

Određivanje elektrokinetičkog potencijala otopine katehina, otopine β -glukana i modela katehina i β -glukan

Marković, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:335019>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Tamara Marković

**ODREĐIVANJE ELEKTROKINETIČKOG POTENCIJALA OTOPINE
KATEHINA, OTOPINE β -GLUKANA I MODELA KATEHINA I β -GLUKAN**

Diplomski rad

Osijek, srpanj 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Fizikalna kemija

Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 29. svibnja 2020.

Mentor: dr. sc. *Ivana Tomac, znan. sur.*

Komentor: *prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron*

ODREĐIVANJE ELEKTROKINETIČKOG POTENCIJALA OTOPINE KATEHINA, OTOPINE β -GLUKANA I MODELA KATEHINA I β -GLUKAN

Tamara Marković, 0113138177

Sažetak: Zeta-potencijal je izraz za elektrokinetički potencijal makromolekula te se definira kao zbroj početnog površinskog naboja i akumuliranog sloja. Predviđanje najstabilnijeg ponašanja neke makromolekule se može postići poznavanjem elektrokinetičkog potencijala. Stabilnost makromolekula ovisi o zeta-potencijalu i naboju na površini makromolekule. Katehin je bioflavonoid koji se nalazi u biljnim napitcima, voću, povrću i njihovim proizvodima. Katehin ima mogući pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje kao što je jačanje imunološkog sustava, zaštita od oksidativnog stresa i slično. Stoga je zadatak ovog diplomskog rada bio odrediti zeta-potencijal otopine katehina, otopine β -glukana i modela katehina i β -glukana kroz različit koncentracijski raspon, a s ciljem određivanja najstabilnijeg ponašanja modela katehina i β -glukana pri različitim pH vrijednostima kroz različit vremenski period. Najstabilnije ponašanje ispitanih modela katehina i β -glukana pokazalo se u pH 10. Vrijednost zeta potencijala modela u rasponu ispitanih pH vrijednosti iznosio je od 1,4 do 5,3 mV u kiselom mediju (pH 1,5) do -25,8 do 30,2 mV u lužnatom mediju (pH 10) te je prema teoriji stabilnosti model najstabilnijeg ponašanja u pH 10.

Ključne riječi: elektrokinetički potencijal, katehin, β -glukan, UV-Vis spektar

Rad sadrži: 36 stranica
19 slika
0 tablica
0 priloga
45 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 17. srpnja 2020.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Physical chemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 7 held on May 29, 2020.

Mentor: Ivana Tomac, PhD

Technical assistance: Lidija Jakobek Barron, PhD, prof.

Determination of the Electrokinetic Potential of the Catechin Solution, β -Glucan Solution and the Catechin and β -Glucan Model

Tamara Marković, 0113138177

Summary:

Zeta potential is a term for the electrokinetic potential of macromolecules and is defined as the sum of the surface charge and the accumulated layer. Predicting the most stable behaviour of a macromolecule could be achieved by knowing the electrokinetic potential. The stability of macromolecules depends on the zeta potential and the charge on the surface of the macromolecule. Catechin is a bioflavonoid found in herbal drinks, fruits, vegetables and their products. Catechin might have a positive effect on human health such as strengthening the immune system, protection against oxidative stress. Therefore, the object of this work was to determine the zeta potential of catechin solution, β -glucan solution and catechin and β -glucan model through different concentration ranges, with the aim of determining the most stable behaviour of catechin and β -glucan model at different pH values during time. The most stable behaviour of the tested model of catechin and β -glucan was shown in pH 10. The zeta potential value of the model in tested pH have ranged from 1.4 to 5.3 mV in acidic medium (pH 1.5) to -25.8 to 30.2 mV in an alkaline medium (pH 10) and according to the theoretical stability criteria the model have had the most stable behaviour in pH 10.

Key words: electrokinetic potential, catechin, β -glucan, UV-Vis spectra

Thesis contains: 36 pages
19 figures
0 tables
0 supplements
45 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: July 17, 2020

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

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. KATEHIN	4
2.2. BETA GLUKAN.....	5
2.3. UV-Vis SPEKTROSKOPIJA	6
2.4. ZETA POTENCIJAL	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. ZADATAK RADA	10
3.2. MATERIJALI I METODE.....	10
3.2.1. Kemikalije	10
3.2.2. Priprema otopine.....	10
3.2.3. UV-Vis spektar	10
3.2.4. Zeta potencijal	11
4. REZULTATI	12
4.1. UV-VIS SPEKTAR OTOPINE KATEHINA	13
4.2. UV-VIS SPEKTAR OTOPINE BETA GLUKANA.....	15
4.3. UV-VIS SPEKTAR MODELA OTOPINE KATEHINA I BETA GLUKANA	15
4.4. ZETA POTENCIJAL OTOPINE KATEHINA, BETA-GLUKANA I MODELA OTOPINE KATEHINA I BETA GLUKANA	17
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČCI.....	25
7. LITERATURA.....	27

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

1. UVOD

Elektrokinetički ili zeta potencijal definira se kao zbroj početnog površinskog naboja i akumuliranog sloja. Odnosno zeta potencijal se javlja samo ako materijal dođe u dodir s tekućinom. Mjerenjem zeta potencijala dobivaju se informacije o stabilnosti nekog sustava, a temeljne veličine koje određuju zeta potencijal su koncentracija, pH vrijednost otopine i provodnost.

Spektroskopske metode se koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu hrane zbog toga što su jednostavne, brze i precizne metode. UV-Vis spektrofotometrija je najčešće korištena metoda za identifikaciju spojeva i određivanje koncentracije pojedinog analita.

β -glukan je polisaharid koji se ubraja u topljiva prehrambena vlakna, a sastoji se od molekula glukoze povezanih β -1,3-glikozidnim vezama i β -1,4-glikozidnim vezama. β -glukan ima široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te u biomedicini. Izvor β -glukana su gljive, biljke i žitarice kao što su ječam, zob.

Katehin je bioflavonoid odnosno polifenolni spoj u koji spadaju flavonoidi odnosno flavonoli. Katehin se sastoji od dva benzenska prstena od kojih jedan sadrži rezorcinolnu skupinu, a drugi kateholnu skupinu. Izvor katehina su voće, povrće i njihovi proizvodi. Epidemiološke studije pokazale su potencijalni pozitivni učinak na ljudsko zdravlje konzumiranjem hrane u kojoj je prisutan katehin.

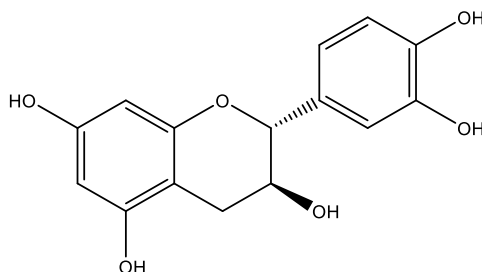
Zadatak ovog diplomskog rada je bio odrediti zeta potencijal otopine katehina, otopine β -glukana i modela katehina i β -glukana kroz različiti koncentracijski raspon, a s ciljem određivanja najstabilnijeg ponašanja modela katehina i β -glukana pri različitim pH vrijednostima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KATEHIN

Polifenolni spojevi mogu se podijeliti na fenolne kiseline, flavonoide, antocijane, tanine i lignin (Ajila i sur., 2011). Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva male molekulske mase. Dobiveni su reakcijom derivata sintetiziranih iz fenilalanina s octenom kiselinom. Strukturu flavonoida čini jezgra koju čine tri fenolna prstena nazvana A, B i C. Flavonoidi se mogu podijeliti prema stupnju oksidacije C-prstena na antocijanine, flavanole (katehine), flavone, flavonole, flavanone i izoflavone (Aherne i O'Brien, 2002).

Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu i predstavljaju sekundarne metabolite u biljkama. Flavonoidi u obliku flavonola, flavona, izoflavona, flavonona se nalaze u biljnim napitcima, voću, povrću i njihovim proizvodima. Epidemiološke studije pokazale su moguće antimikrobno, citotoksično, antiupalno svojstvo i slično. Upravo, položaj hidroksilnih skupina u kemijskoj strukturi flavonoida utječe na njihova antiradikalna svojstva (Saxena i sur., 2012). Katehin je bioflavonoid, ubraja se u skupinu flavonoida odnosno flavanola (Aherne i O'Brien, 2002; Sarkar i sur., 2014). Katehin predstavlja fitokemikaliju, koja potencijalno posjeduje antioksidacijsko svojstvo te svojstvo vezanja slobodnih radikala (Mbaveng i sur., 2014; Srivastava i sur., 2019). Strukturu katehina čine kateholna skupina u prstenu B i rezorcinolna skupina u prstenu A koja ima hidroksilnu skupinu na položaju 3 u prstenu C kao što je prikazano na **Slici 1** (Jainero i sur., 2004). Kateholna i rezorcinolna skupina u strukturi katehina ovise o promjeni pH vrijednosti (Kaur i sur., 2017). Mehanizam oksidacije se sastoji od dva koraka, u prvom koraku se odvija oksidacija kateholne skupine i predstavlja reverzibilnu reakciju. U slijedećem koraku se oksidira rezorcinolna skupina koja predstavlja ireverzibilnu reakciju (Janeiro i sur., 2004).



Slika 1. Kemijska struktura katehina

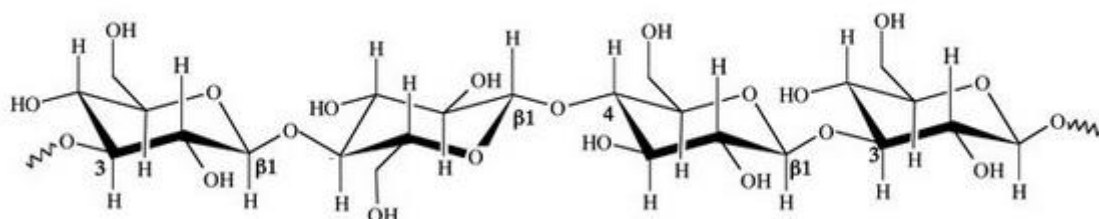
Moguće antioksidativno djelovanje katehina ispitano je *in vitro* i *in vivo* metodama. Potencijalni pozitivan utjecaj katehina na ljudsko zdravlje se očituje na utjecaju na

molekularne mehanizme uključene u angiogenezu, degradaciju ekstracelularnog matriksa, otpornosti na lijekove, zaštita od oksidativnog stresa, jačanje imunološkog sustava i slično (Zanwar i sur., 2014).

Katehin se, kao i većina flavonoida, nalazi u biljkama, voću, povrću i njihovim proizvodima (Joseph i sur., 2013; Kaur i sur., 2017).

2.2. β -GLUKAN

β -glukan je uobičajen naziv za glukozni polimer koji se sastoji od jedinica glukoze međusobno povezane β -1,4 i β -1,3-glikozidnim vezama. Predstavlja polisaharid koji se ubraja u topljiva prehrambena vlakna (Havrlentová i sur., 2011; Limberger-Bayer i sur., 2014). Izvor β -glukana su zob, ječam, gljive i kvasci te se u manjoj količini mogu naći u raži i pšenici. Svaka β -1,3-glikozidna veza je razdvojena s dvije ili tri β -1,4-glikozidne veze što ovisi o vrsti žitarica. Topljivost i viskoznost β -glukana ovisi o temperaturi, molekulskoj masi, podrijetlu i slično. Na **Slici 2** prikazana je kemijska struktura β -glukana.



Slika 2. Kemijska struktura β -glukana (WEB 1)

Potencijalni pozitivan utjecaj β -glukana na ljudsko zdravlje može se uočiti kod smanjenja koncentracije glukoze u krvi, koncentracije kolesterola, aktivacije imunološkog sustava (Mitmesser i sur., 2017; Wang i sur., 2013; Bai i sur., 2019). β -glukan je polisaharid iz skupine topljivih prehrambenih vlakana, on se ne apsorbira u tankom crijevu čovjeka već u debelom crijevu može djelomično ili u potpunosti fermentirati (Quirós-Suaceda i sur., 2014). Primjena β -glukana je u biomedicini, farmakološkoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. U prehrambenoj industriji se upotrebljava kao emulgator, kao zamjena za mast i zgušnjivač (Krpan, 2010).

2.3. UV-Vis SPEKTROSKOPIJA

Spektroskopija se bavi proučavanjem elektromagnetskog zračenja odnosno njegovim djelovanjem na strukturu i kemijski sastav tvari te UV-Vis spektrima koji nastaju interakcijom između tvari.

Spektroskopija se može podijeliti prema vrsti informacija koje daje, prema namjeni kao što su kvalitativna (koristi se za mjerenje emisije zračenja i valne duljine apsorpcije) i kvantitativna (koristi se za mjerenje emisije zračenja i inteziteta apsorpcije) te prema mehanizmu kao što su spektroskopija emisije i spektroskopija apsorpcije (Skoog i sur., 2014).

Spektroskopske metode su selektivne, brze i jeftine te su pogodne za primjenu u analitici (industrija, istraživački laboratoriji). Primjenom spektroskopskih metoda dobiva se velik broj kvalitativnih i kvantitativnih informacija o ispitanoj materiji (Matijević i sur., 2008). Različite spektroskopske metode primjenjuju se u analizi hrane, kao što su atomska spektroskopija, masena spektroskopija (MS), apsorpcijska spektroskopija (infracrvena (IR) i ultraljubičasta i vidljiva (UV/Vis)), nuklearna magnetska rezonancija (NMR) i elektron spinska rezonancija. Najčešće se primjenjuje ultraljubičasta (UV) i vidljiva (Vis) apsorpcijska spektroskopija. UV/Vis spektroskopska tehnika se bavi apsorpcijom ultraljubičastog (100-380 nm) i vidljivog zračenja (380-800 nm), a instrumenti koji se koriste su spektrofotometri i fotometri (sadrže filtre koji mogu propuštati različita područja spektra). Primjena UV/Vis spektrofotometrije u kvalitativnoj analizi u UV/Vis području je za otkrivanje kromofornih skupina. Prednost UV/Vis spektroskopije je primjena u analizi mnogobrojnih spojeva (Skoog i sur., 2014; Matijević i sur., 2008; Jakobek Barron, 2017).

2.4. ZETA POTENCIJAL

Elektrokinetičke pojave odvijaju se paralelno s granicom između dviju faza koje se relativno gibaju jedna prema drugoj pri čemu dolazi do nastanka električnog polja. Glavni elektrokinetički efekti su potencijal strujanja koji predstavlja razliku potencijala između krajeva uske cijevi kroz koje struji elektrolit, zatim elektroforetski potencijal ili Dornov potencijal koji se odnosi na razliku potencijala nastalog gibanjem suspendiranih čvrstih čestica kroz tekućinu koja miruje, nadalje elektroosmoza koja se pojavljuje ako se duž uske cijevi narine razlika potencijala te se djelovanjem električnog polja tekuća faza giba preko čvrste

površine i elektroforeza koja se odnosi na kretanje čestica djelovanjem električnog polja uzduž tekućeg medija u kojem su suspendirane čestice (Metikoš-Huković i sur., 2004).

Mjerenje zeta potencijala je važna metoda karakterizacije površinske funkcionalnosti ili stabilnosti makromolekula. Glavni cilj mjerenja zeta potencijala je dobivanje informacija o površinskoj funkcionalnosti, stabilnosti raspršenih čestica kao i interakciji otopljenih spojeva s čvrstom površinom.

Zeta potencijal je izraz za elektrokinetički potencijal makromolekula i označava se grčkim slovom zeta (ζ). Mjerna jedinica u kojoj se zeta potencijal izražava je volt (V) ili milivolt (mV). Uspostavlja se na površini bilo kojeg materijala kada dođe u kontakt s tekućim medijem pa je stoga zeta potencijal međufazno svojstvo. Kada materijal dođe u dodir s tekućim medijem, funkcionalne skupine na njegovoj površini reagirat će s okolnim medijem što rezultira površinskim nabojem, koji privlači nakupljanje nasuprot nabijenih iona. Suprotno nabijeni ioni spontano se raspoređuju u elektrokemijskom dvosloju. Stoga se zeta potencijal može definirati kao zbroj početnog površinskog naboja i akumuliranog sloja.

Zeta potencijal može se mjeriti na različitim materijalima kao što su makroskopske površine (membrane, polimeri) i čestice raspršene u tekućini (koloidi, nanočestice, liposomi). Međutim, prisutna je razlika u odabiru prave tehnike mjerenje zeta potencijala. Zeta potencijal ovisi o svojstvima tekućeg medija, pH vrijednosti i koncentraciji pufer otopina.

Poznavanje zeta potencijala materijala pomaže u optimiziranju specifičnih postupaka modifikacije površine kako bi se materijal najbolje provodio kad se primijeni.

Zeta potencijal makromolekula ključni je pokazatelj stabilnosti sustava, budući da odražava sposobnost čestica da se elektrostatički odbijaju. Empirijski se smatra da su apsolutne vrijednosti zeta potencijala veće od ± 30 mV indikativne za stabilne čestice jer zeta potencijal ukazuje na stabilnost uzorka, dok znak zeta potencijala pokazuje jesu li pozitivni ili negativni naboji dominantni na površini. Vrijednosti zeta potencijala ispod ± 30 mV ukazuju na nestabilnost sustava (Salopek i sur., 1992; Piljac, 2006; Metikoš-Huković, 2000; Sze i sur., 2003; Egorova, 1994; Kosmulski, 2009).

Zeta potencijal ovisi i o površini samog uzorka, ali i o svojstvima tekuće faze. Ovisnost zeta potencijala o pH je najopsežnije proučavana ovisnost zeta potencijala. Mjerenja pri različitim

pH vrijednostima daju informacije o sastavu površine sustava, odnosno prisutnosti kiselih ili baznih funkcionalnih skupina. pH vrijednost kod koje zeta potencijal iznosi 0 mV je izoelektrična točka i koristi se kao pokazatelj za kemiju površine i zbog toga se koristi za karakterizaciju proteina i peptida kao i za razvoj novih farmaceutskih formulacija. Pored pH vrijednosti, koncentracija iona u vodenoj fazi (različite koncentracije pufer otopina) utječe na zeta potencijal. Povećanjem koncentracije pufer otopine, iznos zeta potencijala se smanjuje.

Važan parametar koji utječe na zeta potencijal je pH vrijednost te koncentracija koja je mogući pokazatelj kako postići proizvod što veće stabilnosti (Hunter, 1981).

Električni dvosloj u dodiru s polarnim otapalom pokazuje određeni površinski naboj koji je posljedica ionske adsorpcije, ionskog otapanja i ionizacije. Dvosloj se sastoji od neutralnih suprotno nabijenih iona koji se difuzijski šire kroz polarni medij. Prisutnost dvosloja povezana je s elektrostatičkom interakcijom između pojedinih dijelova makromolekule te sa stabilnošću makromolekule. Električni dvosloj sastoji se od unutarnjeg (uključuje adsorbirane ione) i vanjskog dijela. Zeta potencijal se mijenja u ovisnosti o promjenama u otopini i primjenjuje se iz razloga praćenja promjena koje se odvijaju u otopini.

Zeta potencijal je osjetljiv na najudaljeniji površinski sloj materijala. Stoga je zeta potencijal prikladan za praćenje promjena površinskog naboja nakon procesa adsorpcije otopljenih tvari u otopini na čvrstoj površini. Poznavanje površinskog naboja i njegovih promjena zbog adsorpcije na površini tekućina-čvrsta tvar važno je za podešavanje svojstava materijala i optimizaciju procesa (Kosmulski, 2009; Egorova, 1994).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je bio:

- odrediti zeta-potencijal:
 - a) otopine katehina,
 - b) otopine β -glukana te
 - c) modela katehina i β -glukanakroz različit koncentracijski raspon i
- odrediti najstabilnije ponašanje modela otopine katehina i β -glukana pri različitim pH vrijednostima.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Kemikalije

Katehin, β -glukan, karbonatne i fosfatne soli, KCl, HCl, ultračista voda.

3.2.2. Priprema otopine

Pripremila se otopina β -glukana koncentracije 200 mg L^{-1} u ultračistoj vodi. Koncentracija otopine β -glukana pripravljena za ispitivanje u ovom radu iznosila je 5 mg L^{-1} .

Otopina katehina koncentracije 1000 mg L^{-1} pripremljena je u metanolu, HPLC čistoće te je razrijeđena u rasponu koncentracija od 25, 50, 75, 100 do 150 mg L^{-1} u pufer otopinama pH vrijednosti 1,5; 5,5; 7,5 i 10.

3.2.3. UV-Vis spektar

Za snimanje UV-Vis spektra upotrijebio se uređaj UV-1280 spektrofotometar tvrtke Shimadzu prikazan na **Slici 3**. UV-Vis spektri modela otopine katehina (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) snimani su pri valnoj duljini (λ) od 200 do 700 nm pri pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10 kroz vremenski period od 1, 2, 5 i 16 sati.



Slika 3. UV spektrofotometar

3.2.4. Zeta potencijal

Mjerenje zeta potencijala provedeno je na uređaju Zetasizer 2000 tvrtke Malvern Instruments (UK), a prikazan je na **Slici 4**. Zetasizer 2000 je kompjutorski laboratorijski uređaj koji se upotrebljava za mjerenje zeta potencijala u različitim uzorcima. Instrument koristi sofisticiranu lasersku interferometrijsku M3-PALS (fazna analiza rasipanja svjetlosti) tehniku. Vrijednosti zeta potencijala dobivene su pomoću Helmholtz-Smoluchowski relacije prikazane **Jednadžbom 1**:

$$\zeta = \frac{\kappa \eta \Delta E}{\epsilon_0 \epsilon \Delta P} \quad (1)$$

gdje su ϵ , ϵ_0 , κ dielektrična konstanta otopine, propusnost vakuumu i vodljivost otopine; η viskoznost otopine; ΔE potencijal strujanja i ΔP razlika u hidrodinamičkom tlaku (Susanto i sur., 2009).

Uzorci za analizu injektirani su špricom u količini najmanje od 5 mL otopine u instrument Zetasizer 2000 pri sobnoj temperaturi od 25 °C

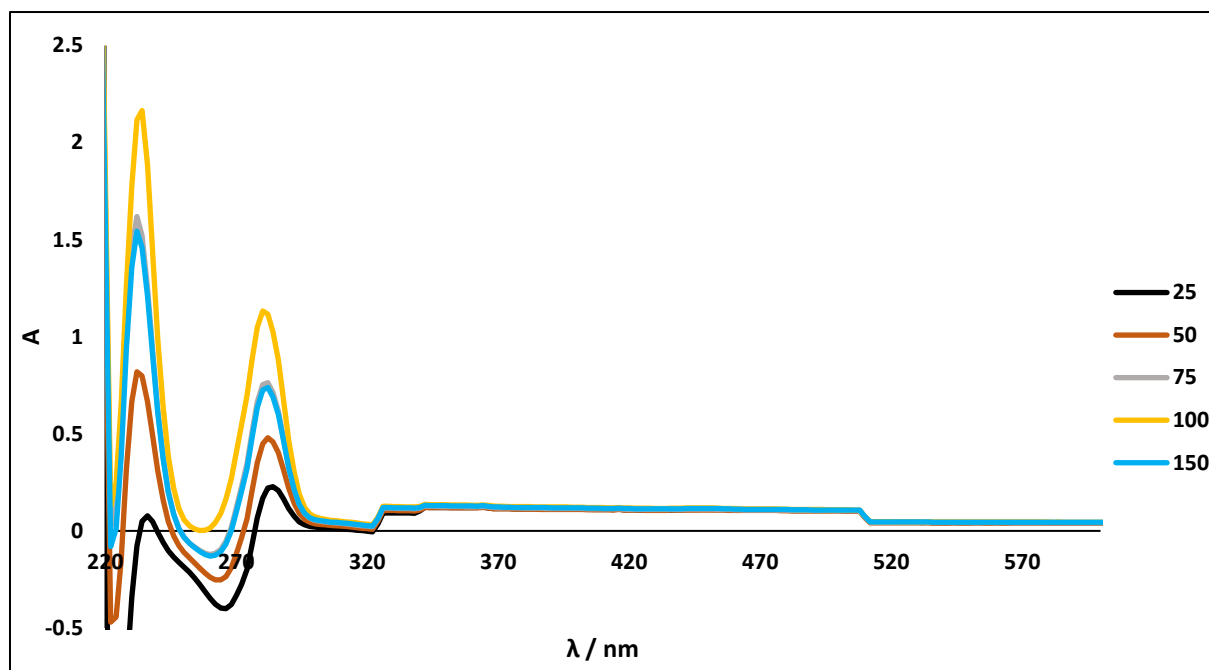
Svaki uzorak mjeren je više puta te se kao konačna vrijednost zeta potencijala uzela srednja vrijednost svih mjerenja.



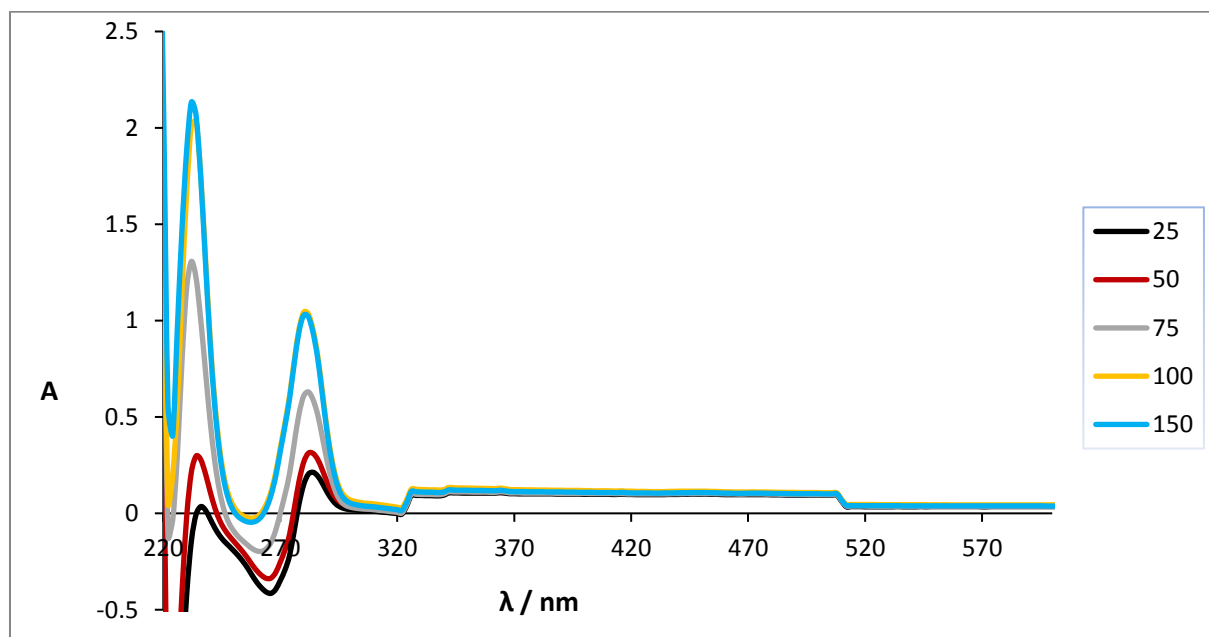
Slika 4. Uređaj Zetasizer 2000

4. REZULTATI

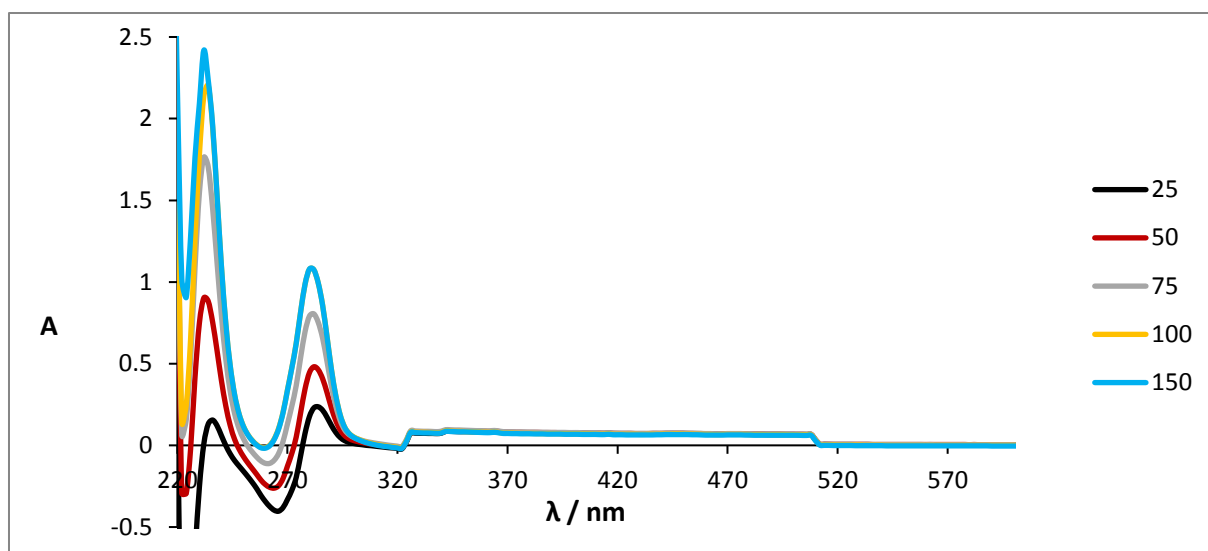
4.1. UV-VIS SPEKTAR OTOPINE KATEHINA



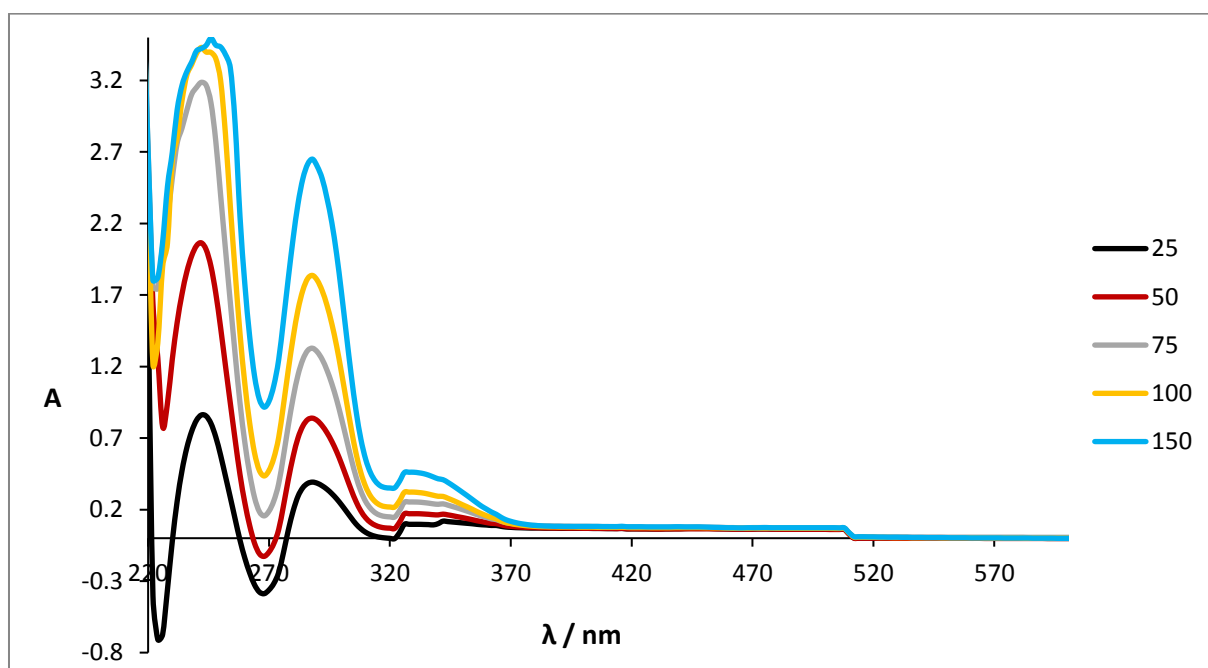
Slika 5. UV-Vis spektar otopine katehina koncentracije (25, 50, 75, 100 i 150 mgL⁻¹) snimljen pri pH 1.5



Slika 6. UV-Vis spektar otopine katehina koncentracije (25, 50, 75, 100 i 150 mgL⁻¹) snimljen pri pH 5.5

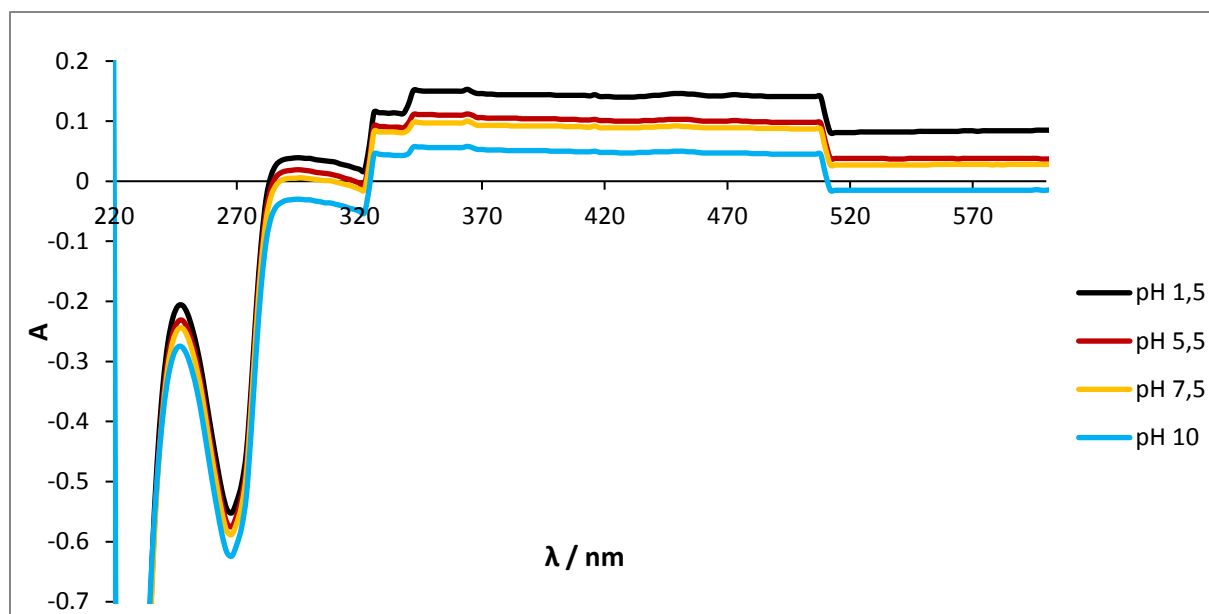


Slika 7. UV-Vis spektar otopine katehina koncentracije (25, 50, 75, 100 i 150 mgL⁻¹) snimljen pri pH 7.5



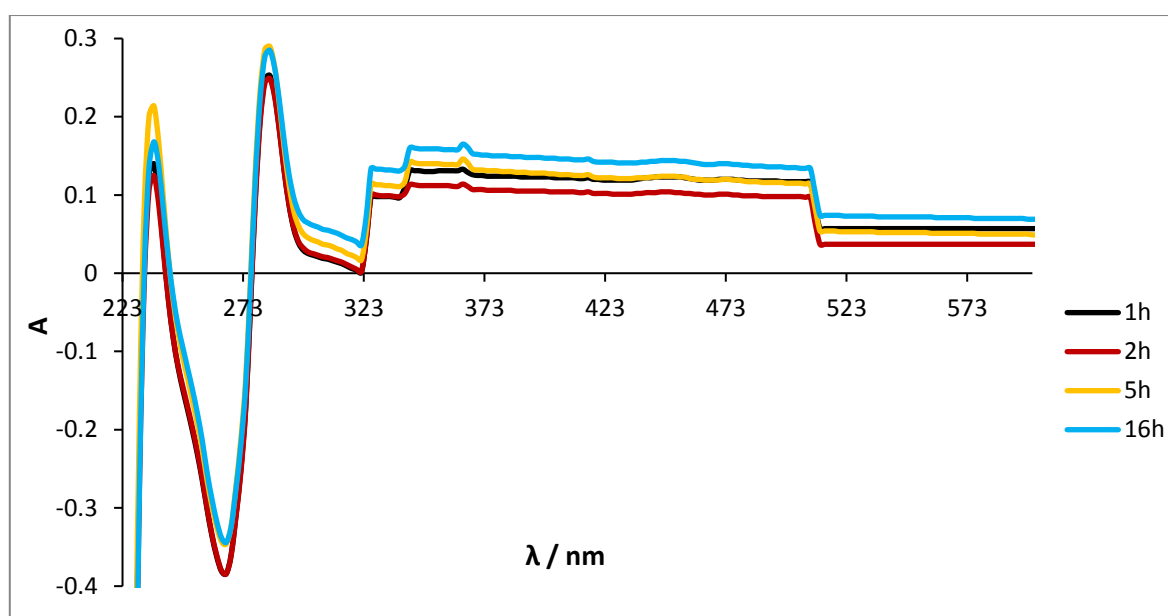
Slika 8. UV-Vis spektar otopine katehina koncentracije (25, 50, 75, 100 i 150 mgL⁻¹) snimljen pri pH 10

4.2. UV-VIS SPEKTAR OTOPINE β -GLUKANA

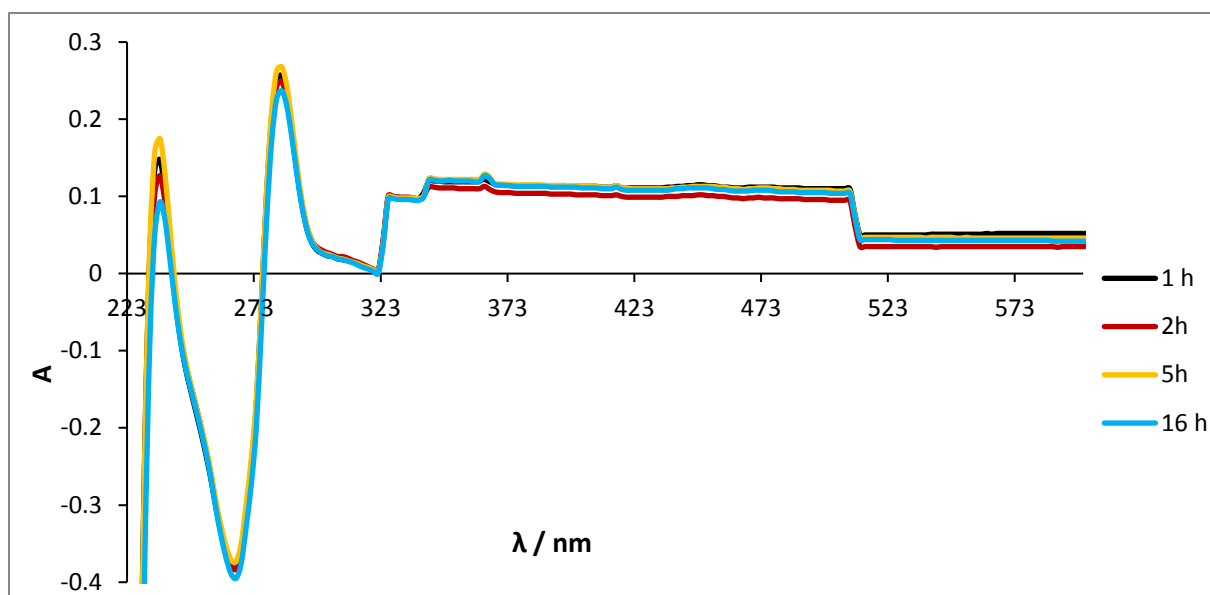


Slika 9. UV-Vis spektar otopine β -glukana (5 mgL⁻¹) snimljen pri različitim pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10

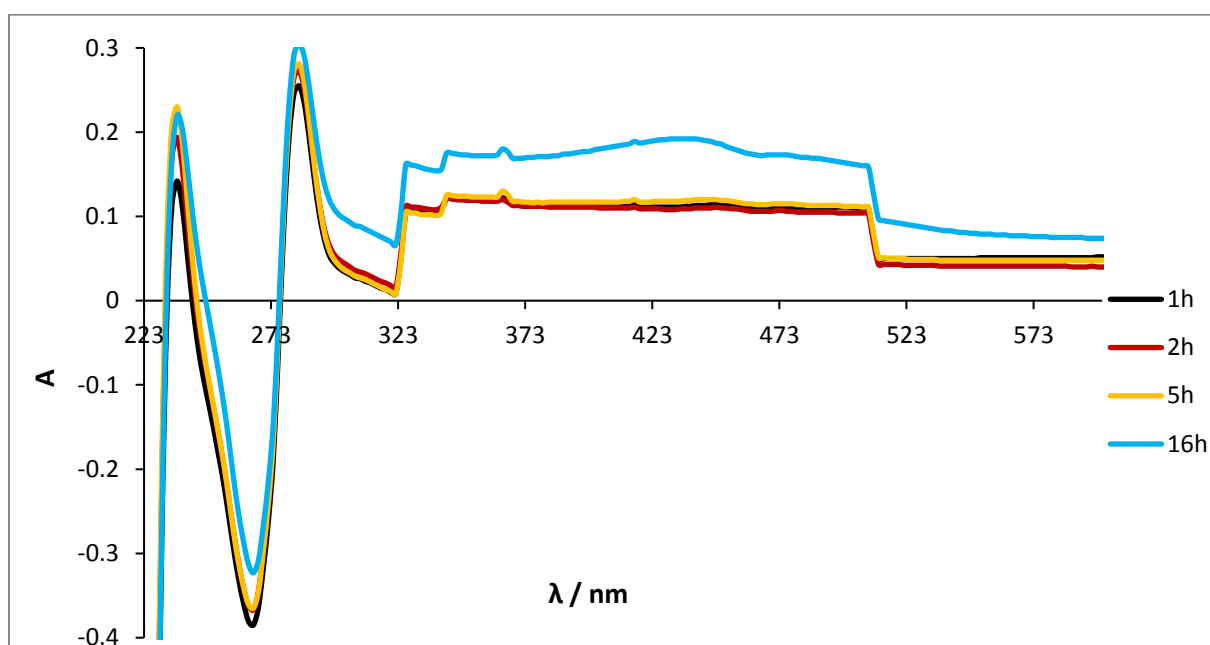
4.3. UV-VIS SPEKTAR MODELA OTOPINE KATEHINA I β -GLUKANA



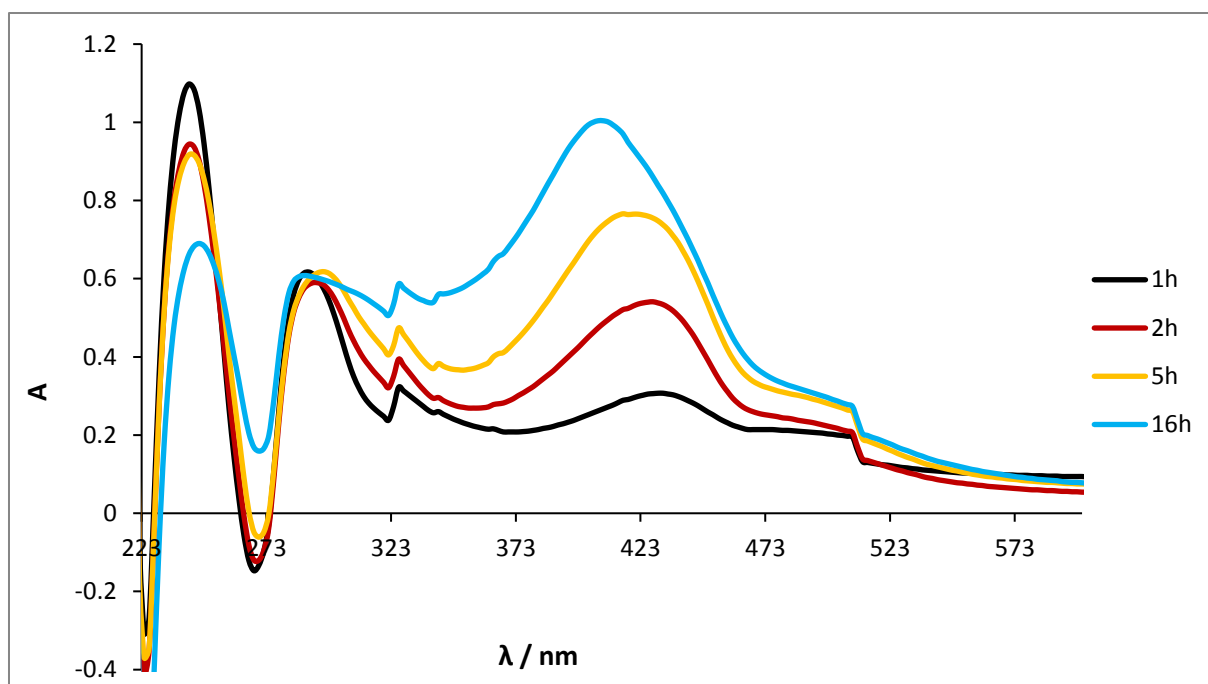
Slika 10. UV-Vis spektar modela otopine katehina (γ = 25 mgL⁻¹) i β -glukana (γ = 5 mgL⁻¹) kroz vremenski period od 1, 2, 5 i 16 h u pH 1.5



Slika 11. UV-Vis spektar modela otopine katehina ($\gamma = 25 \text{ mgL}^{-1}$) i β -glukana ($\gamma = 5 \text{ mgL}^{-1}$) kroz vremenski period od 1, 2, 5 i 16 h u pH 5.5

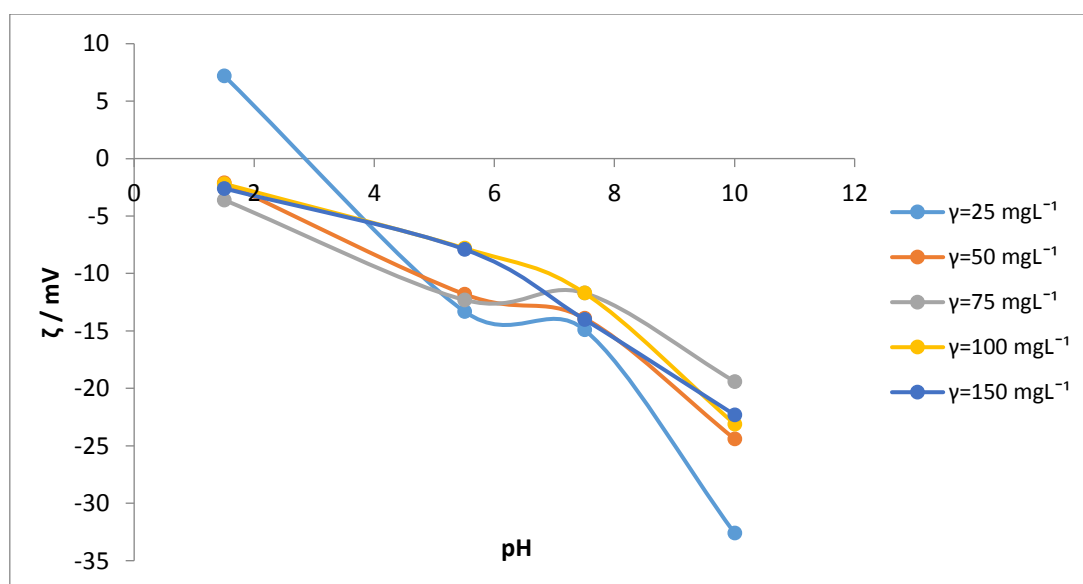


Slika 12. UV-Vis spektar modela otopine katehina ($\gamma = 25 \text{ mgL}^{-1}$) i β -glukana ($\gamma = 5 \text{ mgL}^{-1}$) kroz vremenski period od 1, 2, 5 i 16 h u pH 7.5

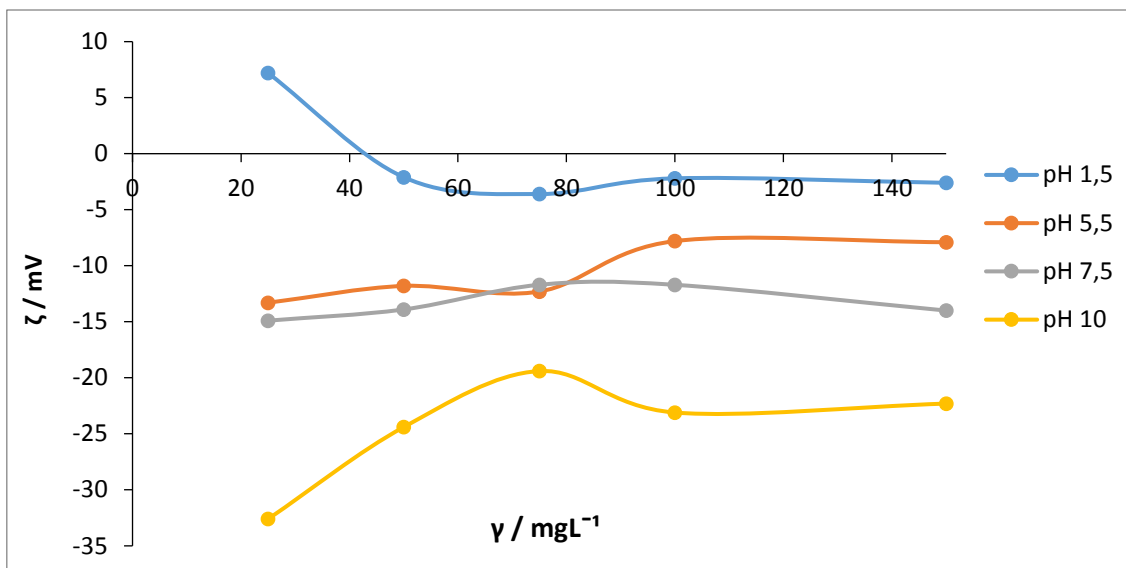


Slika 13. UV-Vis spektar modela otopine katehina ($\gamma = 25 \text{ mgL}^{-1}$) i β -glukana ($\gamma = 5 \text{ mgL}^{-1}$) kroz vremenski period od 1, 2, 5 i 16 h u pH 10

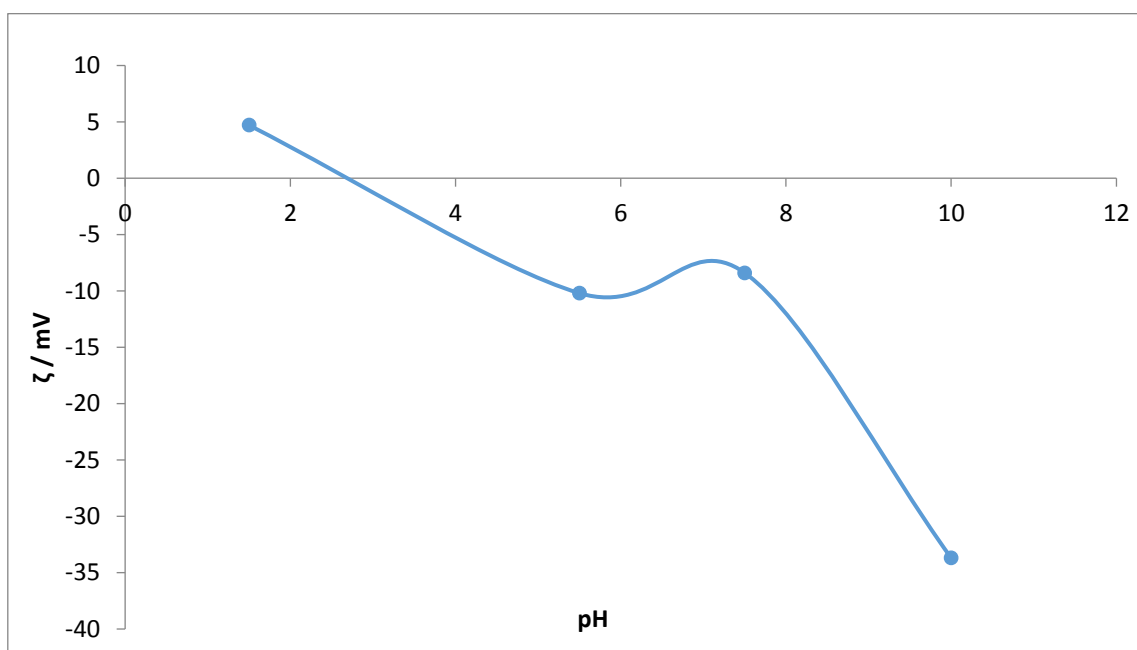
4.4. ZETA POTENCIJAL OTOPINE KATEHINA, β -GLUKANA I MODELA OTOPINE KATEHINA I β -GLUKANA



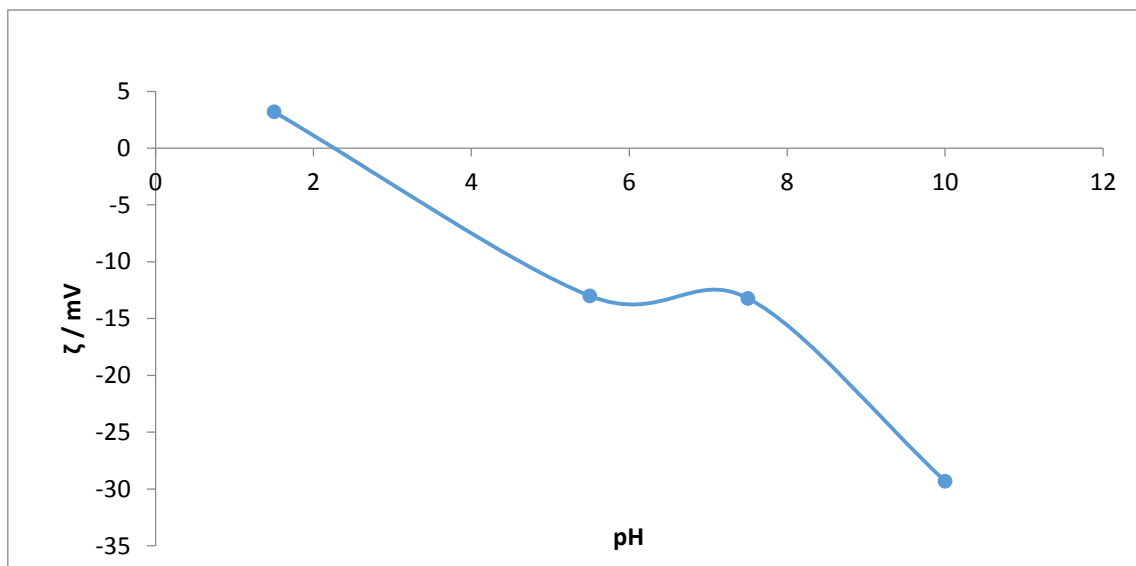
Slika 14. Ovisnost vrijednosti zeta potencijala otopine katehina koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mgL^{-1} o različitim pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10



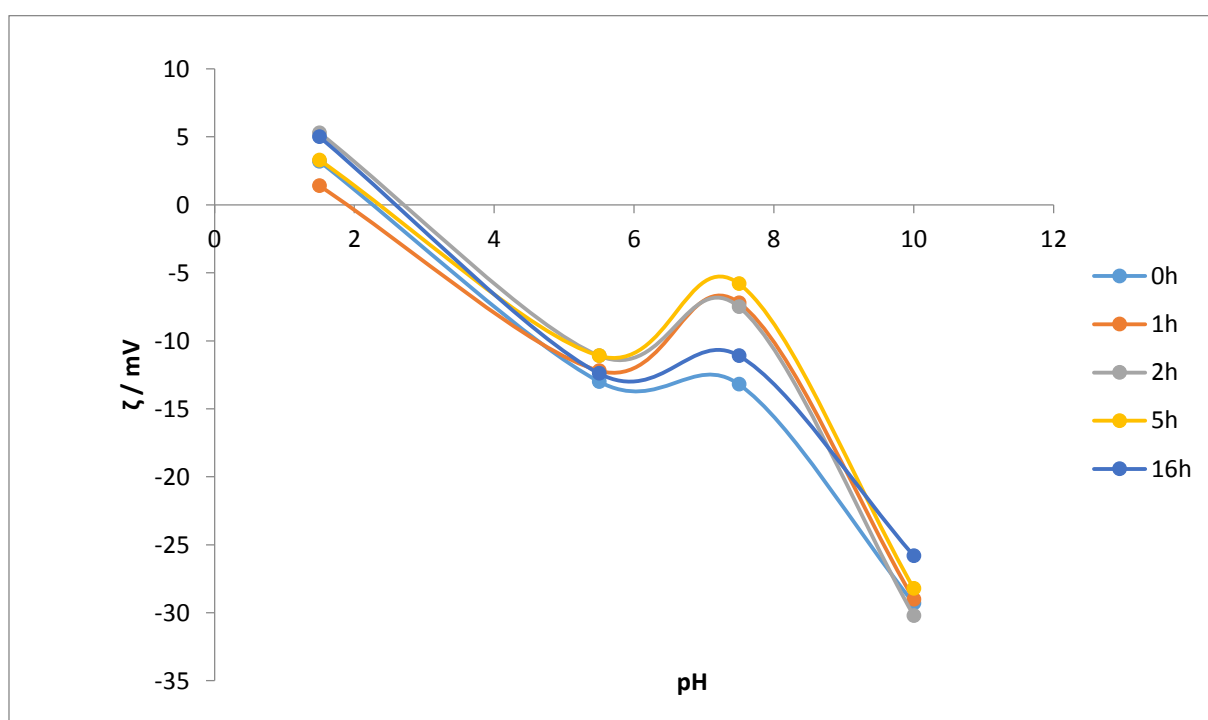
Slika 15. Ovisnost vrijednosti zeta potencijala otopine katehina koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mgL⁻¹ pri različitim pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10



Slika 16. Ovisnost vrijednosti zeta potencijala otopine β-glukana (5 mgL⁻¹) o različitim pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10



Slika 17. Ovisnost vrijednosti zeta potencijala modela otopine katehina (25 mgL^{-1}) i β -glukana (5 mgL^{-1}) o različitim pH vrijednostima 1,5, 5,5, 7,5 i 10



Slika 18. Ovisnost vrijednosti zeta potencijala modela otopine katehina (25 mgL^{-1}) i β -glukana (5 mgL^{-1}) kroz vremenski period od 1h, 2h, 5h i 16 h o različitim pH vrijednostima 1,5; 5,5; 7,5 i 10

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu snimljeni su UV-Vis apsorpcijski spektri otopine katehina, β -glukana i modela otopine katehina i β -glukana te je ispitan utjecaj koncentracije, pH vrijednosti pufera i vremena na vrijednost zeta potencijala katehina, β -glukana i modela katehina i β -glukana.

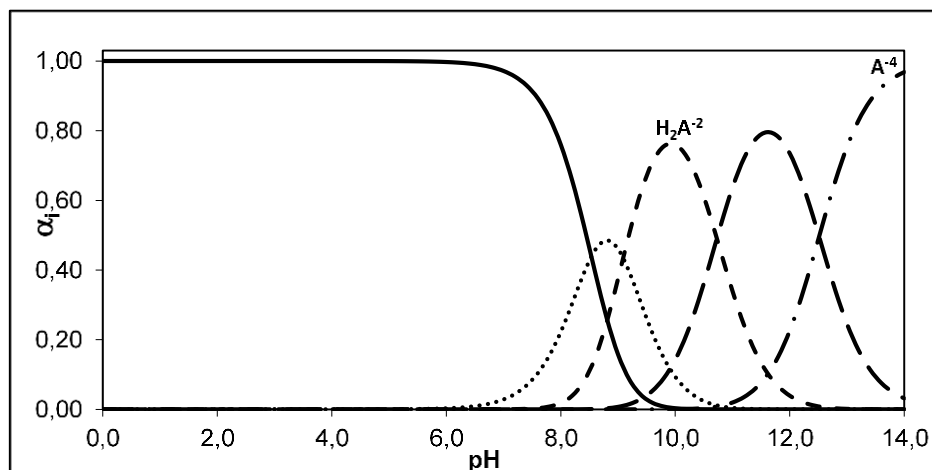
UV-Vis apsorpcijski spektri ispitanih otopina snimljeni su području valnih duljina od 200 do 700 nm. Snimljeni UV-Vis apsorpcijski spektri otopine katehina, β -glukana i modela katehina i β -glukana prikazani su na **Slikama** od **5** do **13**. Na **Slikama** od **5** do **8** prikazani su UV-Vis apsorpcijski spektri otopine katehina pri različitim koncentracijama i pH vrijednostima te se može uočiti da su UV-Vis apsorpcijski spektri otopine katehina koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mg L⁻¹ ovisno o promjeni pH vrijednosti vrlo slični i pokazuju maksimume pri valnim duljinama od oko 250, 280 i 325 nm. Slične UV-Vis apsorpcijske spektre dobili su i autori Friedman i Jürgens (2000) te Sarkar i suradnici (2014).

UV-Vis apsorpcijski spektar β -glukana (5 mg L⁻¹) snimljen je također u rasponu valnih duljina od 200 do 700 nm pri pH 1,5; 5,5; 7,5 i 10 i prikazan je na **Slici 9**. Iz **Slike 9** uočavaju se apsorpcijski maksimumi oko 240, 280 i 320 nm. Pri ispitanim pH vrijednostima UV-Vis apsorpcijski spektri β -glukana (5 mg L⁻¹) su vrlo slični.

Nadalje, snimljeni su UV-Vis apsorpcijski spektri modela otopine katehina (25 mg L⁻¹) i β -glukana (5 mg L⁻¹) u rasponu valnih duljina od 200 do 700 nm te su prikazani na **Slikama 10-13**. Izgled snimljenih UV-Vis apsorpcijskih spektara ispitanog modela pokazuje sličnost u području pH 1,5; 5,5 i 7,5 gdje se mogu uočiti maksimumi pri 230, 280 i 320 nm dok pri pH 10 uočava se još jedan novonastali maksimum na 430 nm koji s vremenom postaje sve izraženiji tako je u 16 h najizraženiji. Pojavu novonastalog apsorpcijskog maksimuma pri valnoj duljini od 430 nm su uočili i Sarkar i suradnici (2014). Ova pojava se može pripisati promjeni kemijske strukture katehina tijekom stajanja, odnosno nastanku oksidiranog oblika katehina. Također se i boja otopine promijenila u pH 10, odnosno postala je intenzivnije žuta porastom pH vrijednosti što je sve utjecalo na pojavu novog apsorpcijskog maksimuma odnosno izgled UV-Vis apsorpcijskog spektra modela (Sarkar i sur., 2014). Stoga se može zaključiti da na izgled UV-Vis spektara otopine katehina, β -glukana i modela katehina i β -glukana utječe kemijska struktura i pH vrijednost.

Nadalje, u ovom radu ispitan je utjecaj koncentracije, pH vrijednosti i vremena na vrijednost zeta potencijala otopine katehina, β -glukana i modela katehina i β -glukana, a s ciljem određivanja najstabilnijeg sustava.

Prema istraživanju Janiero i Brett (2004), mehanizam oksidacije katehina predstavlja izmjenu $1e^- - 1H^+$ u dva koraka odnosno katehin se oksidira u semikinon i daljnjim otpuštanjem e^- prelazi u kinon.



Slika 19. Distribucijski dijagram katehina

Na **Slici 19** prikazan je distribucijski dijagram katehina na temelju pKa vrijednosti preuzete iz literaturnih podataka (Muzolf-Panek i sur., 2012). Iz grafičkog prikaza uočava se da je do pH 6 prisutna neutralna molekula katehina te povećanjem pH vrijednosti od 6 do 11 javljaju se anionski oblici molekule što govori da molekula sudjeluje u kompleksnim reakcijskim procesima (Janeiro i Brett, 2004). Iz distribucijskog dijagrama može se zaključiti da katehin pri pH 1,5 i 5,5 sudjeluje kao neutralna molekula, dok pri pH 7,5 se javlja i kao neutralna molekula i kao anionski oblik, a pri pH 10 se javlja samo u anionskom obliku.

Ispitivanja vrijednosti zeta potencijala otopine katehina, β -glukana i modela katehina i β -glukana u ovom radu prikazana su na **Slikama 14-18**. Na **Slici 14** prikazan je utjecaj koncentracije katehina (25, 50, 75, 100 i 150 mg L⁻¹) pri pH 1,5; 5,5; 7,5 i 10 na vrijednosti zeta potencijala. Iz grafičkog prikaza (**Slika 14**) uočava se da samo koncentracija katehina od 25 mg L⁻¹ pokazuje pozitivnu vrijednost zeta potencijala u pH 1,5, dok ostale koncentracije negativne vrijednosti zeta potencijala. Također, najveća vrijednost zeta potencijala primjećuje se pri pH 10 i iznosi od -20 do -35 mV. Što prema teorijskim kriterijima stabilnosti ukazuje da je pH 10 najstabilniji medij za sve ispitane koncentracije otopine katehina (Salopek i sur., 1992).

Nadalje, iz grafičkih prikaza uočava se da je zeta potencijal u kiselom mediju ispitanih koncentracija pozitivan dok je u blago kiselom, neutralnom i lužnatom mediju pH negativna vrijednost zeta potencijala. Na **Slici 15** se može uočiti da je u lužnatom pH vrijednost zeta potencijala najniža i negativna te iznosi -32,6 mV.

Također, izmjerene su vrijednosti zeta potencijala za β -glukan (5 mg L^{-1}) u području pH 1,5; 5,5; 7,5 i 10 (**Slika 16**). Iz grafičkog prikaza **Slike 16** uočava se pozitivna vrijednost zeta potencijala β -glukana u kiselom mediju te u neutralnom i lužnatom negativna. Također, za ispitanu koncentraciju β -glukana pokazao se pH 10 kao najstabilniji (-33,7 mV), dok najnestabilniji pH 2,5-3 kada je postignuta izoelektrična točka.

Model katehina (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) praćen je u području pH vrijednosti 1,5; 5,5; 7,5 i 10 i kroz vremenski period od 1, 2, 5 i 16 h (**Slika 17 i 18**). Vrijednost zeta potencijala za ispitani model pokazala je prema teorijskim kriterijima stabilnosti da je model najstabilniji u pH 10 što govori da je pri vezanju otopine katehina i β -glukan prisutan anionski oblik molekule katehina što pokazuje i iznos zeta potencijala od -29 do -30 mV te se može zaključiti da promjena pH vrijednosti pufera utječe na kemijsku strukturu otopine katehina kao i na vrijednosti zeta potencijala, a u skladu je s dobivenim distribucijskim dijagramom koji ukazuje prisustvo anionskog oblika molekule katehina u pH 10. U blizini točke pKa 9,7 protonirane fenolne skupine katehina mogu se deprotonirati i nastaje negativni ukupni naboj koji dalje smanjuje vrijednost zeta potencijala modela (Staszewski, 2011). Prisustvo katehina na β -glukanu postiže negativni površinski naboj modela, što govori da je prisutan anionski oblik molekule na površini β -glukana, sličnu pojavu je uočila grupa autora Upadhyay i suradnici (2017) koji su istraživali sloj alginata na površini β -glukana. Također što je pH vrijednost niža vrijednost zeta potencijala je pozitivnija što odgovara literaturnoj referenci (Medvidović-Kosanović i sur., 2009). Vidljivo je da se zeta potencijal mijenja promjenom pH, koncentracije i vremena što znači da je uz pomoć zeta potencijala moguće pratiti promjene u otopinama te kontroliranje procesa (Salopek i sur., 1992).

Prema rezultatima istraživanja zeta potencijala modela katehina (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) može se uočiti da na zeta potencijal i oblik modela katehina utječu koncentracija, pH i kemijska struktura. Usporedbom zasebno vrijednosti katehina i β -glukana s modelom katehina (25 mg L^{-1}) i β -glukana (5 mg L^{-1}) vidljivo je da su vrijednosti zeta potencijala bliže vrijednosti

za β -glukan (5 mg L^{-1}) što je pokazatelj interakcije između molekula katehina i β -glukana koje utječu ne samo na vrijednost zeta potencijala nego i na stabilnost modela.

6. ZAKLJUČCI

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

- UV-Vis apsorpcijski spektri otopine katehina koncentracija 25, 50, 75, 100 i 150 mg L⁻¹ ovisno o promjeni pH su vrlo slični i pokazuju maksimume pri valnim duljinama od oko 250, 280 i 325 nm.
- UV-Vis apsorpcijski spektar β -glukana (5 mg L⁻¹) pokazuje slične vrijednosti pri pH 1,5; 5,5; 7,5 i 10 te se uočavaju apsorpcijski maksimumi oko 240, 280 i 320 nm.
- Apsorpcijski spektri modela katehina (25 mg L⁻¹) i β -glukana (5 mg L⁻¹) pokazuju sličnost u području pH 1,5; 5,5; i 7,5 gdje se mogu uočiti apsorpcijski maksimumi pri 230, 280 i 320 nm dok pri pH 10 uočava se još jedan maksimum pri valnoj duljini 430 nm.
- Zeta potencijal otopine β -glukana pri koncentraciji 5 mg L⁻¹ pokazuje pozitivnu vrijednost u kiselom mediju dok u neutralnom i u lužnatom mediju pokazuje negativnu vrijednost.
- Vrijednost zeta potencijala ispitivane otopine katehina ima pozitivnu vrijednost u pH 1,5, dok ostale koncentracije pokazuju negativne vrijednosti zeta potencijala. Za sve ispitivane koncentracije otopine katehina pH 10 je najstabilniji medij.
- Vrijednosti zeta potencijala ispitanog modela katehina (25 mg L⁻¹) i β -glukana (5 mg L⁻¹) pokazala je prema teorijskim kriterijima stabilnosti da je model najstabilniji u pH 10 (-30 mV) te se može zaključiti da promjena pH vrijednosti pufera utječe na kemijsku strukturu otopine katehina kao i na vrijednosti zeta potencijala.

7. LITERATURA

- Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro: Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent Trends. *Critical Reviews in Biotechnology* 31: 227-49, 2011.
- Aniszewski T: *Alkaloids*. Elsevier Science, USA, 2015.
- Bai J, Ren Y, Li Y, Fan M, Qian H, Wang Li, Wu G, Zhang H, Qi X, Xu M, Rao Z: Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. *Trends in Food Science & Technology* 88: 57-66, 2019.
- Brown P, De Antonis K: High-performance liquid chromatography. U *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, 147-164. Prentice Hall, New Jersey, 1997.
- Christian GD, Dasgupta PK, Schug KA: High-Performance Liquid Chromatography. U *Analytical Chemistry*, 651-654. Courier Kendallville, USA, 2014.
- Egorova EM: The validity of the Smoluchowski equation in electrophoretic studies of lipid membranes. *Electrophoresis* 15: 1125-1131, 1994.
- Friedman M, Jürgens HS: Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2101-2110, 2000.
- Havrlentoná M, Petrušáková Z, Burgárová A, Gago F, Hlinková A, Šturdík E: Cereal β -glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods- A Review. *Czech journal of food sciences* 29: 1-14, 2011.
- Houston M: Dyslipidemia. *Integrative Medicine*, 264-275. Elsevier, Philadelphia, 2018.
- Hunter R.J. *Zeta potential in Colloid Science*. Academic Press, NY, 1981.
- Jakobek Barron L: *Nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne metode II*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2017.
- Janeiro P, Oliveria Brett AM. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 518: 109-115, 2004.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B: Nutrients and Food Constituents in Cognitive Decline and Neurodegenerative Disease. U *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, 373-390. Academic Press, USA, 2013.
- Kaur R, Rajput R, Nag P, Kumar S, Rachana, Singh M: Synthesis, Characterization and evaluation of antioxidant properties of catechin hydrate nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 39: 398-407, 2017.
- Kosmulski M: The pH Dependent Surface Charging and Points of Zero Charge. VI. Update. *Journal of Colloid and Interface Science* 426: 209-12, 2014.

- Krpan V, Petravić-Tominac V, Gospodarić I, Sajli L, Đaković S, Filipović-Grčić J: Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. *Prehrambena tehnologija i biotehnologija* 48: 189-197, 2010.
- Kuljanin T, Mišljenović N, Lević B, Koprivica GB: Electric double layer and electrokinetic potential of pectic macromolecules in sugar beet. *Acta periodica technologica* 39 : 21-28, 2008.
- Limberger-Bayer VM, de Francisco A, Chan A, Oro T, Ogliari PJ, Barreto PLM: Barley β -glucans Extraction and Partial Characterization. *Food Chemistry* 154: 84-9, 2014.
- Luxbacher T, Pušić T, Bukšek H, Petrinić I: Zeta potential determination of flat solid surfaces using a SurPASS electrokinetic analyzer. *Tekstil: Journal of Textile & Clothing Technology* 58: 8, 2009.
- Matijević B, Blažić M: Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo* 58 : 2, 2008.
- Mbaveng AT, Zhao Q, Kuete V: Harmful and Protective Effects of Phenolic Compounds from African Medicinal Plants. U *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, ur. Victor Kuete, 577-609. Elsevier, USA, 2014.
- Medvidović-Kosanović M, Šeruga M, Jakobek L, Novak I: Electrochemical and Antioxidant Properties of (+)- Catechin, Quercetin and Rutin. *Croatica Chemica Acta* 83: 2, 2010.
- Metikoš-Huković M: *Elektrokemija*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2000.
- Metikoš Huković M, Martinez S: *Praktikum iz elektrokemije*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2004.
- Mitmesser S, Combs M: Prebiotics: Inulin and other oligosaccharides. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Implication for Human Health, Prebiotics, and Dysbiosis 23: 201-208, 2017.
- Munjanja B: UV-Visible Absorption, Fluorescence, and Chemiluminescence Spectroscopy. *Handbook of Food Analysis* 31: 572-583, 2015.
- Muzolf-Panek M, Gliszczyńska-Świgło A, Szymusiak H, Tyrakowska B: The influence of stereochemistry on the antioxidant properties of catechin epimers. *European Food Research and Technology* 235: 1001-1009, 2012.
- Nollet L, Toldra F: *Handbook of Food Analysis*. CRC Press, Boca Raton, 2015.

- O'Brien NM, Aisling Aherne S: Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition* 18: 75-81, 2002.
- Piljac I: *Elektroforeza*. Zagreb: Media Print, 2006.
- Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi SG, Ayala-Zavala JF, Bello-Perez LA, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa LA, González-Córdova AF, González-Aguilar GA: Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food Function* 5: 1063-1072, 2014.
- Salopek B, Krasić D, Filipović S: Measurement and application of zeta-potential. U *Rudarsko geološko-naftni zbornik* 4: 147-151, 1992.
- Sarkar B, Kumar D, Sasmal D, Mukhopadhyay K: Antioxidant and DNA Damage Protective Properties of Anthocyanin-Rich Extracts From Hibiscus and Ocimum: A Comparative Study. *Natural Product Research* 28: 1393-8, 2014.
- Saxena M, Saxena J, Pradhan A: Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 16: 130-134, 2012.
- Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Brooks/Cole, Belmont, SAD, 2014.
- Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning, Kanada, 2007.
- Smith AI: Peptide Characterization and Purification Using High-Performance Liquid Chromatography. U *Methods in Neurosciences*, 91-106. Academic Press, UK, 1993.
- Srivastava A, Pant AB: Phytomedicine. U *New Look to Phytomedicine*, 625-655. Academic Press, UK, 2019.
- Staszewski M, Jagus RJ, Pilosof AMR: Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC. *Food Hydrocolloids* 25: 1077-1084, 2011.
- Susanto H, Feng Y, Ulbricht M: Fouling behavior of aqueous solutions of polyphenolic compounds during ultrafiltration. *Journal of Food Engineering* 91: 333-340, 2009.
- Sze A, Erickson D, Ren L, Li D: Zeta-potential Measurement Using the Smoluchowski Equation and the Slope of the Current-Time Relationship in Electroosmotic Flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 261: 402-10, 2003.
- Upadhyay TK, Fatima N, Sharma D, Saravanakumar V, Sharma R: Preparation and characterization of beta-glucan particles containing a payload of nanoembedded

- rifabutin for enhanced targeted delivery to macrophages. *EXCLI Journal* 16: 210-228, 2017.
- Wang Y, Liu J, Chen F, Zhao G: Effects of Molecular Structure of Polyphenols on Their Noncovalent Interactions with Oat β -glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 4533-4538, 2013.
- Waters Corporation, 2020.:https://www.waters.com/waters/en_HR/Global-Job-Opportunities/nav.htm?cid=134690899&locale=en_HR (3.4.2020.)
- Zanwar AA Badole SL, Shende PS, Hegde MV, Bodhankar SL: Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease. *Polyphenols in Human Health and Disease* 1: 267-271, 2014.
- WEB 1: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-oat-beta-glucan-showing-the-beta-1-4-and-beta-1-3-glycosidically_fig2_227527409 (7.7.2020.)