.1.5. Hillova izoterma

Hilova adsorpcijska izoterma upotrebljava se za opisivanje vezanja različitih adsorbata na homogenu površinu adsorbensa. Taj model pretpostavlja da je adsorpcija kooperativni proces pri čemu ligand na molekuli adsorbata može imati utjecaj na adsorbiranje drugog liganda (Foo i Hameed, 2010; Ringot i sur., 2007). Nelinearni zapis Hillove izoterme dan je jednadžbom (12), a linearni jednadžbom (13) (Ringot i sur., 2007).

$$q_e = \frac{q_m c_e^{n_H}}{K_D + c_e^{n_H}} \quad (12)$$

$$\ln\left(\frac{q_e}{q_m - q_e}\right) = n_H \ln c_e - \ln K_D \quad (13)$$

Oznaka q_m predstavlja maksimalni teorijski adsorpcijski kapacitet (mol/g), n_H je Hillov kooperativni koeficijent vezanja ($n_H > 1$ pozitivna kooperacija u vezanju, $n_H < 1$ negativna kooperacija u vezanju, $n_H = 1$ nekooperativno hiperboličko vezanje), a K_D Hillova konstanta (mol/L).

Kod linearnog oblika Hillove jednadžbe, dijagram ovisnosti $\ln(q_e/(q_m - q_e))$ o $\ln c_e$ daje pravac s nagibom n_H i odsječkom na ordinati ($-\ln K_D$).

2.4.2. Adsorpcijska termodinamika

Poznajući promjenu Gibbsove energije procesa adsorpcije (ΔG) može se utvrditi spontanost interakcija adsorbata i adsorbensa, vjerojatnost interakcija adsorbensa i adsorbata vidljiva je preko standardne entropije procesa ΔS , a je li proces egzoterman ili endoterman može se saznati iz standardne entalpije procesa ΔH . ΔG se može odrediti primjenom jednadžbe (14) (Marsal i sur., 2012) gdje K_A predstavlja termodinamičku ravnotežnu konstantu.

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (14)$$

Za neutralne ili slabo nabijene adsorbate, K_A se može zamijeniti konstantom slobodne energije adsorpcije ili konstantom afiniteta K_L izraženom u L/mol (Liu, 2009).

ΔS i ΔH mogu se odrediti iz van 't Hoffova dijagrama (Marsal i sur., 2012), tj. dijagrama ovisnosti $\ln K_L$ o $1/T$ preko jednadžbe:

$$\ln K_L = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (15)$$

gdje je K_L konstanta slobodne energije adsorpcije ili konstanta afiniteta (u L/mol).

2.5. Adsorpcijska kinetika

Kinetika proučava zakone brzina kemijskih reakcija (Đorđević i Dražić, 1987). Kako bi se opisala kinetika nekog procesa, mogu se primijeniti različiti modeli. Ti modeli mogu se podijeliti na adsorpcijske reakcijske modele (model pseudo-prvog reda, model pseudo-drugog reda) i adsorpcijske difuzijske modele. Adsorpcijski difuzijski modeli temelje se na sljedećim stupnjevima procesa adsorpcije: difuzija adsorbata preko tekućeg filma koji okružuje adsorbens, difuzija adsorbata u pore adsorbensa (međučestična difuzija) te adsorpcija i desorpcija adsorbata s površine adsorbensa. Adsorpcijski reakcijski modeli ne uzimaju u obzir pojedinačne korake tijekom procesa adsorpcije (Qiu i sur., 2009). Reakcijski i difuzijski modeli služe za dobivanje kinetičkih parametara.

2.5.1. Model pseudo-prvog reda

Model pseudo-prvog reda (Lagergrenov model) je jedan od najstarijih i najčešće primjenjivanih modela koji opisuje brzinu adsorpcije u tekućinama (Plazinski i sur., 2009). Kako bi se jednadžba za kinetiku prvog reda bazirana na adsorpcijskom kapacitetu razlikovala od one bazirane na koncentraciji otopine, nazivamo ju jednadžbom pseudo-prvog reda (Qiu i sur., 2009). Jednadžba pseudo-prvog reda u diferencijalnom obliku (Plazinski i sur., 2009) glasi:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (16)$$

I ovdje q_e predstavlja ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mol/g), q_t (mol/g) je ravnotežni adsorpcijski kapacitet u vremenu t (h), a k_1 konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda (h^{-1}).

Integriranjem jednadžbe (16) u granicama od 0 do t , odnosno za q_t vrijednosti 0 i q_t , dobije se linearni oblik jednadžbe pseudo-prvog reda (Idan i sur., 2018; Marsal i sur., 2012; Qiu i sur., 2009):

$$\log (q_e - q_t) = -\left(\frac{k_1}{2,303}\right)t + \log (q_e) \quad (17)$$

Vrijednosti parametara q_e i k_1 mogu se odrediti linearnom regresijom iz dijagrama ovisnosti $\log(q_e - q_t)$ o t . Konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda k_1 određuje brzinu postizanja ravnoteže u sustavu: ako vrijednost k_1 raste tijekom vremena, potrebno je kraće vrijeme da sustav postigne ravnotežu (Plazinski i sur., 2009).

Vrijeme polureakcije je vrijeme koje je potrebno da se koncentracija reaktanta smanji za polovicu. Za reakcije pseudo-prvog reda vrijeme polureakcije, $t_{1/2}$ (h) može se odrediti izrazom:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_1} \quad (18)$$

2.5.2. Model pseudo-drugog reda

Model pseudo-drugog reda najčešće se temelji na pretpostavci da brzinu adsorpcijske kinetike određuju brzine procesa adsorpcije i desorpcije (Plazinski i sur., 2009). Jednadžba pseudo-drugog reda u diferencijalnom obliku (Wu i sur., 2009; Plazinski i sur., 2009) dana je izrazom:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (19)$$

gdje je k_2 konstanta brzine reakcije pseudo-drugog reda (g/mol h).

Integriranjem jednadžbe (19) u granicama od 0 do t (granice vrijednosti q_t su 0 i q_t) dobije se linearni oblik jednadžbe pseudo-drugog reda (Idan i sur., 2018; Marsal i sur., 2012; Plazinski i sur., 2009):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e}t + \frac{1}{k_2 q_e^2} \quad (20)$$

Vrijednosti parametara q_e i k_2 mogu se odrediti linearnom regresijom iz dijagrama ovisnosti t/q_t o t .

Vrijeme polureakcije za reakciju pseudo-drugog reda može se odrediti pomoću jednadžbe:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 \cdot q_{e,0}} \quad (21)$$

gdje je $q_{e,0}$ adsorpcijski kapacitet na početku reakcije (mol/g).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Kako bi se istražile interakcije između polifenola i β -glukana provedena su ravnotežna i kinetička istraživanja procesa adsorpcije. Adsorpcija je ispitana i na realnom uzorku.

Ravnotežna istraživanja adsorpcije provedena su pri pH 5,5 na različitim temperaturama (25, 37 i 45 °C). Rezultati su obrađeni nelinearnom regresijom jednadžbi adsorpcijskih izoterma (Freundlich, Langmuir, Dubinjin-Raduškjevič, Tjomkin i Hill). Nakon provedene adsorpcije na različitim temperaturama ispitana je i termodinamika procesa adsorpcije. Kinetika procesa adsorpcije ispitana je (25 °C, pH 5,5) primjenom modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda. Kako bi se dobile informacije o mogućem utjecaju molekulskih struktura polifenolnih spojeva na adsorpcijski kapacitet, snimljeni su UV/Vis-spektri polifenola, β -glukana, modelne otopine i kompleksa. Istražen je utjecaj pH-vrijednosti na proces adsorpcije (pH 1,5, 5,5 i 10,0 na 37 °C). Provedena je i adsorpcija polifenola iz ekstrakta jabuka na β -glukanu kako bi se proučila adsorpcija polifenola iz realnog uzorka.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kemikalije

U tablici 1 nalazi se popis korištenih kemikalija u doktorskom radu.

Tablica 1 Popis korištenih kemikalija

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
metanol	HPLC	J.T. Baker, Nizozemska
galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina monohidrat)	$\geq 98 \%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>p</i> -kumarinska kiselina (<i>trans</i> -4-hidroksicimetna kiselina)	$\geq 98 \%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
kafeinska kiselina (3,4-hidroksicimetna kiselina)	$\geq 98 \%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
klorogenska kiselina (3-(3,4-dihidroksicinamoil)-kinska kiselina	≥ 95	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
kvercetin-3- β -D-glukozid	$\geq 90\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
kvercetin hidrat (5,7,3',4'-flavon-3-ol)	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
(+)-katehin hidrat (2,3- <i>trans</i> -katehin)	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β -D-glukan iz ječma	$\geq 95 \%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
procijanidin B1 (epikatehin-(4 β -8)-katehin)	$\geq 90 \%$	Extrasynthese, Genay, Francuska
procijanidin B2 (epikatehin-(4 β -8)-epikatehin)	$\geq 90 \%$	Extrasynthese, Genay, Francuska
floretin (2',4,4',6'-tetrahidroksidihidroalkon)	$\geq 99 \%$	Extrasynthese, Genay, Francuska
floridzin (floretin-2'-O-glukozid)	$\geq 99 \%$	Extrasynthese, Genay, Francuska
cijanidin-3-glukozid klorid (kuromarin klorid)	$\geq 96 \%$	Extrasynthese, Genay, Francuska
cijanidin-3-galaktozid (ideain klorid)	$\geq 97 \%$	Extrasynthese, Genay, Francuska
kvercetin-3-O-galaktozid	$\geq 98 \%$	Extrasynthese, Genay, Francuska
kvercetin-3-O-ramnozid	98,5 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
Folin-Ciocalteuov reagens		Kemika, Zagreb, Hrvatska
natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat		Kemika, Zagreb, Hrvatska
natrijev dihidrogenfosfat dihidrat		Kemika, Zagreb, Hrvatska
natrijev bikarbonat		Kemika, Zagreb, Hrvatska
kristalni natrijev acetat trihidrat		Kemika, Zagreb, Hrvatska
bevodni natrijev karbonat		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
natrijev nitrit		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
kalijev klorid		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
natrijev hidroksid		Avantor, Arnhem, Nizozemska
klorovodična kiselina	37 %	Avantor, Arnhem, Nizozemska
bevodni aluminijev klorid		Fluka, Buchs, Švedska
Sephadex LH-20		Pharmacia A.B., Uppsala, Švedska

3.2.2. Priprema otopina i standarda

Koncentrirane otopine standarda polifenola pripremljene su u metanolu u koncentraciji od 1000 mg/L za galnu kiselinu, *p*-kumarinsku kiselinu, kafeinsku kiselinu, klorogensku kiselinu, floretin, i floretin-2-glukozid, zatim za kvercetin-3-glukozid u koncentraciji od 900 mg/L, kvercetin-3-galaktozid od 490 mg/L, te za kvercetin-3-ramnozid od 276 mg/L, zatim u destiliranoj vodi u koncentraciji 160 mg/L za procijanidin B1 i 450 mg/L za procijanidin B2) te naposljetku u 0,1 %-tnoj otopini HCl-a u metanolu u koncentraciji 480 mg/L za cijanidin-3-glukozid i 485 mg/L za cijanidin-3-galaktozid. Pripremljene koncentrirane otopine čuvane su u zamrzivaču na $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentrirana otopina β -glukana koncentracije od 190 mg/L

pripremljena je u destiliranoj vodi, nakon toga grijana 15 minuta na 80 °C te potom odložena u hladnjak na +4 °C.

Pripremljene su otopine pH 1,0 (0,025 mol/L kalijeva klorida i HCl) i pH 4,5 (0,4 mol/L natrijeva acetata i HCl) koje su upotrijebljene za određivanje ukupnih antocijanina. Otopina pH 1,0 dobivena je na način da se izvaže 1,86 g kalijeva klorida koji se otopi u 1 L destilirane vode, mjeri se pH-vrijednost i namjesti se na pH 1,0 s koncentriranom HCl. Otopina pH 4,5 dobivena je na način da se izvaže 54,43 g natrijeva acetata koji se otopi u litri destilirane vode te se potom pH-vrijednost podesi dodatkom koncentrirane otopine HCl. Otopina pH 1,5 (0,1 mol/L klorovodične kiseline i 0,1 mol/L kalijeva klorida), pH 5,5 (0,13 mol/L natrijeva hidrogenfosfata dodekahidrata i 0,13 mol/L natrijeva dihidrogenfosfat dihidrata) i pH 10,0 (0,1 mol/L natrijeva karbonata i 0,1 mol/L natrijeva bikarbonata) pripremljene su za adsorpcijske eksperimente. Za proračun pH otopina korištena je Henderson-Hasselbalchova jednadžba.

3.2.3. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih polifenola

Spektroskopska metoda za ukupne polifenole (Singleton i sur., 1999) validirana je za standarde polifenola iz skupine fenolnih kiselina (galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina), flavan-3-ola (procijanidin B1, procijanidin B2) i dihidrokalkona (florethin, floretin-2-glukozid). Priređene su otopine različitih koncentracija polifenola u rasponu navedenom u tablici 2 (radne standardne otopine). U staklene kivete dodano je 20 μ L odgovarajuće radne standardne otopine polifenola, 1580 μ L destilirane vode, 100 μ L Folin-Ciocalteuova reagensa i 300 μ L natrijeva karbonata (200 g/L). Uzorci su homogenizirani na tresilici (Grant Bio, Cambridgeshire, Engleska) i stavljeni u inkubator (Memmert IN 30, Schwabach, Njemačka) na 40 °C tijekom 30 minuta. Apsorbancija je mjerena na spektrofotometru UV 2005 (Selecta, Španjolska) pri 765 nm (Singleton i sur., 1999) prema slijepoj probi. Slijepa proba je sadržavala sve osim uzorka.

Na temelju očitanih vrijednosti apsorbancije, konstruirane su kalibracijske krivulje za praćenje ukupnih polifenola. Metodom su praćeni neadsorbirani polifenoli; napravljene su dvije paralele, a mjerenje svake otopine provedeno je tri puta što je u konačnici za svaku koncentraciju dalo ukupan broj od šest mjerenja.

3.2.4. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih antocijanina

Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih antocijanina (Giusti i sur., 2001; Tonutare i sur., 2014) validirana je za standarde polifenola iz skupine antocijanina (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid). Kod te metode upotrijebljena je otopina pH 1,0 (0,025 mol/L kalijev klorid i HCl) i otopina pH 4,5 (0,4 mol/L natrijev acetat i HCl). U staklene kivete dodano je 100 μ L otopina antocijanina razrijeđenih koncentracija i 1900 μ L otopine pH 1,0. U druge staklene kivete dodano je 100 μ L otopina antocijanina razrijeđenih koncentracija i 1900 μ L otopine pH 4,5. Nakon 15 minuta stajanja na tamnom mjestu mjerena je apsorbancija (A) pri 510 i 700 nm. Kao slijepa proba služila je destilirana voda. Apsorbancija je određena pomoću jednadžbe (22):

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4,5} \quad (22)$$

gdje je A apsorbancija uzorka (standarda antocijanina), A_{510} apsorbancija mjerena na 510 nm i A_{700} apsorbancija mjerena na 700 nm.

Metodom za ukupne antocijanine konstruirane su kalibracijske krivulje cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-galaktozida koje su poslužile za praćenje ukupnih antocijanina tijekom procesa adsorpcije. Ta metoda primijenjena je za praćenje koncentracije neadsorbiranih antocijanina; napravljene su dvije paralele, a mjerenje svake otopine provedeno je tri puta što je u konačnici za svaku koncentraciju dalo ukupan broj od šest mjerenja.

3.2.5. Validacija analitičkih metoda za određivanje polifenola

Kalibracijske krivulje standarda polifenola konstruirane su stavljanjem u odnos koncentracije analita i odziva mjernog instrumenta: kod spektroskopskih metoda to je bila apsorbancija, a kod kromatografije površina ispod kromatografskog pika.

Granica detekcije (engl. *limit of detection*; LOD) određena je matematički iz iznosa standardne devijacije odsječka kalibracijskog pravca (SD) i njegova nagiba (a) prema jednadžbi (23).

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{SD}{a} \quad (23)$$

Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*; LOQ) smatra se trostrukom LOD vrijednošću te je određena matematički prema jednadžbi (24):

$$\text{LOQ} = 10 \frac{SD}{a} \quad (24)$$

Preciznost se može iskazati kao ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost (Taverniers i sur., 2004). Preciznost spektroskopskih metoda iz ovog doktorskoga rada izražena je preko ponovljivosti i međupreciznosti na temelju mjerenih koncentracija radnih standardnih otopina polifenola. Za potrebe izračuna ponovljivosti, mjerenja su provedena u vremenskom periodu od sedam dana ne mijenjajući pri tome laboratorij, analitičara ili analitički instrument. Međupreciznost je određena na temelju mjerenja provedenih također unutar istog laboratorija, te uz promjenu analitičara i upotrijebljenih reagensa. Prema jednadžbi (25) (Taverniers i sur., 2004), određen je koeficijent varijacije (KV) u postocima.

$$KV = \frac{SD}{\bar{y}} \times 100 \quad (25)$$

SD predstavlja standardnu devijaciju mjerenih koncentracija, a \bar{y} njihovu srednju vrijednost. Preciznost kromatografske metode određena je samo preko određivanja ponovljivosti.

Točnost spektroskopskih metoda i kromatografske metode određena je provedbom regresijske analize u programu MS Excel 2013 (pomoću alata Data Analysis), uz interval pouzdanosti od 95 %.

3.2.6. Adsorpcija standarda polifenola na β -glukanu

Modelna otopina za proces adsorpcije sastojala se od polifenola, β -glukana i otopina određene pH-vrijednosti. Za potrebe ovog ispitivanja služile su otopine pH-vrijednosti 1,5, 5,5 i 10,0 opisane u poglavlju 3.2.2. Ukupan volumen modelne otopine iznosio je 500 μL . Koncentracija polifenolnih standarda u modelnoj otopini iznosila je 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L, a β -glukana 5 mg/L. Adsorpcije su ispitivane na trima različitim temperaturama: 25, 37 i 45 °C pri konstantnoj pH-vrijednosti medija od 5,5 te za različite pH-vrijednosti medija: 1,5, 5,5 i 10,0, pri konstantnoj temperaturi od 37 °C. Modelne otopine homogenizirane su (homogenizator Grant Bio, Cambridgeshire, Engleska) te stavljene u inkubator (Incubator IN30, Memmert, Schwabach, Njemačka). Nakon uspostavljanja adsorpcijske ravnoteže (16 h,

prema Wang i sur., (2013)), neadsorbirani polifenoli odvojeni su na centrifugi (Eppendorf minispin, Hamburg, Njemačka) preko polietersulfonske membrane (Sartorius, Vivaspin 500, 10 000 MWCO, 100 – 500 μ L). Neadsorbirani polifenoli prošli su kroz membranu te im je određena koncentracija (c , mol/L) dok su se polifenoli adsorbirani na β -glukanu zadržali na membrani. Isti eksperiment ponovljen je za slijepu probu bez otopine β -glukana te je i ovdje određena koncentracija polifenola (c_0 , mol/L). Neadsorbirani polifenoli analizirani su validiranom Folin-Ciocalteuovom metodom te spektroskopskom metodom za ukupne antocijanine.

Koncentracija adsorbiranih polifenola (c_a , mol/L) određena je jednadžbom (26):

$$c_a = c_0 - c_e \quad (26)$$

Adsorpcijski kapacitet (q_e , mol/g) određen je jednadžbom (28):

$$q_e = \frac{c_a \cdot V_m}{\gamma_a \cdot V_a} \quad (28)$$

gdje je V_m ukupan volumen modelne otopine (L), γ_a (g/L) masena koncentracija β -glukana, a V_a (L) volumen otopine β -glukana koji je dodan u modelnu otopinu.

Količine adsorbiranih (q_e) i neadsorbiranih (c_e) polifenola u ravnoteži modelirane su nelinearnom regresijom pomoću Langmuirove, Freundlichove, Dubinjin-Raduškjevičeve, Tjomkinove i Hillove izoterme. Tim postupkom određene su konstante Freundlichove izoterme (K_F i $1/n$) prema jednadžbi (2), Langmuirove (K_L i q_m) prema jednadžbi (4), Dubinjin-Raduškjevičeve (q_m , c_s i E) prema jednadžbama (6), (8) i (9), Tjomkinove (A i b_T) prema jednadžbi (10), a Hillove (n_H , K_D i q_m) prema jednadžbi (12). Dubinjin-Raduškjevičeva konstanta c_s i Tjomkinova konstanta K_D nisu dobivene nelinearnom regresijom, već su odabrane na način da prate model nakon što su nelinearnom regresijom dobivene konstante q_m i E .

Termodinamički parametri: Gibbsova energija ΔG , standardna entalpija procesa adsorpcije ΔH i standardna entropija procesa adsorpcije ΔS određeni su pomoću izraza (14) i (15).

3.2.7. Snimanje UV/Vis-spektara

Snimljeni su UV/Vis-spektri radnih standardnih otopina polifenola, otopina β -glukana te modelne otopine koja sadrži polifenole i β -glukan. Spektri su snimani u kvarcnim kivetama volumena 2 mL na spektrofotometru UV-1280 (Shimadzu, Kyoto, Japan) u području valnih

duljina od 200 do 600 nm. Spektri standarda fenolnih kiselina (galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina), flavan-3-ola (procijanidin B1, procijanidin B2), dihidrokalkona (floretin, floretin-2-glukozid) i antocijanina (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid) snimljeni su za koncentracije 10 mg/L pri pH 5,5. Spektar β -glukana snimljen je za otopinu koncentracije 5 mg/L pri pH 5,5. Snimljen je i UV/Vis-spektar modelne otopine u kojoj se odvijala adsorpcija polifenola i β -glukana na 25 °C pri pH 5,5 nakon 16 h: koncentracija polifenola iznosila je 25 mg/L, β -glukana 5 mg/L, a ostatak otopine bio je pufer (pH 5,5). Određeni su maksimumi apsorbancije za pojedini polifenolni spoj te pomaci maksimuma u spektru. Snimljen je i spektar kompleksa (polifenol – β -glukan) na 25 °C pri pH 5,5 nakon 16 h: koncentracija polifenola iznosila je 25, a β -glukana 5 mg/L.

3.2.8. Kinetika adsorpcije polifenola na β -glukanu

Modelna otopina za proces adsorpcije sastojala se od polifenola, β -glukana i otopine pH-vrijednosti 5,5. Ukupan volumen modelne otopine iznosio je 500 μ L. Koncentracija polifenolnih standarda u modelnoj otopini iznosila je 100 mg/L, a β -glukana 5 mg/L. Modelne otopine homogenizirane su (homogenizator Grant Bio, Cambridgeshire, Engleska) te stavljene u inkubator (Incubator IN 30, Memmert, Schwabach, Njemačka). Adsorpcija je provedena na 25 °C tijekom 1, 2, 5, 8, 10 i 16 h. Postupak je ponovljen prema odjeljku 3.2.6. Koncentracija adsorbiranih polifenola određena je jednadžbom (26). Konstanta pseudo-prvog reda određena je prema jednadžbi (17), a pseudo-drugog reda prema jednadžbi (20). Mjerenje je provedeno tri puta za svaku koncentraciju u dvije paralele ($n = 6$). Vremena polureakcija određena su prema jednadžbama (18) i (21).

3.2.9. Ekstrakcija polifenola iz mesa i kože jabuka

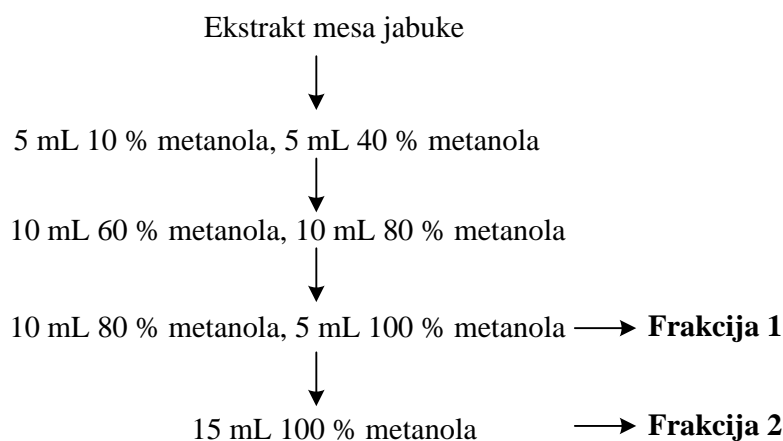
Tradicionalna sorta jabuke „Božićnica“ oguljena je (oko 1 kg), a kožica je samljevena u mikseru za kavu. Meso je izrezano na četiri dijela, sredina i sjemenke su uklonjeni, a meso je homogenizirano štapnim mikserom. Za pripremu ekstrakta mesa odnosno kože jabuka odvagano je približno 0,5 g jabučne sirovine (meso ili kožica) te je dodan 1 mL 80 %-tnog metanola. Uzorci su stavljani 15 min u ultrazvučnu kupelj (RK 100, Berlin, Njemačka) te potom centrifugirani 15 minuta na 10 000 rpm (centrifuga Eppendorf MiniSpin, Hamburg, Njemačka). Nakon centrifugiranja, ekstrakt je dekantiran. Postupak je ponovljen deset puta, a ekstrakti su međusobno spojeni. Ukupno je dobiveno oko 10 mL ekstrakta mesa i kože jabuka.

3.2.10. Gel-filtracijsko razdvajanje polifenola iz jabuka

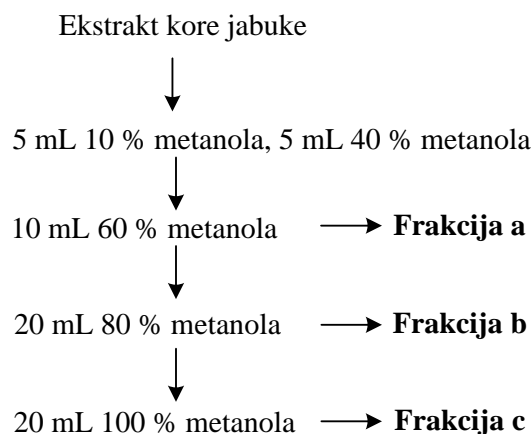
Pojedine skupine polifenola izdvojene su iz ekstrakta kože i mesa jabuke pomoću gel-filtracijske kromatografije na koloni (Lenz Laborglas, Wertheim, promjer 200 mm, volumen 15 mL) ispunjenoj gelom Sephadex LH-20 (Pharmacia A.B., Uppsala, Švedska) kao stacionarnom fazom. U kolonu je stavljeno približno 5 g gela Sephadex te je potom dodano 30 mL 80 %-tnog metanola kako bi gel nabubrio. Po bubrenju, kolona je isprana najprije s 10 mL 60 %-tnog metanola, a potom s 20 mL 10 %-tnog metanola. Nakon ispiranja, u kolonu je ispušten pripremljen ekstrakt mesa jabuke (10 mL). Ekstrakt je potom eluiran dodatkom otopina metanola različitih postotaka (10, 40, 60, 80 i 100 %) te su hvatane dvije frakcije polifenola: frakcija 1 i frakcija 2 na slici 13.

Nakon razdvajanja frakcija polifenola iz ekstrakta mesa jabuke, kolona je ispirana s 30 mL 80 %-tnog metanola te je potom postupak ponovljen za ekstrakt kože jabuke (10 mL). Ekstrakt je također eluiran otopinama metanola različitog udjela (10, 40, 60, 80 i 100 %-tni metanol) no nešto drugačijih volumena nego što je bilo u slučaju ekstrakta mesa jabuke (slika 14). Hvatane su tri frakcije polifenola: frakcija a, frakcija b i frakcija c.

Sve dobivene frakcije uparene su na rotirajućem isparivaču te otopljene u 1 mL 100 %-tnog metanola.



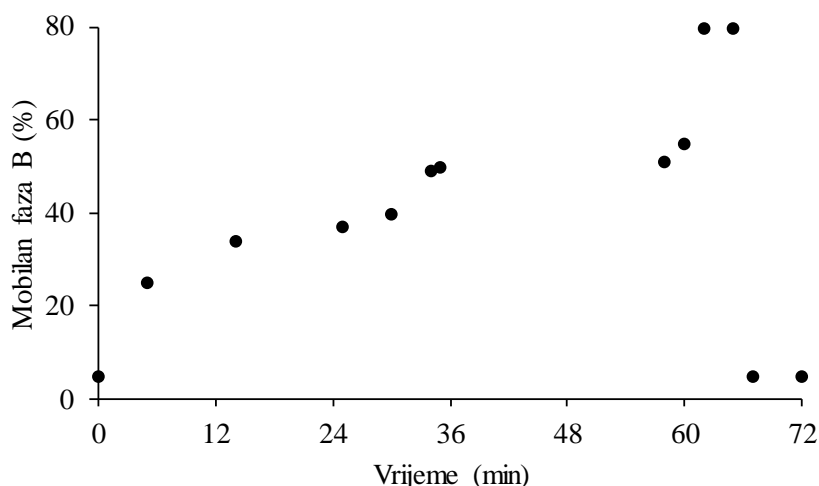
Slika 13 Shema eluiranja polifenola u ekstraktu mesa jabuke



Slika 14 Shema eluiranja polifenola u ekstraktu kože jabuke

3.2.1. Kromatografija obrnutih faza za određivanje polifenola u ekstraktu kože i mesa jabuke

Kromatografska analiza polifenola uključivala je kromatografiju obrnutih faza (RP-HPLC). Analiza je provedena na sustavu 1260 Infinity opremljenom kvaternom pumpom 1260 Infinity II i detektorom 1260 Infinity II DAD, dok je za potrebe separacije polifenola upotrijebljena kolona Poroshell 120 (EC-C18, 4,6×100 mm, 2,7 μ m) s pretkolonom Poroshell 120 UHPLC Guard (EC-C 18, 4,6 mm); sva navedena oprema je od proizvođača Agilent (Santa Clara, SAD). Za pripremu mobilne faze upotrijebljene su dvije otopine: 0,1 %-tna otopina H_3PO_4 (otopina A) i 100 %-tni metanol (otopina B). Analiza je provedena gradijentnom elucijom. Udio otopine B u mobilnoj fazi povećavan je linearno tijekom trajanja analize sukladno shemi prikazanoj na slici 15. Protok je iznosio 0,8 mL/min, a volumen injektiranog uzorka 10 μ L. Kromatogrami su snimani u području valnih duljina od 200 do 600 nm. Procijanidin B2, floretin-2-glukozid, floretin-2-ksiloglukozid praćeni su na 280 nm, klorogenska kiselina na 320 nm, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-ramnozid, kvercetin-3-ksilozid, derivat kvercetina 1 i derivat kvercetina 2 na 360 nm, a cijanidin-3-galaktozid na 510 nm. Identifikacija polifenola (procijanidin B2, floretin-2-glukozid, klorogenska kiselina, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-ramnozid, cijanidin-3-galaktozid) iz jabuka izvedena je usporedbom spektara i retencijskih vremena pikova standarda i pikova dobivenih analizom ekstrakata mesa i kože jabuka, dok je kvantifikacija provedena na temelju kalibracijskih pravaca izrađenih iz radnih standardnih otopina polifenola. Neki pikovi djelomično su identificirani pomoću UV/Vis-spektara ili podataka iz literature (floretin-2-ksiloglukozid, kvercetin-3-ksilozid, derivat kvercetina 1, derivat kvercetina 2).



Slika 15 Postotak mobilne faze B tijekom vremena

Konstruirane su kalibracijske krivulje za praćenje polifenola. Metodom su praćeni polifenoli iz jabuke neadsorbirani tijekom procesa adsorpcije, a napravljene su dvije paralele.

3.2.2. Adsorpcija polifenola iz ekstrakta mesa i kože jabuke na β -glukanu

Adsorpcija polifenola iz ekstrakata mesa i kože jabuka (frakcije 1 i 2 te a, b i c) provedena je na β -glukanu. Otopina se sastojala od različitih volumena frakcija polifenola (50, 100, 200 i 300 μ L), zatim od β -glukana (5 mg/L, 13,16 μ L), a ostatak volumena do ukupno 500 μ L činio je fosfatni pufer (pH 5,5). Adsorpcija je provedena pri 25 °C i pH-vrijednosti medija 5,5. Modelne otopine homogenizirane su (homogenizator Grant Bio, Cambridgeshire, Engleska) te stavljene u inkubator (Incubator IN30, Memmert, Schwabach, Njemačka). Nakon uspostavljanja adsorpcijske ravnoteže (16 h, prema Wang i sur., (2013)), neadsorbirani polifenoli odvojeni su od adsorbiranih na centrifugi (Eppendorf MiniSpin, Hamburg, Njemačka) preko polietersulfonske membrane (Sartorius, Vivaspin 500, 10 000 MWCO, 100 – 500 μ L). Proveden je eksperiment slijepe probe bez β -glukana.

Koncentracija adsorbiranih polifenola određena je prema jednadžbi (26), koncentracija neadsorbiranih polifenola prema jednadžbi (27), te adsorpcijski kapacitet prema jednadžbi (28). Određene su konstante Freundlichove izoterme (K_F i $1/n$) prema jednadžbi (2), Langmuirove (K_L i q_m) prema jednadžbi (4), Dubinjin-Raduškjevičeve (q_s , E i c_s) prema jednadžbama (6), (8) i (9), Tjomkinove (A i b_T) prema jednadžbi (10), i Hillove (n_H , q_m i K_D) prema jednadžbi (12).

3.2.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je računalnim programom MS Excel 2013 (Microsoft Corporation, SAD). Statistička obrada podataka provedena je Tukeyevim *post-hoc* testom u programskom paketu *Statistica* (TIBCO Software Inc., SAD), a statističku razliku između podataka prikazuju različita slova.

Za potrebu izrade kalibracijskih dijagrama provedena je regresijska analiza.

Nakon adsorpcije polifenola na β -glukanu, na eksperimentalne podatke primijenjeni su modeli Freundlicha, Langmuira, Dubinjin-Raduškjeviča, Tjomkina i Hilla. Konstante modela dobivene su nelinearnom regresijom pomoću alata Solver (Redmond, USA). Standardna pogreška nelinearne regresije S određena je pomoću jednadžbe:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n n [q_{e,i} - f(c_{e,i}, a, b)]^2}{N - k}} \quad (29)$$

gdje n predstavlja broj mjerenja provedenih za pojedinu koncentraciju polifenola, $c_{e,i}$ (mol/L) je i -ta vrijednost ravnotežne koncentracije polifenola, $q_{e,i}$ (mol/g) i -ta vrijednost ravnotežnog adsorpcijskog kapaciteta, f nelinearna funkcija s parametrima a i b koji predstavljaju konstante modela, N ukupan broj mjerenja, a k broj parametara u modelu.

4. REZULTATI

4.1. Validacije analitičkih metoda

4.1.1. Validacija spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola

Tablica 2 Područje linearnosti, granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola

Standard	Područje linearnosti mg/L	Kalibracijska jednadžba	R^2	LOD mg/L	LOQ mg/L
Fenolne kiseline					
galna kiselina	5,4 – 500	$y=0,0013x-0,0101$	0,9994	1,8	5,4
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,4 – 200	$y=0,0010x+0,0043$	0,9975	1,1	3,4
kafeinska kiselina	5,2 – 500	$y=0,0015x+0,0079$	0,9983	1,7	5,2
klorogenska kiselina	6,2 – 500	$y=0,0008x+0,0029$	0,9979	2,0	6,2
Flavan-3-oli					
procijanidin B1	4,2 – 160	$y=0,0022x-0,0072$	0,9939	1,4	4,2
procijanidin B2	6,5 – 300	$y=0,0012x+0,0091$	0,9957	2,1	6,5
Dihidroalkoni					
floretin	5,3 – 1000	$y=0,0008x-0,0013$	0,9989	1,8	5,3
floretin-2-glukozid	1,4 – 1000	$y=0,0005x+0,0033$	0,9974	0,5	1,4

Tablica 3 Preciznosti spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola

Standard	Koncentracija Ponovljivost		Srednja vrijednost ponovljivosti		Srednja vrijednost međupreciznosti	
	mg/L	%	%	%	%	%
Fenolne kiseline						
galna kiselina	40	8,3	3,6	7,9	4,8	
	70	0,6		1,8		
	150	1,9		4,8		
<i>p</i> -kumarinska kiselina	40	2,9	3,5	4,1	5,0	
	70	6,2		8,8		
	150	1,4		2,0		
kafeinska kiselina	40	11,2	5,8	7,6	4,3	
	70	4,3		3,7		
	150	1,9		1,7		
klorogenska kiselina	40	1,8	2,9	0,9	2,3	
	70	5,5		3,5		
	150	1,3		2,6		
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	15	4,2	3,3			
	100	4,8				
	160	0,9				
procijanidin B2	33	3,0	3,1	1,5	3,5	
	65	1,7		2,4		
	117	4,6		6,6		
Dihidroalkoni						
floretin	40	3,0	4,5	2,5	4,0	
	70	8,1		6,6		
	150	2,4		2,8		
floretin-2-glukozid	40	0,0	3,9	3,9	5,3	
	70	6,1		6,9		
	150	5,6		5,0		

Tablica 4 Analiza točnosti spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola

Standard	Nagib pravca	95 %-tni interval pouzdanosti		Odsječak na ordinati	95 %-tni interval pouzdanosti	
		Donja granica	Gornja granica		Donja granica	Gornja granica
Fenolne kiseline						
galna kiselina	0,9804	0,9153	1,0455	1,6333	-4,4679	7,7346
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,0206	0,9814	1,0598	0,8377	-2,4981	4,1734
kafeinska kiselina	0,9848	0,9239	1,0903	-0,0238	-6,4411	6,3935
klorogenska kiselina	1,0071	0,9807	1,0765	-6,4166	-15,9528	3,1197
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	1,0117	0,9470	1,0765	-0,0114	-5,4219	5,3990
procijanidin B2	0,9986	0,9623	1,0350	-0,0200	-4,8360	4,7960
Dihidroalkaloni						
floretin	1,0286	0,9807	1,0765	-0,6392	-5,5525	4,2740
floretin-2-glukozid	1,1198	0,9675	1,2721	-6,6781	-20,8023	7,4461

4.1.2. Validacija spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih antocijanina

Tablica 5 Područje linearnosti, granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih antocijanina

Standard	Područje linearnosti mg/L	Kalibracijska jednadžba	R^2	LOD mg/L	LOQ mg/L
Antocijanini					
cijanidin-3-glukozid	1-200	$y=0,0036x-0,0071$	0,9991	0,3	0,8
cijanidin-3-galaktozid	1-200	$y=0,0029x+0,016$	0,9946	0,2	0,7

Tablica 6 Preciznost spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih antocijanina

Standard	Koncentracija mg/L	Ponovljivost %	Srednja vrijednost ponovljivosti
			%
Antocijanini			
cijanidin-3-glukozid	40	1,0	0,77
	70	0,6	
	150	0,7	
cijanidin-3-galaktozid	40	2,0	2,23
	70	3,7	
	150	1,0	

Tablica 7 Analiza točnosti spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih antocijanina

Standard	Nagib pravca	95 %-tni interval pouzdanosti		Odsječak na ordinati	95 %-tni interval pouzdanosti	
		Donja granica	Gornja granica		Donja granica	Gornja granica
Antocijanini						
cijanidin-3-glukozid	1,0156	0,9713	1,0219	-0,0133	-2,4932	2,5088
cijanidin-3-galaktozid	0,9975	0,9545	1,0766	0,0078	-6,2744	6,2478

4.1.3. Validacija kromatografije obrnutih faza za određivanje polifenolnih spojeva

Tablica 8 Parametri validacije kromatografije obrnutih faza za određivanje individualnih polifenola u jabukama

Standard	Područje linearnosti mg/L	Kalibracijska jednadžba	R^2	LOD mg/L	LOQ mg/L	Preciznost KV (%)	Analitički povrat %
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	1,16-48,00	$y=5,3923x+1,7429$	0,9959	0,38	1,16	2,6	113,7
(-)-epikatehin	4,09-46,00	$y=10,5690x-4,7658$	0,9984	1,35	4,09	1,7	98,0
procijanidin B1	2,39-22,50	$y=4,7074x+19,2770$	0,9927	0,79	2,39	2,1	90,3
procijanidin B2	1,81-22,50	$y=20,2200x-5,9652$	0,9985	0,60	1,81	1,4	101,5
Dihidroalkoni							
floretin	1,04-45,60	$y=110,2200x+8,0922$	0,9998	0,34	1,04	1,3	102,2
floretin-2-glukozid	0,92-46,00	$y=60,1500x+2,7218$	0,9997	0,21	0,64	1,7	102,4
Fenolne kiseline							
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,47-49,00	$y=199,5700x-416,3800$	0,9947	1,15	3,47	1,6	95,0
klorogenska kiselina	0,91-45,60	$y=21,8440x+27,4410$	0,9986	0,01	0,04	2,8	98,3
Flavonoli							
kvercetin-3-galaktozid	0,98-49,00	$y=33,0990x-0,1574$	1,0000	0,02	0,07	1,3	99,3
kvercetin-3-glukozid	2,18-45,00	$y=38,2330x-15,0050$	0,9993	0,72	2,18	0,9	107,2
kvercetin-3-ramnozid	2,64-49,20	$y=64,5370x-39,8810$	0,9976	0,87	2,64	0,8	90,2
kvercetin	1,73-42,90	$y=116,6600x-33,8510$	0,9989	0,57	1,73	0,8	98,5
Antocijanini							
cijanidin-3-galaktozid	1,71-24,30	$y=38,7230x+14,7940$	0,9933	0,56	1,71	3,4	99,3

Tablica 9 Analiza točnosti kromatografije obrnutih faza za određivanje individualnih polifenola u jabukama

Standard	Nagib pravca	95 %-tni interval pouzdanosti		Odsječak na ordinati	95 %-tni interval pouzdanosti		
		Donja granica	Gornja granica		Donja granica	Gornja granica	
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	0,9959	0,1829	1,8089	0,0803	-22,9249	23,0854	
(-)-epikatehin	0,9985	0,4932	1,5037	0,0296	-13,6626	13,7219	
procijanidin B1	0,9927	-0,0890	2,0744	0,0668	-14,2940	14,4276	
procijanidin B2	0,9984	0,4994	1,4975	0,0141	-6,6010	6,6293	
Dihidroalkoni							
floretin	0,9998	0,8335	1,1661	0,0032	-4,4621	4,4684	
floretin-2-glukozid	0,9997	0,7688	1,2306	0,0062	-6,2494	6,2617	
Fenolne kiseline							
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,9947	0,0718	1,9176	0,1057	-26,5617	26,7731	
klorogenska kiselina	0,9986	0,5239	1,4732	0,0259	-12,7228	12,7746	
Flavonoli							
kvercetin-3-galaktozid	1,0000	0,9669	1,0331	0,0001	-0,9541	0,9543	
kvercetin-3-glukozid	0,9993	0,6525	1,5347	0,0136	-9,1786	9,2059	
kvercetin-3-ramnozid	1,1006	0,6665	1,5347	-0,4744	-12,0323	11,0836	
kvercetin	0,9989	0,5739	1,4239	0,0196	-10,7212	10,7603	
Antocijanini							
cijanidin-3-galaktozid	0,9988	0,5569	1,4407	0,0119	-6,3156	6,3396	

4.2. Adsorpcija polifenola na β -glukan na različitim temperaturamaTablica 10 Količina adsorbiranih fenolnih kiselina, flavan-3-ola, dihidrokalkona i antocijanina po masi β -glukana (q_e , mmol/g) na 25, 37 i 45 °C

Standard	q_e^* (mmol/g)		
	25 °C	37 °C	45 °C
Fenolne kiseline			
galna kiselina	2,47±1,59 ^a	4,49±1,76 ^a	2,32±1,07 ^a
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,30±0,87 ^a	1,91±0,00 ^{b,c}	0,68±0,00 ^a
kafeinska kiselina	1,33±0,94 ^a	2,27±1,06 ^{b,c}	1,52±1,16 ^a
klorogenska kiselina	1,36±1,00 ^a	1,53±0,89 ^{b,c}	1,50±0,81 ^a
Flavan-3-oli			
procijanidin B1	0,21±0,07 ^a	0,23±0,22 ^c	0,69±0,40 ^a
procijanidin B2	0,23±0,00 ^a	0,69±0,60 ^c	0,76±0,00 ^a
Dihidroalkoni			
floretin	2,20±0,53 ^a	0,83±0,43 ^c	1,82±0,43 ^a
floretin-2-glukozid	0,00±0,00 ^a	2,90±0,54 ^{a,b}	0,00±0,00 ^a
Antocijanini			
cijanidin-3-glukozid	1,71±0,11 ^a	1,20±0,37 ^{b,c}	0,79±0,17 ^a
cijanidin-3-galaktozid	0,51±0,43 ^a	0,80±0,25 ^c	0,43±0,29 ^a

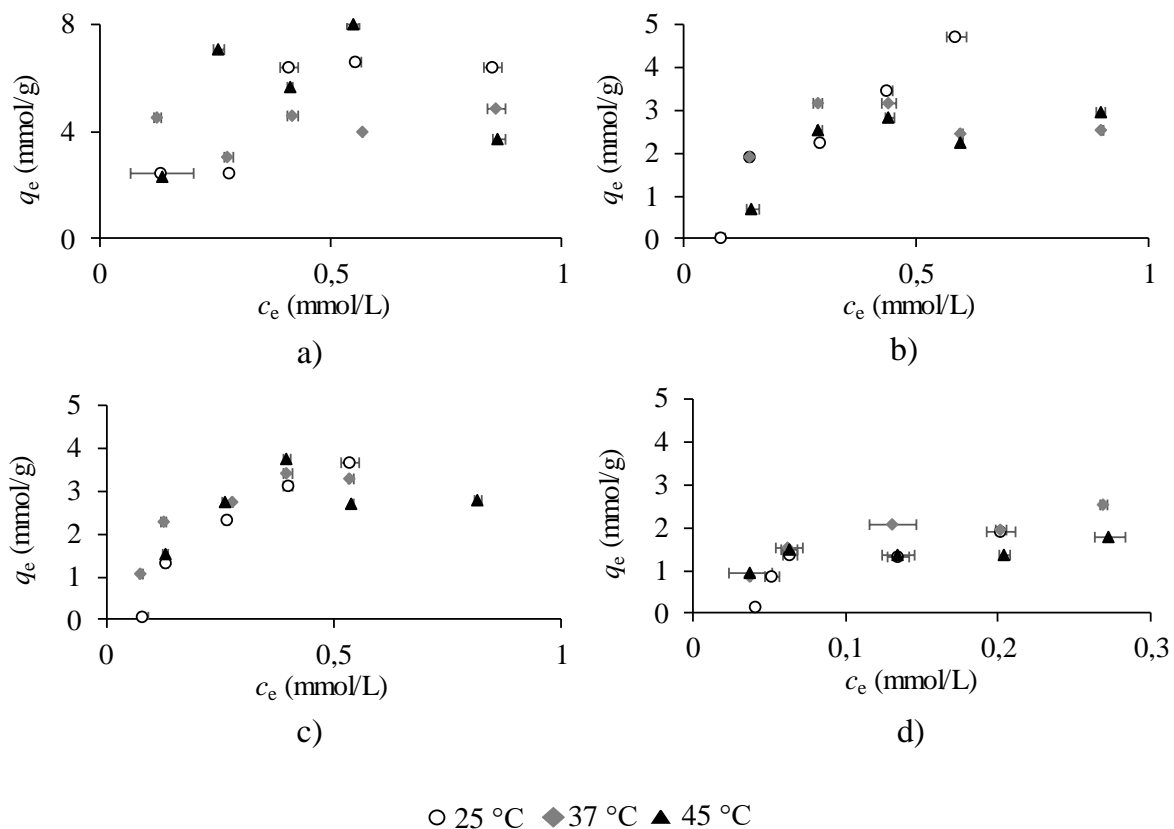
q_e vrijednosti dobivene procesom adsorpcije s početnom koncentracijom polifenola 25 mg/L

*eksponenti u koloni (a-c) odgovaraju razlici između adsorpcijskih kapaciteta polifenola na istoj temperaturi (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

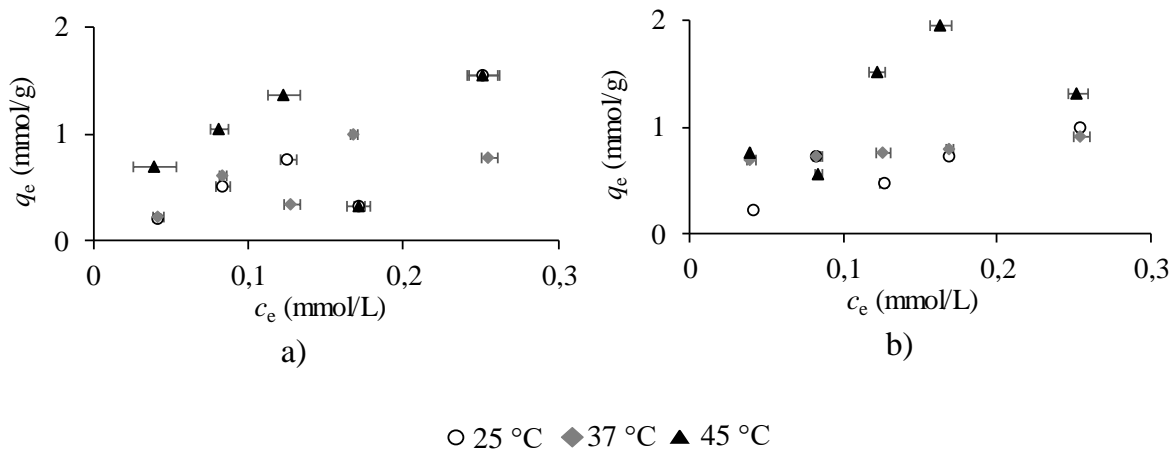
Tablica 11 Statistička analiza razlika u adsorpcijskim kapacitetima za svaki polifenol na 25, 37 i 45 °C

Standard	Temperatura		
	25 °C	37 °C	45 °C
Fenolne kiseline			
galna kiselina	a	a	a
<i>p</i> -kumarinska kiselina	a	a	a
kafeinska kiselina	a	a	a
klorogenska kiselina	a	a	a
Flavan-3-oli			
procijanidin B1	a	a	a
procijanidin B2	a	a	a
Dihidroalkoni			
floretin	a	a	a
floretin-2-glukozid	b	a	b
Antocijanini			
cijanidin-3-glukozid	a	a	a
cijanidin-3-galaktozid	a	a	a

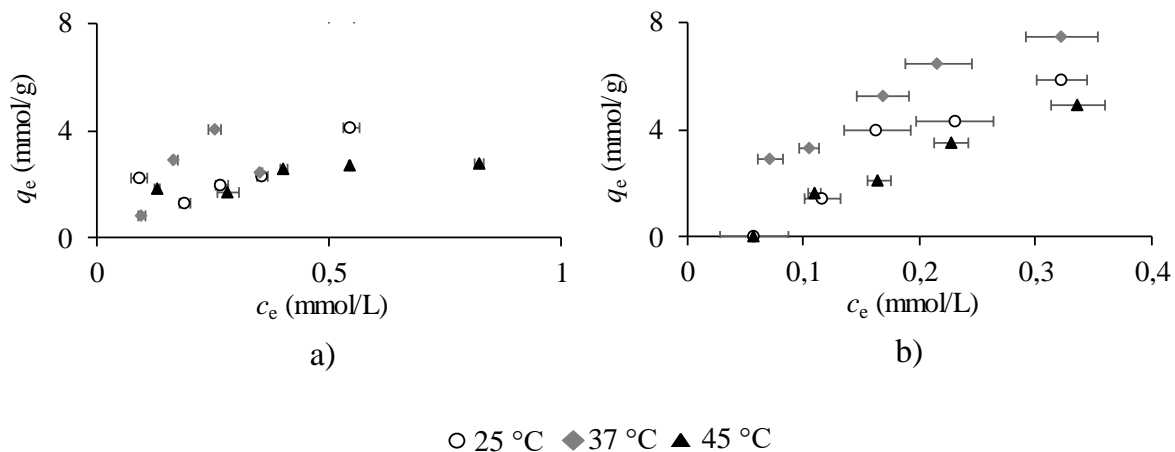
*eksponenti u retku (a-b) odgovaraju statističkoj razlici između adsorpcijskih kapaciteta na različitim temperaturama za svaki polifenol posebno (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)



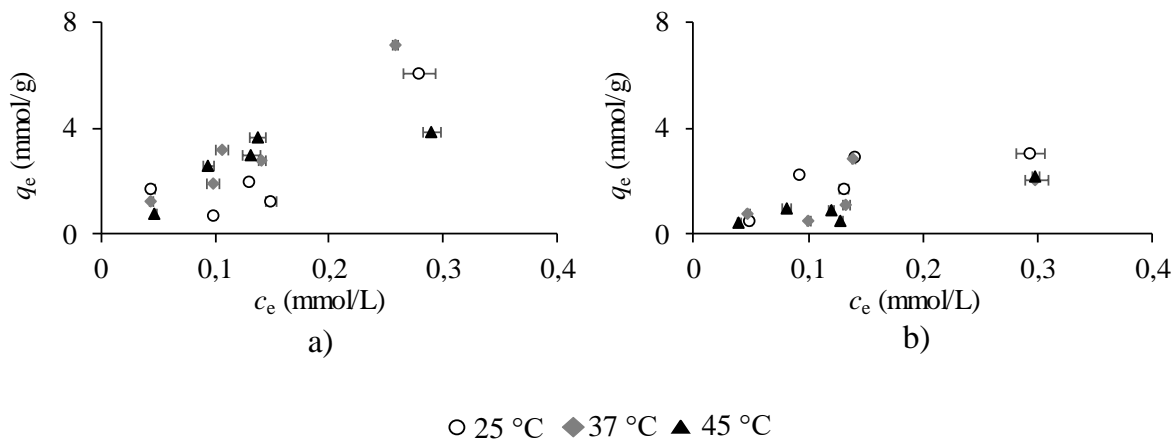
Slika 16 Adsorpcijske ravnoteže galne kiseline (a), *p*-kumarinske kiseline (b), kafeinske kiseline (c) i klorogenske kiseline (d) na β -glukanu pri 25, 37 i 45 °C



Slika 17 Adsorpcijske ravnoteže procijanidina B1 (a) i procijanidina B2 (b) na β -glukanu pri 25, 37 i 45 °C



Slika 18 Adsorpcijske ravnoteže floretina (a) i floretin-2-glukozida (b) na β -glukanu pri 25, 37 i 45 °C



Slika 19 Adsorpcijske ravnoteže cijanidin-3-glukozida (a) i cijanidin-3-galaktozida (b) na β -glukanu na 25, 37 i 45 °C

Tablica 12 Parametri Freundlichova i Langmuirova modela za adsorpciju polifenola na β -glukanu na 25, 37 i 45 °C

Standard	Freundlichov model*			Langmuirov model*		
	$1/n$	K_F (mol/g) (L/mol) ^{1/n}	S (10 ⁻⁴)	q_m (mmol/g)	K_L (L/mol)	S (10 ⁻⁴)
25 °C						
Fenolne kiseline						
galna kiselina	0,26±0,05 ^a	0,04±0,01 ^a	37	11,00±1,40 ^a	2782±1176 ^c	31
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,41±0,20 ^a	0,12±0,13 ^a	10	5,30±1,50 ^{b,c,d,e}	4557±2970 ^c	11
kafeinska kiselina	0,54±0,35 ^a	0,66±0,90 ^a	14	4,10±1,20 ^{c,d,e}	5262±370 ^c	12
klorogenska kiselina	0,39±0,02 ^a	0,06±0,01 ^a	10	2,80±1,00 ^{d,e}	11782±25 ^{b,c}	10
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	0,26±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	5	0,80±0,00 ^e	24911±1986 ^a	5
procijanidin B2	0,63±0,06 ^a	0,19±0,08 ^a	2	1,80±0,10 ^{d,e}	4743±1373 ^c	2
Dihidroalkoni						
floretin	0,55±0,00 ^a	0,27±0,01 ^a	16	8,20±0,90 ^{a,b,c}	1962±179 ^c	10
floretin-2-glukozid	0,53±0,00 ^a	0,45±0,01 ^a	25	9,00±1,00 ^{a,b}	2852±553 ^c	15
Antocijanini						
cijanidin-3-glukozid	0,27±0,01 ^a	0,03±0,00 ^a	28	5,80±0,80 ^{b,c,d}	4426±138 ^c	19
cijanidin-3-galaktozid	0,02±0,03 ^a	0,01±0,00 ^a	14	3,90±0,20 ^{c,d,e}	23259±8868 ^{a,b}	13
37 °C						
Fenolne kiseline						
galna kiselina	0,09±0,00 ^c	0,01±0,00 ^b	14	4,30±1,10 ^{a,b,c}	66335±17167 ^a	13
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,35±0,00 ^{a,b,c}	0,05±0,01 ^b	10	2,90±0,80 ^{b,c}	15315±1713 ^b	12
kafeinska kiselina	0,21±0,28 ^{b,c}	0,04±0,05 ^b	11	4,90±0,20 ^{a,b,c}	9456±6581 ^b	10
klorogenska kiselina	0,42±0,22 ^{a,b,c}	0,13±0,16 ^b	5	2,60±0,40 ^{b,c}	21785±2524 ^b	7
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	0,77±0,04 ^a	0,62±0,11 ^b	6	1,70±1,30 ^{b,c}	5641±3807 ^b	4
procijanidin B2	0,27±0,14 ^{b,c}	0,01±0,01 ^b	3	1,20±0,40 ^c	12666±1274 ^b	4
Dihidroalkoni						
floretin	0,80±0,06 ^a	2,87±0,49 ^a	29	9,40±1,00 ^{a,b}	12876±1744 ^b	4
floretin-2-glukozid	0,52±0,01 ^{a,b,c}	0,52±0,03 ^b	14	9,80±0,00 ^a	7317±2417 ^b	5
Antocijanini						
cijanidin-3-glukozid	0,34±0,02 ^{a,b,c}	0,07±0,01 ^b	29	9,20±1,00 ^{a,b,c}	9672±6276 ^b	19
cijanidin-3-galaktozid	0,65±0,03 ^{a,b}	0,44±0,07 ^b	14	5,20±1,00 ^{a,b,c}	9023±7193 ^b	11
45 °C						
Fenolne kiseline						
galna kiselina	0,29±0,13 ^a	0,06±0,04 ^a	27	8,60±0,60 ^a	6988±3941 ^b	25
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,48±0,14 ^a	0,14±0,12 ^a	8	4,30±1,40 ^{b,c,d}	4139±3060 ^b	8
kafeinska kiselina	0,75±0,07 ^a	1,14±0,29 ^a	21	5,10±0,20 ^{b,c}	3095±337 ^b	12
klorogenska kiselina	0,39±0,02 ^a	0,04±0,01 ^a	5	2,10±0,10 ^{d,e}	14631±175 ^b	6
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	0,28±0,01 ^a	0,01±0,00 ^a	6	1,30±0,10 ^e	32096±3668 ^a	6
procijanidin B2	0,34±0,21 ^a	0,09±0,09 ^a	30	4,40±1,00 ^{b,c,d}	11250±1768 ^b	14
Dihidroalkoni						
floretin	0,48±0,57 ^a	1,16±1,64 ^a	8	3,70±0,04 ^{b,c,d}	19638±11356 ^{a,b}	7
floretin-2-glukozid	0,45±0,02 ^a	0,17±0,04 ^a	22	4,80±1,00 ^{b,c}	9446±1797 ^b	14
Antocijanini						
cijanidin-3-glukozid	0,53±0,06 ^a	0,30±0,01 ^a	10	5,90±0,80 ^b	7028±2008 ^b	8
cijanidin-3-galaktozid	0,65±0,03 ^a	0,34±0,03 ^a	7	2,80±0,06 ^{c,d,e}	3202±33 ^b	7

parametri su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

*ekspONENTI u koloni (a-e) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola na jednoj temperaturi (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)
S predstavlja standardnu pogrešku

Tablica 13 Parametri Dubinjin-Raduškjevičeva i Tjomkinova modela za adsorpciju polifenola na β -glukanu na 25, 37 i 45 °C

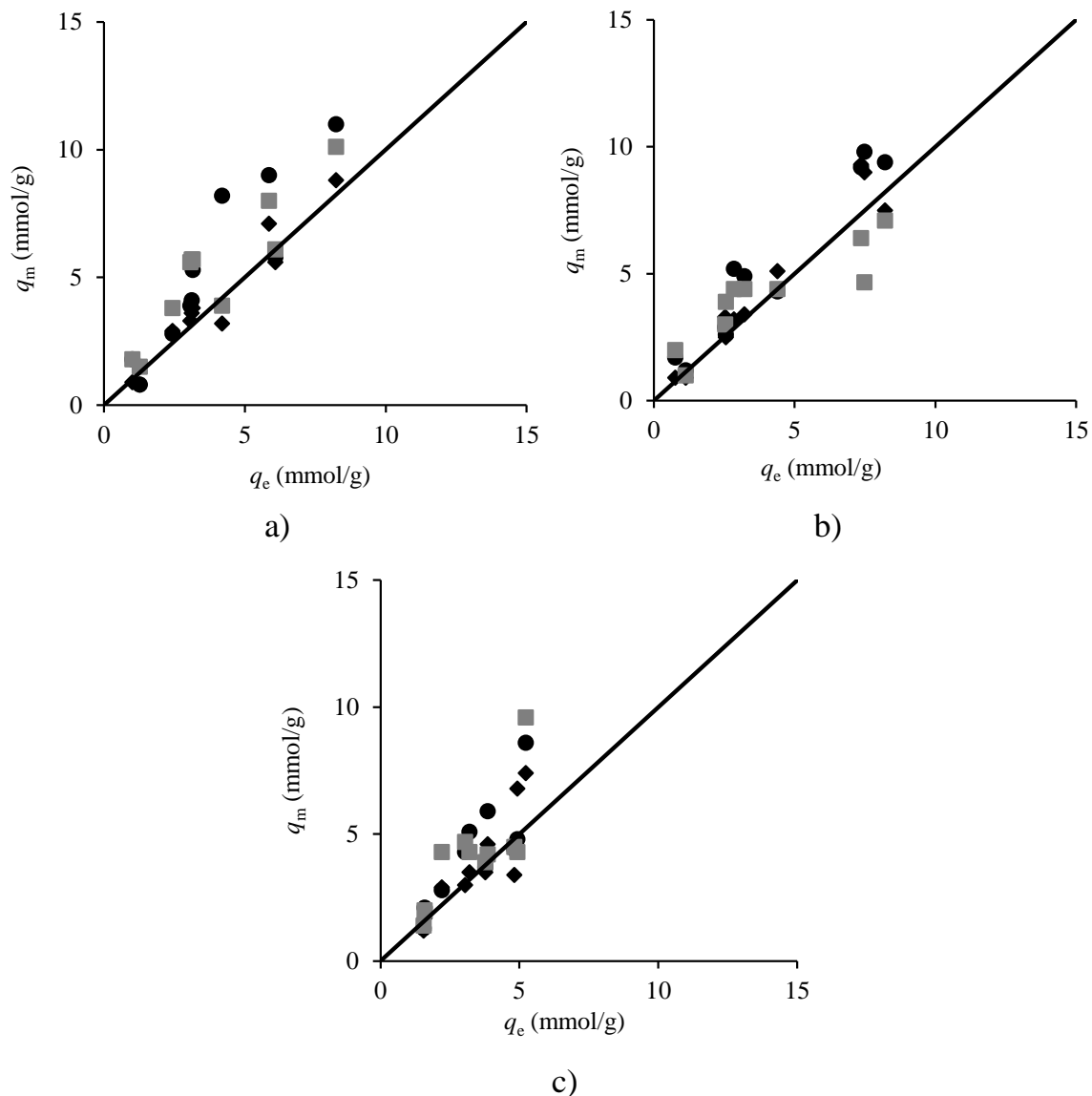
Standard	Dubinjin-Raduškjevičev model *				Tjomkinov model*		
	q_m (mmol/g)	E (J/mol)	c_s (mmol/L)	S (10^{-4})	A (L/g)	b_T (J/mol)	S (10^{-4})
25 °C							
Fenolne kiseline							
galna kiselina	8,80±3,20 ^a	2553±2374 ^a	0,80±0,00 ^a	22	7717±86 ^b	523186±52 ^d	39
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,80±0,40 ^{a,b,c}	2605±413 ^a	0,60±0,00 ^b	10	17153±551 ^b	1532867±3676 ^d	17
kafeinska kiselina	3,60±1,10 ^{a,b,c}	2800±352 ^a	0,60±0,00 ^a	12	27908±1541 ^b	2516008±1767 ^{c,d}	21
klorogenska kiselina	2,90±0,70 ^{a,b,c}	2026±95 ^a	0,40±0,00 ^c	12	62601±5101 ^b	3219827±9485 ^{b,c,d}	5
Flavan-3-oli							
procijanidin B1	0,80±0,20 ^c	3765±800 ^a	0,30±0,00 ^d	5	15966±1391 ^b	24372640±2339 ^a	0
procijanidin B2	0,90±0,00 ^{b,c}	3085±537 ^a	0,30±0,00 ^d	3	59044±636 ^b	6671158±4101 ^b	5
Dihidroalkoni							
floretin	3,20±0,40 ^{a,b,c}	3640±917 ^a	0,60±0,00 ^b	11	62868±1500 ^b	2553484±70777 ^{c,d}	25
floretin-2-glukozid	7,10±3,00 ^{a,b}	2206±681 ^a	0,30±0,00 ^d	11	16149±622 ^b	1477765±1176249 ^d	5
Antocijanini							
cijanidin-3-glukozid	5,60±0,40 ^{a,b,c}	3373±88 ^a	0,80±0,00 ^a	20	33591±2022 ^b	1425918±42426 ^d	28
cijanidin-3-galaktozid	3,30±1,00 ^{a,b,c}	5483±2258 ^a	0,80±0,00 ^a	10	669930±62147 ^a	5549167±728393 ^{b,c}	14
37 °C							
Fenolne kiseline							
galna kiselina	5,10±0,60 ^{a,b,c}	1856±47 ^a	0,80±0,00 ^a	35	14072547±1414 ^a	6198677±2118 ^{a,b}	19
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,30±0,90 ^{a,b,c}	1999±56 ^a	0,40±0,00 ^b	19	41582±1343 ^b	2216241±1556 ^b	17
kafeinska kiselina	3,40±0,60 ^{a,b,c}	6623±3731 ^a	0,80±0,00 ^a	10	39310±565 ^b	2247927±63710 ^b	13
klorogenska kiselina	2,50±0,10 ^{b,c}	4171±1602 ^a	0,40±0,00 ^b	7	180524±1792 ^b	3964700±9804 ^b	5
Flavan-3-oli							
procijanidin B1	0,90±0,40 ^c	2204±234 ^a	0,30±0,00 ^c	6	32778±1133 ^b	4778001±6929 ^b	6
procijanidin B2	0,90±0,10 ^c	4639±1590 ^a	0,30±0,00 ^c	4	5754384±803 ^{a,b}	15307590±7690 ^a	3
Dihidroalkoni							
floretin	7,50±1,00 ^{a,b}	2531±657 ^a	0,80±0,00 ^a	29	12965±3911 ^b	767289±160144 ^b	26
floretin-2-glukozid	9,00±1,00 ^{a,b}	4001±591 ^a	0,30±0,00 ^c	7	33286±11864 ^b	814378±180540 ^b	9
Antocijanini							
cijanidin-3-glukozid	9,30±3,00 ^a	2697±210 ^a	0,80±0,00 ^a	12	24471±4324 ^b	847756±133954 ^b	20
cijanidin-3-galaktozid	3,20±0,10 ^{a,b,c}	3716±665 ^a	0,80±0,00 ^a	12	34504±8435 ^b	2463278±179463 ^b	14
45 °C							
Fenolne kiseline							
galna kiselina	7,40±1,20 ^a	4445±892 ^a	0,80±0,00 ^a	29	113296±1252 ^a	1424868±3217 ^b	31
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,00±0,20 ^{c,d}	3306±662 ^a	0,80±0,00 ^a	9	19539±8246 ^a	2221184±4210 ^b	10
kafeinska kiselina	3,50±0,40 ^{b,c,d}	3665±1644 ^a	0,80±0,00 ^a	12	10251±197 ^a	1356606±4666 ^b	16
klorogenska kiselina	1,70±0,10 ^{c,d}	4971±264 ^a	0,40±0,00 ^b	6	137660±7141 ^a	6081638±1919 ^{a,b}	5
Flavan-3-oli							
procijanidin B1	1,20±0,10 ^d	5896±655 ^a	0,30±0,00 ^c	7	224113±2284 ^a	10793015±14358 ^a	6
procijanidin B2	3,40±0,40 ^{c,d}	3519±693 ^a	0,30±0,00 ^c	16	144169±1293 ^a	2698325±6829 ^b	29
Dihidroalkoni							
floretin	3,50±0,30 ^{b,c,d}	4754±3441 ^a	0,80±0,00 ^a	8	9438±2223 ^a	5625122±6058177 ^{a,b}	9
floretin-2-glukozid	6,80±2,00 ^{a,b}	2908±169 ^a	0,40±0,00 ^b	5	16575±11864 ^a	1023969±299030 ^b	6
Antocijanini							
cijanidin-3-glukozid	4,60±0,30 ^{a,b,c}	4754±254 ^a	0,80±0,00 ^a	9	45310±3886 ^a	1698145±118861 ^b	8
cijanidin-3-galaktozid	2,90±0,70 ^{c,d}	2969±1000 ^a	0,80±0,00 ^a	7	35186±14987 ^a	4023461±11232 ^{a,b}	8

* eksponenti u koloni (a-d) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola na jednoj temperaturi (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

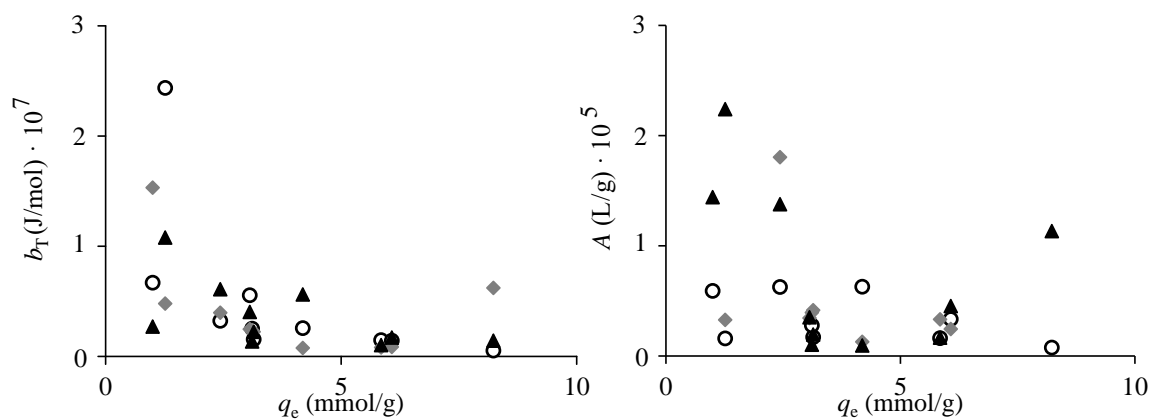
Tablica 14 Parametri Hillova modela za adsorpciju polifenola na β -glukanu na 25, 37 i 45 °C

Standard	Hillov model*			
	q_m (mmol/g)	n_H	K_D (mmol/L)	S (10^{-4})
25 °C				
Fenolne kiseline				
galna kiselina	10,10±2,80 ^a	0,85±0,08 ^a	0,80±0,00 ^a	35
<i>p</i> -kumarinska kiselina	5,70±1,70 ^{a,b}	0,89±0,08 ^a	0,80±0,00 ^a	12
kafeinska kiselina	5,70±2,80 ^{a,b}	0,90±0,07 ^a	0,80±0,00 ^a	13
klorogenska kiselina	3,80±0,20 ^{a,b}	0,91±0,06 ^a	0,40±0,00 ^c	11
Flavan-3-oli				
procijanidin B1	1,50±0,90 ^b	0,91±0,12 ^a	0,30±0,00 ^d	5
procijanidin B2	1,80±0,10 ^b	0,97±0,03 ^a	0,30±0,00 ^d	3
Dihidroalkoni				
floretin	3,90±0,14 ^{a,b}	0,98±0,01 ^a	0,30±0,00 ^d	13
floretin-2-glukozid	8,00±6,40 ^{a,b}	0,79±0,00 ^a	0,30±0,00 ^d	21
Antocijanini				
cijanidin-3-glukozid	6,10±2,10 ^{a,b}	0,87±0,00 ^a	0,30±0,00 ^d	20
cijanidin-3-galaktozid	5,60±2,80 ^{a,b}	0,93±0,00 ^a	0,50±0,00 ^b	10
37 °C				
Fenolne kiseline				
galna kiselina	4,40±0,80 ^{a,b,c}	0,61±0,01 ^a	0,80±0,00 ^a	16
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,00±1,10 ^{a,b,c}	0,57±0,21 ^a	0,80±0,00 ^a	14
kafeinska kiselina	4,40±1,80 ^{a,b,c}	0,73±0,21 ^a	0,80±0,00 ^a	10
klorogenska kiselina	3,90±1,10 ^{a,b,c}	0,88±0,13 ^a	0,40±0,00 ^c	6
Flavan-3-oli				
procijanidin B1	2,00±1,10 ^{b,c}	1,00±0,03 ^a	0,30±0,00 ^d	6
procijanidin B2	1,00±0,00 ^c	0,79±0,12 ^a	0,30±0,00 ^d	4
Dihidroalkoni				
floretin	7,10±2,10 ^a	0,87±0,00 ^a	0,50±0,00 ^b	35
floretin-2-glukozid	4,66±5,50 ^{a,b,c}	0,89±0,00 ^a	0,30±0,00 ^d	30
Antocijanini				
cijanidin-3-glukozid	6,40±1,10 ^{a,b}	0,91±0,00 ^a	0,30±0,00 ^d	26
cijanidin-3-galaktozid	4,40±1,70 ^{a,b,c}	0,95±0,00 ^a	0,31±0,00 ^d	12
45 °C				
Fenolne kiseline				
galna kiselina	9,60±0,40 ^a	0,81±0,07 ^a	0,80±0,00 ^a	60
<i>p</i> -kumarinska kiselina	4,70±1,50 ^b	0,90±0,09 ^a	0,80±0,00 ^a	10
kafeinska kiselina	4,30±0,10 ^b	0,82±0,01 ^a	0,80±0,00 ^a	15
klorogenska kiselina	2,00±0,30 ^{c,d}	0,78±0,11 ^a	0,40±0,00 ^b	6
Flavan-3-oli				
procijanidin B1	1,40±0,10 ^d	0,80±0,01 ^a	0,30±0,00 ^c	7
procijanidin B2	4,50±0,40 ^b	0,87±0,08 ^a	0,30±0,00 ^c	16
Dihidroalkoni				
floretin	3,90±0,64 ^{b,c}	0,74±0,00 ^a	0,40±0,00 ^b	9
floretin-2-glukozid	4,30±0,07 ^b	0,90±0,00 ^a	0,30±0,00 ^c	12
Antocijanini				
cijanidin-3-glukozid	4,20±0,02 ^b	0,89±0,00 ^a	0,30±0,00 ^c	7
cijanidin-3-galaktozid	4,30±0,02 ^b	0,96±0,00 ^a	0,30±0,00 ^c	6

*ekspozenti u koloni (a-d) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola na jednoj temperaturi (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)



Slika 20 Odnos adsorpcijskih parametara q_m iz Langmuirove (●), Dubinjin-Raduškjevičeve (◆) i Hillove izoterme (■) naspram eksperimentalno određenih adsorpcijskih kapaciteta polifenola q_e . Prikazani rezultati odnose se za početne koncentracije od 150 mg/L, pH-vrijednost medija 5,5 te temperature: a) 25 °C, b) 37 °C i c) 45 °C.

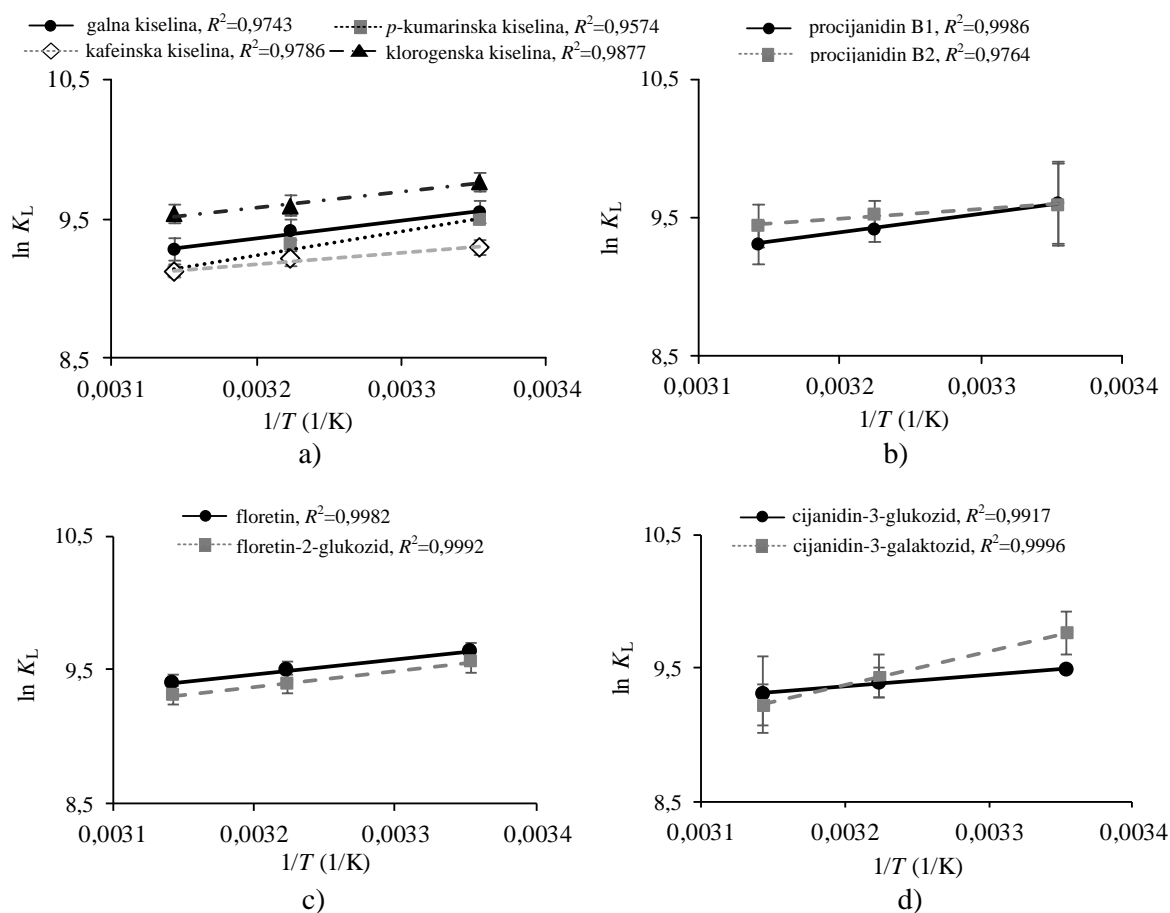


Slika 21 Odnos Tjorkinovog parametara b_T (a) i A (b) naspram eksperimentalno određenih adsorpcijskih kapaciteta (s početnom koncentracijom 150 mg/L) na 25 (○), 37 (◆) i 45 °C (▲)

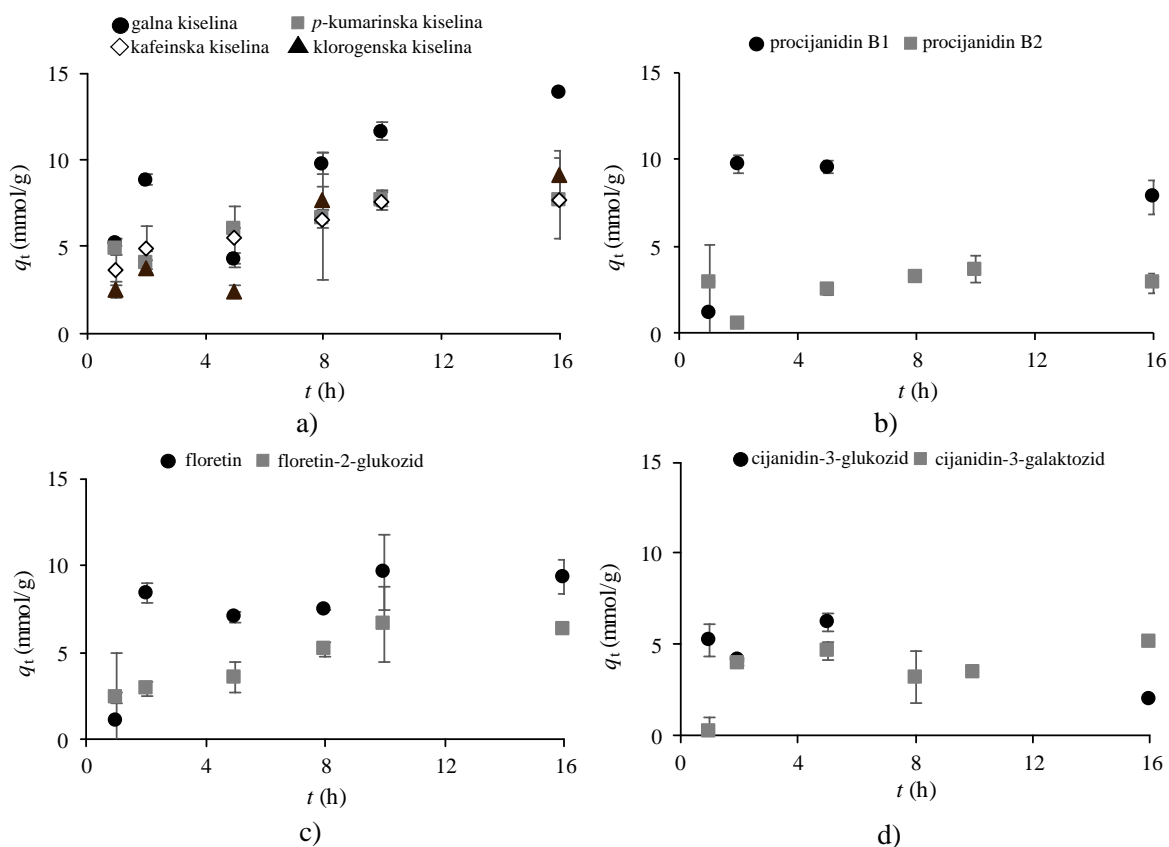
Tablica 15 Statistička analiza razlika na tri različite temperature u adsorpcijskim parametrima za svaki polifenol*

Standard	T/°C	Freunlich		Langmuir		Dubinjin-Raduškjevič			Tjomkin		Hill		
		1/n	K _F	q _m	K _L	q _m	E	c _s	A	b _T	q _m	n _H	K _D
Fenolne kiseline													
galna kiselina	25	a	a	a	b	a	a	a	b	b	a	a	a
	37	a	a	b	a	a	a	a	a	a	b	a	a
	45	a	a	a, b	b	a	a	a	b	b	a	a	a
p-kumarinska kiselina	25	a	a	a	a, b	a	a	b	b	a	a	a	a
	37	a	a	a	a	a	a	c	a	a	a	a	a
	45	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	a
kafeinska kiselina	25	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a
	37	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	45	a	a	a	a	a	a	a	c	b	a	a	a
klorogenska kiselina	25	a	a	a	b	a	a	a	a	a	b	a	a
	37	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	45	a	a	a	a, b	a	a	a	a	a	a, b	a	a
Flavan-3-oli													
procijanidin B1	25	b	b	a	a	a	a, b	a	a	b	a	a	a
	37	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a	a	a
	45	b	b	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
procijanidin B2	25	a	a	b	b	b	a	a	a	a	b	a	a
	37	a	a	b	a	b	a	a	a	a	b	a	a
	45	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Dihidroalkoni													
florelin	25	a	a	a	a	b	a	b	a	a	b	a	c
	37	a	b	a	a	a	a	a	b	a	a	b	a
	45	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a, b	c	b
florelin-2-glukozid	25	b	b	a	a	a	a	b	a	a	b	a	a
	37	b	b	a	a	a	a	b	a	a	b	b	a
	45	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a
Antocijanini													
cijanidin-3-glukozid	25	b	b	a	a	a	b	a	a, b	b	a	b, c	a
	37	b	a, b	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a
	45	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	b	a
cijanidin-3-galaktozid	25	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	c	a
	37	b	b	a	a	a	a	a	b	b	a	a, b	b
	45	b	b	a	a	a	a	a	b	a, b	a	a	b

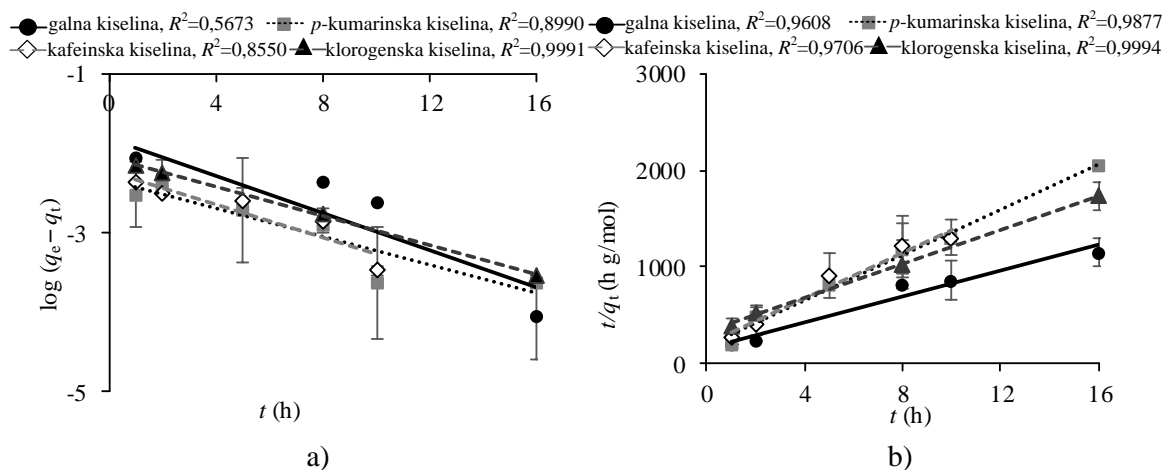
*različita slova u koloni (a-b) odgovaraju statističkoj razlici između temperatura za svaki polifenol posebno (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

4.2.1. Termodinamika adsorpcije polifenola na β -glukanSlika 22 Van't Hoffov dijagram za adsorpciju fenolnih kiselina (a), flavan-3-ola (b), dihidrokalkona (c) i antocijanina (d) na β -glukanuTablica 16 Termodinamički parametri za adsorpciju polifenola na β -glukanu

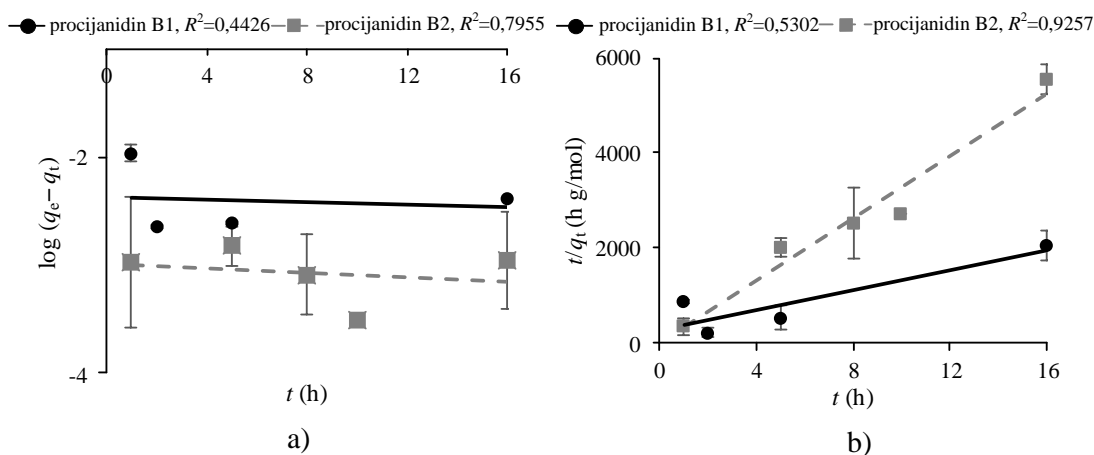
Standard	ΔG (J/mol)			ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol K)
	25 °C	37 °C	45 °C		
Fenolne kiseline					
galna kiselina	-23662	-24278	-24523	-10607±670	43±2
p -kumarinska kiselina	-23511	-24038	-24099	-24359±634	31±2
kafeinska kiselina	-23028	-23739	-24120	-6633±276	55±1
klorogenska kiselina	-24173	-24726	-25193	-9128±188	50±1
Flavan-3-oli					
procijanidin B1	-23788	-24261	-24618	-11502±276	41±1
procijanidin B2	-23757	-24523	-24944	-5959±658	60±2
Dihidrokalkoni					
floretin	-23849	-24454	-24819	-9352±358	46±1
floretin-2-glukozid	-23664	-24209	-24599	-9783±94	46±0
Antocijanini					
cijanidin-3-glukozid	-23495	-24187	-24584	-7184±176	55±1
cijanidin-3-galaktozid	-24184	-24322	-24373	-21325±35	10±0

4.3. Kinetika adsorpcije polifenola na β -glukanu

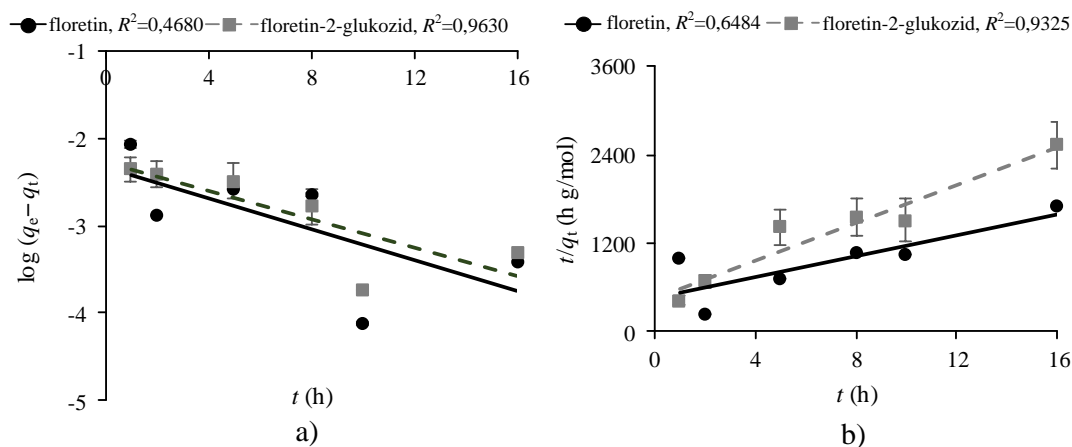
Slika 23 Ovisnost količine adsorbiranih polifenola na β -glukanu (q_t) o vremenu adsorpcije (t) za fenolne kiseline (a), flavan-3-ole (b), dihidrokalkone (c) i antocijanine (d) (adsorpcija pri 25 °C i pH medija 5,5)



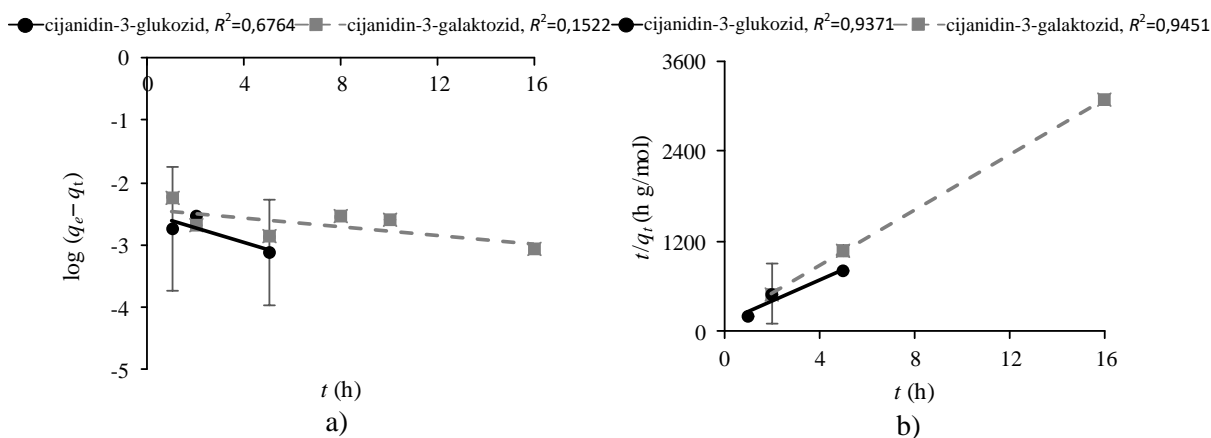
Slika 24 Kinetički modeli pseudo-prvog (a) i pseudo-drugog reda (b) za adsorpciju fenolnih kiselina na β -glukanu pri 25 °C i pH medija 5,5



Slika 25 Kinetički modeli pseudo-prvog (a) i pseudo-drugog reda (b) za adsorpciju flavan-3-ola na β -glukanu pri 25 °C i pH medija 5,5



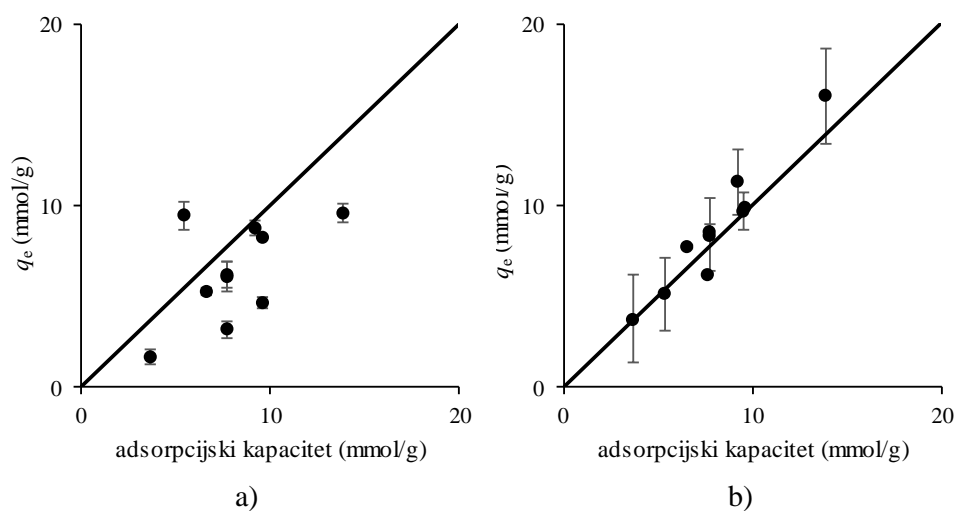
Slika 26 Kinetički modeli pseudo-prvog (a) i pseudo-drugog reda (b) za adsorpciju dihidrokalkona na β -glukanu pri 25 °C i pH medija 5,5



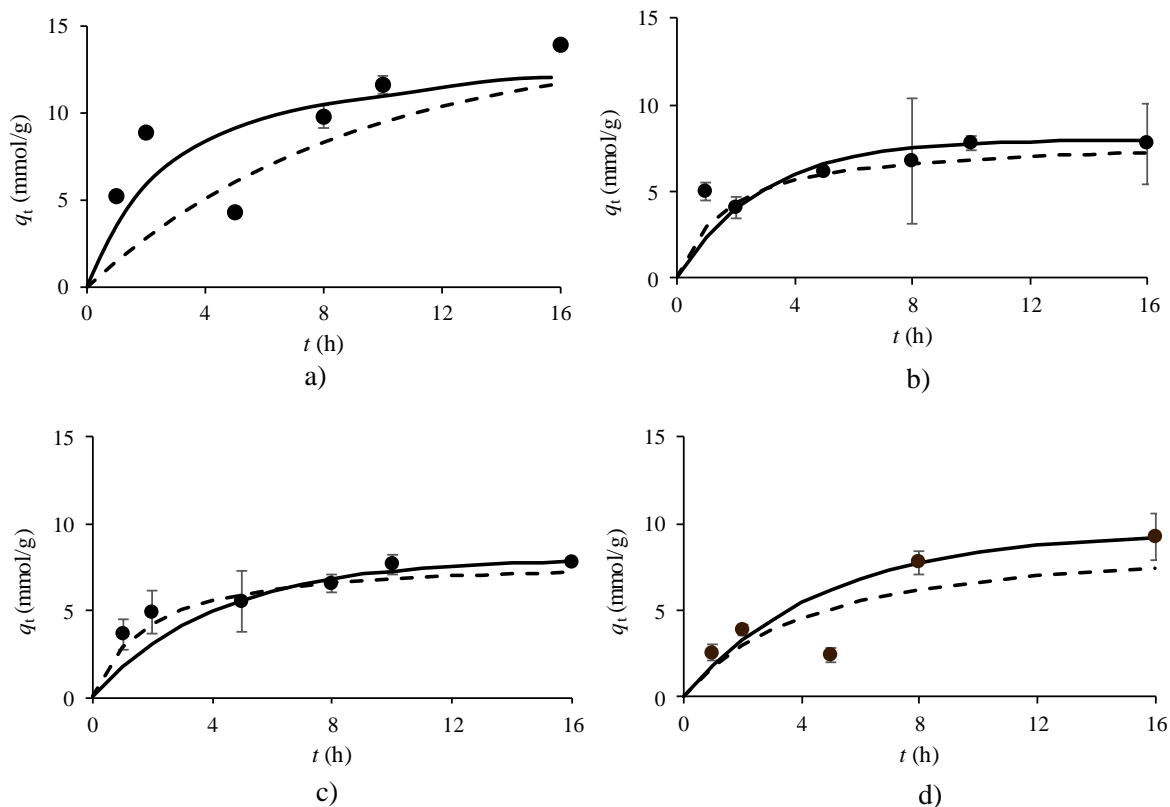
Slika 27 Kinetički modeli pseudo-prvog (a) i pseudo-drugog reda (b) za adsorpciju antocijanina na β -glukanu pri 25 °C i pH medija 5,5

Tablica 17 Kinetički parametri modela pseudo-prvog reda i pseudo drugog reda za adsorpciju polifenola na β -glukanu

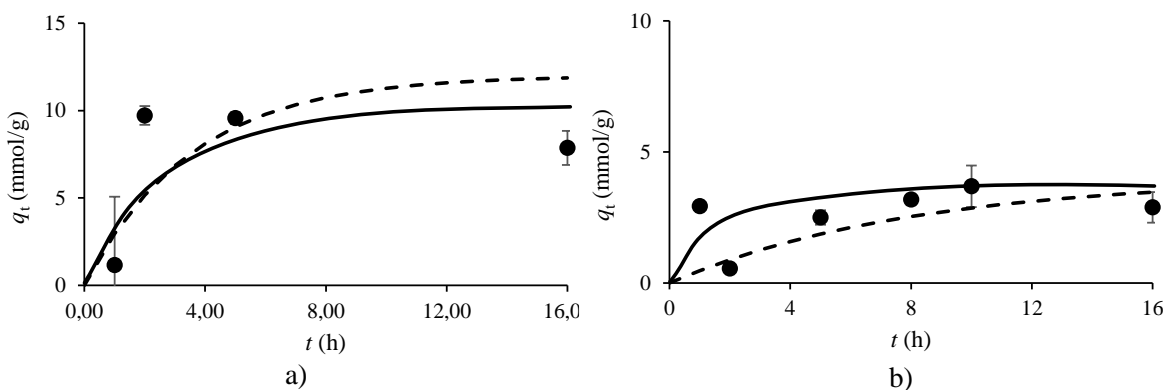
Standard	Model pseudo-prvog reda		Model pseudo-drugog reda	
	k_1 (h ⁻¹)	q_e (mmol/g)	k_2 (g/mol h)	q_e (mmol/g)
Fenolne kiseline				
galna kiselina	0,12±0,00	9,61±0,00	25,71±1,53	16,05±1,50
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,34±0,14	6,20±0,00	73,92±6,22	8,53±0,00
kafeinska kiselina	0,24±0,09	6,09±0,00	72,19±20,26	8,37±0,00
klorogenska kiselina	0,21±0,01	8,76±2,20	24,32±1,32	11,30±1,70
Flavan-3-oli				
procijanidin B1	0,28±0,00	8,31±3,60	37,61±4,12	9,66±0,10
procijanidin B2	0,13±0,07	1,70±0,20	229,79±46,04	3,78±0,10
Dihidroalkoni				
floretin	0,21±0,00	4,68±0,00	74,31±0,00	9,99±0,41
floretin-2-glukozid	0,19±0,09	5,26±0,90	36,54±12,22	7,76±0,51
Antocijanini				
cijanidin-3-glukozid	0,26±0,04	3,17±0,77	178,09±13,53	7,05±0,29
cijanidin-3-galaktozid	0,02±0,07	9,47±0,10	243,13±12,62	5,40±0,87



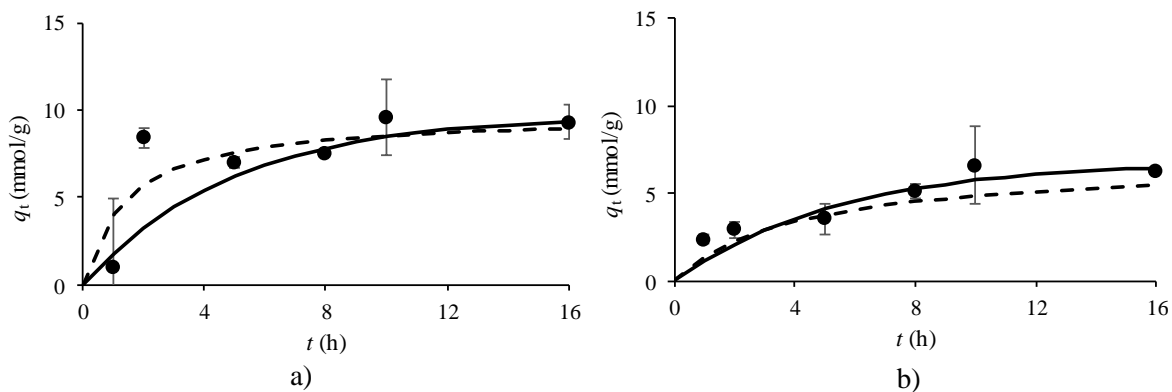
Slika 28 Odnos adsorpcijskih kapaciteta q_e iz pseudo-prvog (a) i pseudo-drugog reda (b) naspram eksperimentalno određenih adsorpcijskih kapaciteta polifenola. Prikazani eksperimentalni rezultati odnose se za početne koncentracije od 150 mg/L, pH-vrijednost medija 5,5 te temperature 25 °C



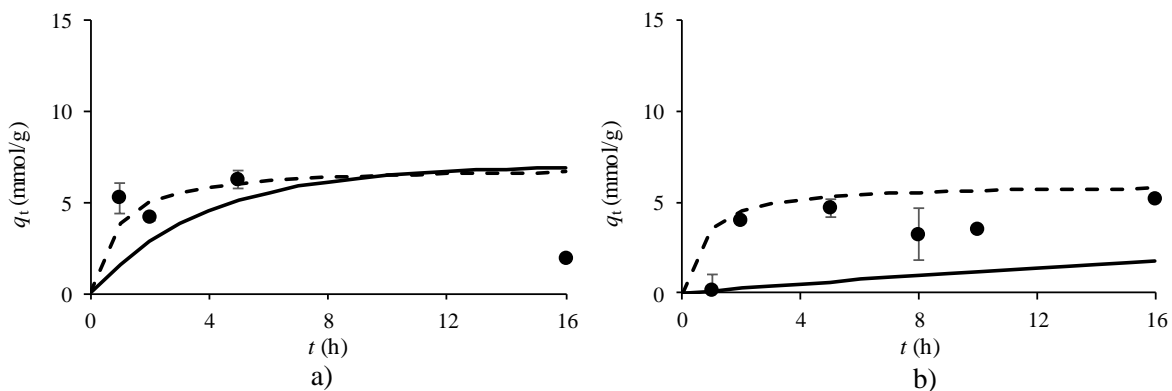
Slika 29 Slaganje kinetičkih modela pseudo-prvog reda (—) i pseudo drugog reda (---) s eksperimentalno određenim adsorpcijskim kapacitetima q_e (●) za adsorpciju galne kiseline (a), *p*-kumarinske kiseline (b), kafeinske kiseline (c) i klorogenske kiseline (d) na β -glukanu



Slika 30 Slaganje kinetičkih modela pseudo-prvog reda (—) i pseudo drugog reda (---) s eksperimentalnim podacima q_e (●) za adsorpciju procijanidina B1 (a) i procijanidina B2 (b) na β -glukanu



Slika 31 Slaganje kinetičkih modela pseudo-prvog reda (—) i pseudo drugog reda (---) reda s eksperimentalnim podacima q_e (●) za adsorpciju floretina (a) i floretin-2-glukozida (b) na β -glukanu

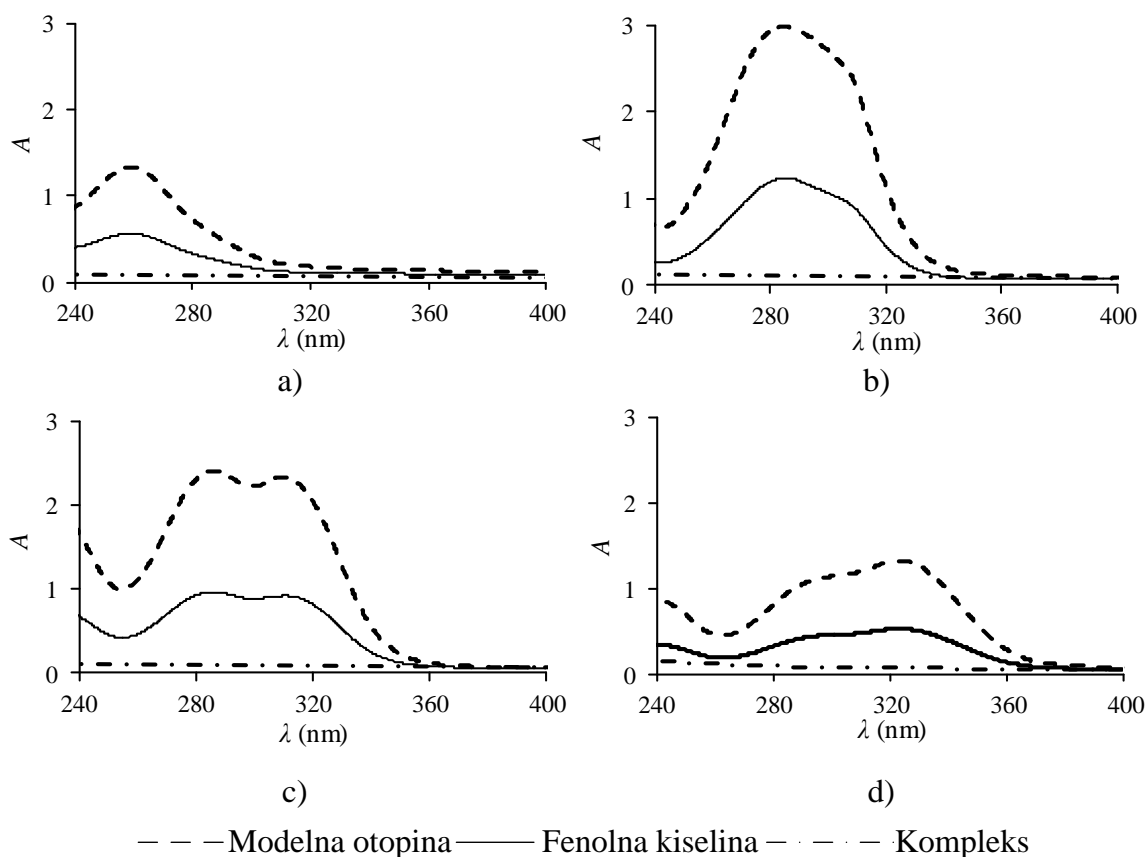


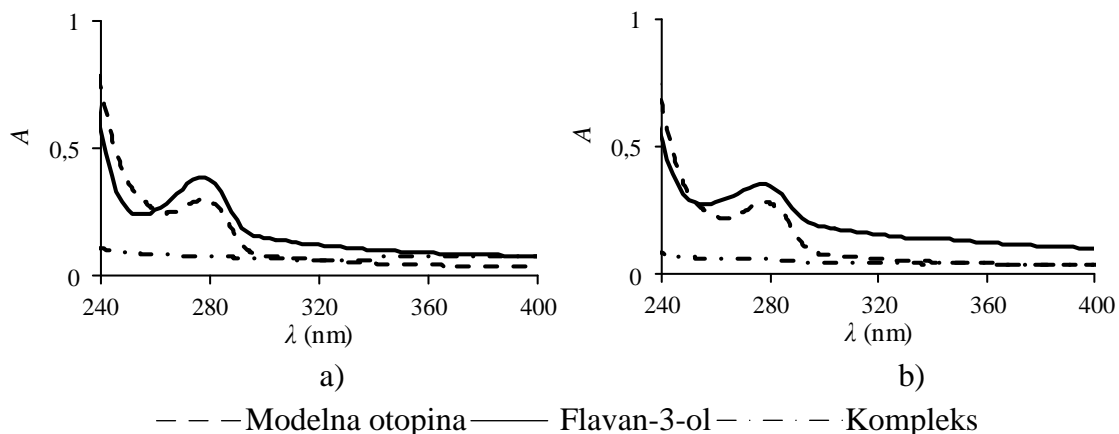
Slika 32 Slaganje kinetičkih modela pseudo-prvog reda (—) i pseudo drugog reda (---) reda s eksperimentalnim podacima q_e (●) za adsorpciju cijanidin-3-glukozida (a) i cijanidin-3-galaktozida (b) na β -glukanu

Tablica 18 Vrijeme polureakcije za model pseudo-prvog i pseudo-drugog reda za adsorpciju polifenola na β -glukanu

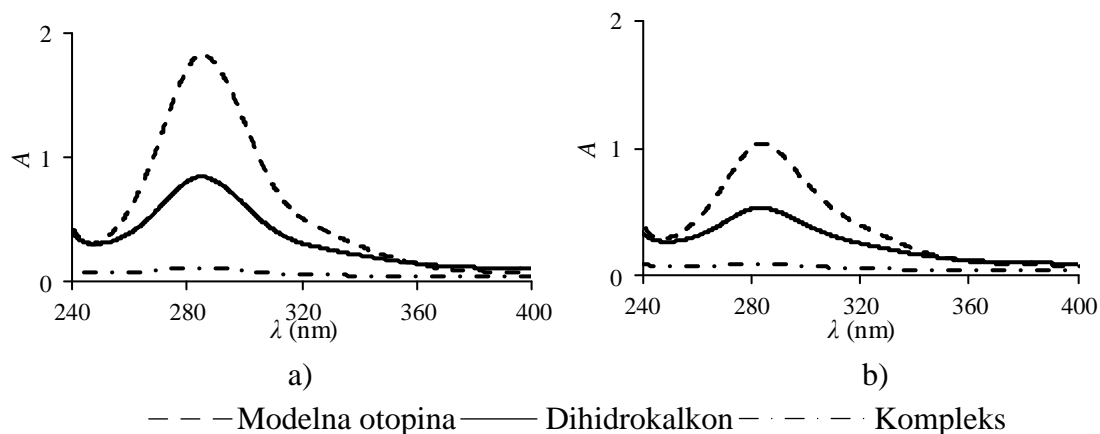
Standard	Model pseudo-prvog reda	Model pseudo-drugog reda
	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
Fenolne kiseline		
galna kiselina	6,14±0,00	2,42±0,30
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,01±0,71	1,60±0,24
kafeinska kiselina	2,86±0,62	1,66±0,11
klorogenska kiselina	3,27±0,11	3,64±1,57
Flavan-3-oli		
procijanidin B1	2,46±0,45	2,75±0,15
procijanidin B2	5,51±2,49	1,51±0,41
Dihidroalkoni		
floretin	3,38±0,78	1,35±0,00
floretin-2-glukozid	3,71±0,56	7,22±0,93
Antocijanini		
cijanidin-3-glukozid	2,63±0,42	0,80±0,02
cijanidin-3-galaktozid	31,35±14,95	0,76±0,01

4.4. UV/Vis-spektri u procesu adsorpcije

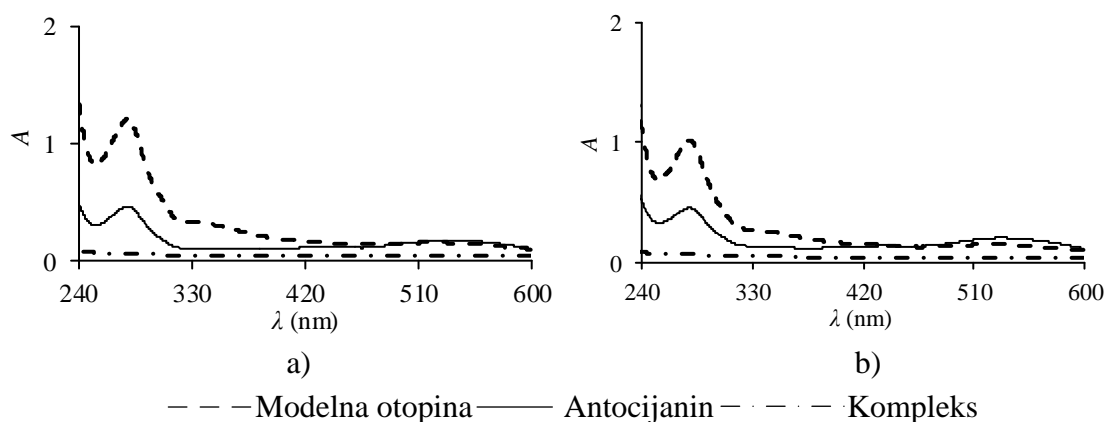
Slika 33 UV/Vis-spektri fenolnih kiselina, modelne otopine i kompleksa fenolna kiselina – β -glukan za adsorpciju na 25 °C (pH 5,5): a) galna kiselina; b) *p*-kumarinska kiselina; c) kafeinska kiselina; d) klorogenska kiselina



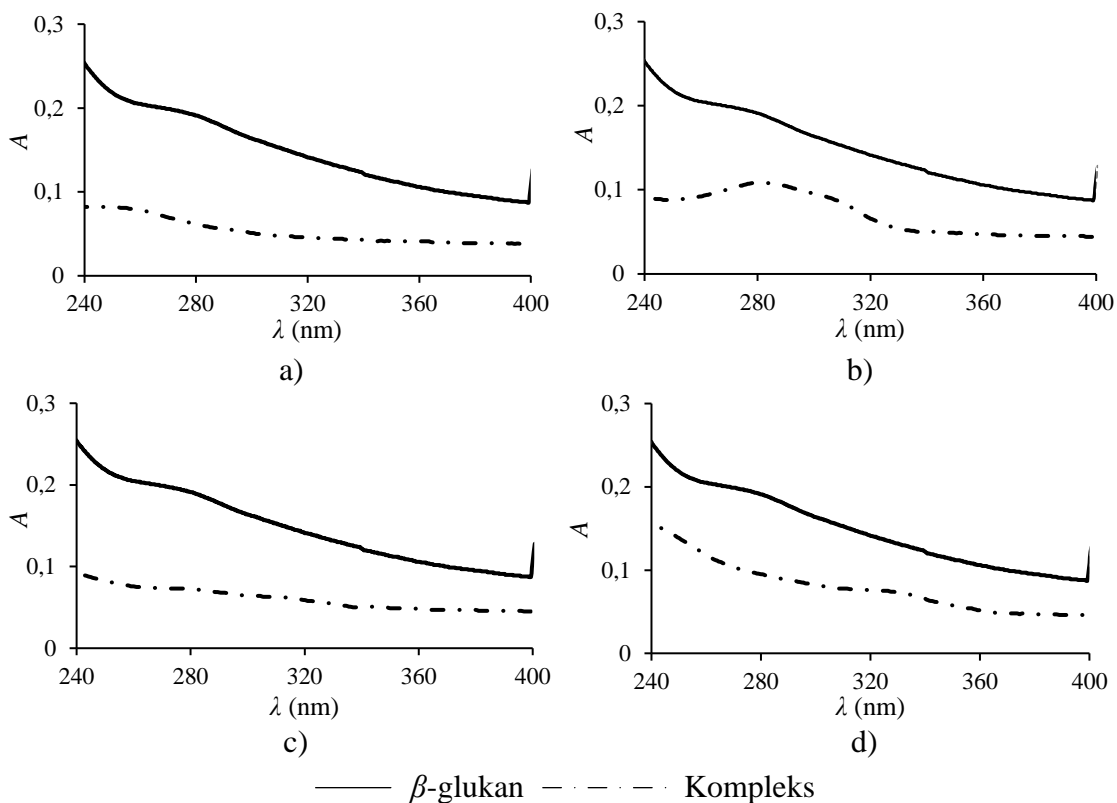
Slika 34 UV/Vis-spektri flavan-3-ola, modelne otopine i kompleksa flavan-3-ol – β -glukan u kojoj se odvijala adsorpcija na 25 °C (pH 5,5): a) procijanidin B1; b) procijanidin B2



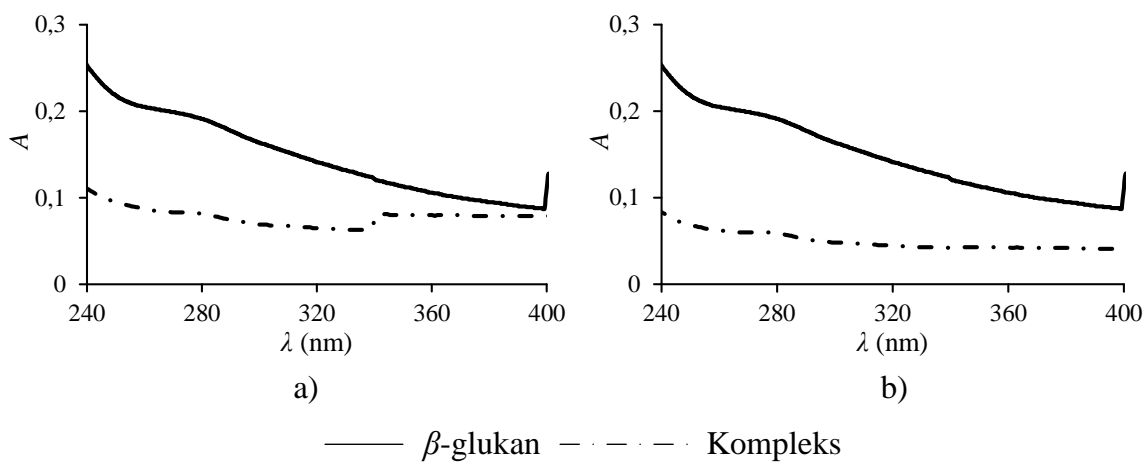
Slika 35 UV/Vis-spektri dihidrokalkona, modelne otopine i kompleksa dihidrokalkon – β -glukan u kojoj se odvijala adsorpcija na 25 °C (pH 5,5): a) floretin; b) floretin-2-glukozid



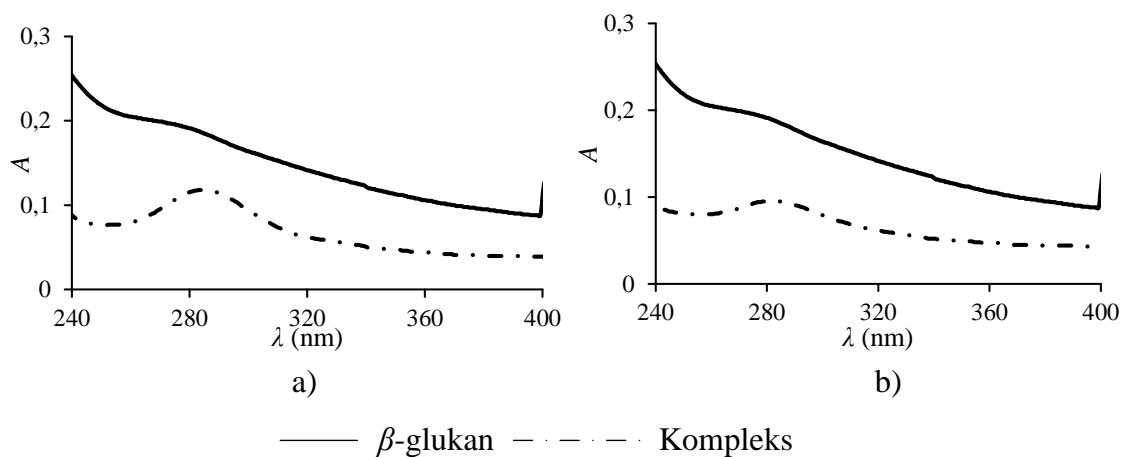
Slika 36 UV/Vis-spektri antocijanina, modelne otopine i kompleksa antocijanin – β -glukan u kojoj se odvijala adsorpcija na 25 °C (pH 5,5): a) cijanidin-3-glukozid; b) cijanidin-3-galaktozid



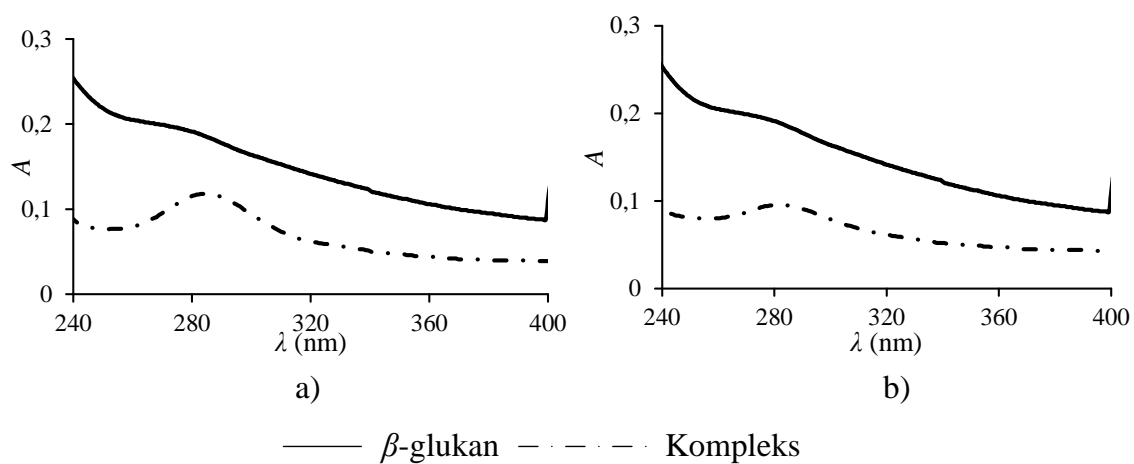
Slika 37 UV/Vis-spektri β -glukana i kompleksa (fenolna kiselina – β -glukan) za adsorpciju na 25 °C (pH 5,5): a) galna kiselina; b) *p*-kumarinska kiselina; c) kafeinska kiselina; d) klorogenska kiselina



Slika 38 UV/Vis-spektri β -glukana i kompleksa (flavan-3-ol – β -glukan) za adsorpciju na 25 °C (pH 5,5): a) procijanidin B1; b) procijanidin B2



Slika 39 UV/Vis-spektri β -glukana i kompleksa (dihidrokalikon – β -glukan) za adsorpciju na 25 °C (pH 5,5): a) floretin; b) floretin-2-glukozid



Slika 40 UV/Vis-spektri β -glukana i kompleksa (antocijanin – β -glukan) za adsorpciju na 25 °C (pH 5,5): a) cijanidin-3-glukozid; b) cijanidin-3-galaktozid

4.5. Adsorpcija polifenola na β -glukan na različitim pH-vrijednostimaTablica 19 Količina adsorbiranih fenolnih kiselina, flavan-3-ola, dihidrokalkona i antocijanina adsorbirana po masi β -glukana (q_e , mmol/g) na pH 1,5, 5,5 i 10,0

Standard	q_e^* (mmol/g)		
	pH 1,5	pH 5,5	pH 10,0
Fenolne kiseline			
galna kiselina	0,87±0,53 ^{a,b,c}	4,50±1,80 ^a	4,40±1,10 ^a
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,00±0,18 ^{a,b,c}	1,90±0,00 ^{b,c}	3,00±1,90 ^b
kafeinska kiselina	2,50±1,10 ^a	2,30±1,10 ^{b,c}	1,90±0,00 ^{b,c}
klorogenska kiselina	0,71±0,39 ^{b,c}	1,50±0,89 ^{b,c}	0,55±0,41 ^d
Flavan-3-oli			
procijanidin B1	0,59±0,22 ^{b,c}	0,23±0,22 ^c	1,00±0,37 ^{c,d}
procijanidin B2	1,40±0,55 ^{a,b,c}	0,69±0,60 ^c	1,50±0,34 ^{c,d}
Dihidrokalkoni			
floretin	2,50±1,10 ^{a,b}	0,83±0,43 ^c	2,20±0,41 ^{b,c}
floretin-2-glukozid	0,00±0,00 ^c	2,90±0,54 ^{a,b}	0,00±0,00 ^d
Antocijanini			
cijanidin-3-glukozid	0,56±0,27 ^{b,c}	1,20±0,37 ^{b,c}	0,21±0,27 ^d
cijanidin-3-galaktozid	1,40±0,87 ^{a,b,c}	0,80±0,25 ^c	1,00±0,00 ^{c,d}

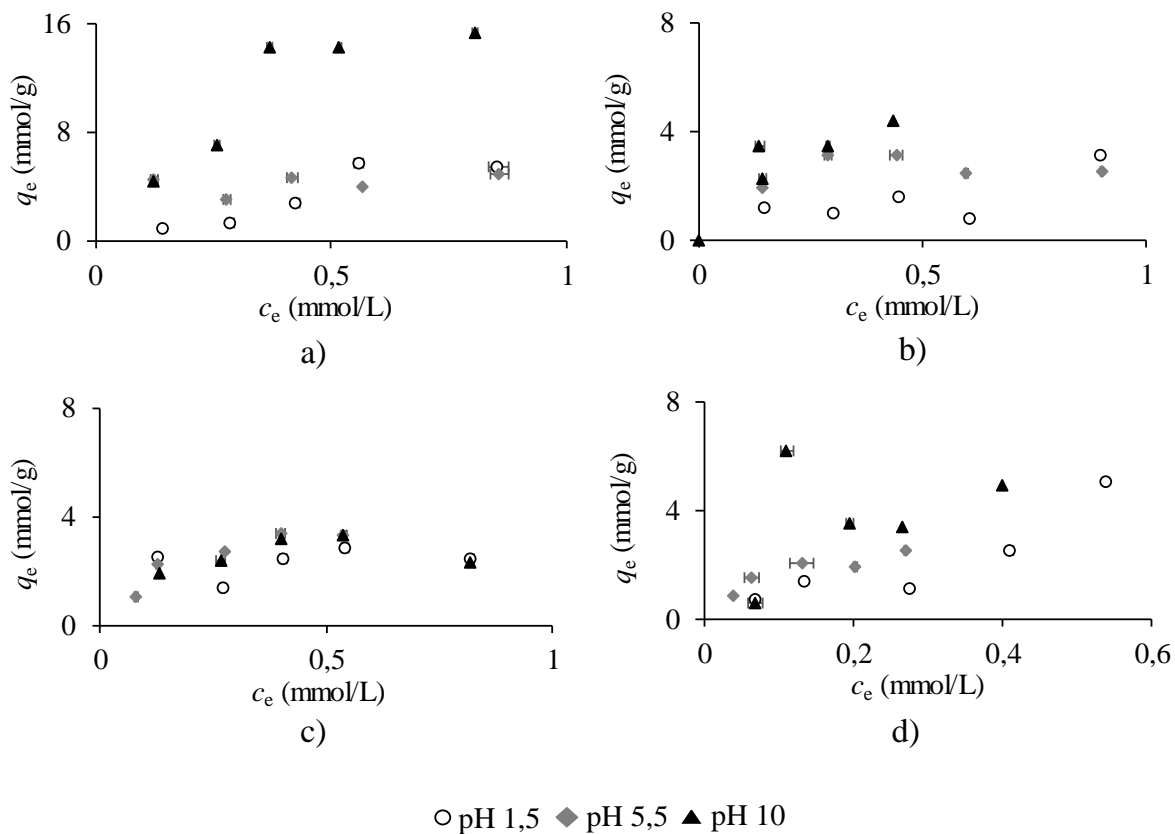
q_e vrijednosti dobivene su procesom adsorpcije sa početnom koncentracijom polifenola 25 mg/L

*eksponenti u koloni (a-d) odgovaraju razlici između polifenola na istoj pH-vrijednosti (dobivene Tukeyvim *post-hoc* testom)

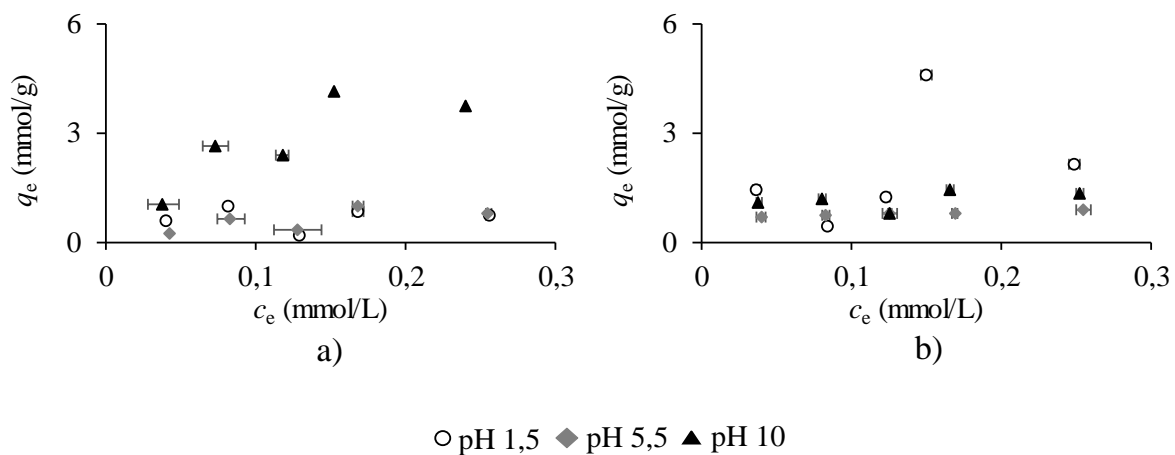
Tablica 20 Analiza razlika adsorpcijskih kapaciteta pojedinih polifenola na pH 1,5, 5,5, 10,0*

Standard	pH		
	1,5	5,5	10,0
Fenolne kiseline			
galna kiselina	b	a	a
<i>p</i> -kumarinska kiselina	a	a	a
kafeinska kiselina	a	a	a
klorogenska kiselina	a	a	a
Flavan-3-oli			
procijanidin B1	a, b	b	a
procijanidin B2	a	a	a
Dihidrokalkoni			
floretin	a	b	a
floretin-2-glukozid	b	a	b
Antocijanini			
cijanidin-3-glukozid	a	a	a
cijanidin-3-galaktozid	a	a	a

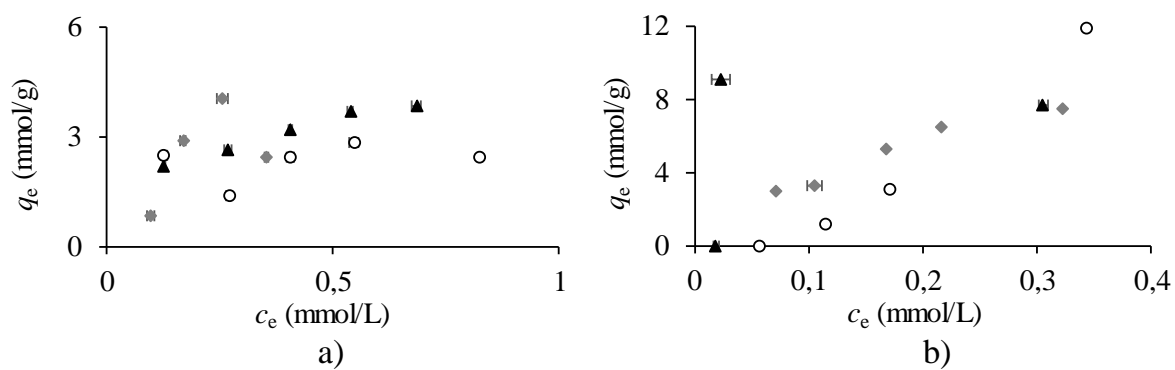
*različita slova u retku (a i b) odgovaraju statističkoj razlici između adsorpcijskih kapaciteta na različitim pH-vrijednostima za svaki polifenol posebno (dobivene Tukeyvim *post-hoc* testom)



Slika 41 Adsorpcijska ravnoteža za adsorpciju galne kiseline (a), *p*-kumarinske kiseline (b), kafeinske kiseline (c) i klorogenske kiseline (d) na β -glukanu pri pH 1,5, 5,5 i 10,0

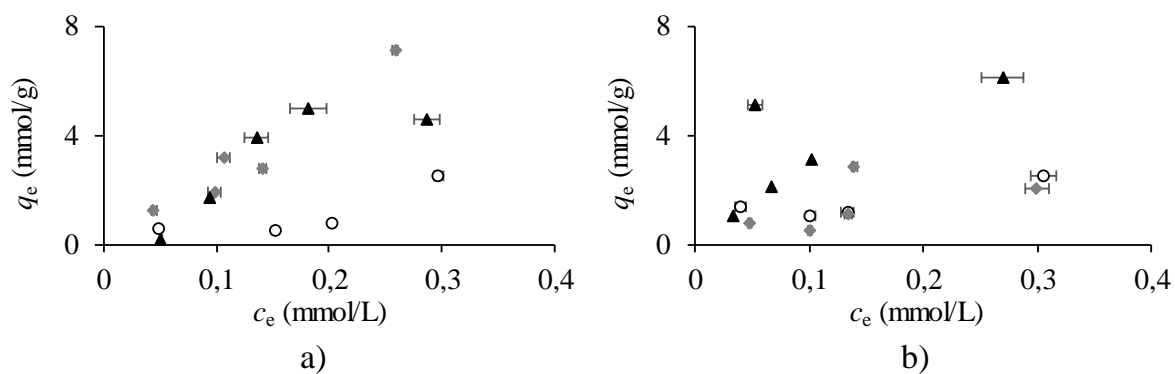


Slika 42 Adsorpcijska ravnoteža za adsorpciju procijanidina B1 (a) i procijanidina B2 (b) na β -glukanu pri pH 1,5, 5,5 i 10,0



○ pH 1,5 ◆ pH 5,5 ▲ pH 10

Slika 43 Adsorpcijska ravnoteža za adsorpciju floretina (a) i floretin-2-glukozida (b) na β -glukanu pri pH 1,5, 5,5 i 10,0



○ pH 1,5 ◆ pH 5,5 ▲ pH 10

Slika 44 Adsorpcijska ravnoteža za adsorpciju cijanidin-3-glukozida (a) i cijanidin-3-galaktozida (b) na β -glukanu na pH 1,5, 5,5 i 10,0

Tablica 21 Parametri Freundlichova i Langmuirova modela za adsorpciju polifenola na β -glukanu pri pH 1,5, 5,5 i 10,0

Standard	Freundlichov model*			Langmuirov model*		
	$1/n$	K_F (mol/g) (L/mol) ^{1/n}	S (10 ⁻⁴)	q_m (mmol/g)	K_L (L/mol)	S (10 ⁻⁴)
pH 1,5						
Fenolne kiseline						
galna kiselina	1,18±0,03 ^a	27,52±1,82 ^a	28	7,50±2,60 ^a	4167±1179 ^a	33
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,89±0,13 ^{a,b}	1,67±1,39 ^b	7	3,10±0,40 ^a	2667±943 ^a	9
kafeinska kiselina	0,16±0,00 ^c	0,01±0,00 ^b	17	3,70±0,10 ^a	6738±6701 ^a	14
klorogenska kiselina	0,37±0,01 ^c	0,04±0,01 ^b	5	2,40±0,30 ^a	8333±2357 ^a	8
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	0,04±0,00 ^c	0,00±0,00 ^b	4	1,10±0,30 ^a	11806±982 ^a	5
procijanidin B2	0,50±0,13 ^{b,c}	0,25±0,25	17	5,00±1,30 ^a	5986±1636 ^a	17
Dihidroalkoni						
floretin	0,28±0,33 ^c	0,072±0,10 ^b	12	5,70±0,00 ^a	2073±0,000 ^a	8
floretin-2-glukozid	0,16±0,00 ^c	0,00±0,00 ^b	69	8,90±0,80 ^a	3906±1137 ^a	46
Antocijanini						
cijanidin-3-glukozid	0,03±0,01 ^c	0,02±0,00 ^b	9	2,70±0,70 ^a	8469±1973 ^a	8
cijanidin-3-galaktozid	0,36±0,13 ^c	0,06±0,08 ^b	7	1,00±0,13 ^a	14554±19522 ^a	6
pH 5,5						
Fenolne kiseline						
galna kiselina	0,09±0,00 ^c	0,01±0,00 ^b	14	4,30±1,10 ^{a,b,c}	66335±17167 ^a	13
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,35±0,00 ^{a,b,c}	0,05±0,01 ^b	10	2,90±0,80 ^{b,c}	15315±1713 ^b	12
kafeinska kiselina	0,21±0,28 ^{b,c}	0,04±0,05 ^b	11	4,90±0,20 ^{a,b,c}	9456±6581 ^b	10
klorogenska kiselina	0,42±0,22 ^{a,b,c}	0,13±0,16 ^b	5	2,60±0,40 ^{b,c}	21785±2524 ^b	7
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	0,77±0,04 ^a	0,62±0,11 ^b	6	1,70±1,30 ^{b,c}	5641±3807 ^b	4
procijanidin B2	0,27±0,14 ^{b,c}	0,01±0,01 ^b	3	1,20±0,40 ^c	12666±1274 ^b	4
Dihidroalkoni						
floretin	0,80±0,06 ^a	2,87±0,49 ^a	29	9,40±1,00 ^{a,b}	12876±1744 ^b	4
floretin-2-glukozid	0,52±0,01 ^{a,b,c}	0,52±0,03 ^b	14	9,80±0,00 ^a	7317±2417 ^b	5
Antocijanini						
cijanidin-3-glukozid	0,34±0,02 ^{a,b,c}	0,07±0,01 ^b	29	9,20±1,00 ^{a,b,c}	9672±6276 ^b	19
cijanidin-3-galaktozid	0,65±0,03 ^{a,b}	0,44±0,07 ^b	14	5,20±1,00 ^{a,b,c}	9023±7193 ^b	11
pH 10,0						
Fenolne kiseline						
galna kiselina	0,57±0,03 ^{a,b}	0,97±0,24 ^b	27	16,90±2,10 ^a	6351±143 ^d	32
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,40±0,28 ^{a,b,c}	0,24±0,31 ^b	1	6,50±2,60 ^{b,c,d}	22585±3924 ^b	3
kafeinska kiselina	0,22±0,20 ^{b,c}	0,02±0,03 ^b	12	3,80±0,60 ^{c,d,e}	4859±199 ^d	10
klorogenska kiselina	0,73±0,06 ^a	1,57±0,57 ^{a,b}	6	5,20±0,10 ^{c,d,e}	9167±1179 ^{c,d}	10
Flavan-3-oli						
procijanidin B1	0,53±0,04 ^{a,b}	0,37±0,16 ^b	8	4,30±0,20 ^{c,d,e}	20870±1230 ^{b,c}	9
procijanidin B2	0,28±0,01 ^{b,c}	0,02±0,01 ^b	3	1,50±0,40 ^e	36748±4599 ^a	3
Dihidroalkoni						
floretin	0,01±0,00 ^c	0,00±0,00 ^b	14	2,60±0,10 ^{d,e}	39192±5626 ^a	10
floretin-2-glukozid	0,28±0,03 ^{b,c}	0,08±0,01 ^b	51	10,00±1,00 ^b	13428±6061 ^{b,c,d}	36
Antocijanini						
cijanidin-3-glukozid	0,50±0,02 ^{a,b}	0,32±0,01 ^b	33	7,10±0,70 ^{b,c}	7414±773 ^d	22
cijanidin-3-galaktozid	0,74±0,05 ^a	2,87±1,20 ^a	7	7,40±1,40 ^{b,c}	9761±237 ^{b,c,d}	11

*ekspONENTI u koloni (a-e) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola na jednoj pH-vrijednosti (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

Tablica 22 Parametri Dubinjin-Raduškjevičevog i Tjomkinovog modela za adsorpciju polifenola na β -glukanu pri pH 1,5, 5,5 i 10,0

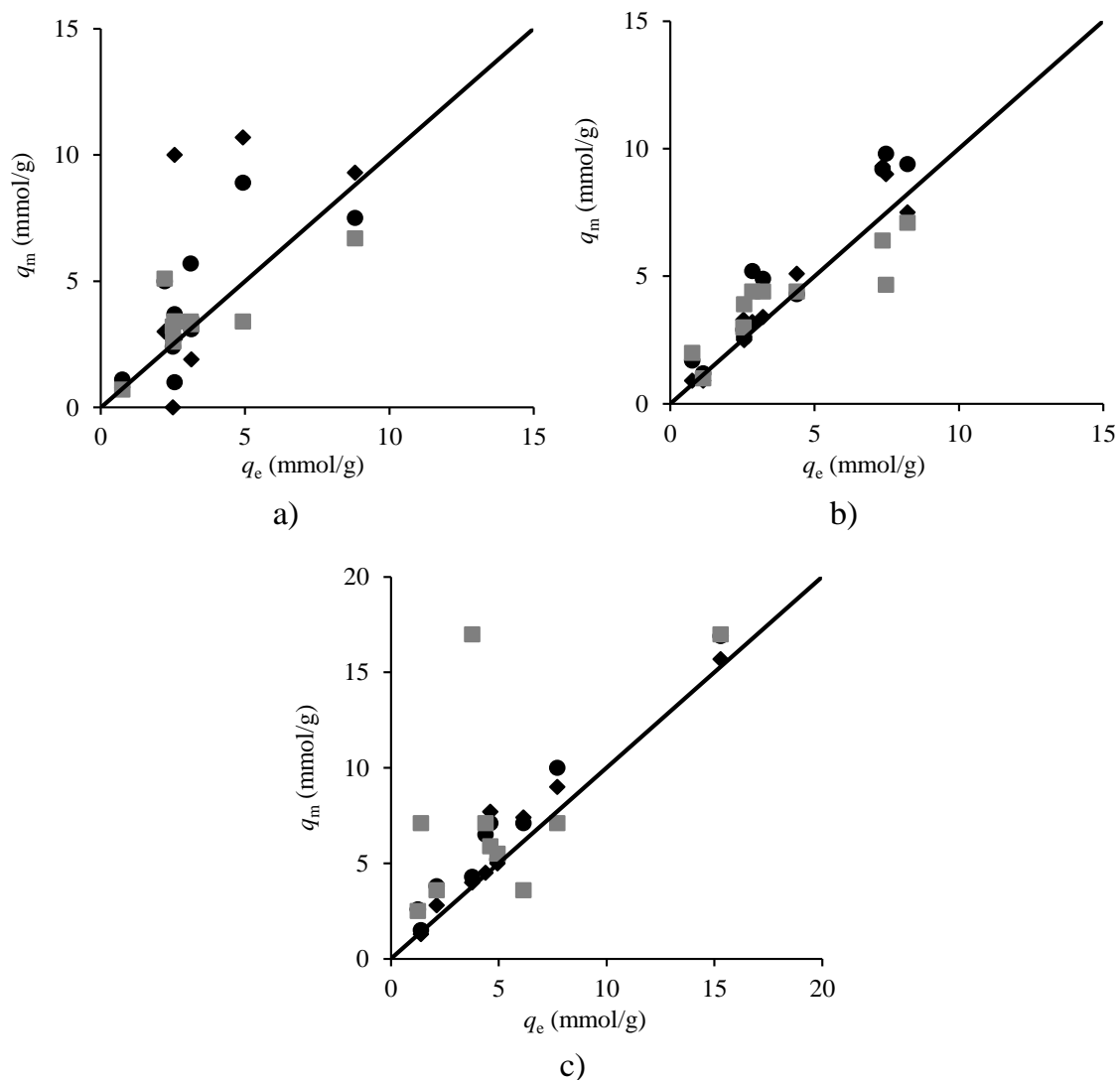
Standard	Dubinjin-Raduškjevičev model*				Tjomkinov model*		
	q_m (mmol/g)	E (J/mol)	c_s (mmol/L)	S (10^{-4})	A (L/g)	b_T (J/mol)	S (10^{-4})
1,5							
Fenolne kiseline							
galna kiselina	9,30±4,80 ^{a,b}	1190±115 ^e	0,80±0,00 ^a	13	7186±1149 ^b	732523±1124 ^c	32
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,90±0,10 ^{a,b}	3480±684 ^{b,c,d}	0,80±0,00 ^a	13	17534±5870 ^b	3239191±4797 ^{b,c}	11
kafeinska kiselina	2,70±0,90 ^{a,b}	4291±305 ^{b,c}	0,80±0,00 ^a	16	508357±7092 ^a	5379754±8768 ^{b,c}	17
klorogenska kiselina	2,00±0,40 ^{a,b}	2404±424 ^{d,e}	0,40±0,00 ^c	12	73638±6966 ^b	4425682±2843 ^{b,c}	4
Flavan-3-oli							
procijanidin B1	0,80±0,30 ^b	4300±170 ^{b,c}	0,30±0,00 ^d	5	360992±4949 ^a	11997722±2827 ^a	7
procijanidin B2	3,00±0,50 ^{a,b}	3091±641 ^{c,d}	0,30±0,00 ^d	20	87424±3357 ^b	2882565±7765 ^{b,c}	17
Dihidroalkoni							
floretin	3,30±0,14 ^{a,b}	2829±120 ^{c,d}	0,80±0,00 ^a	12	501872±16263 ^a	5796754±287085 ^{b,c}	15
floretin-2-glukozid	10,70±1,50 ^a	2099±298 ^{d,e}	0,50±0,00 ^b	8	13321±85182 ^b	469148±264023 ^c	29
Antocijanini							
cijanidin-3-glukozid	2,90±0,42 ^{a,b}	4917±377 ^b	0,50±0,00 ^b	14	441697±58725 ^a	6444754±784888 ^b	13
cijanidin-3-galaktozid	1,00±1,30 ^{a,b}	6956±423 ^a	0,80±0,00 ^a	8	429843±132580 ^a	1010936±20333 ^c	7
5,5							
Fenolne kiseline							
galna kiselina	5,10±0,60 ^{a,b,c}	1856±47 ^a	0,80±0,00 ^a	35	14072547±1414 ^a	6198677±2118 ^{a,b}	19
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,30±0,90 ^{a,b,c}	1999±56 ^a	0,40±,00 ^b	19	41582±1343 ^b	2216241±1556 ^b	17
kafeinska kiselina	3,40±0,60 ^{a,b,c}	6623±3731 ^a	0,80±0,00 ^a	10	39310±565 ^b	2247927±63710 ^b	13
klorogenska kiselina	2,50±0,10 ^{b,c}	4171±1602 ^a	0,40±0,00 ^b	7	180524±1792 ^b	3964700±9804 ^b	5
Flavan-3-oli							
procijanidin B1	0,90±0,40 ^c	2204±234 ^a	0,30±0,00 ^c	6	32778±1133 ^b	4778001±6929 ^b	6
procijanidin B2	0,90±0,10 ^c	4639±1590 ^a	0,30±0,00 ^c	4	5754384±803 ^{a,b}	15307590±7690 ^a	3
Dihidroalkoni							
floretin	7,50±1,00 ^{a,b}	2531±657 ^a	0,80±0,00 ^a	29	12965±3911 ^b	767289±160144 ^b	26
floretin-2-glukozid	9,00±1,00 ^{a,b}	4001±591 ^a	0,30±0,00 ^c	7	33286±11864 ^b	814378±180540 ^b	9
Antocijanini							
cijanidin-3-glukozid	9,30±3,00 ^a	2697±210 ^a	0,80±0,00 ^a	12	24471±4324 ^b	847756±133954 ^b	20
cijanidin-3-galaktozid	3,20±0,10 ^{a,b,c}	3716±665 ^a	0,80±0,00 ^a	12	34504±8435 ^b	2463278±179463 ^b	14
10,0							
Fenolne kiseline							
galna kiselina	15,70±0,70 ^a	2790±130 ^b	0,80±0,00 ^a	22	15755±1953 ^a	396467±3668 ^a	27
<i>p</i> -kumarinska kiselina	4,50±0,40 ^{d,e}	5188±2287 ^{a,b}	0,80±0,00 ^a	4	44741±6010 ^a	2532915±1662 ^a	2
kafeinska kiselina	2,80±0,60 ^{d,e}	4797±1377 ^{a,b}	0,80±0,00 ^a	12	54453±7071 ^a	3071643±2969 ^a	13
klorogenska kiselina	5,00±0,50 ^{c,d}	3052±560 ^b	0,40±0,00 ^b	8	21953±2408 ^a	1157342±370498 ^a	4
Flavan-3-oli							
procijanidin B1	4,00±0,40 ^{d,e}	3437±316 ^{a,b}	0,30±0,00 ^c	8	60786±1770 ^a	1691267±3596 ^a	4
procijanidin B2	1,30±0,30 ^e	5984±129 ^{a,b}	0,30±0,00 ^c	4	666268±1555 ^a	4571067±5057 ^a	4
Dihidroalkoni							
floretin	2,60±0,11 ^{d,e}	7024±418 ^a	0,80±0,00 ^a	14	539872±57275 ^a	6040854±502045 ^a	15
floretin-2-glukozid	9,00±0,35 ^b	5551±834 ^{a,b}	0,30±0,00 ^c	44	115416±85182 ^a	1072386±278906 ^a	43
Antocijanini							
cijanidin-3-glukozid	7,70±1,80 ^{b,c}	3546±1092 ^{a,b}	0,80±0,00 ^a	23	24602±5573 ^a	942251±30803 ^a	24
cijanidin-3-galaktozid	7,40±1,40 ^b	4003±66 ^{a,b}	0,80±0,00 ^a	4	40158±671 ^a	1010936±20333 ^a	6

*ekspONENTI u koloni (a-e) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola na jednoj pH-vrijednosti (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

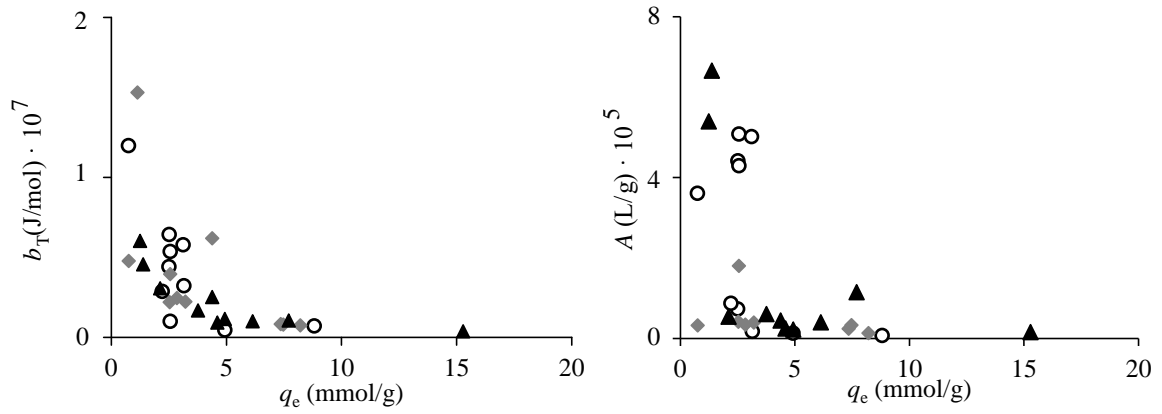
Tablica 23 Parametri Hillova modela za adsorpciju polifenola na β -glukanu pri pH 1,5, 5,5 i 10,0

Standard	Hillov model*			
	q_m (mmol/g)	n_H	K_D (mmol/L)	S (10^{-4})
pH 1,5				
Fenolne kiseline				
galna kiselina	6,70±1,00 ^a	0,86±0,04 ^{a,b}	0,80±0,00 ^a	45
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,30±0,40 ^{a,b,c}	0,93±0,04 ^a	0,80±0,00 ^a	12
kafeinska kiselina	3,40±0,70 ^{a,b,c}	0,81±0,06 ^{a,b,c}	0,80±0,00 ^a	16
klorogenska kiselina	3,20±1,60 ^{a,b,c}	0,92±0,08 ^a	0,40±0,00 ^b	10
Flavan-3-oli				
procijanidin B1	0,70±0,30 ^c	0,57±0,01 ^d	0,30±0,00 ^c	5
procijanidin B2	5,10±1,80 ^{a,b}	0,93±0,06 ^a	0,30±0,00 ^c	20
Dihidroalkoni				
floretin	3,40±0,60 ^{a,b,c}	0,69±0,00 ^{b,c,d}	0,80±0,00 ^a	14
floretin-2-glukozid	3,40±0,60 ^{a,b,c}	0,79±0,00 ^{a,b,c}	0,30±0,00 ^c	63
Antocijanini				
cijanidin-3-glukozid	2,60±0,50 ^{b,c}	0,95±0,00 ^a	0,30±0,00 ^c	13
cijanidin-3-galaktozid	3,40±0,70 ^{a,b,c}	0,60±0,00 ^{c,d}	0,30±0,00 ^c	7
pH 5,5				
Fenolne kiseline				
galna kiselina	4,40±0,80 ^{a,b,c}	0,61±0,01 ^a	0,80±0,00 ^a	16
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,00±1,10 ^{a,b,c}	0,57±0,21 ^a	0,80±0,00 ^a	14
kafeinska kiselina	4,40±1,80 ^{a,b,c}	0,73±0,21 ^a	0,80±0,00 ^a	10
klorogenska kiselina	3,90±1,10 ^{a,b,c}	0,88±0,13 ^a	0,40±0,00 ^c	6
Flavan-3-oli				
procijanidin B1	2,00±1,10 ^{b,c}	1,00±0,03 ^a	0,30±0,00 ^d	6
procijanidin B2	1,00±0,00 ^c	0,79±0,12 ^a	0,30±0,00 ^d	4
Dihidroalkoni				
floretin	7,10±2,10 ^a	0,87±0,00 ^a	0,50±0,00 ^b	35
floretin-2-glukozid	4,66±5,50 ^{a,b,c}	0,89±0,00 ^a	0,30±0,00 ^d	30
Antocijanini				
cijanidin-3-glukozid	6,40±1,10 ^{a,b}	0,91±0,00 ^a	0,30±0,00 ^d	26
cijanidin-3-galaktozid	4,40±1,70 ^{a,b,c}	0,95±0,00 ^a	0,31±0,00 ^d	12
pH 10,0				
Fenolne kiseline				
galna kiselina	17,00±1,40 ^a	0,83±0,02 ^a	0,80±0,00 ^a	29
<i>p</i> -kumarinska kiselina	7,10±3,00 ^b	0,83±0,16 ^a	0,80±0,00 ^a	3
kafeinska kiselina	3,60±1,50 ^b	0,78±0,12 ^a	0,80±0,00 ^a	12
klorogenska kiselina	5,50±0,80 ^b	0,83±0,08 ^a	0,40±0,00 ^b	13
Flavan-3-oli				
procijanidin B1	17,00±1,40 ^a	0,83±0,02 ^a	0,30±0,00 ^c	29
procijanidin B2	7,10±3,00 ^c	0,83±0,16 ^a	0,30±0,00 ^c	3
Dihidroalkoni				
floretin	2,50±0,00 ^b	0,83±0,00 ^a	0,80±0,00 ^a	14
floretin-2-glukozid	7,10±0,80 ^b	0,86±0,00 ^a	0,30±0,00 ^c	64
Antocijanini				
cijanidin-3-glukozid	5,90±1,80 ^b	0,66±0,00 ^a	0,30±0,00 ^c	33
cijanidin-3-galaktozid	3,60±1,40 ^b	0,64±0,00 ^a	0,30±0,00 ^c	25

*ekspONENTI u koloni (a-d) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola na jednoj pH-vrijednosti (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)



Slika 45 Odnos adsorpcijskih parametara q_m iz Langmuirove (●), Dubinjin-Raduškjevičeve (◆) i Hillove izoterme (■) naspram eksperimentalno određenih adsorpcijskih kapaciteta polifenola q_e . Prikazani rezultati odnose se za početne koncentracije od 150 mg/L, pri : a) pH 1,5; b) pH 5,5; c) pH 10,0



Slika 46 Odnos Tjorkinovih parametara b_T (a) i A (b) naspram eksperimentalno određenih adsorpcijskih kapaciteta (q_e) pri pH 1,5 (\circ), 5,5 (\blacklozenge) i 10 (\blacktriangle). Početna koncentracija adsorbirajućih tvari iznosila je 150 mg/L

Tablica 24 Analiza razlika u adsorpcijskim parametrima za svaki polifenol*

Standard	pH	Freundlich		Langmuir		Dubinjin-Raduškjevič			Tjomkin		Hill		
		1/n	K_F	q_m	K_L	q_m	E	K_D	A	b_T	q_m	n_H	c_s
Fenolne kiseline galna kiselina	1,5	a	a	b	b	a	c	a	b	b	b	a	a
	5,5	c	b	b	a	a	b	a	a	a	b	a	a
	10	b	b	a	b	a	a	a	b	b	a	a	a
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,5	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	b
	5,5	a	a	a	a	a, b	a	a	a	a	a	a	a
	10	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b
kafeinska kiselina	1,5	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	5,5	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	a
	10	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	a
klorogenska kiselina	1,5	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
	5,5	b	a	b	a	b	a	a	a	a	a	a	a
	10	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a
Flavan-3-oli procijanidin B1	1,5	c	b	a	b	b	a	a	a	a	b	c	a
	5,5	a	a	a	b	b	b	a	b	b	a, b	a	a
	10	b	a, b	a	a	a	a	a	b	b	a	b	a
procijanidin B2	1,5	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	5,5	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
	10	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
Dihidroalkoni florelin	1,5	a	b	a	b	b	b	a	b	b	a	c	a
	5,5	a	a	a	b	a	b	b	a	a	a	a	a
	10	a	b	a	a	b	a	a	b	b	a	b	a
florelin-2-glukozid	1,5	c	c	a	a	a	b	a	a	a	a	c	a
	5,5	a	a	a	a	a	a, b	a	a	a	b	a	b
	10	b	b	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b
Antocijanini cijanidin-3-glukozid	1,5	c	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	5,5	b	b	a	a	a	a	a	b	b	a	b	b
	10	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a	c	a
cijanidin-3-galaktozid	1,5	b	a	a	a	b	a	a	a	a	a	c	a
	5,5	a, b	a	a	a	b	b	a	b	a	a	a	a
	10	a	a	a	a	a	b	a	b	a	a	b	a

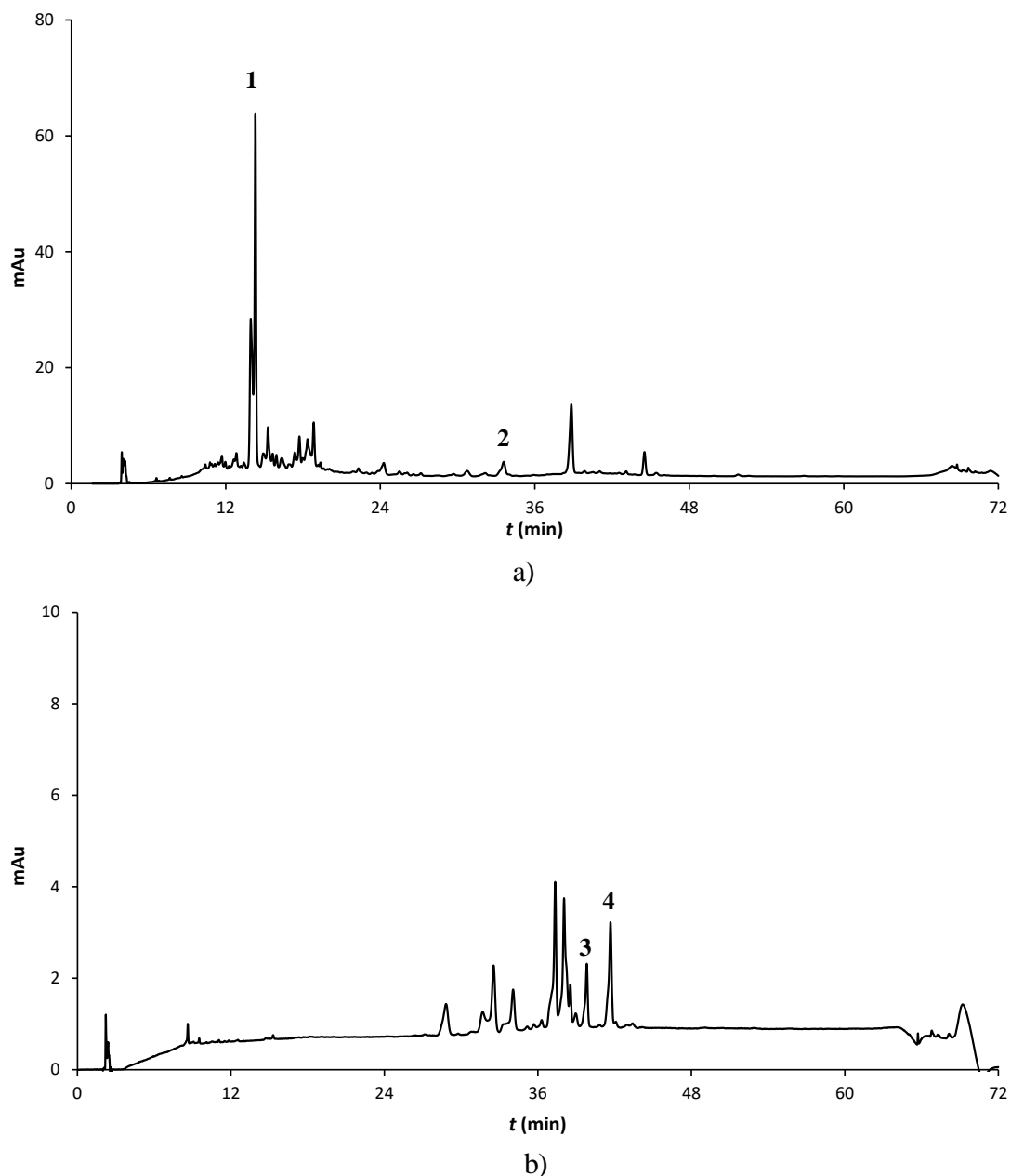
*različita slova u koloni (a-c) odgovaraju statističkoj razlici između pH-vrijednosti za svaki polifenol posebno (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

4.6. Adsorpcija polifenola iz jabuke na β -glukan

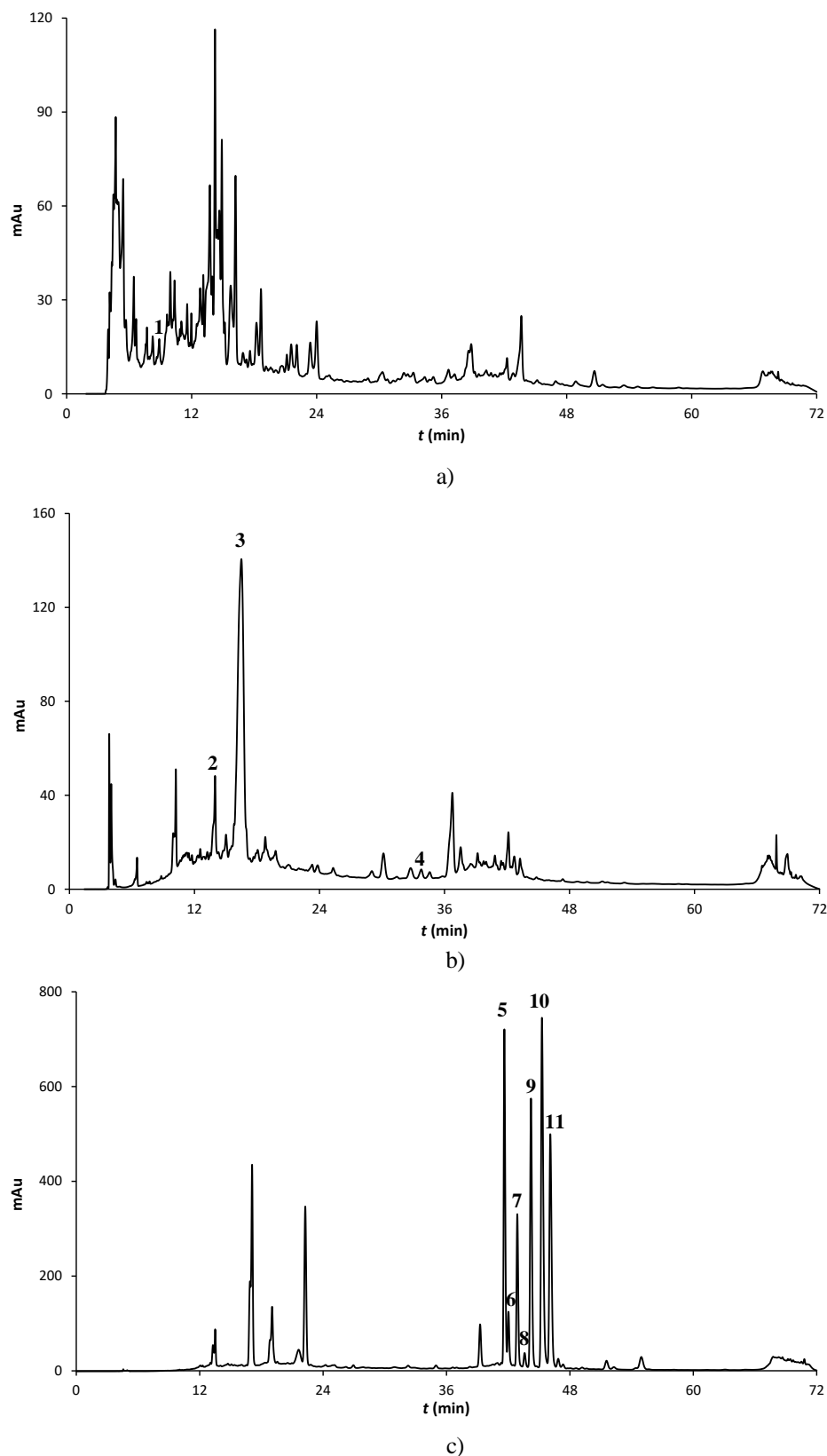
4.6.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenola u jabukama

Tablica 25 Količina pojedinih polifenola u jabuci (Božićnica) (mg/kg svježih jabuka) određena RP-HPLC metodom

Standard	Meso (mg/kg)	Kožica (mg/kg)
Fenolne kiseline		
klorogenska kiselina	802,00±0,00	138,91±0,10
Flavan-3-oli		
procijanidin B1	20,00±2,00	31,45±0,21
procijanidin B2	14,00±0,00	54,12±0,24
(+)-katehin	27,00±1,00	146,35±0,14
Flavonoli		
kvercetin-3-glukozid		279,92±0,11
kvercetin-3-galaktozid	10,00±0,00	731,48±0,63
kvercetin-3-ramnozid	12,00±0,00	81,37±0,32
derivat kvercetina 1		79,19±0,10
derivat kvercetina 2		14,43±0,00
kvercetin-3-ksilozid		156,01±0,52
Dihidroalkoni		
floretin-2-glukozid	57,00±0,00	194,97±0,84
floretin-2-ksiloglukozid	41,00±0,00	36,65±0,09
Antocijanini		
cijanidin-3-galaktozid		93,36±0,52
Ukupno	983,00±3,00	2038,21±3,82



Slika 47 Kromatogrami s identificiranim polifenolima u frakcijama mesa jabuke: a) frakcija 1 (na 280 nm); b) frakcija 2 (na 360 nm). Numerirani pikovi označavaju klorogensku kiselinu (1), floretin-2-ksiloglukozid (2), floretin-2-glukozid (3) i kvercetin-3-ramnozid (4)



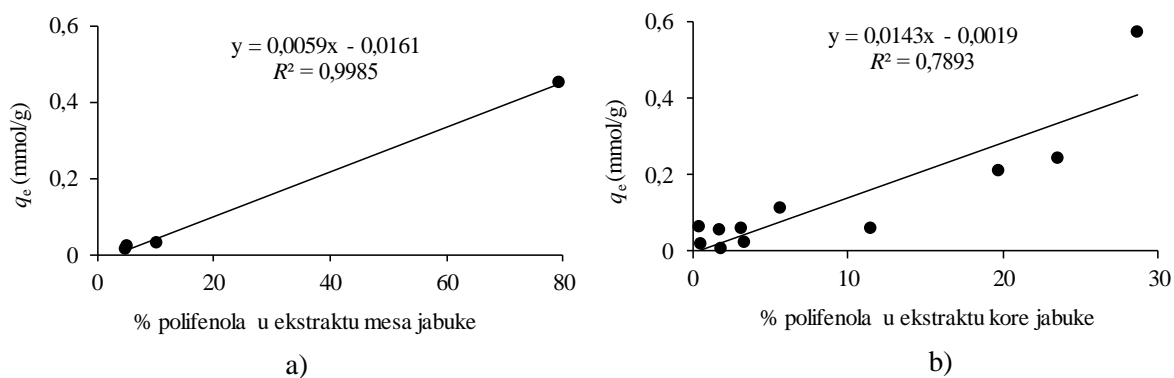
Slika 48 Kromatogrami s identificiranim polifenolima u frakcijama kože jabuke na 280 nm: a) frakcija a; b) frakcija b; c) frakcija c. Numerirani pikovi označavaju procijanidin B2 (1), klorogensku kiselinu (2), cijanidin-3-galaktozid (3), floretin-2-ksiloglukozid (4), kvercetin-3-galaktozid (5), kvercetin-3-glukozid (6), derivat kvercetina 1 (7), derivat kvercetina 2 (8), floretin-2-glukozid (9), kvercetin-3-ksilozid (10) i kvercetin-3-ramnozid (11).

Tablica 26 Količina adsorbiranih polifenola iz frakcija mesa i kožice jabuke po masi β -glukana (q_e , mmol/g) na 25 °C

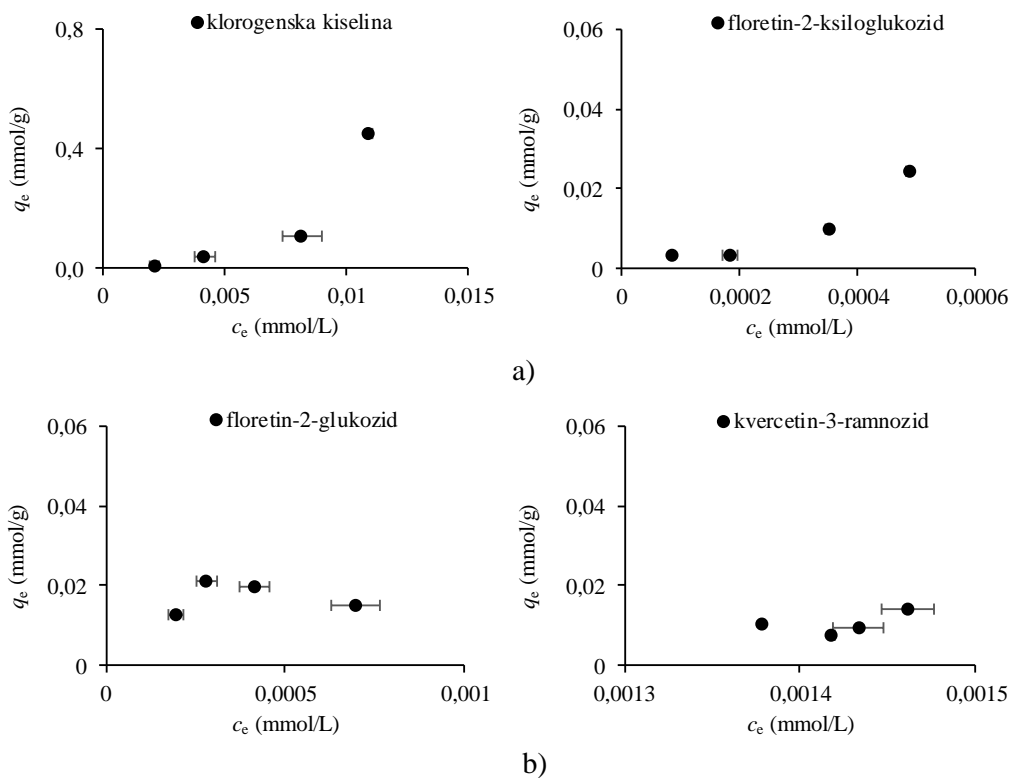
Standard	q_e^* (mmol/g)
Meso	
Frakcija 1	
klorogenska kiselina	0,45±0,039 ^a
floretin-2-ksiloglukozid	0,02±0,00 ^b
Frakcija 2	
floretin-2-glukozid	0,03±0,00 ^b
kvercetin-3-ramnozid	0,01±0,00 ^b
Kožica	
Frakcija a	
procijanidin B2	0,06±0,00 ^c
Frakcija b	
klorogenska kiselina	0,57±0,08 ^a
floretin-2-ksiloglukozid	0,11±0,00 ^{b,c}
cijanidin-3-galaktozid	0,05±0,00 ^c
Frakcija c	
floretin-2-glukozid	0,21±0,00 ^b
kvercetin-3-glukozid	0,06±0,05 ^c
kvercetin-3-galaktozid	0,24±0,00 ^b
kvercetin-3-ramnozid	0,06±0,01 ^c
kvercetin-3-ksilozid	0,02±0,00 ^c
derivat kvercetina 1	0,00±0,00 ^c
derivat kvercetina 2	0,02±0,01 ^c

q_e vrijednosti dobivene su procesom adsorpcije gdje je u reakcijsku otopinu dodano 300 μ L frakcije jabuke, a prikazane su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

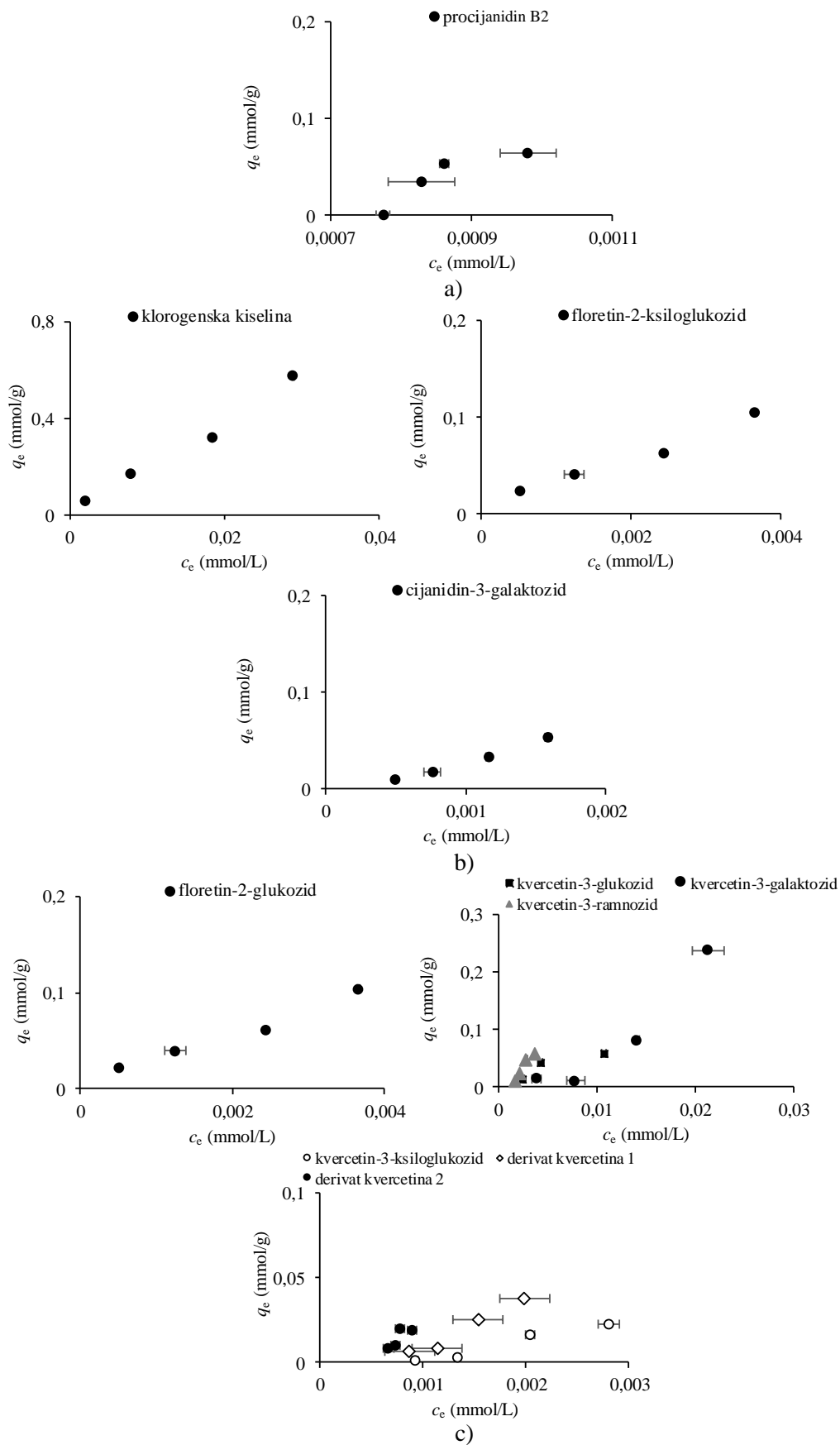
* eksponenti u koloni (a-c) odgovaraju razlici između polifenola mesa i kožice jabuke (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)



Slika 49 Odnos između postotka polifenola u ekstraktu mesa (a) i kožice (b) jabuke i njihova adsorpcijskog kapaciteta (početni volumen frakcije u procesu adsorpcije 300 μ L)



Slika 50 Adsorpcijske ravnoteže za adsorpciju frakcije 1 (a) i frakcije 2 (b) iz mesa jabuke na β -glukanu na 25 °C i pH 5,5



Slika 51 Adsorpcijske ravnoteže za adsorpciju frakcije a (a), frakcije b (b) i frakcije c (c) kožice jabuke na β -glukanu na 25 °C i pH 5,5

Tablica 27 Parametri Freundlichova i Langmuirova modela za adsorpciju polifenola iz frakcija mesa i kože jabuke na β -glukanu na 25 °C

Standard	Freundlichov model*			Langmuirov model*		
	$1/n$	K_F (mol/g) (L/mol) ^{1/n}	S (10 ⁻⁴)	q_m (mmol/g)	K_L (L/mol)	S (10 ⁻⁴)
Meso						
Frakcija 1						
klorogenska kiselina	0,81±0,02 ^a	2,79±0,28 ^a	1	0,52±0,03 ^a	44759±13520 ^a	0,7
floretin-2-ksiloglukozid	0,61±0,02 ^c	0,12±0,01 ^b	0,5	0,03±0,00 ^b	2848337±114643 ^b	0,5
Frakcija 2						
floretin-2-glukozid	0,57±0,01 ^b	0,08±0,01 ^b	1	0,04±0,01 ^b	2995462±315477 ^b	0,4
kvercetin-3-ramnozid	0,67±0,00 ^b	0,09±0,00 ^b	0,4	0,01±0,00 ^b	2772386±0,00 ^b	0,4
Kožica						
Frakcija a						
procijanidin B2	0,94±0,03 ^b	18,09±0,71 ^a	0,8	0,07±0,00 ^d	2760973±122310 ^a	0,3
Frakcija b						
klorogenska kiselina	0,95±0,01 ^b	13,32±1,70 ^b	0,7	0,56±0,00 ^a	67074±3178 ^d	1
floretin-2-ksiloglukozid	0,83±0,02 ^{a,b}	3,79±0,08 ^d	0,5	0,11±0,01 ^{c,d}	92426±6028 ^d	0,1
cijanidin-3-galaktozid	0,89±0,03 ^{c,d}	9,12±2,12 ^c	0,5	0,06±0,00 ^d	719024±36510 ^b	0,1
Frakcija c						
floretin-2-glukozid	0,92±0,01 ^{a,b}	2,74±0,11 ^d	0,6	0,21±0,00 ^{b,c}	98218±946 ^d	0,8
kvercetin-3-glukozid	0,90±0,02 ^{a,b}	1,87±0,07 ^d	0,3	0,09±0,00 ^d	90583±10375 ^d	0,3
kvercetin-3-galaktozid	0,91±0,01 ^{a,b}	3,10±0,14 ^d	0,6	0,24±0,00 ^b	120534±4107 ^d	0,9
kvercetin-3-ramnozid	0,72±0,00 ^a	0,54±0,03 ^d	0,2	0,06±0,00 ^d	505316±41589 ^{b,c}	0,2
kvercetin-3-ksilozid	0,78±0,05 ^{a,b}	0,30±0,09 ^d	0,9	0,04±0,00 ^d	441570±131739 ^c	0,7
derivat kvercetina 1	0,57±0,07 ^{a,b}	0,90±0,00 ^d	0,2	0,06±0,00 ^d	474423±85278 ^c	0,2
derivat kvercetina 2	0,83±0,13 ^{a,b}	0,68±0,17 ^d	0,8	0,06±0,00 ^d	488162±252215 ^c	0,8

*eksponenti u koloni odgovaraju statističkoj razlici između polifenola mesa i kože jabuke (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

Tablica 28 Parametri Dubinjin-Raduškjevičevog i Tjomkinovog modela za adsorpciju polifenola iz frakcija mesa i kože jabuke na β -glukanu na 25 °C

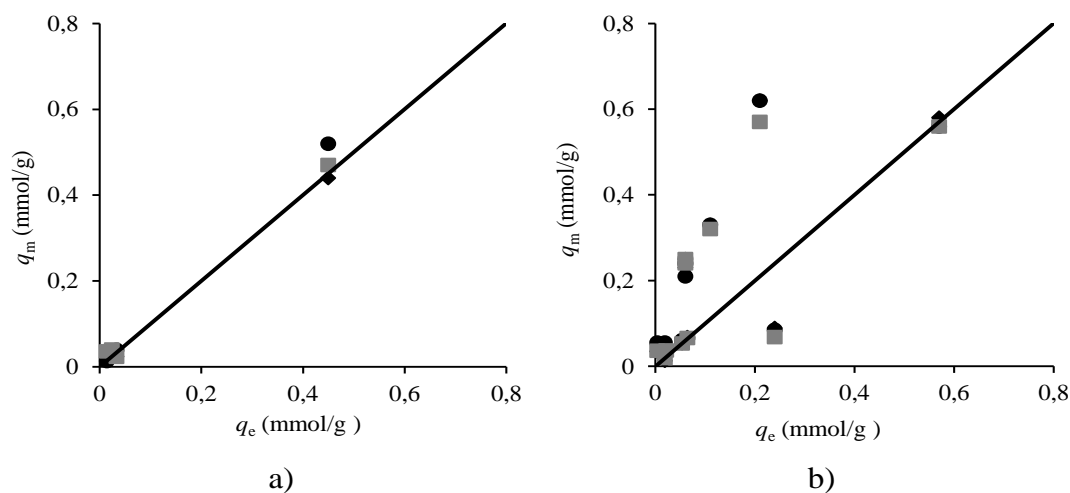
Standard	Dubinjin-Raduškjevičev model*				Tjomkinov model*		
	q_m (mmol/g)	E (J/mol)	c_s (mmol/L)	S (10^{-4})	A (L/g)	b_T (J/mol)	S (10^{-4})
Meso							
Frakcija 1							
klorogenska kiselina	0,44±0,02 ^a	3090±8 ^a	0,03±0,02 ^a	1	167382±10465 ^b	84±6 ^b	17
floretin-2-ksiloglukozid	0,04±0,01 ^b	5685±218 ^b	0,03±0,02 ^a	0,1	3598356±69954	9139±424 ^b	0,2
Frakcija 2							
floretin-2-glukozid	0,02±0,01 ^b	4401±47 ^b	0,00±0,00 ^a	0,5	899982±70710 ^a	1048±70 ^b	3
kvercetin-3-ramnozid	0,04±0,00 ^b	5179±619 ^b	0,04±0,02 ^a	0,4	734782±7071	947901±5656 ^a	10
Kožica							
Frakcija a							
procijanidin B2	0,07±0,00 ^d	6870±187 ^c	0,03±0,00 ^a	0,3	1141611±707 ^d	8281±70 ^a	25
Frakcija b							
klorogenska kiselina	0,58±0,00 ^a	6867±37 ^c	0,33±0,00 ^a	0,9	100161±70 ^c	88±3 ^d	24
floretin-2-ksiloglukozid	0,12±0,01 ^{b,c,d}	6956±78 ^{a,b,c}	0,01±0,00 ^a	0,9	1210555±770	57±6 ^d	12
cijanidin-3-galaktozid	0,05±0,00 ^d	6930±40 ^c	0,01±0,00 ^a	0,9	1141605±700 ^d	8106±8 ^a	12
Frakcija c							
floretin-2-glukozid	0,23±0,00 ^{b,c}	6101±52 ^{a,b,c}	0,13±0,00 ^a	1	100170±14 ^c	467±6 ^d	3
kvercetin-3-glukozid	0,09±0,00 ^{d,e}	6493±41 ^{b,c}	0,09±0,00 ^a	0,4	120155±7 ^{b,c}	582±16 ^{c,d}	2
kvercetin-3-galaktozid	0,25±0,00 ^{c,d}	6591±33 ^{b,c}	0,24±0,00 ^a	1	120140±28 ^{b,c}	347±8 ^d	5
kvercetin-3-ramnozid	0,06±0,00 ^{d,e}	6789±71 ^c	0,06±0,00 ^a	0,2	300006±7 ^{b,c}	921±14 ^{b,c,d}	1
kvercetin-3-ksilozid	0,03±0,00 ^{d,e}	5698±0,00 ^{a,d}	0,15±0,00 ^a	0,4	801525±14142 ^{a,d}	1501±14 ^{b,c}	11
derivat kvercetina 1	0,04±0,00 ^{d,e}	3523±872 ^a	1,16±0,00 ^a	0,5	531763±327760 ^{a,b}	1411±707 ^{b,c}	6
derivat kvercetina 2	0,01±0,00 ^e	4012±1912 ^{a,b}	0,02±0,00 ^a	0,3	838525±21213 ^{a,d}	1761±70 ^b	10

*ekspONENTI u koloni (a-e) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola mesa i kože jabuke (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)

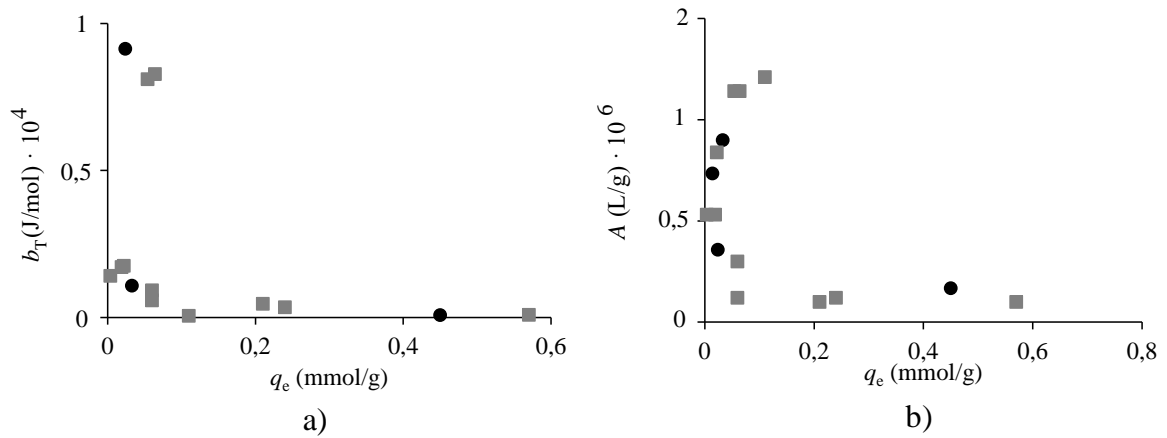
Tablica 29 Parametri Hillova modela za adsorpciju polifenola iz frakcija mesa i kože jabuke na β -glukanu na 25 °C

Standard	Hillov model*			
	q_m (mmol/g)	n_H	K_D (mmol/L)	S (10^{-4})
Meso				
Frakcija 1				
klorogenska kiselina	0,47±0,02 ^a	0,90±0,03 ^a	0,03±0,00 ^a	1
floretin-2-ksiloglukozid	0,04±0,00 ^b	0,88±0,00 ^b	0,00±0,00 ^c	0,5
Frakcija 2				
floretin-2-glukozid	0,02±0,00 ^b	0,71±0,03 ^b	0,02±0,00 ^b	0,1
kvercetin-3-ramnozid	0,02±0,00 ^b	0,73±0,00 ^b	0,02±0,00 ^b	1
Kožica				
Frakcija a				
procijanidin B2	0,07±0,00 ^c	0,80±0,01 ^{b,c}	0,01±0,00 ^b	0,2
Frakcija b				
klorogenska kiselina	0,56±0,00 ^a	0,91±0,01 ^b	0,01±0,00 ^b	2
floretin-2-ksiloglukozid	0,12±0,01 ^{b,c}	0,74±0,01 ^{b,c}	0,06±0,00 ^a	0,2
cijanidin-3-galaktozid	0,05±0,00 ^c	0,82±0,02 ^{b,c}	0,08±0,00 ^b	0,2
Frakcija c				
floretin-2-glukozid	0,24±0,00 ^b	0,84±0,01 ^{b,c}	0,06±0,00 ^a	0,9
kvercetin-3-glukozid	0,07±0,00 ^c	0,75±0,01 ^{b,c}	0,06±0,00 ^a	0,3
kvercetin-3-galaktozid	0,25±0,00 ^b	0,84±0,03 ^{b,c}	0,06±0,00 ^a	1
kvercetin-3-ramnozid	0,07±0,00 ^c	0,72±0,01 ^c	0,06±0,00 ^a	1
kvercetin-3-ksilozid	0,04±0,00 ^c	0,72±0,01 ^c	0,06±0,00 ^a	0,2
derivat kvercetina 1	0,04±0,00 ^c	0,68±0,04 ^c	0,06±0,00 ^a	0,3
derivat kvercetina 2	0,02±0,00 ^c	0,49±0,11 ^a	0,06±0,00 ^a	0,2

*eksponenti u koloni (a-c) odgovaraju statističkoj razlici između polifenola mesa i kože jabuke (dobivene Tukeyevim *post-hoc* testom)



Slika 52 Odnos adsorpcijskih parametara q_m iz Langmuirove (●), Dubinjin-Raduškjevičeve (◆) i Hillove izoterme (■) naspram eksperimentalno određenih adsorpcijskih kapaciteta polifenola q_e . Prikazani rezultati odnose se za početne koncentracije od 300 μ L ekstrakta, za frakciju mesa (a) i kože (b) jabuke



Slika 53 Odnos Tjorkinovih parametara b_T (a) i A (b) naspram eksperimentalno određenih adsorpcijskih kapaciteta (q_e) za polifenole iz frakcija mesa (●) i kože (■) jabuke. Početni volumen adsorbirajućih tvari iz frakcija iznosio je 300 μ L

5. RASPRAVA

5.1. Validacija primijenjenih analitičkih metoda

Za analizu polifenolnih spojeva u različitim matricama upotrebljavaju se različite analitičke metode. Za analizu pojedinačnih polifenolnih komponenti u uzorcima koji sadrže veliki broj polifenola kao što su ekstrakti voća, povrća, bilja, sokovi te biološke tekućine najčešće se koristi kromatografska analiza (Amarnath i sur., 2003; Escarpa i González, 2001; Klimczak i sur., 2007; Tsao i sur., 2003; Zhao i sur., 2005; Wang i sur., 2004). Spektroskopske metode mogu se koristiti za analizu ukupne količine polifenola (Folin-Ciocalteuova metoda) ili ukupne količine antocijanina (pH-diferencijalna metoda) u ekstraktima. Prednost spektroskopskih metoda je što su jednostavne, brze i jeftine, no nisu specifične. Ukoliko modelne otopine u kojima se odvija reakcija, u ovom slučaju adsorpcija, sadrže jedan polifenolni spoj, taj spoj može se određivati jednostavnijim, bržim i jeftinijim spektroskopskim metodama. U ovom radu, za analizu polifenola u modelnim otopinama u kojima je ispitivana adsorpcija svakog pojedinog polifenolnog spoja zasebno, primijenjena je spektroskopska metoda za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteuova metoda) te spektroskopska metoda za određivanje ukupnih antocijanina (pH-diferencijalna metoda).

Svaka od primijenjenih metoda mora se prije upotrebe validirati kako bi se osigurala pouzdanost dobivenih podataka (Matić i sur., 2017). Metoda za ukupne polifenole validirana je za analizu vina (Dóka i sur., 2002; López-Vélez i sur., 2003; Rastija i sur., 2009), sokova (Bermúdez-Soto i sur., 2004; Klimczak i sur., 2007; Mullen i sur., 2007) te ekstrakta voća i povrća (Chun i Kim, 2004; Palacios i sur., 2011; Sellappan i sur., 2002). Metoda za ukupne antocijanine validirana je za određivanje antocijanina u različitim uzorcima (Lao i Giusti, 2016; Lee i sur., 2005; Vega Arroyo i sur., 2017). Sukladno navedenom, metode primijenjene u ovom radu također su validirane.

5.1.1. Validacija spektroskopskih metoda

Metoda za ukupne polifenole validirana je za polifenole koji pripadaju skupini fenolnih kiselina (galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina), flavan-3-ola (procijanidin B1, procijanidin B2) i dihidrokalkona (floretin, floretin-2-glukozid). Metoda za ukupne antocijanine koja je služila za analizu polifenola iz skupine antocijanina, validirana je za cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-galaktozid.

U tablici 2 dane su jednadžbe kalibracijskih pravaca spektroskopske metode za određivanje ukupnih polifenola s izračunatim vrijednostima LOD i LOQ. Za sve analizirane polifenole vidljiva je visoka linearnost metode u ispitivanom rasponu koncentracija (visoke R^2 vrijednosti), a vrijednosti LOD i LOQ su prihvatljivo niske. Nagib kalibracijskih pravaca govori o osjetljivosti metode. Veći nagib sugerira veću osjetljivost metode, a osjetljivija metoda daje točnije rezultate. Spektroskopska metoda pokazala se najosjetljivijom prema procijanidinu B1, a najmanje osjetljivom za floretin-2-glukozid.

Preciznost metode izražena je preko KV kao srednja vrijednost ponovljivosti i srednja vrijednost međupreciznosti (tablica 3). Rezultati za srednju vrijednost ponovljivosti i srednju vrijednost međupreciznosti prihvatljivo su niski (Taverniers i sur., 2004). Rezultati analize točnosti spektroskopske metode za određivanje ukupnih polifenola prikazani su u tablici 4. Uspoređene su stvarne i kalibracijskim modelom predviđene vrijednosti koncentracija. Analiza je s 95 %-tnom pouzdanošću odbacila postojanje sustavne pogreške (interval pouzdanosti za nagib pravca uključuje vrijednost 1, dok za odsječak uključuje vrijednost 0 (Thompson i sur., 2002)).

Podaci vezani uz linearnost, LOD i LOQ za spektroskopsku metodu određivanja ukupnih antocijanina prikazani su u tablici 5. Za oba standarda antocijanina, u ispitivanom koncentracijskom području, prema R^2 dobivene su linearne kalibracijske krivulje. Također, vrijednosti LOD i LOQ su prihvatljivo niske. Metoda je osjetljivija za cijanidin-3-glukozid s obzirom na veći nagib kalibracijskog pravca. Preciznost metode izražena je preko KV kao srednja vrijednost ponovljivosti (tablica 6). Rezultati za srednju vrijednost ponovljivosti prihvatljivo su niski (Taverniers i sur., 2004). Analiza točnosti je s 95%-tnom pouzdanošću (tablica 7) utvrdila izostanak sustavne pogreške.

Važno je napomenuti da se u spektroskopskoj metodi za određivanje ukupnih antocijanina apsorpcija zračenja mjeri na dvije različite pH-vrijednosti, pH 1 i pH 4,5 zbog promjene pojavnosti antocijanina na različitim pH-vrijednostima. Naime, pri pH 1 antocijanini se nalaze u obliku flavilijeva kationa te daju crveno obojenje otopine. Pri pH 4,5 antocijanini se nalaze u obliku karbinolne pseudobaze koja je bezbojna. Mjerenjem apsorpcije pri pH 1 dobivaju se podaci za određivanje antocijanina u uzorcima, a od te vrijednosti oduzima se apsorpcija izmjerena u otopini pH 4,5 na kojoj antocijanini ne apsorbiraju. Tim načinom uklonjene su interferencije svih spojeva koji bi mogli apsorbirati u istom području pH. Osim toga, apsorpcija na obje pH-vrijednosti mjeri se na 510 i 700 nm. 510 nm je područje vidljivog zračenja koje je karakteristično za apsorpciju antocijanina, dok na 700 nm ne bi trebali pokazati apsorpciju

zračenja. I u tom slučaju, rezultati apsorpcije na 510 nm korigiraju se oduzimanjem apsorpcije na 700 nm gdje antocijanini ne bi trebali pokazati apsorpciju. Valna duljina 510 nm za praćenje apsorpcije antocijanina uobičajeno se upotrebljava u ovoj standardnoj spektroskopskoj metodi (Giusti i Wrolstad, 2001) te je odabrana za mjerenje i u ovom radu. Razlog tome je maksimum apsorpcije cijanidin-3-glukozida na 510 nm u otopini pH-vrijednosti 1 (Giusti i Wrolstad, 2001). Maksimum apsorpcije antocijanina može se mijenjati s obzirom na to u kojem se otapalu nalazi antocijanin (Tonutare i sur., 2014). Prema literaturi, maksimum apsorpcije za cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-galaktozid u 0,1 % HCl u metanolu je na oko 530 nm (Giusti i Wrolstad, 2001). No, u spektroskopskoj metodi određivanja antocijanina antocijanini se nalaze u otopini pH 1 te se mjerenje provodi pri 510 nm.

Validirane metode upotrijebljene su za praćenje koncentracije pojedinih polifenola nakon adsorpcije.

5.1.2. Validacija kromatografije obrnutih faza

Za identifikaciju i kvantifikaciju polifenola iz ekstrakta jabuka validirana je RP-HPLC kromatografska metoda. Validacija za polifenole iz skupine flavan-3-ola i dihidrokalkona provedena je na 280 nm, za fenolne kiseline na 320 nm, za flavonole na 360 nm, a za antocijanine na 510 nm. Za sve ispitane polifenole dobivene su linearne kalibracijske krivulje (tablica 8) u ispitivanom rasponu koncentracija. Dobivene vrijednosti LOD i LOQ, preciznosti izražene preko koeficijenta varijacije, te analitički povrat (engl. *recovery*) su u prihvatljivim granicama. Analiza točnosti s 95%-tnom pouzdanošću (tablica 9) odbacila je postojanje sustavne pogreške. Validirana metoda upotrijebljena je za praćenje koncentracije polifenola iz jabuke nakon adsorpcije

5.2. Adsorpcija polifenola na β -glukanu na različitim temperaturama

Kako bi se istražio utjecaj temperature na proces adsorpcije na β -glukanu te mogla odrediti termodinamika procesa, adsorpcija polifenolnih spojeva provedena je na trima različitim temperaturama: 25, 37 i 45 °C, pri pH-vrijednosti medija 5,5.

Količine polifenola adsorbirane po masi β -glukana (q_e , mmol/g), određene u procesu adsorpcije prikazane su u tablici 10. Dobivene q_e -vrijednosti za gotovo sve polifenole bile su do 2,9 mmol/g. Iznimka je galna kiselina koja je pokazala nešto veći adsorpcijski kapacitet: od

2,3 do 4,5 mmol/g, ovisno o temperaturi. Dobivene podatke teško je usporediti s literaturno dostupnim podacima jer na q_e -vrijednost mogu utjecati različiti faktori. Prvi je molearna masa β -glukana, koja može varirati ovisno o podrijetlu (zob ili ječam) (Ajithkumar i sur., 2005; Zheng i sur., 2011) i okolišnim uvjetima tijekom rasta biljke (Ajithkumar i sur., 2005). Drugi uvjeti koji utječu na adsorpciju su pH-vrijednost medija u kojem se odvija adsorpcija, ionska jakost medija i temperatura odvijanja adsorpcije. Rezultati nekih prijašnjih istraživanja pokazali su da su se standardi polifenola koji se mogu naći u čaju adsorbirali na β -glukan u rasponu od 0,54 do 0,88 mmol/g (Gao i sur., 2012a) ili od 0,105 do 0,29 mmol/g (Wang i sur., 2013) i usporedivi su s adsorpcijskim kapacitetima utvrđenim u ovom istraživanju (tablica 10).

Vrijednosti q_e analizirane su Tukeyevim *post-hoc* testom kako bi se uvidjele moguće razlike između polifenola na svakoj pojedinoj temperaturi (tablica 10). Između fenolnih kiselina, adsorpcija polifenola na β -glukan veća je za galnu kiselinu, a manja za kafeinsku, *p*-kumarinsku i klorogensku kiselinu na svim temperaturama, no razlike u adsorpcijskim kapacitetima su statistički značajne samo na 37 °C. Slično ponašanje pronađeno je i u literaturi gdje su Wang i sur. (2013) utvrdili veći adsorpcijski kapacitet galne kiseline u odnosu na kafeinsku i *p*-kumarinsku kiselinu za proces adsorpcije na β -glukanu iz zobi. Iako procijanidin B2 pokazuje veći adsorpcijski kapacitet od procijanidina B1, između ta dva ispitivana flavan-3-ola nema statistički značajne razlike na sve tri temperature. Isto je i sa skupinom antocijanina, u kojoj je na sve tri temperature adsorpcijski kapacitet cijanidin-3-glukozida veći od cijanidin-3-galaktozida, no te razlike nisu statistički značajne. Između floretina i floretin-2-glukozida utvrđena je statistički značajna razlika samo na 37 °C na kojoj floretin-2-glukozid pokazuje veći adsorpcijski kapacitet od floretina.

Primjenom Tukeyeva *post-hoc* statističkog testa ispitana je razlika za svaki pojedini polifenol na tri različite temperature ne bi li se uočile moguće razlike u adsorpcijskom kapacitetu ovisno o temperaturi (tablica 11). Iako je vidljivo da je adsorpcijski kapacitet veći na 37 nego na 25 i 45 °C za sve fenolne kiseline, floretin-2-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, potom da u slučaju procijanidina B1 i B2 pokazuje porast s rastom temperature od 25 do 45 °C, smanjuje se s povećanjem temperature od 25 do 45 °C za cijanidin-3-glukozid te u slučaju floretina pokazuje manju vrijednost na 37 nego na 25 i 45 °C (tablica 10), te razlike nisu statistički značajne (tablica 11). Iznimka je floretin-2-glukozid (tablica 11) koji je pokazao veći adsorpcijski kapacitet na 37 °C. Ranija istraživanja pokazala su da temperatura ima utjecaj na adsorpciju polifenola iz čaja (Wu i sur., 2011) ili (-)-epigalokatehin-3-galata (Gao i sur., 2012b) na β -glukanu iz zobi, zatim na adsorpciju procijanidina na staničnu stjenku jabuke (Le

Bourvelec i sur., 2004) što je slično rezultatima u ovom radu, no pronađene razlike nisu statistički značajne.

Da bi se proces adsorpcije mogao modelirati adsorpcijskim izotermama, proveden je za sve ispitivane polifenole na više početnih koncentracija polifenola. Dobiveni ravnotežni adsorpcijski kapacitet (q_e , mmol/g) i ravnotežna koncentracija adsorbata u otopini (c_e , mmol/L) prikazani su na slikama 16 – 19, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. I u ovom slučaju, galna kiselina pokazala je veći adsorpcijski kapacitet od kafeinske, *p*-kumarinske i klorogenske kiseline. Flavan-3-oli su pokazali relativno slične adsorpcijske kapacitete. U skupini dihidrokalkona floretin-2-glukozid pokazao je nešto veći adsorpcijski kapacitet od floretina, dok je u skupini antocijanina cijanidin-3-glukozid pokazao nešto veći adsorpcijski kapacitet od cijanidin-3-galaktozida.

Postojeća istraživanja pokazala su da kemijska struktura polifenola može imati utjecaj na adsorpcijski kapacitet (Le Bourvellec i sur., 2004; Wang i sur., 2013). Na adsorpciju mogu utjecati galoilna skupina na molekuli polifenola, broj OH-skupina na molekuli, metilacija i metoksilacija te glikozilacija (Gao i sur., 2012b; Kammerer i sur., 2007; Wang i sur., 2013). Naime, pokazalo se da se polifenoli s galoilnom skupinom bolje adsorbiraju na glukan (Gao i sur., 2012b) ili na polimetil-metakrilatnu smolu (Kammerer i sur., 2007) te time galoilna skupina na molekuli polifenola poboljšava adsorpciju. Adsorpcija je favorizirana kod flavonoida s tri ili manje OH-skupina na aglikonu polifenola (Wang i sur., 2013). Metilacija i metoksilacija fenolnih kiselina smanjila je adsorpcijski kapacitet na β -glukanu (Wang i sur., 2013). Glikozilacija je uzrokovala brojne komplicirane efekte (Wang i sur., 2013). Osim galoilne skupine, OH-skupine, metilacije, metoksilacije te glikozilacije, na adsorpciju utječe i kemijska struktura pojedinih polifenolnih skupina. Tako se pokazalo da je adsorpcijski kapacitet β -glukana veći za flavonole nego za fenolne kiseline (Wang i sur., 2013).

Najveći adsorpcijski kapacitet od svih fenolnih kiselina u ovom istraživanju na različitim temperaturama pokazala je galna kiselina (slika 16, tablica 10). Ukoliko se pokuša povezati adsorpcijske kapacitete s molekulskom strukturom promatranih fenolnih kiselina, moguće je da je on rezultat brojnosti OH-skupina na benzenskom prstenu. Naime, galna kiselina ima najveći broj OH-skupina na benzenskom prstenu (tri) kao i najveću adsorpciju (slika 16, tablica 10) što se slaže s istraživanjem Wang i sur. (2013) u kojem je galna kiselina također pokazala najveći adsorpcijski kapacitet na β -glukanu iz zobi u usporedbi s brojnim drugim polifenolima. Zatim slijedi adsorpcijski kapacitet kafeinske kiseline (dvije OH-skupine) i *p*-kumarinske kiseline (jedna OH-skupina) (slika 16; prema tablici 10 na 37 °C). Adsorpcijski kapacitet bio je najniži

za klorogensku kiselinu (slika 16; prema tablici 10 na 37 °C). Pri tome je moguće da je esterifikacija snizila adsorpcijski kapacitet kod klorogenske kiseline (Wang i sur., 2013). To se slaže s istraživanjima nekih znanstvenika (Le Bourvellec i sur., 2004; Wang i sur., 2013) koja su pokazala da na proces adsorpcije utječe broj funkcionalnih skupina koje mogu stvarati vezu između polifenola i adsorbensa. Između flavan-3-ola, procijanidin B2 pokazao je nešto veći adsorpcijski kapacitet od procijanidina B1 iako razlike nisu bile statistički značajne (tablica 10). Budući da se te dvije molekule razlikuju po prostornom rasporedu OH-skupina na molekuli, moguće je da je prostorni raspored OH-skupina imao utjecaj na adsorpcijski kapacitet kao što to sugeriraju Le Bourvellec i sur. (2004). Međutim, teško je donijeti konkretan zaključak na temelju usporedbe adsorpcijskih kapaciteta svega dvaju spojeva. Floretin-2-glukozid pokazao je nešto veći adsorpcijski kapacitet od floretina (slika 18; tablica 10 na 37 °C; statistički značajna razlika). Molekule se razlikuju po tome što je na floretin-2-glukozid vezana molekula glukoze, što nije slučaj kod floretina. Stoga postoji mogućnost utjecaja glikozilacije na adsorpcijski kapacitet molekula floretin-2-glukozida (Wang i sur., 2013). Između dva ispitivana antocijanina, cijanidin-3-glukozid je pokazao veći adsorpcijski kapacitet u usporedbi s cijanidin-3-galaktozidom (slika 19; tablica 10; no bez postojanja statistički značajne razlike), pri čemu se može naslutiti da je molekula glukoze bila više favorizirana od molekule galaktoze.

5.2.1. Adsorpcijske izoterme na tri različite temperature

Eksperimentalni podaci dobiveni u procesu adsorpcije (q_e i c_e) analizirani su uvrštavanjem u različite adsorpcijske modele: Freundlich, Langmuir, Dubinjin-Raduškjevič, Tjomkin i Hill. Uvrštavanje Langmuirova modela među modele kojima će se ispitivati adsorpcija na β -glukanu je logična posljedica činjenice da se upravo taj model najčešće koristi za opisivanje adsorpcije polifenola (Le Bourvellec i Renard, 2012; Marsal i sur., 2012; Matić i sur., 2018; Phan i sur., 2015; Phan i sur., 2017; Zhang i sur., 2017). Freundlichov model također se susreće u literaturi za opisivanje procesa adsorpcije (Gao i sur., 2012b; Wu i sur., 2011). Dubinjin-Raduškjevičev model odabran je kao model koji se u literaturi često primjenjuje, a primjer je opisivanje adsorpcije polifenola na kožnim strugotinama (Marsal i sur., 2012). Zbog toga su navedeni modeli istraženi i u ovom radu. Zbog dobivanja više informacija o procesu adsorpcije, primijenjeni su i Tjomkinov i Hillov model.

U tablicama 12 – 14 prikazani su parametri modela za adsorpciju polifenola na β -glukanu. Vrijednosti parametra $1/n$ Freundlichova modela su za sve polifenole i na svim temperaturama

manje od 1, što ukazuje na adsorpciju koja je favorizirana na svim temperaturama. Parametri q_m iz Langmuirova, Hillova i Dubinjin-Raduškjevičeva modela mogu dati podatke o maksimalnom teorijskom kapacitetu/zasićenju β -glukana. Teorijski adsorpcijski kapaciteti predviđeni modelima bili su u većini slučajeva najveći za galnu kiselinu, a slijede ju *p*-kumarinska, kafeinska i klorogenska kiselina na svim temperaturama. Osim toga, *p*-kumarinska i kafeinska kiselina pokazale su veće teorijske adsorpcijske kapacitete od klorogenske kiseline na svim temperaturama. U skupini flavan-3-ola, teorijski kapaciteti su bili općenito veći za procijanidin B2, zatim u skupini dihidrokalkona u većini slučajeva za floretin-2-glukozid, te u skupini antocijanina za cijanidin-3-glukozid. Iznimke od uočenih razlika vidljive su samo pri pojedinim temperaturama. Uočene razlike između polifenolnih spojeva u pojedinim skupinama statistički su značajne samo na nekim temperaturama. Predviđeni teorijski adsorpcijski parametri q_m pokazali su dobro slaganje s eksperimentalnim vrijednostima adsorpcijskog kapaciteta (slika 20).

Parametar E iz Dubinjin-Raduškjevičeva modela predstavlja srednju slobodnu energiju adsorpcije. Sve izračunate slobodne energije bile su manje od 8 kJ/mol što ukazuje na fizikalnu prirodu veza između polifenola i β -glukana, primjerice vodikove ili van der Waalove veze (Marsal i sur., 2012). Dosadašnja istraživanja pokazala su da veze između polifenola i β -glukana mogu biti hidrofobne interakcije, vodikove veze te van der Waalove interakcije (Simonsen i sur., 2009; Veverka i sur., 2014; Wu i sur., 2011), a postojanje veza koje nisu kovalentne prirode dokazali su u svojim istraživanjima i Gao i sur. (2012b), Le Bourvellec i sur. (2004) te Wu i sur. (2011). Također, predložen je mehanizam interakcije između polifenola ((-)-epigalokatehin-3-galat) i β -glukana (Gao i sur., 2012b) preko kisikova atoma i OH-skupine na molekuli β -glukana i OH-skupine na polifenolima. Nastajanje vodikovih veza smanjuje udaljenost između aromatskih prstenova kod polifenola i β -glukana što omogućava van der Waalove interakcije (Gao i sur., 2012b).

Parametar n_H Hillova modela manji je od 1 za sve ispitane polifenole što ukazuje na negativnu kooperaciju za adsorpciju drugih molekula; dakle, kada se molekula polifenola adsorbira na površinu β -glukana dolazi do opadanja afiniteta za adsorpciju drugih molekula. Parametar b_T koji predstavlja entalpiju adsorpcije, te A koji predstavlja Tjomkinov adsorpcijski potencijal, smanjuju se kako se povećava eksperimentalno određen adsorpcijski kapacitet (slika 21). Čini se kako je veći adsorpcijski kapacitet povezan s nižim vrijednostima entalpije adsorpcije i Tjomkinov adsorpcijskog potencijala.

Parametri adsorpcijskih modela pokazali su različite vrijednosti na različitim temperaturama. S ciljem da se utvrdi jesu li te razlike statistički značajne, proveden je Tukeyev *post-hoc* test (tablica 15). Parametri adsorpcijskih izoterma pokazuju u pojedinačnim slučajevima razliku s obzirom na temperaturu adsorpcije.

5.2.2. Termodinamika adsorpcije polifenola na β -glukanu

Provođenje adsorpcije na različitim temperaturama omogućilo je određivanje standardne entalpije procesa adsorpcije (ΔH), standardne entropije procesa adsorpcije (ΔS) pomoću van 't Hoffova dijagrama (slika 22) pri čemu se ΔH određuje preko nagiba pravca, a ΔS iz odsjeka na ordinati. Gibbsova energija (ΔG) procesa adsorpcije određena je prema jednadžbi 14. Za određivanje termodinamičkih parametara upotrijebljena je Langmuirova konstanta (K_L) koja je bila različita za različite temperature (tablica 12).

Vrijednosti termodinamičkih parametara prikazane su u tablici 16. Za sve ispitivane polifenole ΔG je imala negativnu vrijednost na svim temperaturama što ukazuje na spontan proces adsorpcije (tablica 16). Pravci van 't Hoffova dijagrama imali su visoke vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) (slika 22) što ukazuje na dobru podudarnost podataka s modelom. Iz tih dijagrama dobivene su pozitivne ΔS vrijednosti što ukazuje na visoku vjerojatnost interakcija polifenola i β -glukana. Također, vrijednosti ΔH bile su negativne za sve polifenole što ukazuje na egzotermnost procesa adsorpcije (Nguela i sur., 2016). U literaturi je pronađeno da je adsorpcija polifenola na brojnim adsorbensima također bila egzotermna (Soto i sur., 2011; Gao i sur., 2013).

5.3. Kinetika adsorpcije polifenola na β -glukan

Ispitivanje adsorpcije polifenola na β -glukanu u ovisnosti o vremenu omogućuje određivanje kinetičkih parametara adsorpcije. Dobiveni rezultati adsorpcijskog kapaciteta q_t u ovisnosti o vremenu adsorpcije prikazani su na slici 23. Ti rezultati modelirani su lineariziranim kinetičkim modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda (slike 24 – 27). Prema R^2 dobivenih lineariziranih modela, vidljivo je kako se eksperimentalni podaci nešto bolje slažu s modelom pseudo-drugog reda nego s modelom pseudo-prvog reda (slike 24 – 27). Određene su konstante brzine reakcije pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, te q_e -vrijednosti predviđene modelom (tablica 17). Da bi se vidjelo odgovaraju li q_e -vrijednosti predviđene modelom eksperimentalno

određenim vrijednostima, provedena je grafička usporedba (slika 28). Iz slike 28 vidljivo je da model pseudo-drugog reda predviđa q_e -vrijednosti koje bolje odgovaraju eksperimentalno određenim vrijednostima u usporedbi s modelom pseudo-prvog reda. To ponovo ukazuje na činjenicu da pseudo-drugi red bolje opisuje proces adsorpcije polifenola na β -glukan. U ranijim istraživanjima također je utvrđeno da jednadžba pseudo-prvog reda u većini slučajeva ne može opisati kinetičke podatke jednako dobro kao jednadžba pseudo-drugog reda (Plazinski i sur., 2009) slično kao i u ovom istraživanju.

Napravljena je simulacija q_t vrijednosti predviđenih modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda te su predviđene vrijednosti prikazane u dijagramu ovisnosti q_t o vremenu adsorpcije (slike 29–32). I iz ovog prikaza je vidljivo da vrijednosti q_t predviđene modelom pseudo-drugog reda odgovaraju eksperimentalnim vrijednostima q_t .

U tablici 18 prikazana su vremena polureakcije za model pseudo-prvog i pseudo-drugog reda. S obzirom na to da model pseudo-drugog reda bolje opisuje proces adsorpcije, vrijeme polureakcije adsorpcije izračunato je prema tom modelu. Rezultati pokazuju da se polifenoli razlikuju po brzini adsorpcije.

Prema navedenim rezultatima, može se pretpostaviti da se adsorpcija polifenola na β -glukan odvija prema pseudo-drugom redu što odgovara ranijim istraživanjima (Marsal i sur., 2012). Prema modelu pseudo-drugog reda brzinu adsorpcijske kinetike određuje brzina procesa adsorpcije i desorpcije (Ho i McKay, 1999). Vrijeme polureakcije (vrijeme potrebno da se polovica od ukupne količine polifenola adsorbira na β -glukan) u rasponu je od 0,76 h do 7,22 h. Nakon toga vremena, proces adsorpcije znatnije usporava do postizanja konstantnoga adsorpcijskog kapaciteta.

5.4. UV/Vis-spektri polifenola

Da bi se dobio uvid u interakcije između polifenola i β -glukana u procesu adsorpcije, snimljeni su UV/Vis-spektri polifenola, fizičke mješavine polifenola i β -glukana (modelna otopina) te kompleksa polifenol- β -glukan koji je nastao na kraju procesa adsorpcije (slike 33 – 36). Galna kiselina pokazuje maksimum apsorpcije na 260 nm, *p*-kumarinska na 290 s ramenom na 310 nm, kafeinska kiselina na 285 i 315 nm, klorogenska na 330 nm (slika 33). Oba flavan-3-ola pokazuju maksimum na 280 nm (slika 34), a oba dihidrokalkona na 285 nm (slika 35). Antocijanini pokazuju tipične maksimume na 280 i 530 nm (slika 36). Svi ti tipični UV/Vis-

spektri slažu se s literaturno dostupnim podacima (Anouar i sur., 2012; Weng Kong i sur., 2014).

Modelne otopine koje su zapravo fizičke mješavine polifenola i β -glukana pokazale su iste maksimume u UV/Vis-spektrima kao i čisti polifenoli, osim u slučaju flavan-3-ola gdje je vidljiv pomak maksimuma s 280 na 283 nm (slike 33 – 36). Takvi pomaci mogu ukazivati na interakcije između polifenola i β -glukana, no to je potrebno provjeriti dodatnim ispitivanjima.

Spektri čistog β -glukana te kompleksa β -glukan-polifenol prikazani su na slikama 37 do 40. Na tim slikama mogu se vidjeti blagi maksimumi na UV/Vis-spektrima kompleksa u području gdje maksimume pokazuju i čisti polifenoli. U slučaju kompleksa s galnom kiselinom blagi maksimum vidljiv je na 260 nm (slika 37). Kompleks s *p*-kumarinskom kiselinom pokazuje maksimum na 290 i 310 nm, s kafeinskom kiselinom na 285 i 315 nm, s klorogenskom kiselinom na 330 nm (slika 37). Kompleks s flavan-3-olima pokazuje maksimum na 280 nm (slika 38), s dihidrokalkonima na 285 nm (slika 39), s antocijaninima na 280 nm (slika 40). Ti maksimumi ukazuju na vezanje polifenola s β -glukanom.

5.5. Adsorpcija polifenola na β -glukanu na različitim pH-vrijednostima

Poznato je da na proces adsorpcije utječe pH-vrijednost medija (Phan i sur., 2016). S ciljem da se utvrdi utjecaj pH-vrijednosti medija na proces adsorpcije polifenola na β -glukanu, provedeni su eksperimenti na trima različitim pH-vrijednostima: 1,5, 5,5 i 10,0. Temperatura je bila konstantna i iznosila je 37 °C.

Količine adsorbiranih polifenola po masi β -glukana (q_e , mmol/g) prikazane su u tablici 19. Količine su određene s obzirom na proces adsorpcije u kojem je početna koncentracija polifenola iznosila 25 mg/L. Vrijednosti q_e za sve polifenole iznosile su do 3,0 mmol/g, osim za galnu kiselinu čije su vrijednosti bile u rasponu od 0,87 do 4,50 mmol/g. Rezultati prijašnjih istraživanja adsorpcije polifenola (Gao i sur., 2012a) usporedivi su s adsorpcijskim kapacitetima utvrđenim u ovom istraživanju (tablica 19).

Vrijednosti q_e analizirane su Tukeyevim *post-hoc* testom (tablica 19). U skupini fenolnih kiselina pri pH-vrijednostima 5,5 i 10,0 galna kiselina pokazala je veći adsorpcijski kapacitet od *p*-kumarinske, kafeinske i klorogenske kiseline, a ta razlika statistički je značajna. U skupini flavan-3-ola procijanidin B2 je pokazao veći q_e pri svim pH-vrijednostima, no te razlike nisu statistički značajne. U skupini dihidrokalkona floretin je pokazao veći q_e od floretin-2-

glukozida pri pH 1,5 i 10,0, dok je na pH 5,5 floretin-2-glukozid pokazao veći q_e . Te razlike su statistički značajne. U skupini antocijanina cijanidin-3-galaktozid pokazao je veći q_e pri pH 1,5 i 10,0, a manji pri pH 5,5, no utvrđene razlike statistički nisu značajne. Razlike u adsorpcijskom kapacitetu polifenola mogu biti povezane s različitom kemijskom strukturom polifenola koja je već spomenuta.

Kako bi se vidjele statističke razlike za svaki pojedinačni polifenol pri promjeni pH-vrijednosti medija, proveden je Tukeyev *post-hoc* test (tablica 20). Analiza je ukazala na određene razlike u q_e -vrijednostima na različitim pH. Utvrđeno je kako se fenolne kiseline adsorbiraju slično na svim pH-vrijednostima, osim galne kiseline koja je pokazala niži adsorpcijski kapacitet pri pH 1,5, a veći pri pH 5,5 i 10,0 (tablica 20). To se slaže s rezultatima ranijih istraživanja u kojima su fenolne kiseline kao što su kafeinska kiselina i klorogenska kiselina pokazale ovisnost o pH tijekom procesa adsorpcije na polistiren-divinilbenzensku smolu (Bretag i sur., 2009). Fenolne kiseline su kiseline s COOH-skupinom u kemijskoj strukturi koja disocira u ovisnosti o pH okoline. U slučaju nižih pH-vrijednosti, fenolne kiseline nalaze se u protoniranom (neionskom, nedisociranom) stanju. Kod pK_a -vrijednosti, 50 % kiseline je disocirano, a na višim pH udio disociranih molekula povećava se. U ovom istraživanju, na pH 1,5 većina molekula fenolnih kiselina vjerojatno je bila u protoniranom (neioniziranom) obliku. Prema pK_a -vrijednosti povećavao se udio molekula disociranih kiselina (na primjer pK_a -vrijednost za galnu kiselinu je 4,4 (Buszewski i sur., 2006), za klorogensku kiselinu 3,3). Na višim pH, fenolne kiseline vjerojatno su bile većim dijelom disocirane (ionski oblik). Prema tome, može se zaključiti da je pH imala utjecaj na omjer deprotoniranih/protoniranih oblika fenolnih kiselina. Pri nižim pH, COOH- i OH-skupine bile su u nedisociranom (protoniranom) obliku što je važno za stvaranje već spomenutih H-veza. S povećanjem pH te povećanjem udjela deprotoniranih skupina vjerojatno su postala važna ionska privlačenja što je dovelo u pojedinim slučajevima do veće adsorpcije. Utjecaj pH na adsorpcijski kapacitet kroz utjecaj na kemijsku strukturu polifenola odnosno na stabilnost molekule polifenola, stupanj disocijacije polifenola i hidrofobnost molekule polifenola pokazana je i u ranijim istraživanjima (Wu i sur., 2011; Phan i sur., 2016). Bretag i sur. (2009) također su opisali utjecaj disocijacije karboksilnih i hidroksilnih skupina na molekuli fenolnih kiselina na adsorpciju.

U skupini flavan-3-ola, procijanidin B1 pokazao je sličan i niži adsorpcijski kapacitet na pH 1,5 i 5,5 a viši na pH 10,0, dok je procijanidin B2 pokazao slične vrijednosti q_e na svim pH-vrijednostima (tablica 20). Prema ranijim istraživanjima, pH-vrijednost između 2,2 i 7,0 nije

imala utjecaj na adsorpciju procijanidina na polisaharide stanične stjenke (Le Bourvellec i sur., 2004) što se slaže s rezultatima u ovom radu. Razlog tome može biti nepostojanje nabijenih skupina na molekulama budući da su procijanidini slabe kiseline s pK_a -vrijednosti od 9 – 10 (Le Bourvellec i sur., 2004). I u ovom radu moguće je da su zbog toga flavan-3-oli pokazali sličan adsorpcijski kapacitet na pH 1,5 i 5,5, s iznimkom većeg adsorpcijskog kapaciteta na pH 10,0 na kojem je možda došlo do određenih promjena na molekulama.

Dva ispitivana dihidrokalkona pokazuju vrlo slične pK_a -vrijednosti. Naime, u literaturi je pronađeno da su pK_a -vrijednosti za floretin 7,29, a za floretin-2-glukozid 6,87 (Xiao i sur., 2019). Prema pK_a -vrijednostima može se vidjeti da su pri pH adsorpcije 1,5 i 5,5 oba dihidrokalkona većinom u nedisociranom obliku. Pri pH 10,0 te su molekule većinom disocirale (Xiao i sur., 2019). Iako se pri ispitivanim pH floretin i floretin-2-glukozid nalaze u sličnim disociranim/nedisociranim oblicima, pokazali su razliku u adsorpciji (floretin viši q_e na pH 1,5 i 10,0, floretin-2-glukozid viši q_e na pH 5,5). Te razlike u adsorpciji mogu biti uzrokovane glikozilacijom aglikona u molekuli floretin-2-glukozida.

Antocijanini nisu pokazali statističku razliku u q_e -vrijednostima na različitim pH (tablica 20). No, potrebno je napomenuti da antocijanini mijenjaju kemijsku strukturu s obzirom na pH okoline. Te strukture su uglavnom u ravnoteži, s jednom strukturom dominantnom u određenim rasponima pH. Tako se na pH 1,5 antocijanini nalaze uglavnom u obliku flavilijeva kationa s pozitivnim nabojem na molekuli. Ta forma daje crvenu boju antocijaninima. Na pH 5,5 antocijanini su vjerojatno u obliku bezbojne karbinolne pseudobaze (struktura hemiacetala) ili kalkona koji nisu nabijeni. Na pH 10,0 antocijanini prelaze u plavu kinonoidalnu bazu (anionska forma). S obzirom na to da je adsorpcija bila slična na različitim pH-vrijednostima, može se reći da ionske forme antocijanina nisu imale velik utjecaj na adsorpciju antocijanina. Ranija istraživanja adsorpcije antocijanina na celulozu pretpostavila su da flavilijev kation može destabilizirati interakcije cijanidin-3-glukozida s celulozom dok pH-vrijednost 5, gdje prevladavaju kalkonski oblik i karbinolna pseudobaza favorizira adsorpciju (Phan i sur., 2016). I u ovom je radu moguće je da su flavilijev kation na pH 1,5 i anionska forma kinonoidalne baze na pH 10,0 destabilizirali adsorpciju, moguće zbog elektrostatskog odbijanja. Na pH 5,5 adsorpcija antocijanina bila je favorizirana.

Da bi se proces adsorpcije na različitim pH mogao modelirati adsorpcijskim izotermama, proveden je za sve ispitivane polifenole na više početnih koncentracija (slike 41 – 44). Iz slika je vidljivo da pojedini polifenoli pokazuju različitu adsorpciju na β -glukan s obzirom na pH.

Galna kiselina, procijanidin B1 i cijanidin-3-galaktozid pokazali su veći adsorpcijski kapacitet na pH 10,0.

5.5.1. Adsorpcijske izoterme na tri različite pH-vrijednosti

Na eksperimentalne podatke primijenjeni su Freundlichov, Langmuirov, Dubinjin-Raduškjevičev, Tjominov i Hillov model (tablice 21–23).

Prema parametru $1/n$ iz Freundlichovog modela (tablica 21), adsorpcija je favorizirana za sve polifenole ($1/n$ je manji od 1) na svim ispitanim pH-vrijednostima, osim za galnu kiselinu pri pH 1,5.

Teorijski adsorpcijski kapaciteti predviđeni modelima (q_m iz Langmuirova, Dubinjin-Raduškjevičeva i Hillova modela) bili su u većini slučajeva najveći za galnu kiselinu, a slijede ju *p*-kumarinska, kafeinska i klorogenska kiselina na svim pH-vrijednostima. U skupini flavan-3-ola, q_m je bio općenito veći za procijanidin B1, u skupini dihidrokalkona za floretin-2-glukozid, te u skupini antocijanina za cijanidin-3-glukozid. Iznimke su uočene samo kod pojedinih pH-vrijednosti. Uočene razlike između polifenolnih spojeva u pojedinim skupinama statistički su značajne samo na pojedinim pH-vrijednostima. Predviđeni adsorpcijski kapaciteti dobiveni iz modela Langmuira, Dubinjin-Raduškjeviča i Hilla pokazali su dobro slaganje s eksperimentalnim adsorpcijskim kapacitetima (slika 45). Sve slobodne energije adsorpcije E ukazuju na fizikalne veze između polifenola i β -glukana na svim pH-vrijednostima (Marsal i sur., 2012). Parametar n_H manji je od 1 za sve polifenole na svim ispitivanim pH-vrijednostima; kao što je već rečeno, takva vrijednost parametra n_H ukazuje na negativnu kooperaciju prilikom adsorbiranja drugih molekula. Parametri b_T i A smanjuju se kako se povećava eksperimentalno određen adsorpcijski kapacitet (tablica 22, slika 46). Moguće je da je veći adsorpcijski kapacitet povezan s nižim vrijednostima topline adsorpcije i Tjominov adsorpcijskog potencijala.

Adsorpcijski parametri pokazali su različite vrijednosti pri različitim pH-vrijednostima medija. Provedeni Tukeyev *post-hoc* test (tablica 24) utvrdio je utjecaj pH na adsorpcijske parametre kod pojedinih polifenola.

5.6. Adsorpcija polifenola iz jabuka na β -glukan

5.6.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenola iz jabuke

Jabuke predstavljaju važan izvor polifenola budući da su dostupne tijekom cijele godine pa se redovito konzumiraju (Donno i sur., 2012, Famarzi i sur. 2015, Giomaro i sur. 2014,

Woydyło i sur. 2008). Polifenoli iz jabuka mogu doći u interakciju s β -glukanom tijekom zajedničkog konzumiranja jabuka i žitarica. Kako bi se istražile interakcije polifenola iz jabuka i β -glukana, provedena je adsorpcija polifenola iz kožice i mesa jabuke na β -glukanu, a tijekom procesa adsorpcije polifenoli su određivani validiranom RP-HPLC metodom. Osim što jabuka može doći u kontakt s β -glukanom što čini interakcije važnima, jabuka je kao voće odabrana za proces adsorpcije u ovom radu jer sadrži veliki dio spojeva koji su ispitivani u modelnim otopinama (flavan-3-oli, dihidrokalkoni, fenolne kiseline, antocijanini).

U jabukama su prema dostupnim istraživanjima identificirane polifenolne skupine flavan-3-ola, fenolnih kiselina, dihidrokalkona, antocijanina i flavan-3-ola (Alonso-Salces i sur., 2005; Ceymann i sur., 2012; Jakobek i sur., 2013; Jakobek i sur., 2017; Khanizadeh i sur., 2008). Analizom kožice i mesa jabuka utvrđeno je kako oni ne sadrže iste skupine polifenola. Tako su u kožici identificirani antocijanini, flavonoli, flavan-3-oli, te manje fenolnih kiselina i dihidrokalkona, a u mesu fenolne kiseline, flavan-3-oli, dihidrokalkoni te vrlo malo flavonola (Jakobek i sur., 2013; Jakobek i Barron, 2016). U jabukama upotrijebljenim u ovom istraživanju pronađene su iste skupine polifenola (tablica 25). Sadržaj polifenola u mesu i kožici jabuka u skladu je s podacima nekih objavljenih istraživanja (Escarpa i González, 1998; Jakobek i sur., 2013). Nadalje, udio polifenola u kožici bio je veći nego u mesu jabuka (tablica 25) što se slaže s rezultatima dostupnih istraživanja (Escarpa i González, 1998).

5.6.2. Adsorpcija polifenola iz jabuke

Kako bi se dobio bolji uvid u adsorpciju polifenola iz jabuke, polifenoli su ekstrahirani iz mesa i kožice jabuke te su pojedine polifenolne skupine iz mesa i kožice jabuka odvojene gel-filtracijskom kromatografijom. Kromatogrami izdvojenih frakcija prikazani su na slikama 47 i 48. U frakciji 1 mesa jabuke izdvojena je najveća količina fenolnih kiselina (klorogenska kiselina), a identificirana je i mala količina dihidrokalkona (florein-2-ksiloglukozid). Prema tome, u procesu adsorpcije na β -glukan praćene su količine adsorbirane klorogenske kiseline i florein-2-ksiloglukozida. U frakciji 2 izdvojene su veće količine dihidrokalkona (florein-2-glukozid) te mala količina flavonola (kvercetin-3-ramnozid). Količine ta dva spoja praćene su procesom adsorpcije. U kožici jabuke u frakciji a izdvojeni su flavan-3-oli (procijanidin B2), a u frakciji b znatnije količine fenolnih kiselina (klorogenska kiselina) i antocijanina (cijanidin-3-galaktozid) te manja količina dihidrokalkona (florein-2-ksiloglukozid). U frakciji c izdvojeni su svi flavonoli (kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-galaktozid, derivat kvercetina 1 i 2,

kvercetin-3-ramnozid i kvercetin-3-ksilozid) te manja količine dihidrokalkona (florelin-2-glukozid). Za spomenute spojeve iz kože ispitan je adsorpcija na β -glukanu.

Eksperimentalni adsorpcijski kapaciteti polifenola iz frakcija ekstrakta mesa i kože prikazani su u tablici 26. Polifenoli iz mesa jabuke adsorbirali su se u rasponu od 0,01 do 0,45, a u koži od 0,00 do 0,57 mmol/g. Iz tablice 26 je vidljivo da je u mesu jabuke najveći adsorpcijski kapacitet pokazala klorogenska kiselina u frakciji 1. U frakciji 2 koja je bila obogaćena florelin-2-glukozidom te sadržavala i malu količinu flavonola kvercetin-3-ramnozida, adsorpcijski kapaciteti oba ta polifenola bili su znatno manji. U koži su veći adsorpcijski kapacitet pokazali klorogenska kiselina i florelin-2-ksiloglukozid u frakciji b. Ta je frakcija bila bogata klorogenskom kiselinom i antocijaninima, te je bilo za očekivati da klorogenska kiselina pokaže veći adsorpcijski kapacitet, no cijanidin-3-galaktozid iz skupine antocijanina nije pokazao veliki adsorpcijski kapacitet. U frakciji c koja je bila bogata flavonolima, visok adsorpcijski kapacitet imali su kvercetin-3-galaktozid i florelin-2-glukozid. Sve spomenute razlike statistički su značajne.

Da bi se vidjela povezanost dobivenih adsorpcijskih kapaciteta q_e s postotkom polifenola u pojedinim frakcijama, prikazana je ovisnost q_e o postotku polifenola u mesu i kori jabuke (slika 49). Pokazalo se kako adsorpcijski kapacitet polifenola pokazuje određenu povezanost s postotkom polifenola u pojedinim frakcijama (slika 49). Polifenoli čiji je udio u frakcijama mesa i kože bio veći pokazali su veći adsorpcijski kapacitet. No potrebno je spomenuti da je R^2 za ovisnost polifenola mesa jabuke o adsorpcijskom kapacitetu pokazala bolje slaganje s linearnim modelom, ali dobivena linearnost rezultat je šireg raspona dobivenih vrijednosti. Nadalje, može se pretpostaviti da je adsorpcija polifenola iz jabuke proces koji ovisi o koncentraciji adsorbata.

Da bi se adsorpcija mogla modelirati jednadžbama adsorpcijskih izoterma, provedena je adsorpcija polifenola iz frakcija s više različitih početnih koncentracija/volumena polifenola. Dobiveni eksperimentalni podaci za adsorpciju polifenola iz frakcija mesa i kore jabuke prikazani su na slikama 50 i 51.

Dobiveni rezultati modelirani su adsorpcijskim izotermama (tablice 27–29). Prema parametru $1/n$ iz Freundlichovog modela adsorpcija je favorizirana za sve polifenole iz frakcija mesa i kože jabuke ($1/n$ je manji od 1). Predviđeni teorijski adsorpcijski kapaciteti q_m iz Langmuirova, Hillova i Dubinjin-Raduškjevičeva modela najveći su za klorogensku kiselinu iz frakcije 1 mesa jabuke, a manji za sve ostale polifenole iz frakcije 1 i 2 mesa jabuke. Kod

polifenola kože jabuke, predviđeni teorijski adsorpcijski kapaciteti bili su najveći za klorogensku kiselinu te za floretin-2-ksiloglukozid u frakciji b. U frakciji c teorijski kapacitet bio je najveći za kvercetin-3-galaktozid, zatim za floretin-2-glukozid, te manji za sve ostale polifenole. Eksperimentalno dobiveni adsorpcijski kapaciteti pokazali su dobro slaganje s q_e i q_m predviđenih modelom (slika 52).

Sve slobodne energije E ukazuju na fizikalne veze između polifenola jabuke i β -glukana (Marsal i sur., 2012). Parametar n_H ukazuje na negativnu kooperaciju u vezanju. Parametri b_T i A smanjuju se kako se povećava eksperimentalno određen adsorpcijski kapacitet (slika 53). Već je spomenuto da je veći adsorpcijski kapacitet povezan s nižim vrijednostima topline adsorpcije i Tjorkinov adsorpcijskog potencijala.

Polifenoli iz jabuke adsorbirali su se na β -glukan u količini koja se slaže s ranijim istraživanjima (Gao i sur., 2012; Le Bourvellec i sur. 2004; Liu i sur., 2016; Phan i sur., 2017; Renard i sur., 2001; Wu i sur., 2011; Zhang i sur., 2017). Pokazalo se da su količina kojom su se polifenoli adsorbirali na β -glukan i količina polifenola u uzorku u ovisnosti. Naime, adsorpcija polifenola iz kompliciranijih sustava koji sadrže više različitih polifenola, koncentracijski je ovisna. Oni polifenoli koji se nalaze u ekstraktima u većoj količini, adsorbirat će se u većoj količini. Vjerojatno su polifenoli koji se u ekstraktu nalaze u većoj količini također prisutni oko molekula β -glukana u većoj količini, što dovodi do veće adsorpcije. Osim toga, polifenoli iz jabuke pokazali su manji adsorpcijski kapacitet od polifenola u modelnim otopinama.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu provedena su ravnotežna i kinetička istraživanja adsorpcije polifenola na β -glukanu. Kako bi se pratila količina pojedinačnih polifenola u modelnim otopinama u kojima se odvijao proces adsorpcije, validirane su spektroskopske metode. Ravnotežna istraživanja provedena su i za polifenole ekstrahirane iz mesa i kože jabuke, a metoda komatografije obrnutih faza validirana je za određivanje polifenola iz jabuke u modelnim otopinama u kojima je promatran proces adsorpcije. Parametri validacije (linearnost, osjetljivost, preciznost, točnost, granica detekcije i granica kvantifikacije) pokazali su prihvatljive vrijednosti, a vrednovane metode upotrijebljene su za praćenje koncentracije polifenola nakon adsorpcije.

Ravnotežna istraživanja adsorpcije provedena su pri 25, 37 i 45 °C (pri pH 5,5). Rezultati su pokazali da se količina adsorbiranih polifenola po masi β -glukana na ispitivanim temperaturama razlikuje za različite polifenole. Količina adsorbiranih polifenola bila je veća za hidroksibenzojevu kiselinu (galna kiselina), a manja za hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, kafeinska, klorogenska kiselina). Na veći adsorpcijski kapacitet galne kiseline moguće je da je utjecao veći broj hidroksilnih skupina na benzenskom prstenu. U skupini flavan-3-ola procijanidin B1 i B2 imali su slične adsorpcijske kapacitete. Između floretina i floretin-2-glukozida utvrđena je statistički značajna razlika samo na 37 °C na kojoj floretin-2-glukozid pokazuje veći adsorpcijski kapacitet od floretina. U skupini antocijanina, cijanidin-3-glukozid je pokazao veći adsorpcijski kapacitet u usporedbi s cijanidin-3-galaktozidom, no te razlike nisu bile značajne.

Adsorpcijski kapaciteti modelirani su jednadžbama adsorpcijskih izoterma, a modeli su pokazali dobro slaganje s eksperimentalnim podacima. Prema parametrima modela moguće je predložiti da je adsorpcija polifenola na β -glukanu fizikalna adsorpcija s vodikovim vezama ili van der Waalsovima interakcijama između polifenola i β -glukana. U adsorpciji je moguća negativna kooperacija u vezanju pri čemu dolazi do opadanja afiniteta za adsorpciju drugih molekula nakon što se molekula polifenola adsorbira na površinu β -glukana. Vjerojatno molekule koje pokazuju veći adsorpcijski kapacitet imaju nižu entalpiju adsorpcije.

Prema termodinamičkim parametrima, proces adsorpcije na β -glukanu bio je spontan i egzoterman za sve polifenole.

Primjenom kinetičkih modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, rezultati su pokazali bolje slaganje s modelom pseudo-drugog reda za sve polifenole. Vrijeme polureakcije iznosilo je 0,76 do 7,22 h.

Ravnotežna istraživanja adsorpcije provedena su na različitim pH-vrijednostima, pH 1,5, 5,5 i 10,0 (pri 37 °C). Pokazalo se da postoje određene razlike u adsorpcijskom kapacitetu polifenola pri svakoj pojedinoj pH-vrijednosti no samo neke od uočenih razlika bile su statistički značajne. Naime, adsorpcijski kapacitet galne kiseline bio je veći od adsorpcijskog kapaciteta *p*-kumarinske, kafeinske i klorogenske kiseline pri sve tri pH-vrijednosti, no ta razlika statistički je bila značajna samo pri pH 5,5 i 10,0. Iako su se adsorpcijski kapaciteti pri sve tri pH za ispitivane flavan-3-ole i antocijanine razlikovali, ie razlike nisu bile statistički značajne. U skupini dihidrokalkona, pri pH 5,5 je veći adsorpcijski kapacitet imao floretin-2-glukozid, a pri pH 1,5 i 10,0 floretin. Te su statistički značajne razlike možda posljedica glikozilacije.

Adsorpcijski kapaciteti pojedinih polifenola razlikovali su se s obzirom na pH-vrijednost odvijanja adsorpcije. Fenolne kiseline adsorbirale su se slično na svim pH-vrijednostima, osim galne kiseline koja je pokazala niži adsorpcijski kapacitet pri pH 1,5, a veći pri pH 5,5 i 10,0. Može se pretpostaviti da pH-vrijednost ima utjecaj na omjer deprotoniranog i protoniranog oblika fenolnih kiselina. Porast pH doveo je do porasta omjera deprotoniranih prema protoniranim funkcionalnim skupinama kod fenolnih kiselina (A^-/A) što je utjecalo na adsorpciju. Pri nižim pH, COOH- i OH-skupine fenolnih kiselina bile su u protoniranom obliku što je važno za stvaranje H-veza. S povećanjem pH te s povećanjem udjela deprotoniranih skupina vjerojatno su postala važna ionska privlačenja što je dovelo u pojedinim slučajevima do veće adsorpcije. U skupini flavan-3-ola, procijanidin B1 imao je niži adsorpcijski kapacitet pri pH 1,5 i 5,5 a viši pri pH 10,0 dok je procijanidin B2 pokazao slične vrijednosti pri svim pH. Razlog sličnim vrijednostima može biti nepostojanje nabijenih skupina na molekulama budući da su procijanidini slabe kiseline, s iznimkom većeg adsorpcijskog kapaciteta pri pH 10,0 na kojem je moguće da je došlo do određenih promjena na molekulama procijanidina. U skupini dihidrokalkona, razlike u adsorpciji između floretina i floretin-2-glukozida pri različitim pH vjerojatno su uzrokovane glikozilacijom. Adsorpcija antocijanina bila je slična na različitim pH-vrijednostima. No antocijanini postoje u različitim oblicima pri različitim pH-vrijednostima. Moguće je da su flavilijev kation koji prevladava na pH 1,5 i anionski oblik kinoidalne baze koja prevladava na pH 10,0 destabilizirali interakcije s β -glukanom, dok su kemijske strukture karbinolne pseudobaze i kalkonske pseudobaze više odgovarala interakcijama s β -glukanom pri pH 5,5.

Modeliranje adsorpcije na različitim pH s adsorpcijskim izotermama pokazalo je dobro slaganje s eksperimentalnim podacima. Prema parametrima modela moguće je predložiti da je

adsorpcija fizikalna na svim pH, s nekovalentnim vodikovim vezama ili van der Waalsovima silama. U adsorpciji je moguća negativna kooperacija u vezanju, a molekule koje pokazuju veći adsorpcijski kapacitet imaju nižu entalpiju adsorpcije.

Proučavanjem procesa adsorpcije fenolnih kiselina, flavan-3-ola, dihidrokalkona i antocijanina na β -glukan, pokazalo se da su polifenoli dolazili u interakcije s β -glukanom u složenom procesu adsorpcije na koji je utjecala koncentracija polifenola, kemijska struktura polifenola i pH-vrijednost otopine.

Polifenoli iz mesa i kože jabuke adsorbirali su se na β -glukan. U realnom sustavu u kojem se nalazilo više polifenola (npr. frakcija jabuke) proces adsorpcije ovisio je o količini polifenola u ekstraktu. Polifenoli s većom koncentracijom u ekstraktu jabuke pokazali su veći adsorpcijski kapacitet, a moguće je da su se vezali na β -glukan fizikalnim vezama kao što su vodikove veze ili van der Waalsove interakcije. Polifenoli koji su pokazali veći adsorpcijski kapacitet imali su nižu energiju adsorpcije. Također, polifenoli iz jabuke pokazali su manji adsorpcijski kapacitet od polifenola u modelnim otopinama.

Prikupljeni rezultati doprinose boljem razumijevanju adsorpcije čistih polifenola te prirodnih polifenolnih smjesa na β -glukanu kao i utjecaja temperature, pH i kemijske strukture polifenola na sam proces adsorpcije.

7. LITERATURA

Ajithkumar, A., Andersson, R., Åman, P. (2005): Content and molecular weight of extractable β -glucan in American and Swedish oat samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1205–1209.

Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2002): Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism, *Nutrition* 18, 75–81.

Alonso-Salces, R.M., Herrero, C., Barranco, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. (2005): Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic composition, *Food Chemistry* 93, 113–123.

Anouar, E.H., Giercshner, J., Duroux, J.R., Trouillas, P. (2012): UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study, *Food Chemistry* 131, 79–89.

Amarnath, K., Amarnath V., Amarnath, K., Valentine, H.J., Valentine, W.M. (2003): A specific HPLC-UV method for the determination of cysteine and related aminothiols in biological samples, *Talanta* 60, 1229–1238.

Babaeivelni, K., Khodadoust, A.P. (2013): Adsorption of fluoride onto crystalline titanium dioxide: effect of pH, ionic strength, and co-existing ions, *Journal of Colloid Interface Science* 394, 419–427.

Bermúdez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, F.A. (2004): Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices, *European Food Research and Technology* 219, 133–141.

Borges, G., Lean, M.E.J., Roberts, S.A., Crozier, A. (2013): Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine, *Food & Function* 30, 754–762.

Bravo, L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews* 56, 317–333.

Bretag, J., Kammerer, D.R., Jensen, U., Carle, R. (2009): Evaluation of the adsorption behaviour of flavonoids and phenolic acids onto a food-grade resin using a D-optimal design, *European Food Research and Technology* 228, 985–999.

Boyer, J., Liu, R.H. (2004): Apple phytochemicals and their health benefits, *Nutrition Journal* 3, 1–15.

Buszewski, B., Kowalska, S., Karasová, G., Lehotay, J. (2006): Influence of pH on benzoic acid derivatives' retention and RP HPLC column classification, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 29, 2663–2657.

Camouse, M., Hanneman, K.K., Conrad, E.P., baron, E.D. (2005): Protective effects of tea polyphenols and caffeine, *Expert Review of Anticancer Therapy* 5, 1061–1068.

Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer, H., Bozzi Nising, A., Hurrell, R.F. (2012): Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measurement the polyphenol profile, *Journal of Food Composition and Analysis* 26, 128–135.

Chen, J., Raymond, K. (2008): Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks, *Vascular Health and Risk Management* 4, 1265–1272.

Chun, O.K., Kim, D.-O. (2004): Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums, *Food Research International* 37, 337–342.

Clifford, M.N: (2000): Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of Science of Food and Agriculture* 80, 1063–1072.

Costa, T.S., Rogez, H., Pena, R.S. (2015): Adsorption capacity of phenolic compounds onto cellulose and xylan, *Food Science and Technology* 35, 314–320.

Da Costa, C.T., Nelson, B.C., Margolis, S.A., Hortin, D. (1998): Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 799, 321–327.

Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R., Perluigi, M. (2012): Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols, *Biochimica et Biophysica Acta* 1822, 737–747.

Dóka, O., Bicanic, D. (2002): Determination of total polyphenolic content in red wines by means of the combined He-Ne laser optothermal window and Folin-Ciocalteu colorimetry assay, *Analytical Chemistry* 74, 2157–2161.

Donno, D., Beccaro, G.L., Mellano, M.G., Torello Marinoni, D., Cerutti, A.K., Canterino, S, Bounous, G. (2012): Application of sensory, nutraceutical and genetic techniques to create a quality profile of ancient apple cultivars, *Journal of Food Quality* 35, 169–181.

Dorđević, S.Đ., Dražić, V.J. (1987): *Fizička hemija*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

Escarpa, A., González, M.C. (2001): Approach to the contents of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods, *Analytica Chimica Acta* 427, 119–127.

Faramarzi, S., Pacifico, S.Y.A., Lettieri, A., Nocera, P., Piccolella, S. (2015): Red-fleshed apples: old autochthonous fruits as a novel source of anthocyanin antioxidants, *Plant Foods for Human Nutrition* 70, 324–330.

Felgines, C., Talavéra, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., Rémésy, C. (2003): Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans, *The Journal of Nutrition* 133, 1296–1301.

Foo, K.Y, Hameed, B.H. (2010): Insight into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chemical Engineering Journal* 156, 2–10.

Gao, R., Wang, Y., Wu, Z., Ming, J., Zhao, G. (2012a): Interaction of barley β -Glucan and tea polyphenols on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Food Science* 77, H128–H134.

Gao, R., Liu, H., Peng, Z., Wu, Z., Wang, Y., Zhao, G. (2012b): Adsorption of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) onto oat β -glucan, *Food Chemistry* 132, 1936–1943.

Gao, Z. P., Yu, Z.F., Yue, L.T., Quek, S.Y. (2013): Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of polyphenols separation from kiwifruit juice using adsorbent resin, *Journal of Food Engineering* 116, 195–201.

Giles, C.H., Smith, D., Huitson, A. (1974): A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I Theoretical, *Journal of Colloid and Interface Science* 47, 755–765.

Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2001): Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F1.2.1–F1.2.13.

Giomaro, G., Karioti, A., Bilia, A.R., Bucchini, A., Giamperi, L., Ricci, D., Fraternali D. (2014): Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy), *Chemistry Central Journal* 8, 2–10.

Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen R., Kanner, J. (2008): The stomach as a „bioreactor“: when red meat meets red wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5002–5007.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572–584.

Hollman, P.C.H., Arts, I.C. (2000): Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of Science of Food and Agriculture* 80, 1081–1093.

Ho, Y, McKay, G. (1999): Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochemistry* 34, 451–465.

Idan, I.J., Abdullah, L.C., Choong, T.S.Y., Jamil, S.N.A.B.M. (2018): Equilibrium, kinetic and thermodynamic adsorption studies of acid dyes on adsorbent developed from kenaf core fiber, *Adsorption science and technology* 36, 694–712.

Izydorczyk, M.S., Dexter, J.E. (2008): Barley β -glucans and arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products – a review, *Food Research International* 41, 850–868.

Jakobek, L., García-Villalba, R., Tomás-Barberán, F.A. (2013): Polyphenol characteristic of old local apple varieties from southeastern european region, *Journal of Food Composition and Analysis* 31, 199–211.

Jakobek, L. (2015): Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins, *Food Chemistry* 175, 556–567.

Jakobek L., Barron, A.R. (2016): Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds, *Journal of Food Composition and Analysis* 45, 9–15.

Jakobek, L., Matić, P., Krešić, V, Barron, A.R. (2017): Adsorption of apple polyphenols onto β -glucan, *Czech Journal of Food Sciences* 35, 476–482.

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

Johansson, L., Karesoja, M., Ekholm, P., Virkki, L., Tenhu, H. (2008): Comparison of the solution properties of (1→3), (1→4)- β -D-glucans extracted from oats and barley, *LWT* 41, 180–184.

Jung, M., Triebel, S., Anke, T., Richling, E., Erkel, G. (2009): Influence of apple polyphenols on inflammatory gene expression, *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 1263–1280.

Kammerer D.R., Saleh Z.S., Carle R., Stanley R.A. (2007): Adsorptive recovery of phenolic compounds from apple juice, *European Food Research and Technology* 224, 605–613.

Kampa, M., Nifli, A.P., Notas, G., Castanas, E. (2007): Polyphenols and cancer growth, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 159, 79–113.

Kanner, J., Gorelik, S., Roman, S., Kohen, R. (2012): Protection by polyphenols of postprandial human plasma and low-density lipoprotein modification: the stomach as a bioreactor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 8790–8796.

Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T., Rupasinghe, H.P.V. (2008): Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing, *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 396–401.

Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., Gliszczyńska-Świąło, A. (2007): Effect of storage on the contents of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juice, *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 313–322.

Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T., Murata, Y. (2011): Antioxidant activity of β -glucan, *International Scholarly Research Network* 2012, 1–5.

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

Lao, F., Giusti, M.M. (2016): Quantification of purple corn (*Zea mays* L.) anthocyanins using spectrophotometric and HPLC approaches: method comparison and correlation, *Food Analytical Methods* 9, 1367–1380.

Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. (2007): Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: physical properties, technological applications and physiological effects, *Journal of Cereal Science* 46, 101–118.

Le Bourvellec, C., Guyot, S., Renard, C.M.G.C. (2004): Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall materials. Part I. Effect of some environmental parameters, *Biochimica et Biophysica Acta* 1672, 192–202.

Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C. (2012): Interactions between polyphenols and macromolecules: quantifications methods and mechanism, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, 213–248.

Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E. (2005): Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study, *Journal of AOAC International* 88, 1269–1278.

Limousin, G., Gaudet, J.P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., Krimissa, M. (2007): Sorption isotherms: a review on physical bases, modeling and measurement, *Applied Geochemistry* 22, 249–275.

Liu, Y. (2009): Is the free energy change of adsorption correctly calculated, *Journal of Chemical & Engineering Data* 54, 1981–1985.

Liu, C., Ge, S., Yang, J., Xu, Y., Zhao, M., Xiong, L., Sun, Q. (2016): Adsorption mechanism of polyphenols onto starch nanoparticles and enhanced antioxidant activity under adverse conditions, *Journal of Functional Foods* 26, 632–644.

López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., Del Valle-Ribes, C. (2003): The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 233–244.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémèsy, C., Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 724–747.

Manach, C., Williamson, G., morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. review of 97 bioavailability studies, *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 230S–242S.

Marsal, A., Maldonado F., Cuadros, S., Bautista M.E., Manich, A.M. (2012): Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of poloyphenols onto tannery shavings, *Chemical Engineering Journal* 183, 21–29.

Matić, P., Sabljčić, M., Jakobek, L. (2017): Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content, *Journal of AOAC International* 100, 1795–1803.

Matić, P., Jakobek, L., Ukić, Š. (2018): An equilibrium and kinetic study of phenolic acids adsorption onto β -glucan, *Croatian Journal of Food Science and Technology* 10, 73–80.

McCann, M.J., Gill, C.I.R., O'Brien, G., Rao, J.R., McRoberts, W.C., Hughes, P., McEntee, R., Rowland, I.R. (2007): Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*, *Food and Chemical Toxicology* 45, 1224–1230.

Mullen, W., Marks, S.C., Crozier, A. (2007): Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3148–3157.

Nguela, J.M, Poncet-Legrand, C., Sieczkowski, N., Vernhet, A. (2016): Interactions of grape tannins and wine polyphenols with a yeast protein extract, mannoproteins and β -glucan, *Food Chemistry* 210, 671–682.

Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arriago, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2011): Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms, *Food Chemistry* 128, 674–678.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 270–278.

Parada, J., Aguilera, J.M., Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients, *Journal of Food Science* 72, R21–R32.

Phan, A.D.T., Netzel, G., Wang, D., Flanagan, B.M., D'Arcy, B.R., Gidley, M.J. (2015): Binding of dietary polyphenols to cellulose: structural and nutritional aspects. *Food Chemistry* 171, 388–396.

Phan, A.D.T., D'Arcy, B.R., Gidley, M.J. (2016): Polyphenols-cellulose interactions: effects of pH, temperature and salt, *International Journal of Food Science and technology* 51, 203–211.

Phan, A.D.T., Flanagan, B.M., D'Arcy, B.R., Gidley, M.J. (2017): Binding selectivity of dietary polyphenols to different plant cell wall components: quantification and mechanism. *Food Chemistry* 233, 216–227.

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

Qui, H., Lv, L., Pan, B., Zhang, Q., Zhang, W., Zhang, Q. (2009): Critical review in adsorption kinetic models, *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 10, 716–724.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységou, L. (2011): Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis, *Angewandte Chemie International Edition* 50, 586–621.

Quirós-Sauceda, A.E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., González-Córdova, A.F., González-Aguilar, G.A. (2014): Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion, *Food & Function* 5, 1063–1072.

Queenan, K.M., Stewart, M.L., Smith, K.N., Thomas, W., Fulcher, R.G., Slavin, J.L. (2007): Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial, *Nutritional Journal* 6, 1–8.

Rastija, V., Srećnik, G., Medić-Šarić, M. (2009): Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins, *Food Chemistry* 115, 54–60.

Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J. F. (2001): Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences, *International Journal of Biological Macromolecules* 29, 115–125.

Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J-P., Auclair, E., Larondelle, Y. (2007): *In vitro* biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: comparison of isotherm models, *Bioresource Technology* 98, 1812–1821.

Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C (2002): Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 276–282.

Sellappan, S., Akoh, C. C., Krewer, G. (2002): Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2432–2438.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagents, *Methods in Enzymology* 299, 152–178.

Simonsen, H.T., Nielsen, M.S., Christensen, N.J., Christensen, U., La Cour, T.V., Motawia, M.S., Jespersen, B.P.M., Engelsen, S.B., Møller, B.L. (2009): Molecular interactions between barley and oat β -glucans and phenolic derivatives, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 2056–2064.

Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C. (2011): Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review, *Journal of Food Engineering* 105, 1–27.

Stoner, G.D., Mukhtar, H. (1995): Polyphenols as cancer chemopreventive agents, *Journal of Cellular Biochemistry* 22, 169–180.

Suárez, B., Álvarez, A.L., Garcia, Y.D., del Barrio, G. (2010): Phenolic profiles, antioxidant activity and *in vitro* antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry* 120, 339–342.

Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E. (2004): Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *Trends in Analytical Chemistry* 23, 535–552.

Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002): Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 74, 835–855.

Tomás-Barberán, F.A., Clifford, M.N. (2000): Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1073–1080.

Tonutare, T., Moor, U., Szajdak, L. (2014): Strawberry anthocyanin determination by pH differential spectroscopic method – how to get true results?, *Hortorum Cultus – Acta Scientiarum Polonorum* 13, 35–47.

Tsao, R., Yang, R. (2003): Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1018, 29–40.

Urano, K., Koichi, Y., Nakazawa, Y. (1980): Equilibria for adsorption of organic compounds on activated carbons in aqueous solutions, *Journal of Colloid and Interface Science* 81, 477–485.

Vega Arroy, J.D., Ruiz-Espinosa, H., Luna-Guevara, J.J., Luna-Guevara, M.L., Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Ochoa-Velasco, C.E. (2017): Effect of solvents and extraction methods on total anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity of *Renalmia alpinia* (Rottb.) Maas peel, *Czech Journal of Food Science* 35, 456–465.

Veverka, M., Dubaj, T., Gallovič, J., Jorík, V., Veverková, E., Mičušík, M., Šimon, P. (2014): Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: synthesis, characterization, and stability, *Journal of Functional Foods* 8, 309–318.

Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K. (2004): Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chemistry* 87, 307–311.

Wang, Y., Liu, J., Chen, F., Zhao, G. (2013): Effects of molecular structure of polyphenols on their noncovalent interactions with oat β -glucan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 4533–4538.

Weng Kong, K., Mat-Junit, S., Ismail, A., Aminudin, N., Abdul-Aziz, A. (2014): Polyphenols in *Barringtonia racemosa* and their protection against oxidation of LDL, serum and haemoglobin, *Food Chemistry* 146, 85–93.

Wojdyło A., Oszmiański J., Laskowski P (2008): Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6520–6530.

Wu, F.C., Tseng, R.L., Huang, S.C., Juang, R.S. (2009): Characteristics of pseudo-second-order kinetic model for liquid-phase adsorption: a mini review, *Chemical Engineering Journal* 151, 1–9.

Wu, Z., Li, H., Ming, J., Zhao, G. (2011): Optimization of adsorption of tea polyphenols onto oat β -glucan using response surface methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 378–385.

Xiao., Z., Wang, Y., Wang, J., Li, P., Ma, F. (2019): Structure-antioxidant capacity relationship of dihydrochalcone compound in *Malus*, *Food Chemistry* 275, 354–360.

Zhang, D., Zhu, J., Ye, F., Zhao, G. (2017): Non-covalent interaction between ferulic acid and arabinan-rich pectic polysaccharide from rapeseed meal, *International Journal of Biological Macromolecules* 103, 307–315.

Zhao, L., Huang, C., Shan, Z., Xiang, B., Mei, L. (2005): Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC–MS, *Journal of Chromatography B* 821, 67–74.

Zhao S., Bomser J., Joseph E.L., DiSilvestro R.A. (2013): Intakes of apples or apple polyphenols decrease plasma values for oxidized low-density lipoprotein/beta₂-glycoprotein I complex, *Journal of Functional Foods* 5, 493–497.

Zheng, X., Li, L., Wang, Q. (2011): Distribution and molecular characterization of β -glucans from hull-less barley bran, shorts and flour, *International Journal of Molecular Sciences* 12, 1563–1574.

ŽIVOTOPIS

Petra Matić [REDACTED] Maturirala je 2004. u Srednjoj školi Prelog u Prelogu kao prehrambeni tehničar, a nakon toga iste godine upisuje Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomski studij završava 2010. kao diplomirani inženjer prehrambene tehnologije i procesnog inženjerstva, smjer prehrambeno inženjerstvo. Nakon završenog diplomskog studija, 2011. zapošljava se u Eurovoću Orahovica kao tehnolog pripravnik u preradi voća i povrća, a 2013. u poduzeću Meggle Osijek kao laborant tehničar u preradi mlijeka. Na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek zapošljava se 2014. u suradničkom zvanju asistenta gdje sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskom i diplomskom studiju, na predmetima Katedre za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode (Ambalaža i pakiranje hrane, Instrumentalne metode analize, Fizikalna kemija, Inženjerska kemija). Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij Kemijsko inženjerstvo i primijenjena kemija upisuje 2014. na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2015. do 2016. sudjelovala je na projektu Zaklade Adris „Nutritivna svojstva starih, zanemarenih kultura jabuka s područja Slavonije važna za njihovo očuvanje“, voditeljice izv. prof. dr. sc. Lidije Jakobek Barron, a od 2017. suradnik je na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Utjecaj prehrambenih vlakana na bioraspoloživost polifenola istraživanjem adsorpcije i simuliranih probavnih procesa, *in vitro*“, voditeljice prof. dr. sc. Lidije Jakobek Barron. Sudjelovala je na 11 međunarodnih skupova s 23 priopćenja te dva domaća skupa s dva priopćenja. Ukupno je objavila šest radova citiranih u bazi Current Contents, tri rada citirana u sekundarnim bazama podataka te četiri rada u zbornicima radova s međunarodnom recenzijom. Bila je neposredni voditelj tri završna te tri diplomatska rada.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Objavljeni radovi iz grupe A1:

1. Jakobek, L., Matić, P., Kraljević, Š., Ukić, Š., Benšić, M., Barron, R. A. (2020): Adsorption between quercetin derivatives and β -glucan studied with a novel approach to modeling adsorption isotherms, *Applied Sciences* 10, 1–16.
2. Jakobek, L., Matić, P. (2019): Non-covalent dietary fiber - polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility, *Trends in Food Science & Technology* 83, 235–247.
3. Matić, P. Sabljčić, M. Jakobek, L. (2017): Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenols and total flavonoid content, *Journal of AOAC International* 100, 1795–1803.
4. Medvidović-Kosanović, M., Stanković, A., Jakobek, L., Krivak, P., Mađarić, R. (2017): Electrochemical and spectrophotometric determination of total polyphenol content in Croatian apple varieties, *Croatica Chemica Acta* 90, 129–134.
5. Jakobek, L., Matić, P., Krešić V., Barron R.A. (2017): Adsorption of apple polyphenols onto β -glucan, *Czech Journal of Food Science* 35, 476–482.
6. Jakobek, L., Šeruga, M., Krivak, P. (2011): The influence of interactions among phenolic compounds on the antiradical activity of chokeberries (*Aronia melanocarpa*), *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62, 345–352.

Objavljeni radovi iz grupe A2:

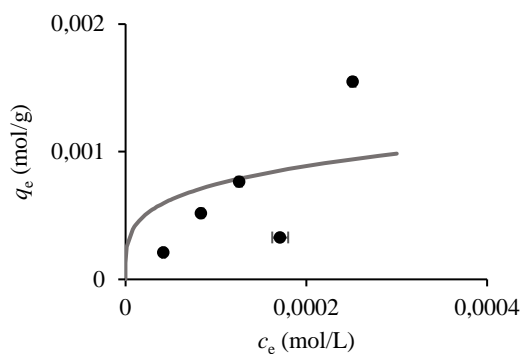
1. Matić, P., Jakobek, L., Ukić, Š. (2018): An equilibrium and kinetic study of phenolic acids adsorption onto β -glucan, *Croatian Journal of Food Science and Technology* 10, 73–80.
2. Jakobek, L., Tomac, I., Matić, P., Sabo, M., Đugum, J., Šubarić, D. (2018): Bioactive polyphenolic compounds from white cabbage cultivars, *Croatian Journal of Food Science and Technology* 10, 164–172.
3. Krivak, P., Ukić, Š., Jakobek, L. (2016): Polyphenols and β -glucan interactions through linear adsorption models, *Croatian Journal of Food Science and Technology* 8, 66–73.

Objavljeni radovi iz grupe A3:

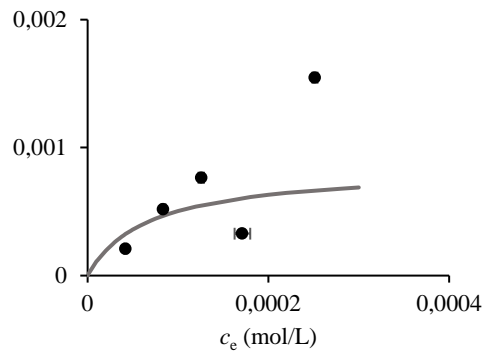
1. Matić, P., Jakobek, L. (2020): Adsorption of individual polyphenol groups from apples onto β -glucan, Book of proceedings XIII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, 89–100.
2. Matić, P., Jakobek, L. (2018): Adsorption of dihydrochalcones onto β -glucan, Proceedings of International conference 17th Ružička days "Today science - tomorrow industry", 72–81.
3. Jakobek, L., Krivak, P., Medvidović-Kosanović, M., Šter, A. (2017): Dihydrochalcones in old apple varieties from Croatia, Proceedings of the International Conference 16th Ružička days „Today Science - Tomorrow Industry“, 146–154.
4. Krivak, P., Jakobek, L. (2015): Antiradical activity of polyphenols from old apple varieties, Proceedings of the International Conference 15th Ružička days „Today Science - Tomorrow Industry“, 242–252.
5. Jakobek, L., Šeruga, M., Krivak, P. (2010): The influence of interactions among phenolic compounds from chokeberry on the antiradical activity of chokeberry, Proceedings of the International Conference 13th Ružička days „Today science - Tomorrow industry“, 302–310.

8. PRILOZI

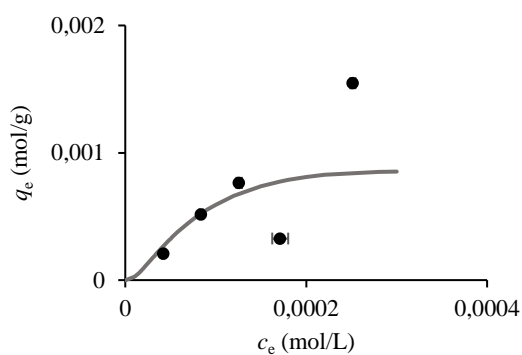
Prilog I Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukanu pri pH 5,5 i 25 °C. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinjin-Raduškjevičev model; d) Tjomkinov model; e) Hillov model



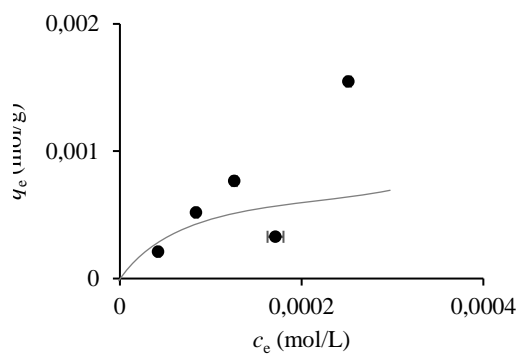
a)



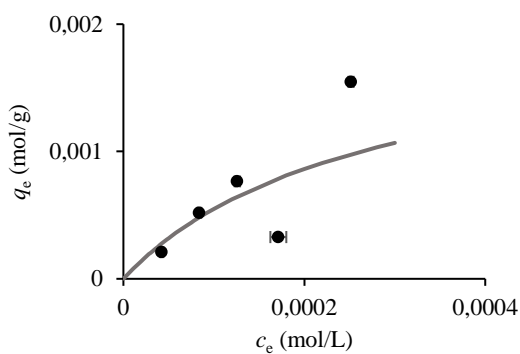
b)



c)

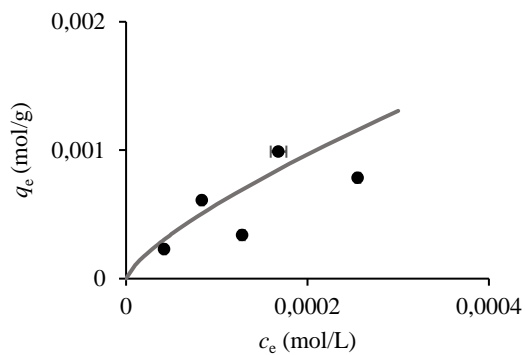


d)

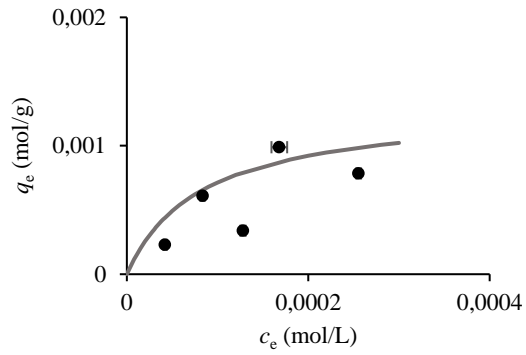


e)

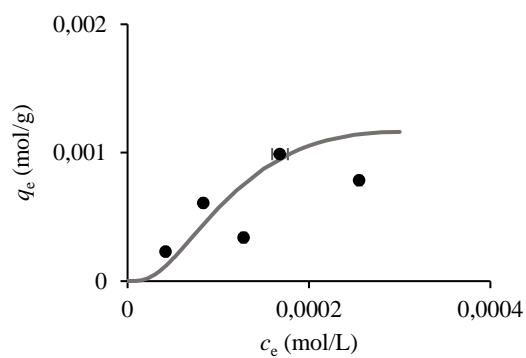
Prilog II Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukanu pri pH 5,5 i 37 °C. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinjin-Raduškjevičev model; d) Tjomkinov model; e) Hillov model



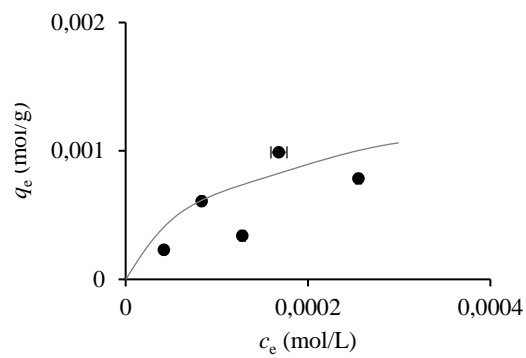
a)



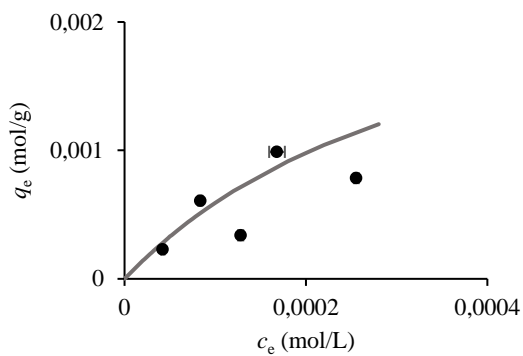
b)



c)

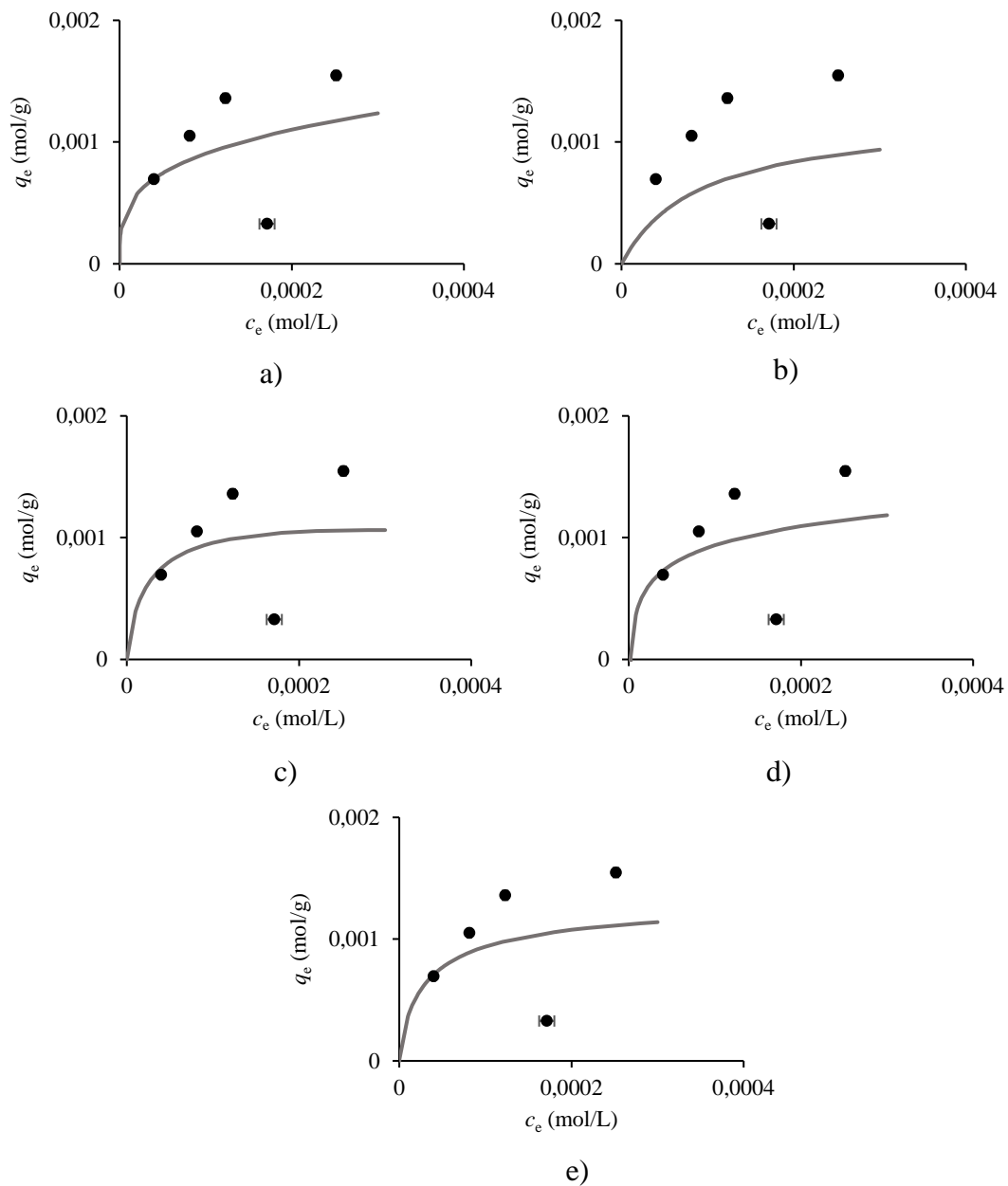


d)

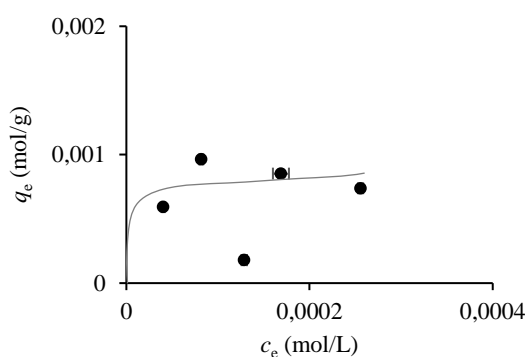


e)

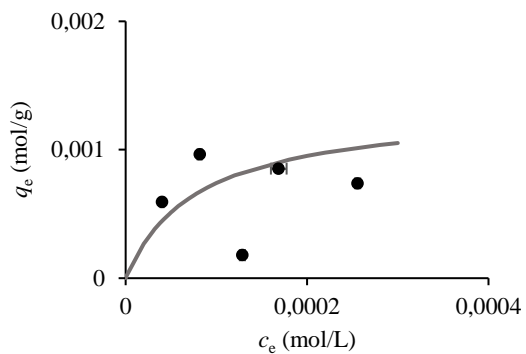
Prilog III Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukanu pri pH 5,5 i 45 °C. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinjin-Raduškjevičev model; d) Tjomkinov model; e) Hillov model



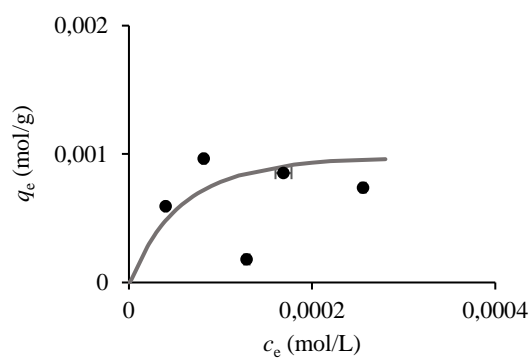
Prilog IV Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukanu pri pH 1,5 i 37 °C. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinjin-Raduškjevičev model; d) Tjomkinov model; e) Hillov model



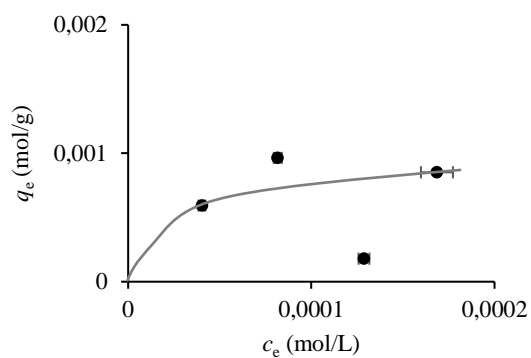
a)



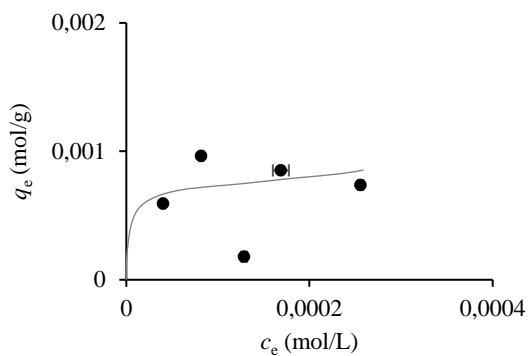
b)



c)

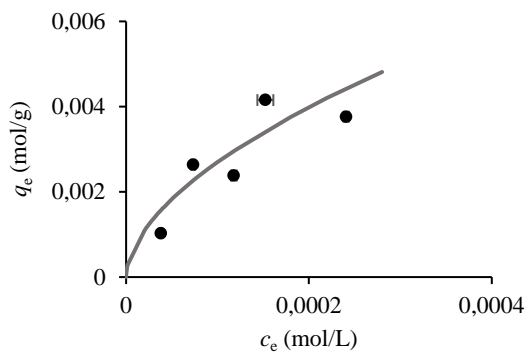


d)

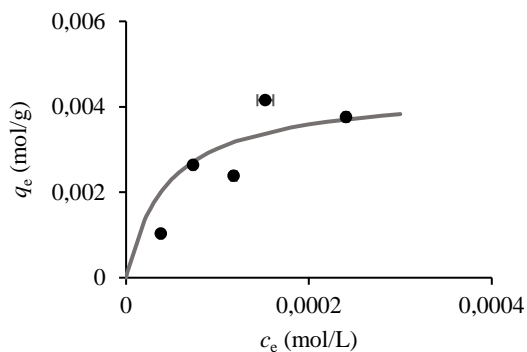


e)

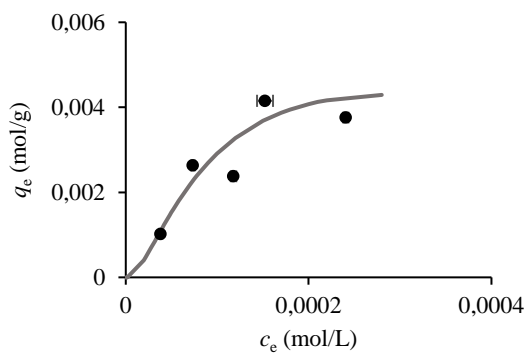
Prilog V Modeli adsorpcije procijanidina B1 na β -glukanu pri pH 10,0 i 37 °C. a) Freundlichov model; b) Langmuirov model; c) Dubinjin-Raduškjevičev model; d) Tjomkinov model; e) Hillov model



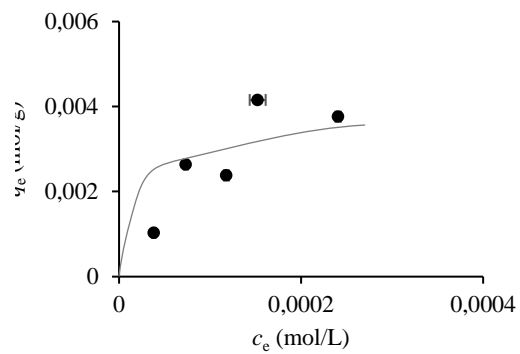
a)



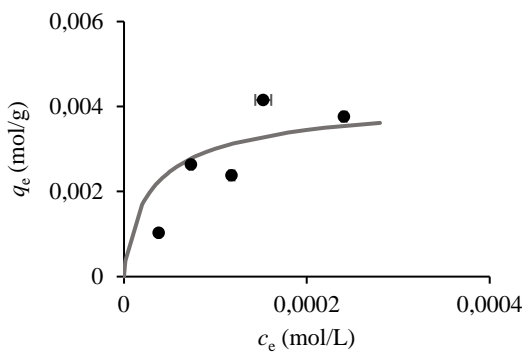
b)



c)



d)



e)