

Predikcija fizikalno-kemijskih parametara vodenih ekstrakata samoniklog bilja primjenom blisko infracrvene spektroskopije u kombinaciji s kemometrijskim metodama

Dabić, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:892970>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**PREDIKCIJA FIZIKALNO-
KEMIJSKIH PARAMETARA
VODENIH EKSTRAKATA
SAMONIKLOG BILJA
PRIMJENOM BLISKO
INFRACRVENE
SPEKTROSKOPIJE U
KOMBINACIJI S
KEMOMETRIJSKIM METODAMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Davora Valingera, te uz pomoć doc.dr.sc. Maje Benković iz Kabineta za osnove inženjerstva, Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru doc.dr.sc. Davoru Valingeru na ukazanoj prilici, strpljenju i posvećenom vremenu.

Zahvaljujem se doc.dr.sc. Maji Benković te svim članovima Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na pristupačnosti i pomoći prilikom izvedbe ovoga rada kao i na uvijek ugodnoj i veseloj atmosferi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

PREDIKCIJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA VODENIH EKSTRAKATA SAMONIKLOG BILJA PRIMJENOM BLISKO INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE U KOMBINACIJI S KEMOMETRIJSKIM METODAMA

Doris Dabić, 986/N

Sažetak: Prehrambena i farmaceutska industrija prepoznali su značaj ljekovitog i začinskog bilja kao izvor bioaktivnih funkcionalnih sastojaka sa antimikrobnom, protuupalnom, antialergijskom i antioksidativnom ulogom u pružanju zdravstvenih benefita za ljude. Epidemiološka istraživanja ukazuju da fitokemikalije usporavaju degenerativne procese i smanjuju rizik od raka i kardiovaskularnih bolesti, a veliki značaj pridaje se implementaciji tih sastojaka u nove proizvode s dodanom vrijednošću. U ovom radu provedeno je istraživanje na vodenim ekstraktima 15 biljaka: kamilice, koprive, maslačka, stolisnika, trputca, melise, nevena, mente, preslice, kadulje, majčine dušice, lavande, masline, gospine trave i lipe. Ekstraktima su testirana fizikalna svojstva (pH, električna vodljivost, TDS, udio suhe tvari, vode i pepela) i kemijski parametri (ukupni polifenoli, antioksidacijski kapacitet izmjeren trima metodama: ABTS, FRAP i DPPH). Cilj je bio provjeriti može li se pomoću blisko infracrvene spektroskopije napraviti predikcija 10 fizikalno-kemijskih parametara, a kako bi to utvrdili provedena je analiza glavnih komponenata (PCA) nakon čega su napravljeni modeli parcijalnom regresijskom metodom najmanjih kvadrata (PLS) i umjetnih neuronskih mreža (ANN). Pokazalo se da NIR spektroskopija u kombinaciji sa PCA i ANN može dati vrlo dobru predikciju fizikalno-kemijskih parametara, a utvrđeno je i da su rezultati ANN modela pokazali bolje slaganje sa eksperimentalnim podacima nego PLS model.

Ključne riječi: samoniklo bilje, blisko-infracrvena spektroskopija, kemometrija, umjetne neuronske mreže, parcijalna linearna regresija

Rad sadrži: 53 stranice, 22 slike, 3 tablice, 70 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Doc.dr.sc. Davor Valinger

Pomoć pri izradi: Doc.dr.sc. Maja Benković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
2. Doc.dr.sc. Davor Valinger
3. Doc.dr.sc. Tomislav Bosiljkov
4. Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjena)

Datum obrane: 17. 09. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisatation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

PREDICTION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY IN COMBINATION WITH CHEMOMETRICS

Doris Dabić, 986/N

Abstract: Food industry and pharmaceutical industry have recognized the importance of herbs and spices as a source of bioactive functional ingredients with an antimicrobial, anti-inflammatory, anti-allergic and antioxidant role in providing health benefits to humans. Epidemiological studies indicate that phytochemicals are slowing down degenerative processes and can reduce the risk of cancer and cardiovascular disease. The implementation of these ingredients in new, value-added products is of great importance to the industry. In this study, an examination was conducted on aqueous extracts of 15 plants: chamomile, nettle, dandelion, yarrow, plantain, lemon balm, calendula, mint, horsetail, sage, thyme, lavender, olive, St. John'swort and linden. Physical properties of extracts were tested (pH, electrical conductivity, TDS, and dry matter, water and ash content) as well as chemical parameters (total polyphenols and antioxidant capacity measured by three methods: ABTS, FRAP and DPPH). The aim was to test whether near-infrared spectroscopy can predict 10 physicochemical parameters, and to determine this, principal component analysis (PCA) was performed, followed by partial least squares regression (PLS) and artificial neural networks (ANN). The study showed that NIR spectroscopy in combination with PCA and ANN can give a very good prediction of physicochemical parameters, and it was found that the ANN model results showed better concurrence with experimental data than the PLS model.

Keywords: medicinal plants, near infrared spectroscopy, chemometrics, artificial neural networks, partial least squares regression

Thesis contains: 53 pages, 22 figures, 3 tables, 70 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Davor Valinger, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD. Maja Benković, Assistant professor

Reviewers:

1. PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full professor
2. PhD. Davor Valinger, Assistant professor
3. PhD. Tomislav Bosiljkov, Assistant professor
4. PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: September 17, 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Ljekovito bilje	2
2.2. Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva ljekovitog bilja	4
2.2.1. Biološki aktivni spojevi	6
2.3. Metode analize fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata	8
2.3.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta	8
2.3.1.1. DPPH metoda	9
2.3.1.2. ABTS metoda	10
2.3.1.3. FRAP metoda	10
2.3.1.4. Ukupni polifenoli	10
2.3.2. Metode određivanja fizikalnih svojstva	11
2.3.2.1. Suha tvar	11
2.3.2.2. pH	11
2.3.2.3. Ukupne otopljene tvari (TDS) i vodljivost	12
2.3.2.4. Pepeo	12
2.3.3. NIR spektroskopija	13
2.3.4. Kemometrija	14
2.3.4.1. Analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, PCA)	15
2.3.4.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (eng. Partial Least Squares, PLS)	16
2.3.4.3. Umjetne neuronske mreže ANN	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Otapala i reagensi	20
3.1.2. Aparatura i pribor	20
3.2. Metode rada	21
3.2.1. Priprema uzorka - ekstrakcija biološki aktivnih komponenata	21
3.2.2. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja	22
3.2.3. pH vrijednost ekstrakata	23

3.2.4. Ukupne otopljene tvari (TDS) i vodljivost.....	23
3.2.5. Pepeo.....	23
3.2.6. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	23
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	24
3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	24
3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	25
3.2.10. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR) i kemometrija	26
3.2.10.1. Obrada podataka i modeliranje.....	26
3.2.10.2. Umjetne neuronske mreže.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata.....	28
4.2. Analiza glavnih komponenti.....	30
4.3. PLS modeli.....	31
4.4. Umjetne neuronske mreže.....	38
5. ZAKLJUČCI.....	47
6. LITERATURA.....	48

1. UVOD

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji 80% svjetske populacije koristi tradicionalne prakse za primarnu zdravstvenu zaštitu od čega 85% te populacije dijeli upotrebu ljekovitih biljaka ili pripravaka na bazi biljaka. Proizvodi na prirodnoj bazi poput biljnih ekstrakta daju neograničeno mnogo mogućnosti za otkrića novih lijekova zbog prisutnosti velike kemijske raznolikosti. Upravo zbog te raznolikosti sve je više istraživanja s ljekovitim biljkama koje pokazuju pozitivan učinak na zdravlje ljudi, a oko 25% aktivnih komponenti u lijekovima koji se trenutno koriste prvo su identificirani u biljkama (Halberstein, 2005). Biološki aktivnim spojevima iz medicinskih i začinskih biljaka pripisane su zasluge za određena zdravstvena poboljšanja zbog antimikrobnih, antialergijskih, protuupalnih, antioksidativnih učinaka kao i uklanjanja slobodnih radikala zbog bogatog sadržaja antioksidativnih spojeva poput polifenola. Dokazano je da antioksidacijska aktivnost pronađena u biljnim proizvodima može pružiti zaštitne učinke inhibiranjem oksidativnih oštećenja DNA, a njihovim adekvatnim unosom smanjuje se rizik od degenerativnih bolesti poput dijabetesa, pretilosti, raka i kardiovaskularnih bolesti. Tržište funkcionalnih proizvoda, lijekova kao i prehrambenih suplemenata predstavljaju ogromnu potrebu za biološki aktivnim spojevima i svim saznanjima vezanim uz njih (Anderson i sur., 1999; Abdel-Lateif i sur., 2016). U ovome radu provedeno je istraživanje na vodenim ekstraktima 15 medicinskih biljaka tradicionalnog naziva: kamilica, kopriva, maslačak, stolisnik, trputac, melisa, neven, menta, preslica, kadulja, majčina dušica, lavanda, maslina, gospina trava i lipa. Cilj rada bio je utvrditi može li se blisko infracrvena spektroskopija (NIR) u kombinaciji s kemometrijskim metodama koristiti za određivanje fizikalnih (pH, ukupno otopljene tvari (TDS), vodljivost, suhu tvar, pepeo) i kemijskih svojstava (ukupni polifenoli, ABTS, DPPH, FRAP) vodenih ekstrakata. NIR spektri zbog velikog broja uzoraka koji su snimljeni i velikog broja valnih duljina predstavljaju skup informacija koje je teško ili nemoguće interpretirati bez kemometrijske analize. Korištenjem analize glavnih komponentata (PCA) smanjen je broj varijabli snimljenih NIR spektara koje su kasnije korištene za modele parcijalnom regresijskom metodom najmanjih kvadrata (PLS) i umjetne neuronske mreže (ANN). Prvih 10 faktora dobivenih PCA analizom korišteni su kao ulazne varijable ANN kako bi se vidjelo na temelju učenja, testiranja i validacije ANN modela mogućnost predviđanja fizikalnih i kemijskih svojstava ispitivanih ekstrakata koji predstavljaju izlazne varijable ANN. Također su napravljeni i PLS modeli na temelju prvih 10 faktora

dobivenih PCA analizom kako bi se ustanovilo koji od ta dva modela daje bolje predikcije fizikalnih i kemijskih svojstava ljekovitog bilja na temelju NIR spektara.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJEKOVITO BILJE

Prvo instinktom, a onda iskustvom, tijekom svoje evolucije čovjek sve bolje i sve više upoznaje ljekovito (medicinsko) bilje i koristi ga u svom životu. U ljekovito bilje ubrajaju se one biljne vrste i kultivari čiji jedan dio ili više dijelova biljke sadrže biološki aktivnu tvar koja se može iskoristiti u terapijske svrhe ili za farmaceutsko-kemijsku analizu (Kolak i sur., 1997). Veliki je broj dokaza kako ljekovito bilje predstavlja najstariji (3000 godina prije Krista) i najrašireniji oblik liječenja (Halberstein, 2005), a konzumiralo se u obliku sirovih droga kao što su tinkture, čajevi, oblozi, prašci i dr. Uporaba biljaka kao lijekova je uključivala izolaciju aktivnih spojeva, počevši od izolacije morfija iz opijuma početkom 19. stoljeća, a izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva iz biljaka još uvijek traje (Balunas i Kinghorn, 2005). Čajevi, ulja, sirupi, tablete i tinkture samo su jedni od oblika ljekovitog bilja namijenjenih za prodaju i konzumaciju. Proizvodi biljne medicine uglavnom su jeftiniji i često se smatraju sigurnijim za upotrebu od sintetičkih lijekova (Hartmann, 2007). Iako su terapije ove vrste pokazale obećavajući potencijal, a djelotvornost dobrog broja biljnih proizvoda jasno je utvrđena, mnogi pripravnici odnosno terapije ostaju neprovjerene i njihova se upotreba ili slabo nadzire ili se uopće ne nadzire. Posljedica toga je nedovoljno poznavanje njihovog načina djelovanja, potencijalnih nuspojava, kontraindikacija i interakcija s postojećim ortodoksnim lijekovima i funkcionalnom hranom. Potrebno je na globalnoj razini standardizirati i ojačati regulatorne politike o biljnim lijekovima (Ekor, 2013). Različite ljekovite biljke nakupljaju i deponiraju biološki aktivne komponente u različitim dijelovima biljke kao što su cvijet, zeleni dijelovi, kora, korijen, podanek, gomolj, lukovica, plod, sjeme (Kolak i sur., 1997). Ljekovite biljke prodaju se svježe, sušene ili kao ekstrakti koji sadrže mnoge spojeve kao npr. flavonoide, glikozide, saponine, sterole, alkaloidne, masne kiseline. Ti spojevi dostupniji su u ekstraktima zbog otapanja biljke u vodi, alkoholu ili nekom drugom otapalu odnosno zbog otpuštanja unutarstaničnih komponenta u ekstrakcijski medij. Biljke sadrže mnoge kemijske spojeve od kojih su mnogi sekundarni metaboliti i uključuju aromatične spojeve od kojih je najviše fenola ili njihovih oksigeniranih derivata kao što su tanini (Hartmann, 2007). Mnogi od tih spojeva

imaju antioksidativna svojstva, a prehrambene smjernice spominju i korisnost biljaka kao alternativu soli (Tapsell i sur., 2006). Bioaktivni spojevi iz začina i bilja mogu smanjiti ili suzbiti rizik od degenerativnih bolesti poput dijabetesa, pretilosti, raka i kardiovaskularnih bolesti (Anderson i sur., 1999).

Prema Nikolić iz 2001 u Hrvatskoj postoji 5516 vrsta biljaka od koji je 1144 biljaka u nekoj vrsti upotrebe od strane ljudi. Najveći broj biljaka koje ljudi koriste na neki način (25%, 735 vrsta) odnosi se na medicinu, a slijede je biljke koje se koriste za hranu (12%), pčelinje biljke (12%), biljke za okolišnu uporabu (8%), biljke za materijale (8%), aditivi za hranu (5%), biljke za društvenu upotrebu (4%) itd. Potpuni popis sa nomenklatorskim i taksonomskim ažuriranjem nedavno je dovršen pod nazivom Flora Croatica Database (FCD).

U Hrvatskoj, medicinske biljke koriste se za liječenje probavnih smetnji (65,4%) i genitourinarnih poremećaja (53,9%), a slijede one za infekcije (45%), probleme kože i potkožnog staničnog tkiva (41%), respiratorne tegobe (36,9%), ozljede (33,3%), poremećaji metaboličkog sustava (32,8%), mišićno-skeletni (31,7%), prehrambeni (30,6%), krvožilni sustav (28,4%) i neodređeni lijekovi (27,1%), upale (26,5 %), trovanja (23,8%), živčana stanja (18,5%), lijekovi protiv bolova (17,4%), mentalni poremećaji (17,1%), krvni sustav (12%), poremećaji osjetilnog sustava (6,2%) i poremećaji endokrinog sustava (5,8%), stanja trudnoće, rođenja i puerperium (4,1%), neoplazme (3%), abnormalnosti (2,8%) i bolesti imunološkog sustava (1,8%) (Nikolić, 2001). Prehrambena i farmaceutska industrija prepoznali su značaj ljekovitog i začinskog bilja kao izvor bioaktivnih funkcionalnih sastojaka, a od nedavno veliki značaj pridaje se implementaciji tih sastojaka u nove proizvode s dodanom vrijednošću. Tako su mliječni proizvodi prepoznati kao jedinstveni nosači koji se uspješno koriste za isporuku fitokemikalija i drugih hranjivih sastojaka do ciljanih mjesta u ljudskom organizmu gdje bi osigurali određene zdravstvene benefite. Bilje i začini korišteni su za obogaćivanje hrane i tijekom povijesti kao konzervansi, poboljšivači organoleptičkih svojstva i ljekovitosti (El-Sayed i Youssef, 2019). Balunas i Kinghorn (2005) navode da se otkrivanje lijekova iz ljekovitog bilja razvilo tako što uključuje brojna područja istraživanja i razne metode analize uključujući izolaciju ciljanih spojeva, sintetičku i kombinatornu kemiju i molekularno modeliranje. U radu su navedeni određeni spojevi kao i biljke iz kojih su prvotno izolirani, a na tržištu se nalaze u sklopu proizvoda koji se koriste u terapiji: anti-malarije, Alzheimer, tirozinemije, kronične obstruktivne bolesti pluća, a spominju se i ostali spojevi koji su u fazi 3 kliničkog istraživanja sa potencijalnim učincima protiv bolova, anti-kancerogeni i anti-HIV. U ovom radu provedeno je istraživanje na samoniklim biljkama koje se koriste u Hrvatskoj na polju medicine, farmacije i kulinarstva.

2.2. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA LJEKOVITOG BILJA

Ekstrakcijske metode često predstavljaju tehniku priprema uzorka, a kvaliteta kvalitativnih i kvantitativnih istraživanja bioaktivnih komponenta iz biljnih materijala uvelike ovisi o odabiru adekvatne ekstrakcijske metode kao i njene adekvatne primjene (Azmir i sur., 2013).

Ekstrakcija je metoda oslobađanja biološki aktivnih sastojaka biljka koristeći selektivna otapala pomoću standardiziranih postupaka (Handa i sur., 2008). Svrha ekstrakcije je odvajanje topljivih biljnih metabolita od netopljivih staničnih ostataka. Početni sirovi ekstrakti pomoću ovih metoda sadrže složene smjese mnogih biljnih metabolita, kao što su alkaloidi, glikozidi, fenolni, terpenoidi i flavonoidi (Azwanida, 2015). Materijal za ekstrakciju može biti svježiji ako se zbog problema degradacije s takvim materijalom počne raditi unutar 3 sata nakon berbe, a suhi materijal je praktičniji te može biti mljeven ili u prahu. Usporedbom ekstrakta svježeg i sušenog lišća *Moringa olifera* zaključeno je da nema velike razlike u ukupnim fenolima, a razina flavonoida je veća u uzorku sušenog lišća. Ako je predpriprema suhog materijala podrazumijevala pretvorbu u prah, takav uzorak ima homogenizirane i manje čestice te stoga veću dodirnu površinu sa otapalom što je bitno kako bi otapalo došlo do što većeg broja ciljanih molekula. Veličina čestice manja od 0,5 mm je idealna za uspješnu ekstrakciju (Azwanida, 2015). Na tržištu su prisutni različiti sustavi otapala, a odabir uvelike ovisi o specifičnoj prirodi ciljanog bioaktivnog spoja. Za ekstrakciju hidrofilnih spojeva koriste se polarna otapala poput metanola, etanola ili etil-acetata, a za ekstrakciju više lipofilnih spojeva, diklormetan ili mješavina diklormetan/metanol u omjeru 1:1. U nekim slučajevima upotrebljava se heksan kako bi se uklonio klorofil (Cosa i sur., 2006). Najčešće korišteno otapalo ipak je voda jer je metoda ekstrakcije koja se najčešće koristi ona za koju nije potrebno imati laboratorij, a to je domaća priprema čaja. Čaj je jedno od najpopularnijih pića koje se konzumira u cijelom svijetu. Proizvodi se i konzumira oko tri milijarde kilograma čaja godišnje, a mnogo studija pokazuje da polifenoli iz čaja smanjuju rizik od raznih oboljenja. Tipičan čajni napitak, pripremljen u omjeru od 1 g lista, 100 ml vode i 3 minute zakuhavanja, obično sadrži 250-350 mg čajne krute tvari koja se sastoji od 30-42% katehina i 3-6% kofeina (Khan i Mukhtar, 2007). Najčešći čimbenici koji utječu na procese ekstrakcije su svojstva matrice biljnog dijela, odabir otapala, temperatura, tlak i vrijeme (Hernandez i sur., 2009). Nekonvencionalne metode, koje su ekološki prihvatljivije zbog smanjene uporabe sintetičkih i organskih kemikalija, skraćenog vremena rada, boljih prinosa i kvalitete ekstrakta, razvijene su u posljednjih 50 godina (Smith, 2003). Ekstrakcija pomoću ultrazvuka, probavnih enzima, pulsirajućeg električnog polja, ekstruzija, ohmičko grijanje, superkritičnim tekućinama, zagrijavanje mikrovalovima i

ubrzanim otapalima neke su od ne-konvencionalnih metoda ekstrakcija kojima se pokušava poboljšati ukupni prinos i selektivnost bioaktivnih sastojaka iz biljnih materijala (Azmir i sur., 2013). Sve ekstrakcijske metode imaju isti cilj: izdvojiti ciljane bioaktivne komponente iz biljnog uzorka, povećati selektivnost analitičkih metoda, povećati osjetljivost bioloških analiza povećanjem koncentracije spojeva koji se žele istražiti, prevesti bioaktivne komponente u prikladniji oblik za detekciju i separaciju, i osigurati reproducibilnu metodu neovisnu o razlikama u uzorcima (Smith, 2003). Konvencionalna metode ekstrakcije, poput Soxhletha, još uvijek se smatraju jednom od referentnih metoda za usporedbu uspjeha novorazvijenih metodologija. Bazira se na principu neprestanog dovoda svježeg otapala u kontakt s biljnim materijalom, jednostavna je za provođenje i ne zahtjeva filtraciju. Mane ove metode kao i nekih drugih tradicionalnih metoda je zahtjevnost na vremenu, daje mali prinos, nije selektivna te koristi otapala upitne sigurnosti. U tradicionalne metode ekstrakcije ubrajamo Soxhletovu ekstrakciju, maceraciju i hidrodestilaciju. Soxhletov ekstraktor je primarno napravljen za ekstrakciju lipida ali njegova uporaba danas je proširena, a često se koristi upravo za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz prirodnih izvora (Herrero, 2006). Maceracija je tehnika najčešće korištena za proizvodnju vina ali u široj uporabi je i kod istraživanja vezanih uz medicinsko bilje, a podrazumijeva namakanje biljnog materijala (grubi ili u prahu) u začepljenom spremniku s otapalom, na sobnoj temperaturi u minimalnom razdoblju od tri dana uz česta mućkanja. Proces ima za cilj omekšati i razbiti stjenku biljne stanice kako bi se oslobodile topive fitokemikalije. Pravilnim odabirom primjenjene temperature kao i odgovarajućeg otapala može se uvelike smanjiti volumen korištenog otapala kao i povećati uspješnost samog procesa (Vankar, 2004). Najjednostavnija definicija hidrodestilacije bi bila - isparavanje i naknadna kondenzacija tekućine (Baser i Buchbauer, 2010). Hidrodestilacija se primjenjuje za izdvajanje sastojka koji se ne otapaju ili vrlo slabo otapaju s vodom, proces traje od 1-10 h. Razlikujemo tri vrste vodene ekstrakcije; vodena destilacija, vodena i parna destilacija, i direktna destilacija parom (Vankar, 2004). Nedostatak ovih metoda je primjena visoke temperature što dovodi do promjene na nekim spojevima ili njihovog uništenja što pak dovodi do ograničenja da će se metoda primjenjivati samo kod termostabilnih spojeva. Većina organskih spojeva poput polifenola ne može se otopiti u vodi pa je ova metoda zbog polarnosti otapala ograničena, ali voda je prihvatljiva za okoliš, nije zapaljiva ni toksična te je lako dostupna što su ujedno i prednosti ove metode (Ong i sur., 2006). Može se zaključiti da, nema univerzalne metode ekstrakcije koja bi bila idealna i svaki postupak ekstrakcije treba biti jedinstven za određeni materijal. Procjena i odabir pripreme materijala kao i same metode ekstrakcije ovisi o ciljevima studije, uzorcima i ciljanim spojevima (Azwanida i sur., 2015). Razvoj i inkorporiranje

hibridnih metoda s obzirom na karakteristike biljnog materijala i bioaktivnog spoja potrebno je istražiti (Azmir i sur., 2013).

Prema literaturnim podacima, biljne ekstrakte karakterizira visok sadržaj bioaktivnih spojeva, od kojih su najzastupljeniji oni iz skupine antioksidansa (polifenoli i fenolne kiseline) i polifenolnih spojeva (fenoli i flavonoidi). U biljnim ekstraktima moguće je utvrditi i određenu količinu proteina (oko 1,9 g/100 g), ugljikohidrata (12,3 g/100g) i masti (0,1g/100g) (Eltayeib i Hamade, 2001).

2.2.1. Biološki aktivni spojevi

Biološki aktivni spojevi uglavnom su sekundarni produkti biljnog metabolizma odnosno komponente biljke koje nastaju nakon njenog primarnog rasta i razvoja. Oni nemaju ulogu u razvoju biljke nego joj pomažu povećati svoju opću sposobnost preživljavanja i svladavanja lokalnih izazova omogućujući joj da komunicira sa svojom okolinom. Nastaju u ovisnosti o potrebama biljke, a jedni od najjednostavnijih primjera su sinteza arome cvjetnih vrsta biljka kako bi privukle kukce koji ju oprašuju i sinteza toksina kako bi odbili patogene ili suzbili rast biljke koja im konkurira za prostor. Sekundarni biljni metaboliti izazivaju farmakološke ili toksikološke učinke na ljude i životinje (Azmir i sur., 2013) te pridonose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća (Alasalvar i sur., 2001). Prema Croteau i sur. (2000) bioaktivne komponente podijeljene su u tri kategorije: (a) Terpeni i terpenoidi (otprilike 25 000 vrsta), (b) alkaloidi (otprilike 12 000 vrsta) i fenoli (otprilike 8 000 vrsta).

Fenolni spojevi: Sintetiziraju ih biljke tijekom normalnog razvoja kao odgovor na stresne uvjete kao što su infekcije, oštećenja i UV zračenje. Nastaju u svim dijelovima biljke i predstavljaju vrlo raznoliku skupinu bioaktivnih spojeva nastalih iz fenilalanina i tirozina. U prirodi su uglavnom u esterificiranom ili konjugiranom obliku tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine. Fenolni spojevi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998). Prema kemijskoj strukturi, fenolni spojevi u biljkama dijele se na: (i) flavonoide, (ii) fenolne kiseline, (iii) kumarine, (iv) stilbene, (v) hidrolizirane i kondenzirane tanine (Shadidi i Naczek, 2004). Polifenoli su glavni antioksidansi u našoj prehrani i česti sastojci hrane biljnog podrijetla, dnevno se prehranom unese oko 1 g što je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa (Scalbert i sur., 2005). Pozitivna djelovanja polifenola navedena u znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: antiinflamatorno, antihipertenzivno, antiaritmično, antimikrobno, antifungalno,

diuretičko, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antikoagulirajuće, analgetsko, antihepatotoksično, antimalarično, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Manach i sur., 2005). Antioksidacijsko djelovanje polifenola povezuje se s njihovom aromatskom strukturom koja omogućava delokalizaciju elektrona i postojanje više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona što dovodi do inaktivacije slobodnih radikala (Kazazić, 2004). Alkaloidi su prirodni organski spojevi koji sadrže dušik. Neki se u malim količinama koriste kao jaki i nezamjenjivi lijekovi, dok su gotovo svi u većim količinama vrlo jaki otrovi. Alkaloidi su proizvodi metabolizma biljaka no njihova uloga u biljci nije razjašnjena. Prvi alkaloid izoliran iz biljnog materijala je morfin. Mogu se naći u svim dijelovima biljke no oni obično tu ne nastaju već se samo odlažu, vjerojatno kao posljednji produkt tvarne izmjene spojeva s dušikom. Čisti alkaloidi većinom su bijeli sitnokristalni prašci ili tekućine. Netopljivi su u vodi, ali topljivi u anorganskim kiselinama i u organskim otapalima. Njihove su soli čvrste, topljive u vodi, a netopljive u organskim otapalima. U medicini se koriste kao analgetici i anestetici, no mogu djelovati i kao sedativi, hipnotici i narkotici. Djeluju kao citostatici (sprečavaju staničnu diobu) pa se to njihovo djelovanje koristi u sprečavanju daljnjeg rasta tumora. Koriste se i u poljoprivredi za uništavanje štetočina. Najpoznatiji alkaloid u širokoj upotrebi je kofein koji je jedan od alkaloida biljke kave. Od ostalih alkaloida koriste se atropin (ubrzava rad srca, može uzrokovati infarkt), muskarin i pilokarpin (djeluju suprotno od atropina), ergometrin (koristi se za vrijeme porođaja), kodein (smanjuje kašalj), nikotin (paralizira ganglije vegetativnog sustava), kokain (lokalni anestetik) (Dobrivojević, E-škola, 2006).

Terpeni su velika grupa prirodnih spojeva opće formule $(C_5H_8)_n$. Kroz povijest su se upotrebljavali i još se upotrebljavaju u razne svrhe i u svim područjima života kao što su: proizvodnja parfema, medicina, prehrambena industrija. Poznato je oko 30000 različitih terpena, a njihova osnovna struktura izgrađena je od 2- metilbutanske jedinice koja se često naziva i izoprenska jedinica. Terpeni se često nazivaju i izoprenoidi. S obzirom na funkcijske skupine terpene uglavnom čine ugljikovodici, alkoholi i njihovi glikozidi, eteri, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri. Terpeni su hlapljive tvari koje daju biljkama i cvijeću njihov karakterističan miris. Biološka i kemijska funkcija terpena u biljkama još nije u potpunosti razjašnjena. Brojne biljke proizvode hlapive terpene s ciljem privlačenja određenih insekata u svrhu oprašivanja ili odbijanja određenih životinja, a te biljke imaju specifičan miris, okus i često imaju farmakološko djelovanje. Nadalje terpeni imaju važnu ulogu kao signalni spojevi i faktori rasta (fitohormoni) (Breitmaier, 2006).

Za biološki aktivne komponente se ne smatra da su esencijalni nutrijenti ali ustanovljeno je da induciraju pozitivne farmakološke efekte ako se konzumiraju u adekvatnoj količini. Nedavno globalno pobuđena svijest o funkcionalnim proizvodima i njihovim benefitima za zdravlje ljudi odgovorna je za rast tržišta funkcionalnih proizvoda. Takvi proizvodi sadrže biološki aktivne molekule koje kada su konzumirane u većoj količini pokazuju pozitivni farmakološki učinak. Tržište funkcionalnih proizvoda, proizvodnja lijekova koji sadrže biološki aktivne komponente kao i proizvodnja suplemenata u prehrambenoj industriji teže za efikasnom i točnom analitičkom metodom kvantifikacije biološki aktivnih komponenta kako u sirovim materijalima tako i u gotovim proizvodima (McGoverin, 2010).

2.3. METODE ANALIZE FIZIKALNIH I KEMIJSKIH SVOJSTAVA EKSTRAKATA

2.3.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidansi su molekule sposobne za inhibiciju oksidacije drugih molekula. Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do prijenosa elektrona ili vodika sa supstance na oksidativni agens, kojom mogu nastati slobodni radikali. Oni mogu započeti lančanu reakciju koja može uzrokovati štetu na stanici ili njeno uništenje. Iako su reakcije oksidacije neophodne za život, jednako tako mogu biti i štetne. U biljnom i životinjskom svijetu nalazimo čitav niz različitih vrsta antioksidansa. Neki od njih su vitamin C, vitamin E, polifenoli i flavonoidi, enzimi kao što su katalaza i superoksid dismutaza (SOD) spadaju u red antioksidansa. Antioksidansi su zaslužni za obranu organizma od bolesti uzrokovanih slobodnim radikalima. Primarni antioksidansi prekidaju lančanu reakciju tako da reagiraju s lipidnim radikalom i stvaraju stabilni produkt. U ovu grupu spadaju: fenoli, vitamini, minerali, flavonoidi, karotenoidi, likopeni, diterpeni, češnjak, kumin i njihovi derivati. Sekundarni antioksidansi su fenolni spojevi koji mijenjaju funkciju vezanog slobodnog radikala i na taj način zaustavljaju lančanu reakciju. U hrani najveći izvor antioksidansa predstavljaju polifenoli. Polifenoli sadrže flavonoide i fenolnu kiselinu. Ova grupa uključuje i vitamine, minerale, organosulfurale i karotenoide. Važno je napomenuti da postoji velika razlika između antioksidativne i antiradikalske aktivnosti. Antioksidativnu aktivnost karakterizira sposobnost antioksidansa da uspori oksidaciju tvari. Antiradikalnu aktivnost karakterizira sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalom i na taj način spriječi lančanu reakciju (Pregiban, 2017). Antioksidacijski kapacitet ili aktivnost predstavlja sposobnost raznih sastojaka biljke i/ili hrane u pronalasku i

neutralizacije slobodnih radikala, a za mjerenje antioksidativne aktivnosti spojeva služe nam različite metode među koje se generalno mogu podijeliti na spektrometrijske, elektrokemijske i kromatografske metode. Elektrokemijske metode se temelje na mjerenju intenziteta struje i potencijala radne elektrode. Ciklička voltametrija, amperometrija i biamperometrija opisane su kao najznačajnije elektrokemijske metode. Kromatografske metode temelje se na razdvajanju spojeva između stacionarne i mobilne faze iz smjese spojeva, nakon čega se antioksidativni kapacitet spojeva određuje spektrofotometrijskom metodom. U spektrometrijskim metodama, antioksidans donira vodik radikalu ili radikalskom kationu, te na taj način reagira s njim. U ovom radu ukratko su objašnjene DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) i FRAP (ferric reducing antioxidant power) metode, a u ostalim radovima spominju se ili koriste i ostale spektrometrijske metode poput ORAC (oxygen radical absorption capacity), HORAC (hydroxyl radical averting capacity), TRAP (total peroxy radical trapping antioxidant parameter), PERAP (potassium ferricyanide reducing power) i CUPRAC (cupric reducing antioxidant power) (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Pregiban, 2017; Knez, 2014).

2.3.1.1. DPPH metoda

DPPH jedna je od najčešće korištenih metoda za procjenu antioksidacijskog kapaciteta biljaka i/ili hrane, a princip na kojem se temelji je redukcija alkoholne otopine DPPH u prisutnosti antioksidansa. DPPH radikal (α -difenil- β -pikrilhidrazil, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) stabilan je dušikov radikal ljubičaste boje, a nespareni elektron iz dušikovog atoma reducira se primanjem vodikovog atoma iz antioksidansa pri čemu dolazi do gubitka ljubičaste boje. Ta promjena boje mjeri se promjenom apsorbancije pri valnim duljinama od 515-528 nm (Turkmen i sur., 2006). Metoda se izvodi u otopini metanola jer se time olakšava ekstrakcija antioksidativnih spojeva iz uzorka. Prednost metode je da DPPH reagira s cijelim antioksidansom, a dovoljno vremena omogućuje da DPPH reagira sporo i kod slabih antioksidansa. Može se koristiti za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa, te u organskim i vodenim otapalima. Reakcijski mehanizam između antioksidansa i DPPH• ovisi o strukturnoj konformaciji antioksidansa (Bondet i sur., 1997).

2.3.1.2. ABTS metoda

Koristi se za određivanje sposobnosti uklanjanja radikala pomoću flavonoida i fenola. ABTS metoda je osjetljivija od DPPH. Primjenjuje se kod različitih pH vrijednosti dok se DPPH metoda primjenjuje samo kod kiselih odnosno niskih pH vrijednosti što ju čini pogodnom metodom za istraživanja utjecaja pH na antioksidativnu aktivnost. Također, ABTS je topljiv u organskim i vodenim otapalima (brza reakcija) pa se primjenjuje za testiranje antioksidativne aktivnosti uzoraka u različitom mediju. Još jedna prednost ABTS metode je da ABTS reagira brzo s uzorkom u vodenim otopinama pufera i postiže stacionarno stanje unutar 30 minuta, dok se kod DPPH metode uspostavlja približno stacionarno stanje tek nakon 8 sati. (Pregiban Kristina-moji radovi). U ovoj metodi se koriste dva slobodna radikala: 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline). Taj kationski radikal je plavo-zelene boje, a dodavanjem antioksidansa dolazi do gubitka boje, a to se utvrđuje spektrofotometrijski na valnoj duljini 734 nm (Shalaby i Shanab, 2013).

2.3.1.3. FRAP metoda

Ova metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} iona - TPTZ (željezo(III)-2,4,6- tri(2-piridil)-s-tirazin) u Fe^{2+} - TPTZ s antioksidansom putem SET mehanizma. Rezultat te reakcije je intenzivno plava boja otopine s apsorbancijom na 550 nm. Redukcija se prati mjerenjem apsorpcije na 593 nm pomoću spektrofotometra s nizom dioda (Moharram i Youssef, 2014).

Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri $\text{pH}=3,6$ kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Živko, 2012). Potencijal ove redoks reakcije iznosi 0,77 V te će posljedično svi spojevi s nižim iznosom redoks potencijala reducirati TPTZ što će dovesti do rezultata veće izmjerene antioksidacijske aktivnosti promatranog uzorka (Rajurkar i Hande, 2011).

2.3.1.4. Ukupni polifenoli

Ukupni polifenoli određuju se spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline koji reagira s fenoksid

ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 765 nm i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Lachman i sur., 1998).

2.3.2. Metode određivanja fizikalnih svojstva

2.3.2.1. Suha tvar

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1995).

Standardna metoda sušenja podrazumijeva određivanje mase uzorka nakon sušenja na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Suha tvar često predstavlja mjeru iskorištenja ekstrakcije (Hernandez i sur., 2009).

2.3.2.2. pH

pH (kratica od lat. *potentia hydrogenii*: snaga vodika) (pH-vrijednost), broj koji služi kao mjera kiselosti (aciditeta), odn. lužnatosti (alkaliteta) vodenih otopina, negativan dekadski logaritam množinske koncentracije (točnije: aktiviteta) vodikovih iona u otopini. Pri 25 °C vrijednost pH može biti između 0 i 14. U čistoj vodi i u neutralnim vodenim otopinama koncentracija vodikovih iona (H^+) i hidroksidnih iona (OH^-) jednaka je i pri 25 °C iznosi $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Prema tomu, njihov je pH prema definiciji jednak 7. Koncentracija vodikovih iona u kiselim otopinama veća je od $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, pa je njihov pH manji od 7; u lužnatim je otopinama koncentracija hidroksidnih iona veća, a vodikovih iona manja od $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, pa je njihov pH veći od 7.

pH vrijednost biljnih ekstrakata uglavnom se kreće u rasponu od 4 do 6,5, a ovisi o primijenjenom otapalu, procesu ekstrakcije te o spojevima koji se u određenim fazama ekstrahiraju. U lužnatom mediju antioksidativni kapacitet biljnih ekstrakata se smanjuje (Bayliak i sur., 2016).

2.3.2.3. Ukupne otopljene tvari (TDS) i vodljivost

Električna vodljivost je mjera za količinu otopljenih čestica (iona) u vodi. Koncentracija rastopljenih soli u vodi određuje vodljivost. Temperatura vode utječe na električnu vodljivost. Povećanjem temperature vode za 1°C, vodljivost raste za ca. 2 %. Stoga se vodljivost općenito odnosi na utvrđenu temperaturu (većina uređaja čine to automatski). Prikaz na ekranu uređaja slijedi u $\mu\text{S cm}^{-1}$ (mikrosiemens po cm) ili mScm^{-1} (milisiemens po cm).

Ispod $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ podrazumjeva potpuno neslanu vodu, 100 - 1.000 μScm^{-1} pitku vodu i oko 50.000 μScm^{-1} podrazumjeva da je ispitivani uzorak morska voda (Anonymus 1, 2008). Elektrovodljivost je sposobnost vode da provodi električnu energiju. Ta sposobnost ovisi o prisutnosti iona, o njihovoj ukupnoj koncentraciji, o pokretljivosti i valenciji iona i o temperaturi mjerenja. Otopine većine anorganskih spojeva relativno su dobri vodiči. Nasuprot tome molekule organskih spojeva, koje ne disociraju u vodenj otopini, struju provode vrlo slabo (ako je uopće provode). Jedinica mjere elektrovodljivosti je mikrosiemens po centimetru ($\mu\text{S cm}^{-1}$), što je recipročna vrijednost jedinici otpora, mikroohmu po centimetru, tj.: $1 \mu\text{Scm}^{-1} = 1/1 \mu\Omega\text{cm}^{-1}$. Izmjerenom vrijednošću elektrovodljivosti možemo procijeniti stupanj mineralizacije vode i tako ocijeniti o kojoj je vrsti vode riječ. Ukupne otopljene tvari (Total Dissolved Solids) su u vodi otopljene anorganske soli. Mjerna jedinica je miligram na litru (mg L^{-1}). Glavninu soli čine kationi kalcija, magnezija, natrija i kalija, te anioni karbonata, hidrogenkarbonata, klorida, sulfata i nitrata. Otopljene tvari u vodi mogu utjecati njen okus (Dadić, 2001).

2.3.2.4. Pepeo

Pepeo je anorganski ostatak koji ostaje nakon uklanjanja vode i organskih tvari zagrijavanjem u prisutnosti kisika, a predstavlja mjeru ukupne količine minerala u hrani. Analitičke tehnike pružanja podataka o ukupnom udjelu minerala temelje se na činjenici da se minerali mogu razlikovati od svih ostalih sastojaka u hrani na neki mjerljiv način. Najraširenije korištene metode temelje se na činjenici da se zagrijavanjem minerali ne uništavaju i da imaju malu hlapivost u odnosu na ostale komponente hrane. Tri glavne vrste analitičkih postupaka koje se koriste za određivanje sadržaja pepela u hrani temelje se na principu: suho pepeljanje, vlažno pepeljanje i niskotemperaturno plazma suho pepeljanje. Metoda odabrana za određenu analizu ovisi o razlogu provođenja analize, vrsti analizirane hrane i dostupnoj opremi. Pepeo se također može koristiti kao prvi korak u pripremi uzoraka za analizu specifičnih minerala, atomskoj

spektroskopiji ili različitim tradicionalnim metodama. Sadržaj pepela u svježim namirnicama rijetko prelazi 5%, iako neka prerađena hrana može imati sadržaj pepela čak do 12%, npr. sušena govedina (McClements, 2003).

2.3.3. NIR spektroskopija

Blisko infracrvena spektroskopija (NIR) temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja valnih duljina u rasponu 780–2500 nm. NIR spektri namirnica sadrže široke pojaseve koji proizlaze iz preklapajućih apsorpcija, a koji uglavnom odgovaraju vrpčama viših tonova i kombinacijama vibracijskih modova koji uključuju C-H, O-H i N-H kemijske veze. Koncentracije sastojaka poput vode, proteina, masti i ugljikohidrata u načelu se mogu odrediti klasičnom apsorpcijskom spektroskopijom. Međutim, za većinu uzoraka hrane, ove kemijske informacije prikrivaju promjene u spektru uzrokovane fizičkim svojstvima, poput veličine čestica praha. To znači da NIR spektroskopija postaje sekundarna metoda koja zahtijeva kalibriranje prema referentnoj metodi za sastojak od interesa. Kao posljedica fizike difuzne propusnost, refleksije i složenosti spektra, kalibriranje se obično provodi pomoću multivarijatne analize (kemometrija). NIR spektroskopija rutinski se koristi za kompozicijsku, funkcionalnu i senzornu analizu prehrambenih sastojaka, procesnih intermedijara i konačnih proizvoda. Jedna od prednosti NIR tehnologije je ta da

omogućava istodobno mjerenje više sastavnih dijelova (Osborne, 2006). Još jedna definicija bila bi da je to je jedna od metoda koja se koristi za kontrolu fizikalnih, ali i kemijskih procesa pa tako i brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva u procesu (Jednačak i Novak, 2013). Ekspeditivnost pomoću koje se mogu snimiti spektri i činjenica da nije potrebna prethodna obrada uzorka promovirala je blisko-infracrvenu spektroskopiju u svijetu instrumentalne analize. Primjena NIR spektroskopije omogućila je razvoj novih metoda koje su brže od njihovih tradicionalnih inačica, a omogućuje i izbjegavanje upotrebe toksičnih ili korozivnih reagensa u nekim slučajevima (Dou i sur., 2007).

Jedan od glavnih izazova u svijetu prehrambene industrije je dobiti precizne informacije o proizvodima koji su na tržištu i njihovom procesu proizvodnje. NIR omogućuje široki raspon primjena u lancu prehrambene proizvodnje kontrolirajući indikatore kvalitete kako u sirovom tako i u finalnom proizvodu. (Ružičkova i Šustova, 2006). NIR pruža informacije o kemijskom sastavu kao i fizičke informacije o veličini čestica i gustoći mase (Pasikatan i sur., 2001). NIR spektroskopija širi svoje područje primjene i na genetiku i transgene proizvode gdje se pokazala

uspješna u identifikaciji istih, čak je brža, ne destruktivna i jeftinija nego PCA i ELISA (Alishahi i sur., 2010).

Prema McGoverin i sur. (2010) NIR spektroskopija korištena je za kvantifikaciju karotenoida, polifenola, masnih kiselina, glukozinolata na velikom spektru proizvoda kao npr. vinima, mliječnim proizvodima, čajevima, voću, povrću, začinskom bilju i žitaricama. Spektralna analiza potpomognuta je različitim kemometrijskim tehnikama jer spektar obuhvaća veliku količinu podataka koje je potrebno kombinirati s drugim metodama kako bi se utvrdilo između kojih uzoraka postoje razlike.

U radu iz 2018, Belšak-Cvitanović i suradnici koriste skoro isto široko rasprostranjeno bilje kao i ovaj rad kako bi između ostalog njihovim vodenim ekstraktima odredili parametre: makronutrijente i sekundarne biljne metabolite. Zaključuju da se NIR spektroskopija zajedno s kemometrijskom analizom svih utvrđenih analitičkih parametara pokazala prikladna za određivanje aminokiselina, ugljikohidrata te određivanje polifenola u ekstraktima ljekovitih biljaka.

2.3.4. Kemometrija

Kada se radi kvalitativna i kvantitativna analiza složenih sustava kao što je hrana dolazi se do rezultata koje je problematično analizirati klasičnim statističkim metodama. NIR spektroskopija često daje rezultate koji nisu jasni odnosno nalaze se u obliku kojeg je teško ili nemoguće čitati, spektri se često preklapaju i može ih biti stotine, a sa tako velikim brojem nemoguće je ulaziti u daljnje kalkulacije ili nešto uspoređivati. Prethodna separacija sastojaka ili povećanje razlučivosti spektra neke su od metoda koje su se koristile prije pojave kemometrijskih tehnika. Kemometrija se definira kao znanstvena disciplina koja koristi matematičke i/ili statističke metode kako bi oblikovala i odabrala optimalan mjeriteljski postupak ili eksperiment te omogućila dobivanje maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka. Kemometrija omogućuje povezivanje rezultata mjerenja na kemijskim sustavima u organizirani sustav. Spektroskopske tehnike u kombinaciji sa kemometrijskim metodama koriste se za praćenje procesa i upravljanje kontrolom kvalitete (Matijević i Blažić, 2008; Gad i sur., 2012).

U prehrambenoj industriji primjenjuje se često u svrhu uočavanja sličnosti odnosno razlika među uzorcima (tzv. grupiranje) ili radi prikazivanja uzoraka u dvo- ili trodimenzionalnom sustavu na temelju raznih karakteristika uzoraka. (Granato i sur., 2017).

U istraživanju koje pokriva ovaj rad korištene su sljedeće tri metode:

- (1) Analiza glavnih komponenta, PCA (eng. *Principal Component Analysis*)
- (2) Analiza najmanjih kvadrata, PLS (eng. *Partial Least Squares*)
- (3) Umjetne neuronske mreže, ANN (eng. *Artificial Neural Networks*).

PCA (principal component analysis), koristi se za obradu velikog broja podataka dobivenih NIR metodom. PCA uočava razlike u snimljenim spektrima uzoraka, te ih obrađuje tako da se dobiju najvažnije karakteristike iz kojih se dobivaju nove ortogonalne varijable koje zovemo „principal components“. Iz njih se računaju „faktori“ za svaki uzorak, koji je linearna kombinacija intenziteta određene karakteristike uzorka koji je od relativne važnosti za model. Faktori se pozicioniraju u kvadrante na grafu. Zbog toga što je faktor ovisan i izračunat na temelju spektralnih karakteristika, uzorci koji su prema određenim komponentama slični, biti će prikazani blizu jedan drugoga na grafu, a što se više razlikuju, bit će udaljeniji (Valinger i sur., 2017). Faktori predstavljaju razlike u karakteristikama uzorka, tj. u njihovom kemijskom sastavu, no ne može se točno znati o kojim spojevima se radi. Razlike između uzoraka utvrđuju se i PLS modelima (partial least squares). To je tehnika koja kombinira karakteristike iz PCA analize i višestruke linearne regresije. PLS analiza temelji se na povezanosti intenziteta signala i svojstava uzorka. Ona omogućava sofisticiran statistički pristup koristeći cijelu regiju spektra umjesto izoliranih analitičkih vrpci. PLS je vrlo korisna tehnika ukoliko je potrebno predvidjeti skup zavisnih varijabli iz jako velikog skupa nezavisnih varijabli (prediktora) (Abdi, 2010).

2.3.4.1. Analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis, PCA*)

Analiza glavnih komponenti omogućuje analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. (Jednačak i Novak, 2013). Služi kako bi se identificirali uzorci podataka odnosno skup podataka koji slijede određeni niz, a kao takvi se ne bi mogli vidjeti *a priori* (Gad i sur., 2012). Primjenjuje se i za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljne analize fizikalnog ili kemijskog procesa. Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u n -dimenzijskom prostoru, gdje svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu x_i ($i = 1, 2, \dots, n$). Uvođenjem glavnih komponenti (engl. *Principal Components, PC*) smanjuje se dimenzionalnost prostora, što pojednostavnjuje interpretaciju podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, dok preostalu varijaciju opisuju ostale glavne komponente (PC2, PC3,...). Vizualizacija podataka se često izvodi pomoću tzv. faktorskih koordinata (eng. *score plots*). Vrijednosti faktorskih koordinata za spektre koji se

razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih koordinata za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućuje i njihovo grupiranje (Jednačak i Novak, 2013).

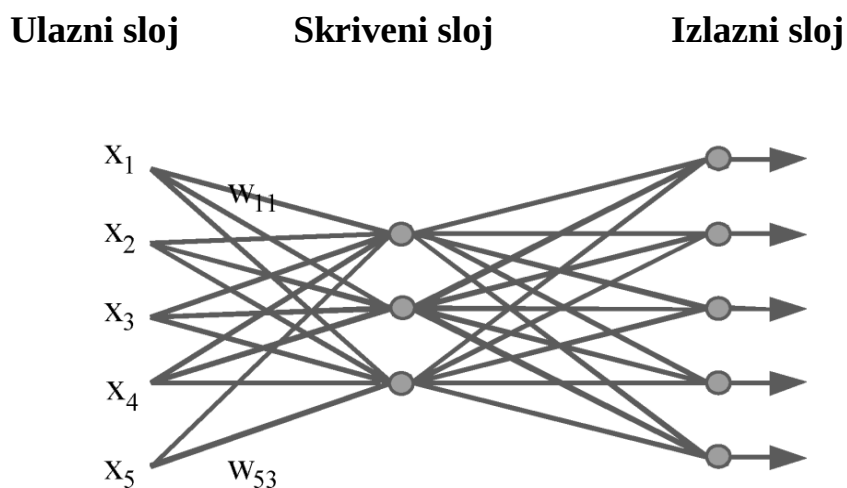
2.3.4.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (eng. Partial Least Squares, PLS)

PLS je multivarijatna statistička metoda razvijena 1975 godine od strane Herman Wolda. Još 1987 Lorber i sur. navode da je primjena ove metode u prirodnim znanostima sve češća i to u ulozi kalibracijskog modela za predikciju raznih varijabli gdje se pokazala uspješnijom od ostalih metoda. Metodom parcijalne regresije najmanjih kvadrata mogu se analizirati podaci unatoč malim razlikama u spektrima. Za razliku od PCA, podaci se PLS metodom opisuju pomoću fizičkog modela u kojemu broj varijabli treba biti što je moguće manji. U PCA metodi su glavne komponente određene samo varijancom mjerenih varijabli i neovisne su o njihovom slaganju s traženim svojstvom, dok se u PLS modelu latentne varijable odabiru tako da se dobije najbolja slaganja ispitivanih svojstava i mjerene varijable. Svrha analize PLS je opisati odnos između objekata u x-prostoru i njihovog položaja u odgovarajućem y-prostoru uz minimalna odstupanja. PLS se može smatrati regresijskim oblikom PCA koji linearnim multivarijatne modelom povezuje podatke smještene u dvije matrice, X i Y (Jednačak i Novak, 2013). Prvo se radi kalibracijski model, što uključuje sakupljanje određenog broja podataka iz snimljenog spektra, koji bi trebali sadržavati sve kemijske i fizičke varijacije koje se kasnije mogu očekivati u nepoznatim uzorcima. Ostali podaci koriste se za validaciju. Metoda se temelji na principu računanja „faktori“ X i „faktori“, Y iz matrica nezavisnih varijabli X i zavisnih varijabli Y. Nove varijable, faktori X su prediktori Y-a, i istovremeno modeliraju X. X i Y faktori (skupovi podataka) su modelirani kako bi se pronašle varijable u X matrici koje će najbolje opisati Y matricu. X faktori su linearne kombinacije originalnih X varijabli, modelirane za određene koeficijente. Prednost PLS-a pred drugim regresijskim metodama je što se može koristiti na multikolinearnim podacima, može se uključiti velik broj predvidljivih varijabli te se istovremeno može modelirati više izlaznih varijabli (Wold i sur., 2001).

2.3.4.3. Umjetne neuronske mreže ANN

Umjetne neuronske mreže - ANN (eng. Artificial Neural Networks) kreirane su na ideji da se pokuša imitirati način na koji funkcionira ljudski mozak. Osnovna gradivna jedinica živčanog sustava je neuron, a slično biološkom neuronu, umjetni prima ulazne informacije povezane s odgovarajućim težinskim faktorom (Huang i sur., 2007). Osnovni princip funkcioniranja ANN

je razvijanje matematičkih algoritama koji neuronskoj mreži daju sposobnost učenja oponašajući procesiranje podataka i prikupljanje znanja ljudskog mozga (Funes i sur., 2015). U najjednostavnijem slučaju neuron zbraja umnoške x_i i w_i i prosljeđuje rezultat do prijenosne funkcije kako bi se dobila neka izlazna informacija. Izlazna informacija se potom šalje do sljedećeg neurona i sada predstavlja ili ulaznu informaciju ili se koristi izravno kao rezultat predviđanja mreže. Težinski faktori predstavljaju koliko su jako međusobno povezani neuroni, budući da neki ulazni signali mogu biti značajniji od drugih, pa se na taj način omogućuje pronalaženje najboljih rješenja. Neuroni su poredani u formi slojeva koji čine tzv. „mrežnu arhitekturu“. Neuroni jednog sloja povezani sa neuronima u barem još jednom sloju. Jedan od najkorištenijih modela je troslojna *feedforward* mreža prikazana na slici 1. Kod ovakvog tipa neuronske mreže ulazni sloj prima ulazni signal iz skupa podataka ili od električnih senzora pri on-line metodi i prosljeđuje informaciju do sljedećeg sloja neurona. Treći, izlazni sloj procesira ulaznu informaciju iz prethodnog sloja i prikazuje ju kao izlaznu informaciju. Slojeve između ulaznog i izlaznog nazivamo skrivenim slojevima i oni predstavljaju jedan oblik crne kutije. Može se koristiti samo jedan skriveni sloj iako neke složenije operacije zahtijevaju i više od jednog, ovisno o problemu (Huang i sur., 2007).



Slika 1 Primjer izgleda neuronske mreže (Huang i sur., 2007)

U svom radu iz 2008 Bašić i sur., između ostalog objašnjavaju postupak učenja mreže: Jednostavnije neuronske mreže moguće je konstruirati tako da obavljaju određeni zadatak. Ovo će redom biti moguće za mreže koje se sastoje od TLU perceptrona, i koje obavljaju unaprijed zadanu logičku funkciju, jer u tom slučaju možemo pratiti što i kako točno mreža radi. U slučaju

kada se koriste složenije prijenosne funkcije, poput sigmoidalne, ili dopušta rad s realnim brojevima, tipično se gubi zor nad načinom kako mreža obrađuje podatke. U tom slučaju uobičajeno je da se definira arhitektura mreže, i prije postupka obrade podatka obavi postupak učenja ili treniranja. Za razliku od konvencionalnih tehnika obrade podataka gdje je postupak obrade potrebno analitički razložiti na određeni broj algoritamskih koraka, kod ovog tipa neuronskih mreža takav algoritam ne postoji. Znanje o obradi podataka, tj. znanje o izlazu kao funkciji ulaza, pohranjeno je implicitno u težinama veza između neurona. Te se težine postupno prilagođavaju kroz postupak učenja neuronske mreže sve do trenutka kada je izlaz iz mreže, provjeren na skupu podataka za testiranje, zadovoljavajući. Pod postupkom učenja kod neuronskih mreža podrazumijevamo iterativan postupak predočavanja ulaznih primjera (uzoraka, iskustva) i eventualno očekivana izlaza. Ovisno o tome da li nam je u postupku učenja *a priori* znan izlaz iz mreže, pa ga pri učenju mreže koristimo uz svaki ulazni primjer, ili nam je točan izlaz nepoznat, razlikujemo dva načina učenja: (1) učenje s učiteljem (eng. *supervised learning*) – učenje mreže provodi se primjerima u obliku para (ulaz, izlaz), (2) učenje bez učitelja (engl. *unsupervised learning*) – mreža uči bez poznavanja izlaza. Skup primjera za učenje često se dijeli na tri odvojena skupa: skup za učenje, skup za testiranje i skup za provjeru (validaciju). Primjeri iz prvog skupa služe za učenje u užem smislu (podešavanje težinskih faktora). Pomoću primjera iz drugog skupa vrši se tijekom učenja provjera rada mreže s trenutnim težinskim faktorima kako bi se postupak učenja zaustavio u trenutku degradacije performanse mreže. Umjetnu neuronsku mrežu moguće je, naime, predtrenirati - nakon određenog broja iteracija mreža gubi svojstvo generalizacije i postaje stručnjak za obradu podatka iz skupa primjera za učenje dok preostale podatke obrađuje loše. Stalnim praćenjem izlaza iz mreže dobivenog pomoću primjera iz skupa za testiranje moguće je otkriti iteraciju u kojoj dobiveni izlaz najmanje odstupa od željenog. Točnost i preciznost obrade podataka moguće je naposljetku provjeriti nad trećim skupom primjera – skupom za provjeru. Uz pojam učenja umjetne neuronske mreže vezani su pojmovi iteracije i epohe. Pod iteracijom podrazumijevamo korak u algoritmu postupka za učenje u kojem se odvija podešavanje težinskih faktora, dok je epoha jedno predstavljanje cjelokupnog skupa za učenje. Ovisno o broju primjera predodčenih mreži za trajanje jedne iteracije, razlikujemo: (1) pojedinačno učenje (eng. *on-line training*) – u jednoj iteraciji predočavamo samo jedan primjer za učenje (tj. kod svakog primjera za učenje vrši se prilagodba težinskih faktora), (2) grupno učenje (eng. *batch training*) – u jednoj iteraciji predočavamo sve primjere za učenje (tj. iteracije se podudaraju s epohama).

ANN kao računalna tehnologija u nastajanju ima širok raspon aplikacija kao npr. kontrola, nadzor i modeliranje, prepoznavanje, detekcija i istraživanje uzoraka, obrada slike, optimizacija i obrada signala. Ove se aplikacije mogu koristiti u poljima proizvodnje, agrokulture, poslovanja, marketinga, medicine, transporta, energije i u različitim industrijama kao npr. u šumarskoj industriji ili industriji odjeće da bi se moglo uočiti nedostatke sirovina i konačnog proizvoda (Funes i sur., 2015). Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća umjetne neuronske mreže razvijaju se i koriste u gotovo svim područjima znanosti o hrani i prehrambenoj tehnologiji, pogotovo za analizu sigurnosti i kvalitete hrane, interpretiranje spektara te predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava pri proizvodnji hrane. Svoju primjenu ANN su našle u modeliranju rasta mikrobnih populacija predviđajući na temelju toga sigurnost pojedinih namirnica te predviđajući fizikalne, kemijske te senzorske karakteristike različitih namirnica na temelju različitih procesa proizvodnje i pripreme (Delgado i sur., 2016). ANN se koriste za rješavanje problema u slučajevima kada analitičke metode zakažu ili ih je teško primijeniti za konkretan problem (Funes i sur., 2015). Tako je primjerice upotrijebljena uspješno uz veliki postotak točnosti za: određivanje koncentracije šećera u uzorcima jabuka prethodno snimljenim NIR spektroskopijom (Bochereau i sur., 1992), senzorsku procjenu kvalitete maslinovog ulja (Angerosa i sur., 1996), za modeliranje termičke obrade hrane (Pena i sur., 2001), za modeliranje karakteristika vina (Vlassides i sur., 2001), određivanje udjela topljivih čvrstih tvari analizom NIR spektara u uzorcima rajčice itd. (Peiris i sur., 1998).

Glavni nedostaci umjetnih neuronskih mreža su:

(1) Sposobnost predikcije snažno ovisi o mogućnosti da se mreža nauči razmišljati odnosno o preciznosti učenja te o samoj arhitekturi mreže; (2) Vrijeme učenja odnosno treninga je veliko; (3) ANN-ovi modeli su složeni i teško ih je interpretirati.

PC-ANNs (eng. Principal component artificial neural networks) metoda je prema Ying Dou i sur. (2007) razvijena kako bi se ove mane nadišle, a pokazala se kao odličan izbor za uspješno modeliranje ne-linearnih sistema.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Biljke korištene tokom istraživanja kupljene su od „Suban specijalizirana prodavaonica- biljna drogerija“ u pakiranjima od 1 kg sušenog proizvoda, a one su: Melisa (*Melissa Officinalis* L.), Kadulja (*Salvia officinalis* L.), Maslačak (*Taraxacum officinale* L.), Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), Neven(*Calendula officinalis* L.), Kamilica (*Matricaria recutita*), Gospina trava (*Tilia cordata*), Trputac (*Plantago lanceolata*), Maslina (*Plantago lanceolata*), Kopriva (*Urtica dioica*), Menta (*Mentha piperita* L.), Lavanda (*Lavandula angustifolia* L.), Stolisnik (*Achillea millefolium*), Preslica (*Equisetum arvense*) i Cvijet lipe (*Tiliae flos*).

3.1.1. Otapala i reagensi

Sljedeća otapala i reagensi su korišteni u eksperimentalnom radu:

Destilirana voda

Kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm

Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Natrijev karbonat (Na_2CO_3), pa. (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)

Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Nizozemska)

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Njemačka)

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) (Sigma Aldrich, Njemačka)

Etanol (Kefo d.o.o., Slovenija)

Galna kiselina, 98 % (AcrosOrganics, SAD)

Trolox (Fluka, Švicarska)

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

Vodena kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka)

Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)

Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)

pH metar (Jenco 601A, SAD)
Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
Laboratorijska peć (Nabertherm L5/11, Njemačka)
Eksikator(Normax, Portugal)
Vorteks (BiosanVortex V1 Pus, Latvija)
Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
Potencijometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
Konduktometar (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska)
NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50µm,
Pribor:
Filter papirod celuloze (veličina pora 20 µm)
Stakleni ljevak
Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 500 mL
Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL
Menzura volumena 100 mL
Metalna špatulica
Aluminijske posudice s poklopcem
Staklene epruvete
Stalak za epruvete
Staklene pipete volumena 10 mL
Pipete volumena 5 mL i 10 mL
Mikropipete volumena 100 µL i 500 µL
Kiveta od kvarcnog stakla

3.2.METODE RADA

3.2.1. Priprema uzorka - ekstrakcija biološki aktivnih komponenta

Ekstrakciju provodimo kako bi oslobodili biološki aktivne komponente iz stanične stjenke biljka u otapalo. Prvi korak je vaganje 2 g sušenog samoniklog bilja u staklenu laboratorijsku čašu volumena 200 mL. Vaganje je odrađeno na analitičkoj vagi (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka). Odvagani uzorci se zatim preliju sa 100 ml destilirane vode, prethodno zagrijane na 80 °C. Tako pripremljena smjesa stavi se u uljnu kupelj s integriranom magnetskom miješalicom (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka) u kojoj se termostatira na 80 °C, 60

minuta pri brzini miješanja od 250 rpm. Nakon 60 minuta, vruća smjesa se profiltrira pomoću staklenog lijevka i filter papira od celuloze veličina pora 20 µm, kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze. Vodenim ekstraktima dalje su se određivale fizikalne i kemijske karakteristike (pH, vodljivost, TDS, udio vode, suha tvar, koncentracija ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet (ABTS, DPPH, FRAP) i pepeo).

3.2.2. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Standardna metoda sušenja podrazumijeva određivanje mase uzorka nakon sušenja na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Ukupnu suhu tvar definiramo kao cjelokupnu količinu tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod određenim uvjetima. Postupak se provodi tako da se u suhu, prethodno označenu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi kvarcni pijesak tako da se pokrije cijelo dno posudice te se ona suši u sušioniku (InkoLab ST60T, Hrvatska) (sa skinutim poklopcem) sat vremena nakon što se postigne temperatura 105°C. Nakon sat vremena, posudice s poklopcima se kliještama izvade iz sušionika i ostavljaju hladiti oko pola sata u eksikatoru. Slijedi vaganje na analitičkoj vagi s točnošću ± 0,0002 g. U ohlađene i izvagane posudice s kvarcnim pijeskom otpipetira se volumen od 3 mL ekstrakta (dvije paralele za svaki uzorak), te se zabilježi masa posudice sa uzorkom prije sušenja. Zatim se uzorci suše 4 sata na 105 °C u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Nakon sušenja, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi. Na kraju se posudice s uzorkom ponovno važu te se bilježi masa nakon sušenja kako bi se mogao izračunati udio suhe tvari i vode.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbama [1] i [2]:

$$\% \text{ vode} = (a-b) * 100 / m \quad [1]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [2]$$

Gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

3.2.3. pH vrijednost ekstrakata

Nakon hlađenja dobivenih ekstrakata na sobnu temperaturu, svakom je uzorku izmjeren pH pomoću pH-metra (Jenco 601A, SAD) u dvije paralele. Mjerenje je obavljeno tako da se sonda uređaja uronila u ekstrakt, te je nakon što se ustalio izmjereni pH očitao sa zaslona uređaja.

3.2.4. Ukupne otopljene tvari (TDS) i vodljivost

Nakon hlađenja uzoraka na sobnu temperaturu, svakom ekstraktu je dva puta izmjerena i očitana vrijednost ukupnih otopljenih tvari prikazana na zaslonu uređaja. Proces podrazumijeva uranjanje elektrode konduktometra (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska) u ekstrakte.

3.2.5. Pepeo

Ova gravimetrijska metoda podrazumijeva oksidaciju sve organske tvari spaljivanjem u peći pod temperaturom $<550^{\circ}\text{C}$. Ostatak nakon spaljivanja predstavlja pepeo.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio pepela u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbi [3]:

$$\% \text{ Pepla} = (m - a) \times 100 / (b - a) \quad [3]$$

Gdje su:

a – masa posudice (g)

b – masa posudice s uzorkom (g)

m – masa posudice s pepelom (g)

3.2.6. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Količina ukupnih polifenola određuje se spektrofotometrijski korištenjem Folin- Ciocalteu reagensa koji reagira s fenolima u kolorimetrijskoj reakciji. Folin-Ciocalteu reagens (koji se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibden kiseline) reagira s fenoksid ionom iz uzorka koji se oksidira, pri čemu se Folin-Ciocalteu reagens reducira do pojave plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Smjesa se priprema tako da se u epruvetu otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 mL uzorka i 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa te se dodatkom 1,5 mL 20%-tne

otopine natrijeva karbonata pokreće reakcija nakon čega uzorci stoje dva sata na sobnoj temperaturi. Za svaki uzorak rade se dvije paralelne probe, a za rezultat uzima se srednja vrijednost. Osim smjese sa uzorcima, priprema se i slijepa proba tako da se umjesto 100 mL uzorka stavlja 100 mL destilirane vode. Zatim se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija, tj. intenzitet plavog obojenja pri 765 nm koji je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u uzorku. Udio polifenolnih spojeva računa se na osnovi baždarnog pravca galne kiseline ($0 - 100 \text{ mg L}^{-1}$), te se rezultati izraze kao mg ekvivalenata galne kiseline po litri, ili gramu uzorka.

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na gašenju plavo zelenog ABTS radikal kationa antioksidansima iz uzorka, a udio „ugašenog“ radikala mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje s smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilen kiseline (Trolox, analog vitamina E topljivog u vodi) pri istim uvjetima.

Kako bi se odredio antioksidacijski kapacitet ovom metodom, potrebno je pripremiti otopinu ABTS radikal-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline) koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS. Otopina radikala pripremi se tako da se preko noći ostavi stajati 7 mM vodene otopine ABTS u koju se doda 140 mM amonijevog peroksid-sulfata, nakon čega se razrijedi etanolom (96%) do konačne koncentracije ABTS kation radikala od 1%, pri čemu apsorbancija otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$. Zatim se alikvot od 40 μL razrijeđenih biljnih uzoraka pomiješa s 4 mL otopine ABTS kation radikala u kiveti te se nakon 6 minuta mjeri apsorbancija na 734 nm. Kao slijepa proba dodaje se etanol umjesto uzorka. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA koja se prema baždarnom pravcu za Trolox preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Troloxa), a rezultati se izražavaju kao molarni (mmol g^{-1}) ili maseni udjel ($\mu\text{gg}^{-1}_{\text{uzorka}}$) ekvivalenta Trolox-a.

3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidativni kapacitet može se odrediti redukcijom 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) koji u metanolnoj otopini zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u

vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora, antioksidansa, dolazi do sparivanja elektrona, stabilizacije DPPH radikala, te do promjene iz ljubičaste boje otopine u žutu. Ta promjena boje koja je uzrokovana prelaskom radikala iz oksidiranog u reducirani oblik mjeri se promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilen kiseline (Troloxa, analoga vitamina E topljivog u vodi)). Eksperiment se provodi tako da se pripremi 0,094 mM otopina 1,1,-difetil-2-pikrilhidrazil radikala u metanolu. Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira 3,9 mL pripremljene otopine i 100 μ L biljnog uzorka kojeg se želi ispitati te se smjesa homogenizira i ostavi 30 minuta u mraku kako bi se odvila reakcija. Kao slijepa proba uzima se otopina DPPH kojem se dodaje metanol umjesto uzorka. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 515 nm spektrofotometrom (Biochrom Libra S11, Engleska) te se iz dobivenih vrijednosti i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a (koji se uzima kao standard) konstruira baždarni pravac. Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se promjena apsorbancije DPPH radikala (ΔA) nakon reakcije. Rezultati ΔA preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni (mmol/g) ili maseni udjel (μ g/g uzorka) ekvivalenta Troloxa.

3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije $c = 300 \text{ mmol L}^{-1}$, $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) te $c = 20 \text{ mmol L}^{-1}$ vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$). FRAP reagens priprema se miješanjem $V = 25 \text{ mL}$ acetatnog pufera, $V = 2,5 \text{ mL}$ TPTZ-a i $V = 2,5 \text{ mL}$ $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, tako da omjer dodanih otopina bude 10 : 1 : 1.

Za postupak mjerenja, u kiveti se pomiješa $V = 50 \mu\text{L}$ uzorka i $V = 950 \mu\text{L}$ FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija na $\lambda = 593 \text{ nm}$ u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka $V = 50 \mu\text{L}$ vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa ($V = 950 \mu\text{L}$). Rezultati se izražavaju kao molarni (mmol g^{-1}) ili maseni udio ($\mu\text{g g}^{-1}$ uzorka) ekvivalenta $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, temeljem baždarnog pravca izrađenog pomoću otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

3.2.10. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR) i kemometrija

Spektroskopija blisko infracrvenog zračenja ima prednost u ekonomskoj dostupnosti, učinkovitosti i sigurnosti kako pri samom korištenju tako i za okoliš. Može se koristiti za istodobno utvrđivanje nekoliko osobina s jednim mjerenjem kao i za brzi probir u sustavima utvrđivanja kvalitete. Metoda se temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u bliskom infracrvenom području spektra, valne duljine u rasponu od 904 do 1699 nm korištene su u ovom radu. U tom rasponu uzorak apsorbira svjetlost frekvencije koje odgovaraju karakterističnim vibracijama, uključujući onima koje nastaju iz veza C-H, O-H, N-H, C = O, a i ostale funkcionalne skupine mogu se detektirati (Cvitanović i sur., 2018). Analiza snimljenih uzoraka može se provoditi pomoću kombinacije raznih kemometrijskih metoda, dok je u ovom slučaju korištena PCA analiza podataka (principal component analysis) i PLS. Pomoću NIR spektrometra Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m, snimi se NIR spektar uzoraka vodenih ekstrakata samoniklog bilja. Sustav za snimanje NIR spektra sastoji se od računala sa instaliranim Control Development softverom Spec32, NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m spektrometra, polikromatskog izvora svjetlosti, optičkih kablova i postolja s poklopcem u koji se stavlja kivet s uzorkom.

Postupak snimanja provodi se tako da se određena količina uzorka ulije u kivetu te se stavi u postolje sa poklopcem koje omogućuje snimanje spektra bez prisustva okolne svjetlosti iz prostorije. Svaki je uzorak vodenog ekstrakta sniman tri puta.

3.2.10.1. Obrada podataka i modeliranje

Za analizu podataka NIR spektara PCA metodom korišten je program Statistica 10.0 (StatSoft, SAD). Podaci spektara nisu bili predprocesirani prije analize. Također je provedena i regresijska analiza u vidu PLS (Partial Least Squares) modela upotrebom programa CAMO Unscrambler X. Prikladnost modela procijenjena je temeljem vrijednosti koeficijenata determinacije (R^2) prema Chadockovoj ljestvici (Tablica 1).

Tablica 1. Chadockova ljestvica

R^2	Značenje
0	odsutnost veze
0,01-0,25	slaba veza
0,25-0,64	veza srednje jakosti
0,64-1	čvrsta veza
1	potpuna veza

3.2.10.2. Umjetne neuronske mreže

Umjetne neuronske mreže korištene su kako bi se na temelju podataka iz NIR spektara predvidjele vrijednosti fizikalnih (pH, električne vodljivosti, TDS-a, udjela suhe tvari, vode i pepela) i kemijskih parametara (ukupni polifenoli, antioksidacijski kapacitet izmjeren trima različitim metodama). Koristeći program Statistica v.10.0 (StatSoft, USA) razvijene su mreže s 13 neurona u skrivenom sloju. Kao ulazne varijable korišteno je prvih 10 faktora dobivenih analizom glavnih komponenti koji su bili odgovorni za 99,5 % varijabilnosti u podacima. Kao izlazne varijable postavljene su pH vrijednost, električna vodljivost, otopljene tvari (TDS), udio vode, suhe tvari i pepela te koncentracija ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet mjeren trima metodama: ABTS, DPPH i FRAP. Kako bi se dobili što precizniji modeli u smislu što većih koeficijenata determinacije umjetnih neuronskih mreža provedena je podjela podataka u skupove za učenje, test i validaciju u različitim omjerima (60:20:20, 70:20:10, 70:15:15 i 50:30:20). Optimalna neuronska mreža odabrana je na temelju koeficijenta determinacije R^2 (poželjno da je što bliže 1) i srednje kvadratne pogreške RMSE (eng. Root Mean Square Error) te na temelju što manjeg broja neurona u skrivenom sloju. Pri odabiru mreže u obzir se uzela i potreba da učenje ima najviši R^2 kojeg slijedi R^2 za test pa za validaciju..

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA

Fizikalna i kemijska svojstva 15 ljekovitih biljaka odnosno njihovih vodenih ekstrakta korištenih u ovom radu prikazani su u Tablici 2 sve sa ciljem da se utvrdi može li se pomoću NIR-a (i ANN) iste i predvidjeti. Rezultati su zabilježeni nakon provedene vodene ekstrakcije na temperaturi od 80 °C pri 250 rpm u trajanju od 60 minuta, a odnose se na pH, vodljivost, TDS, udio vode, suhu tvar, ukupne polifenole, pepeo te antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS, DPPH i FRAP metodama.

Tablica 2. Fizikalna i kemijska svojstva vodenih ekstrakta 15 ljekovitih biljaka

	pH	vodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TDS (mg L^{-1})	udio vode (%)	suha tvar (%)	ukupni polif. (mg GAE g^{-1})	ABTS (mM g^{-1})	DPPH (mM g^{-1})	FRAP (mM g^{-1})	pepeo (%)
lavanda	5,12	1281,00	562,00	99,42	0,58	59,57	0,35	0,39	0,55	5,93
lipa	5,60	1245,00	636,00	99,45	0,55	46,04	0,27	0,20	0,15	7,77
neven	5,71	2840,00	1418,00	99,00	1,00	33,62	0,14	0,10	0,14	9,61
gospina trava	5,15	704,00	352,00	99,70	0,30	27,20	0,09	0,06	0,03	5,33
maslina	5,29	854,00	427,00	99,41	0,59	49,30	0,20	0,24	0,30	6,00
menta	6,11	1689,00	845,00	99,24	0,76	105,82	0,47	0,38	0,47	6,68
majčina dušica	6,24	1005,00	502,00	99,67	0,33	56,47	0,29	0,36	0,43	9,54
melisa	5,95	1710,00	869,00	99,44	0,56	93,46	0,47	0,38	0,53	10,91
kadulja	5,95	1367,00	662,00	99,54	0,46	62,80	0,28	0,33	0,43	7,49
preslica	5,99	2880,00	1530,00	99,43	0,57	17,20	0,09	0,11	0,12	18,10
kamilica	5,64	2070,00	1210,00	98,98	1,02	40,59	0,22	0,24	0,14	7,54
kopriva	7,93	3150,00	1600,00	99,27	0,73	21,31	0,12	0,12	0,06	15,74
maslačak	5,88	5130,00	2570,00	98,83	1,17	56,47	0,32	0,31	0,16	5,92
stolisnik	5,61	1879,00	935,00	99,31	0,69	39,03	0,41	0,49	0,15	7,23
trputac	5,50	4000,00	2020,00	98,77	2,23	39,09	0,27	0,34	0,14	10,26

Vodeni ekstrakti svih biljka osim koprive imaju pH ispod 7 što znači da su blago kiseli. Najniži pH imaju lavanda (5,12) i gospina trava (5,15), a vodeni ekstrakt koprive pokazao se blago lužnatim sa pH 7,93.

Električna vodljivost očekivano je proporcionalna izmjerenim vrijednostima TDS-a kod svih biljaka pa tako najveće vrijednosti ima maslačak, a najniže gospina trava.

Udio vode za sve biljke kreće se od 98,77 % - 99,7% odnosno najniži postotak ima trputac, a najviši gospina trava.

Udio polifenolnih spojeva računao se na osnovi baždarnog pravca galne kiseline (0 – 100 mg L⁻¹), a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu uzorka.

Najveća razlika pokazala se ona između mente koja ima vrijednost 105, 82 mg gST-1 i preslice sa 17,20 mg gST-1. Razlog tome mogao bi biti što list paprene metvice sadrži oko 19-23% polifenola (Zheng i Wang, 2001), a oko 75% sadržaja polifenola prisutnih u lišću, prisutno je u ekstrahiranoj infuziji (750mg L⁻¹) (Duband i sur., 1992). U radu Cvitanović i sur. (2018) rezultati za ukupnu količinu polifenola također su izdvojili vodeni ekstrakt mente kao onaj s najvećim udjelom polifenola (1,9 g L⁻¹ vodenog ekstrakta), a preslica i kopriva pokazale su najmanje vrijednosti kao i kod ovog istraživanja.

U literaturi je zabilježeno da polifenoli i antioksidacijski kapacitet slijede isti trend, a tako se pokazalo i u rezultatima ovog rada pa gospina trava, preslica, kopriva i neven imaju najmanju antioksidacijsku aktivnost dok melisa, stolisnik, lavanda i neven imaju najveću.

Sve tri metode pokazale su da gospina trava ima najmanji antioksidacijski kapacitet, a melisa, stolisnik i lavanda su redom po metodama ABTS, DPPH i FRAP pokazale najveće vrijednosti. Različiti rezultati po metodama vjerojatno su posljedica detekcije drugih spojeva, pogrešaka pri mjerenju, korištenje različitih materijala te svih ostalih razlika koje proizlaze iz same razlike u metodama.

Jurinjak Tušek i sur. u svom radu iz 2016 zaključuju da je najveća efikasnost ekstrakcije ukupnih sadržaja polifenola, antioksidanata i prinosa ekstrakcije postignuta pri najvišoj temperaturi ekstrakcije od T = 80 ° C za sve četiri biljke korištene u istraživanju (kamilica, maslačak, neven, stolisnik).

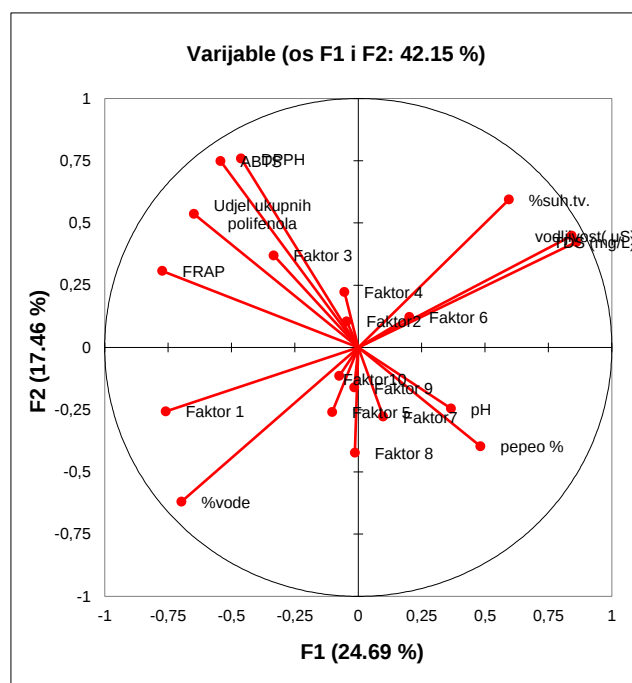
Izmjerenom vrijednošću električne vodljivosti možemo procijeniti stupanj mineralizacije vode, a mjeru ukupne količine minerala u hrani predstavlja pepeo. Pepeo je anorganski ostatak koji ostaje nakon uklanjanja vode i organskih tvari zagrijavanjem u prisutnosti kisika, a otopine većine anorganskih spojeva relativno su dobri vodiči. To znači da bi biljka koja ima veći udio pepela trebala imati i veću električnu vodljivost jer znači da ima više minerala. Najmanji udio pepela ima gospina trava sa 5,33 %, a ima i najmanju vodljivost 704 μS cm⁻¹. Najveći udio

pepela ima preslica sa 18,10 % međutim nije pokazala očekivanu vodljivost koja bi trebala biti najveća nego iznosi $2880 \mu\text{Scm}^{-1}$, dok su ispred nje vodljivosti koprive ($3150,00 \mu\text{Scm}^{-1}$), trputca ($4000,00 \mu\text{Scm}^{-1}$) i maslačka sa najvećom vrijednosti od $5130 \mu\text{Scm}^{-1}$. Ostale biljke također ne prate očekivanu proporcionalnost.

4.2. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI

Svaki uzorak sa NIR- om je snimljen 3 puta kako bi bilo moguće raditi sa što većim skupom podataka i dobivene spektre povezati sa rezultatima fizikalnih i kemijskih svojstava biljnih ekstrakata prikazanih u tablici 2.

Kako bi to provjerili potrebno je prvo obraditi „sirove“/neobrađene spektre pomoću analize glavnih komponenata (PCA). PCA ne samo da se koristi kako bi se odvojili uzorci prema sličnostima odnosno razlikama, nego je njezina prvobitna primjena smanjiti broj varijabli s kojima se kasnije računa. Na taj način dobiju se koordinate faktora u prostornoj ravnini koje se kasnije mogu koristiti za daljnju obradu. Grafički prikaz korelacija između PCA faktora za NIR spektar u kombinaciji s 6 fizikalnih parametara, ukupnim polifenolima i antioksidacijskom kapacitetu prikazani su naslici 2.



Slika 2. Grafički prikaz korelacija između PCA faktora i fizikalno-kemijskih parametara: pH, vodljivost, TDS, udio vode, udio suhe tvari, pepeo, ukupni polifenoli, ABTS, DPPH i FRAP za NIR spektar.

Na Slici 2 se može vidjeti da je došlo do razdvajanja fizikalno-kemijskih svojstava koji su se rasporedili u sva četiri kvadranta.

U prvom kvadrantu nalaze se suha tvar, vodljivost i TDS zajedno sa faktorima 2, 4 i 6. U drugom kvadrantu nalaze se ukupni polifenoli, ABTS, DPPH i FRAP zajedno sa faktorom 3.

U trećem kvadrantu nalazi se voda zajedno sa faktorom 1, a u četvrtom kvadrantu su pH i pepeo zajedno sa faktorima 5, 7, 8, 9 i 10.

Koji puta moguće je povezati određeni faktor ili faktore s određenim fizikalnim ili kemijskim svojstvom te napraviti uspješne modele predikcije kao što je prikazano u radu Valinger i sur. (2018). Ukoliko se želi kao u ovom slučaju povezati veliki broj ispitivanih parametara s faktorima dobivenim PCA analizom iz slike 2 vidljivo je da bi trebalo koristiti svih 10 parametara jer su fizikalno-kemijska svojstva raspodijeljena u sva četiri kvadranta. Kada bi bio slučaj da su npr. fizikalno kemijska svojstva raspodijeljena u dva kvadranta onda bi se mogli koristiti faktori koji su samo u ta dva kvadranta za razvoj predikcijskih modela. Kako na temelju ovih rezultata to nije bilo moguće za PLS modele i umjetne neuronske mreže koje bi mogle odrediti povezanost NIR spektara i fizikalno-kemijskih svojstava korišteno je svih 10 faktora (Valinger i sur., 2018).

4.3.PLS MODELI

Parcijalna linearna regresija predstavlja model u kojem su ulazne varijable valne duljine NIR spektara u obliku prvih 10 faktora dobivenih PCA analizom, a izlaznu veličinu predstavljaju ispitivane veličine u vodenim ekstraktima promatranog ljekovitog bilja prikazane u tablici 2. Svrha korištenja je razvoj modela koji bi pretpostavio fizikalno-kemijske parametre na temelju NIR spektra. Za procjenu kvalitete i reprezentativnosti modela korišteni su sljedeći parametri:

- Koeficijent determinacije, R^2
- Korijen srednje kvadratne pogreške predikcije, RMSEP (eng. *Root Mean Square Errors of Prediction*)

Za pH su dobivene dosta dobre korelacije između modela i eksperimentalnih podataka što je vidljivo na slici 3, a potvrđuje i R^2 0,788 sa pripadajućom RMSE 0,297.

Predikcija PLS modela za TDS i vodljivost također su pokazali dobre korelacije sa R^2 0,768 i 0,781 ali RMSE su 298,260 i 567,080. Razlog tako velikih vrijednosti pogreške su velike

vrijednosti dobivene za ova fizikalna svojstva te su pogreške u rangu od otprilike 10 %. Sa slike 5 (TDS) je vidljivo da su najveća odstupanja od 1000 do 1500 mg L⁻¹.

U ostalim slučajevima (slika 6 – slika 12) nisu dobivene tako dobre korelacije, a najgore slaganje modela i eksperimentalnih podataka vidljivo je na primjeru ukupnih polifenola (slika 8) sa R² 0,364, a RMSE 18,840. Raspršenost podataka dosta je velika.

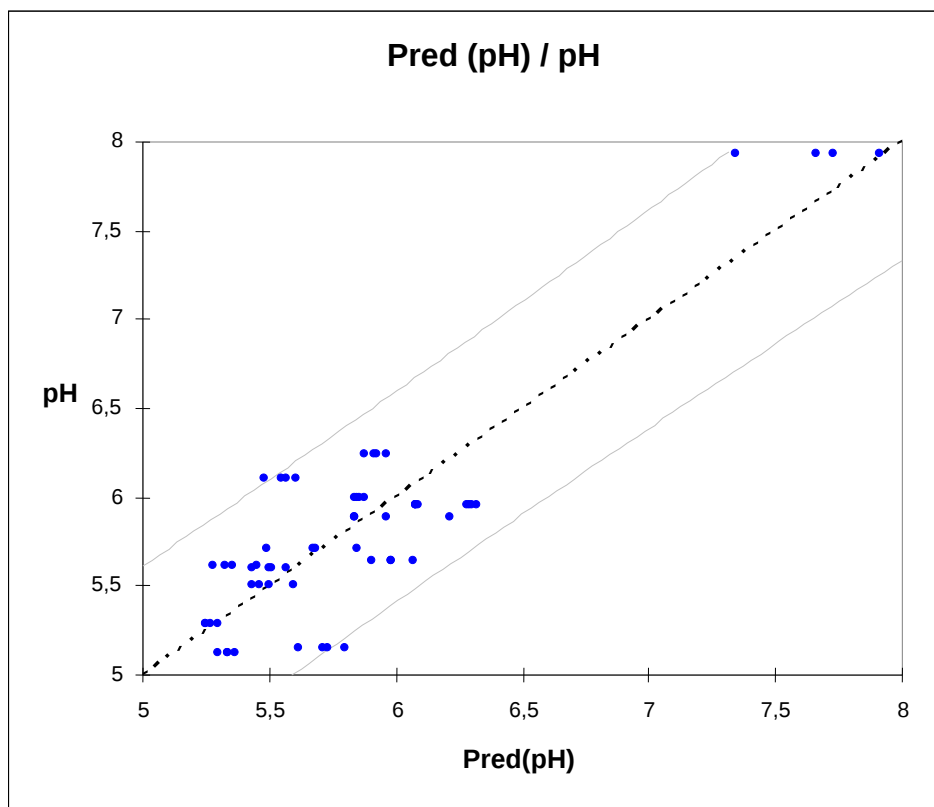
Velika je razlika između modela i eksperimentalnih podataka vidljiva je i na slici 7 za suhu tvar gdje je najveća vidljivost odstupanja za 1,5 %, a za 1 % je dobro slaganje. R² za suhu tvar je 0,488, a za udio vode 0,696. Pripadajuće RMSE za udio vode je 0,152, a suhu tvar 0,390.

Za ABTS, DPPH i FRAP (slika 9 – slika 11) dobivena je dosta loša korelacija između modela i eksperimentalnih podataka sa R² 0,4128, 0,528 i 0,5138. RMSE redom za ABTS, DPPH i FRAP iznose 0,093, 0,085 i 0,121. Predikcija PLS modela za pepeo dala je vrijednost R² 0,5467 i RMSE 2,395, a korelacija između modela i eksperimentalnih podataka vidljiva je sa slike 12.

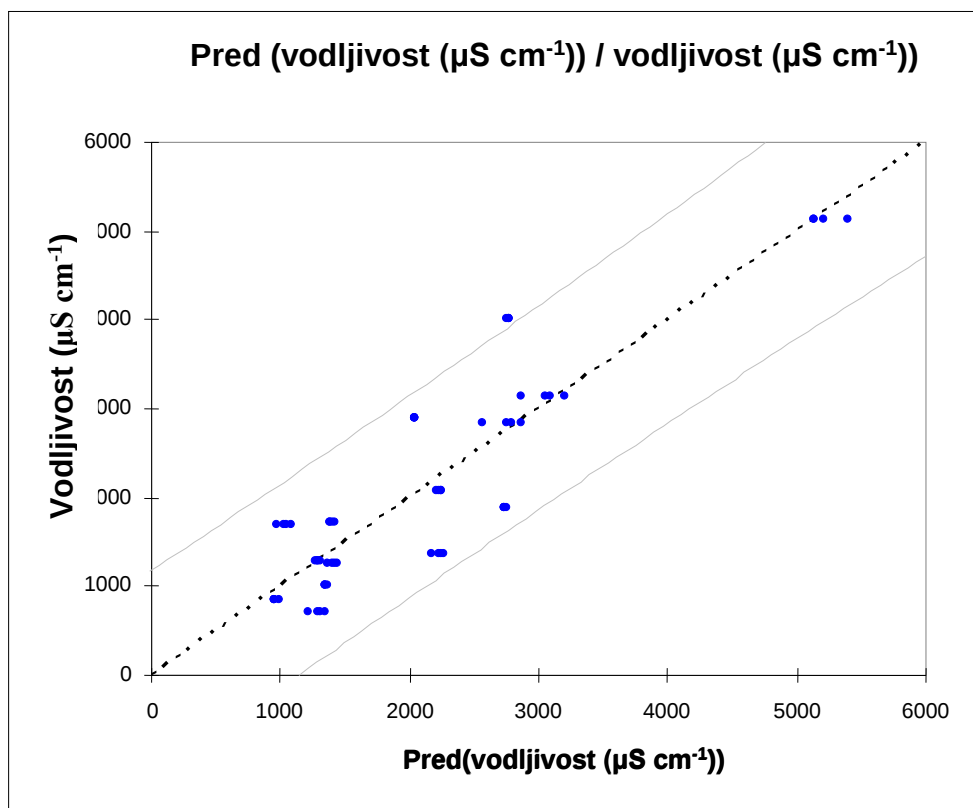
Krećući od najmanje do najveće vrijednosti R² fizikalnih parametara, redoslijed je slijedeći: suha tvar, pepeo, udio vode, TDS, vodljivost, pH.

Krećući od najmanje do najveće vrijednosti R² kemijskih parametara, redoslijed je slijedeći: ukupni polifenoli, ABTS, FRAP i DPPH.

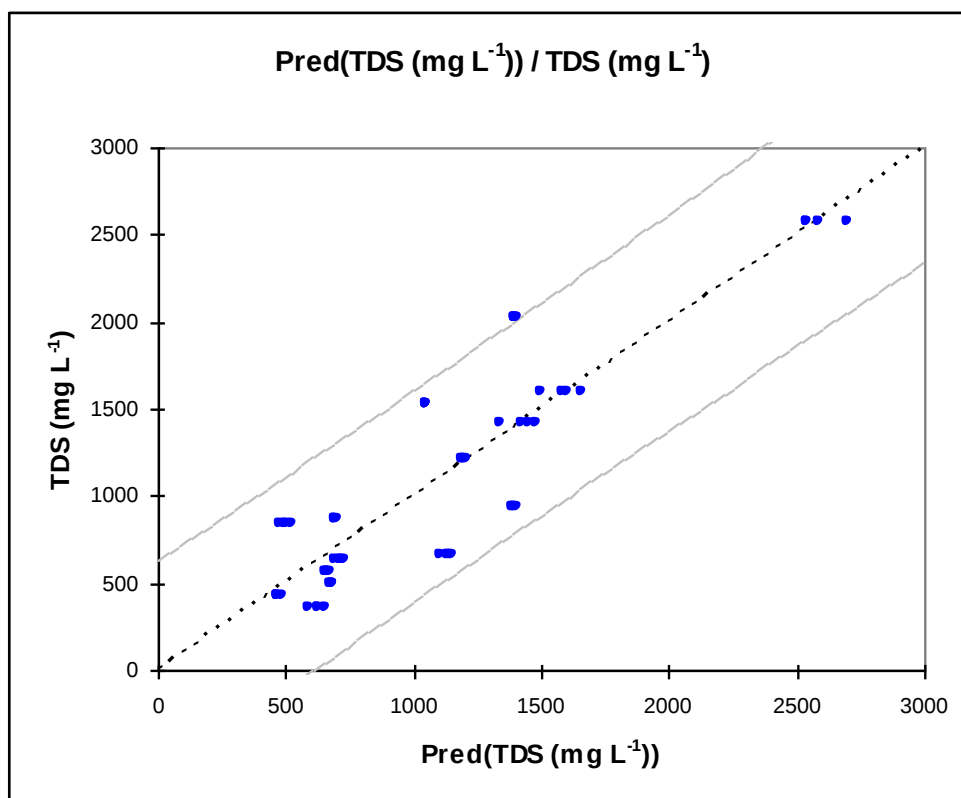
U nastavku teksta prikazani su PLS modeli odnosno procjena fizikalno-kemijskih parametara. Može se reći da je korelacija između modela i eksperimentalnih podataka dosta loša. Razlog tome može biti što se PLS model pokazao kao dobra metoda za predikciju linearnih sustava, a u ovom slučaju tražila se predikcija ne-linearnog sustava.



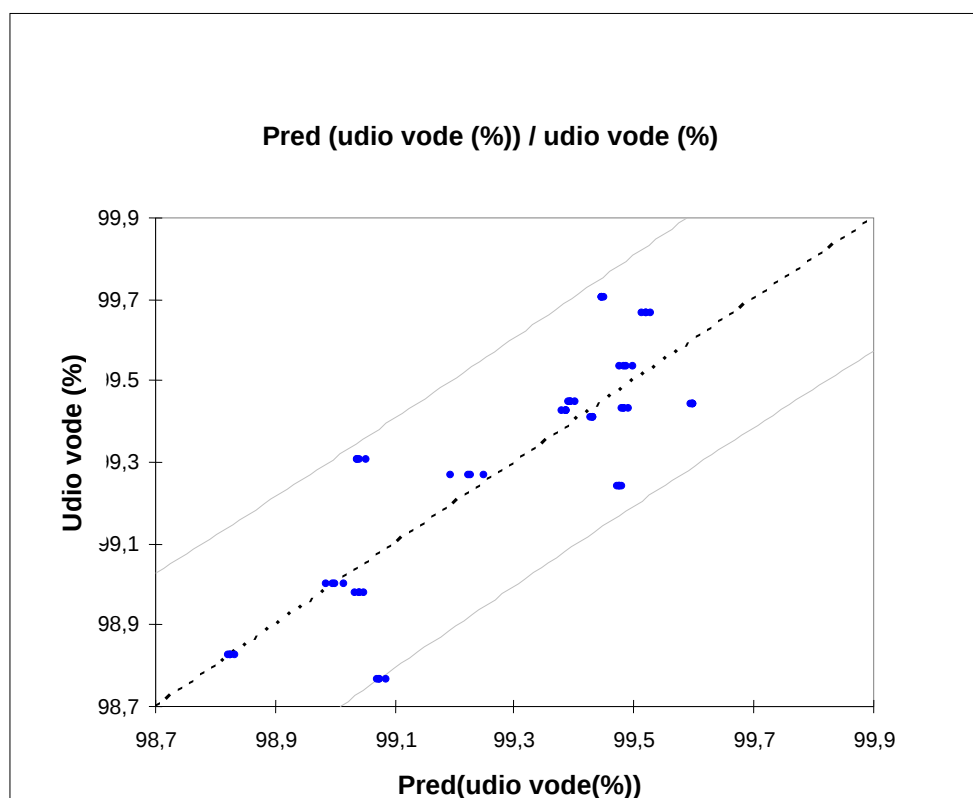
Slika 3. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za pH



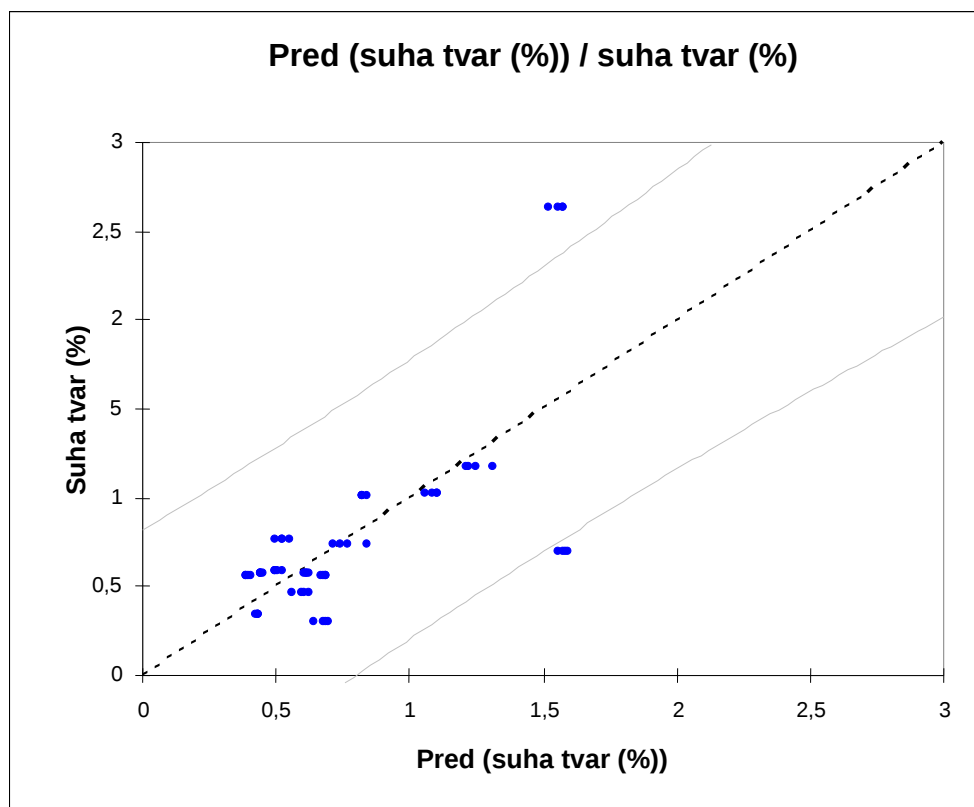
Slika 4. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za vodljivost.



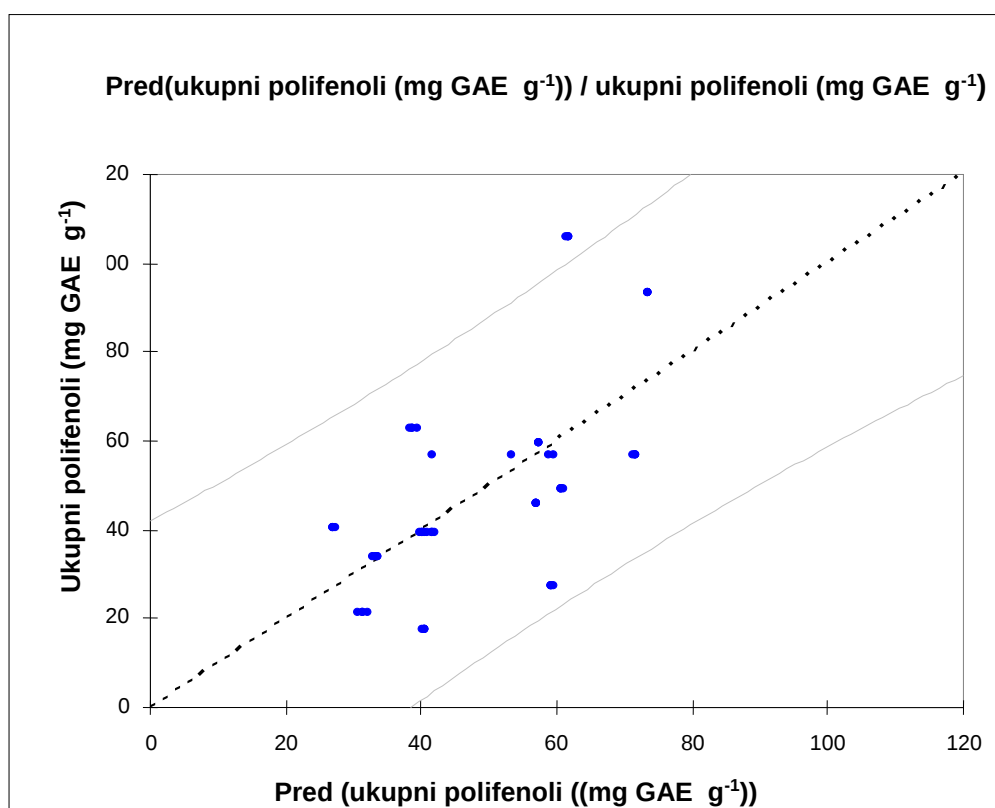
Slika 5. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za TDS



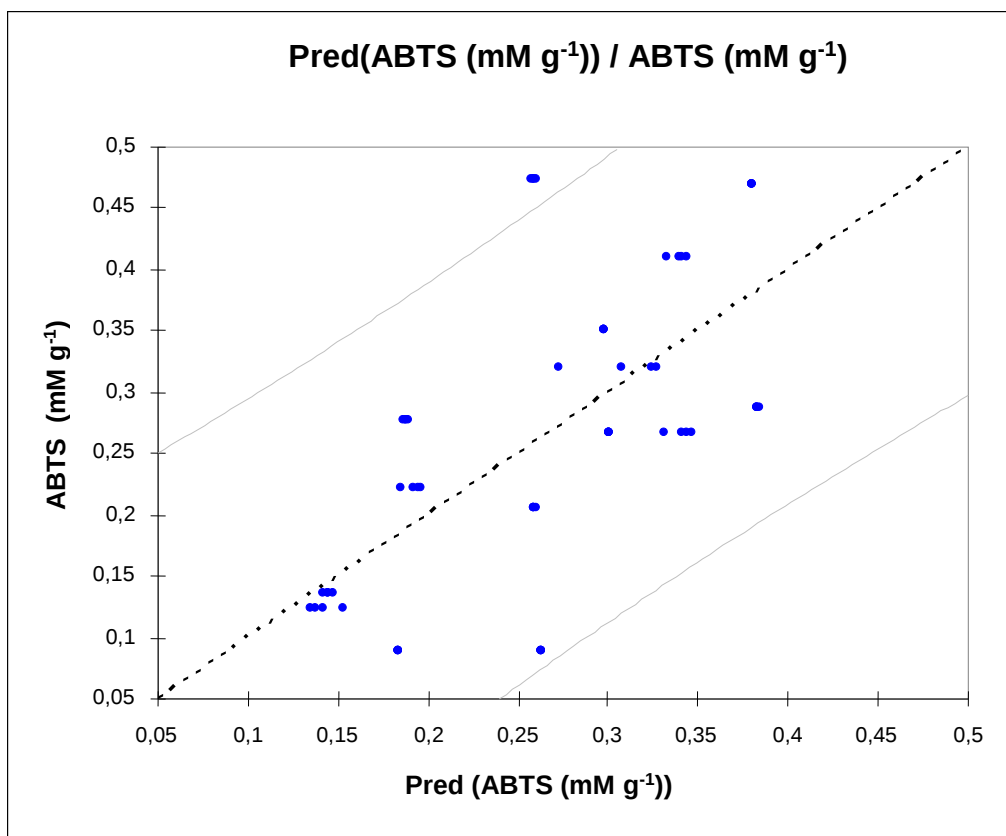
Slika 6. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za udio vode



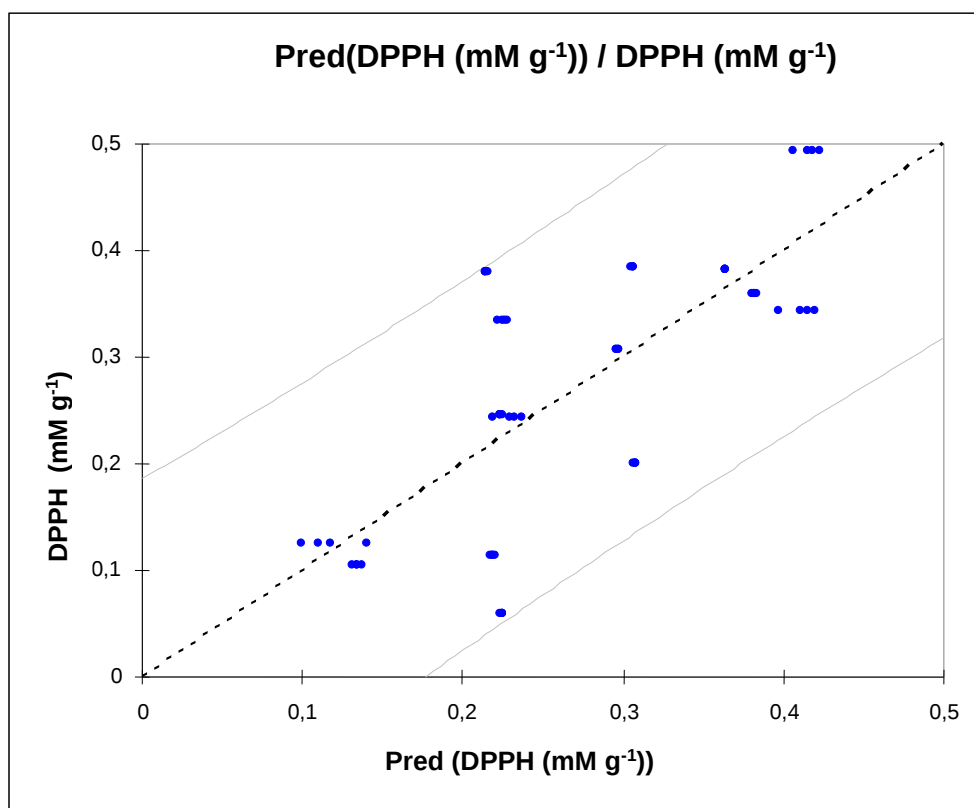
Slika 7. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za suhu tvar



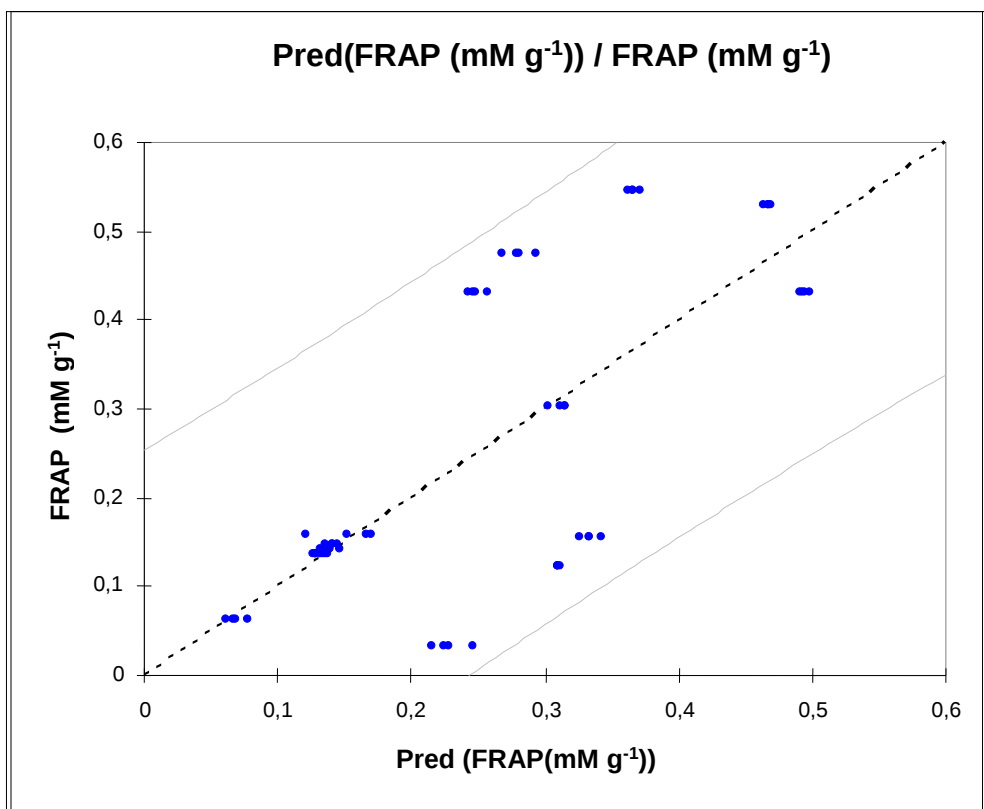
Slika 8. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za ukupne polifenole



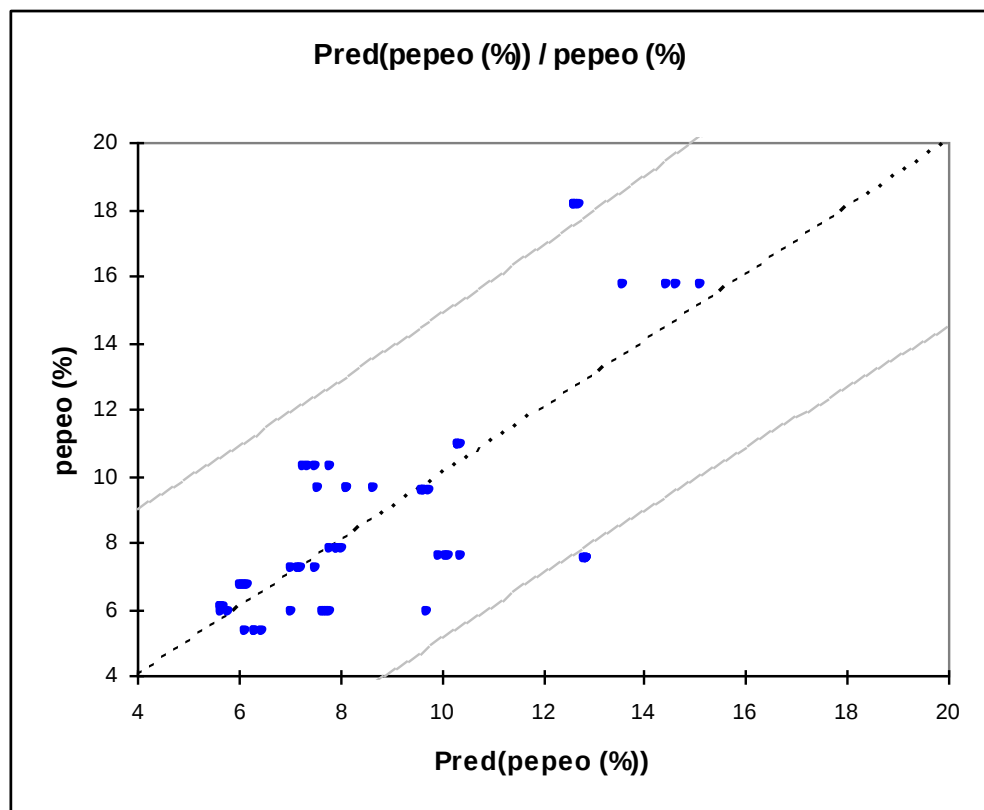
Slika 9. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za ABTS



Slika 10. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za DPPH



Slika 11. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za FRAP



Slika 12. Predikcija PLS modela na temelju eksperimentalnih podataka za pepeo

4.4. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Za umjetne neuronske mreže, nisu korišteni cijeli spektri NIR spektra već je napravljena PCA analiza kako bi se smanjio broj varijabli te je analiza predikcije umjetnih neuronskih mreži rađena sa svih 10 faktora dobivenih PCA analizom koji predstavljaju ulazne parametre dok su izlazni parametri bili fizikalna svojstva (pH, električna vodljivost, TDS, udio vode, suhe tvari i pepela), ukupni polifenoli i antioksidacijski kapacitet mjeren trima metodama: ABTS, DPPH i FRAP. Cilj je bio saznati može li se ANN model uspješno koristiti za predviđanje vrijednosti promatranih fizikalno-kemijskih parametara u odnosu na eksperimentalne rezultate prikazane u tablici 2. Svaka neuronska mreža bazira se na učenju, testiranju i validaciji. Ispitane vrijednosti za učenje, test i validaciju uključivale su omjere podataka u odnosima 60:20:20, 70:20:10, 70:15:15 i 50:30:20. Najboljim se pokazao omjer 60:20:20 što se tiče učenja, testiranja i validacije. Optimalna neuronska mreža odabrana je na temelju koeficijenta determinacije R^2 (poželjno da je što bliže 1) i srednjeg kvadratnog odstupanja RMSE (eng. Root Mean Square Error) te na temelju što manjeg broja neurona u skrivenom sloju. Pri odabiru mreže u obzir se uzela i potreba da učenje ima najviši R^2 kojeg slijedi R^2 za test pa za validaciju. Pogreška bi za učenje trebala biti najmanja. Ako se sa što manje neurona uspije doći do konačnog rješenja to je mreža stabilnija, bolja. Ako je potrebno manje neurona znači i da je ulazne i izlazne varijable manje zahtjevno za povezati (Bašić i sur., 2008).

Na temelju rezultata 200 ANN prikazano je njih 5 koje su prema vrijednostima R^2 za učenje, test i validaciju pokazale najbolje slaganje između modela i eksperimentalni podataka. Između 5 najboljih odabrana je jedna umjetna neuronska mreža arhitekture mreže „10-13-10“. što znači da ima 10 ulaznih i 10 izlaznih varijabli koje su povezane preko 13 neurona u skrivenom sloju. Navedena neuronska odabrana je jer ima najbolju preciznost učenja te najbolju preciznost testiranja, te najmanju pogrešku učenja i testiranja. Iako je validacija neznatno niža od neuronske mreže „10-12-10“ zbog prethodno navedenih razloga izabrana je neuronska mreža arhitekture „10-13-10“. Rezultati umjetnih neuronskih mreža u obliku koeficijenta determinacije (u tablici „preciznost“) i pogreški za NIR spektre 15 vodenih ekstrakta biljaka prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Karakteristike modela odabrane umjetne neuronske mreže (ANN) razvijene za predviđanje fizikalnih svojstva (pH, električna vodljivosti, TDS-a, udio suhe tvari, vode i pepela) i kemijski parametri (ukupni polifenoli, antioksidacijski kapacitet izmjeren trima metodama: ABTS, FRAP i DPPH) na temelju NIR spektra

Arhitektura mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
10-12-10	0,990	0,009	0,962	0,024	0,948	0,026	Tanh	Tanh
10-8-10	0,989	0,008	0,972	0,023	0,923	0,028	Logistic	Identity
10-11-10	0,992	0,007	0,962	0,018	0,873	0,048	Logistic	Logistic
10-13-10	0,998	0,001	0,987	0,009	0,966	0,013	Logistic	Identity
10-12-10	0,997	0,002	0,984	0,011	0,977	0,011	Exponential	Identity

U nastavku teksta prikazan je rad odabrane neuronske mreže „10-13-10“ odnosno njezina procjena fizikalno-kemijskih parametara. Analizom rezultata može se uočiti da odabrana mreža osigurava dobro slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i modelom utvrđenih vrijednosti na razini učenja, testa i validacije jer su za svih 10 parametara koeficijenti determinacije na skoro svim razinama (učenje, testiranje, validacija) viši od 0,9. Iznimka je jedino vrijednost R^2 za validaciju kod udjela suhe tvari koja iznosi 0,858.

Vrijednosti koeficijenta determinacije za validaciju kreću se unutar intervala od 0,858 za suhu tvar do 0,993 za pepeo.

Razlika između najmanjeg (0,858) i najvećeg (0,993) R^2 kod fizikalnih parametara iznosi 0,135, a odnosi se na pepeo i suhu tvar.

Razlika između najmanjeg (0,989) i najvećeg (0,956) R^2 kod kemijskih parametara je 0,033, a odnosi se na ukupne polifenole i DPPH.

Krećući od najmanje do najveće vrijednosti R^2 fizikalnih parametara, redoslijed je slijedeći: Suha tvar, udio vode, električna vodljivost, TDS, pH i pepeo.

Krećući od najmanje do najveće vrijednosti R^2 kemijskih parametara redoslijed je slijedeći: DPPH, FRAP, ABTS i ukupni polifenoli.

Umjetna neuronska mreža „10-13-10“ pokazala je najbolju korelaciju između modela i eksperimentalnih vrijednosti za pepeo kao što je vidljivo i na slici 22. Prilikom učenja za pepeo je dobivena vrijednost R^2 0,999, za test 0,987, i 0,993 za validaciju.

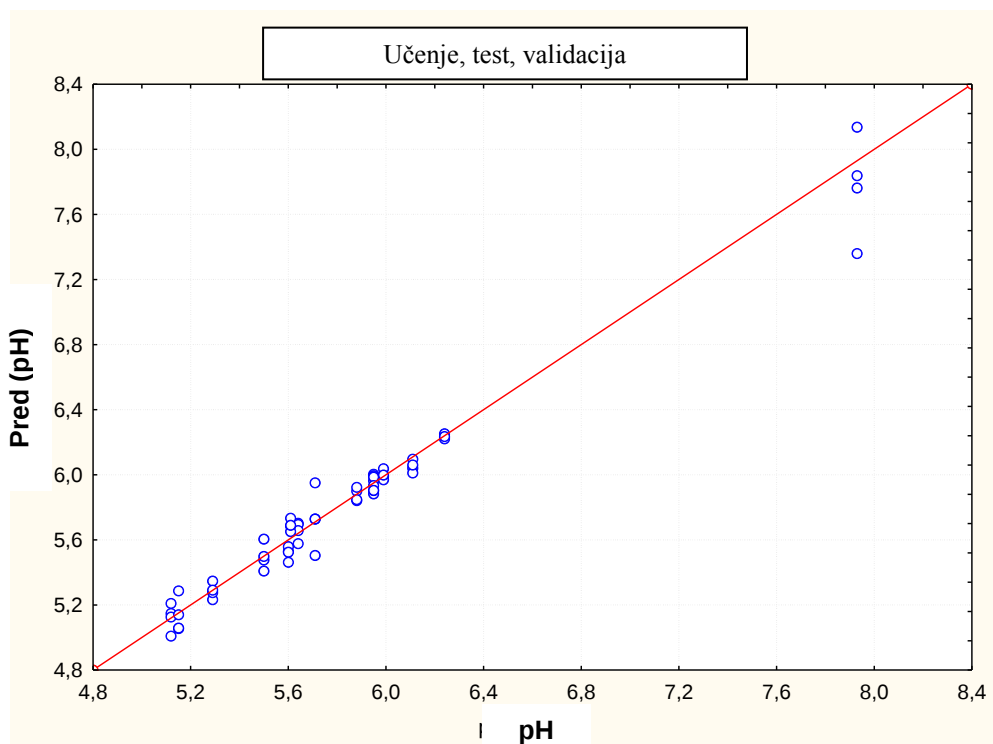
Jako dobro slaganje između modela i eksperimentalnih vrijednosti uočeno je i za pH (slika 13). Prilikom učenja za pH je dobivena vrijednost R^2 0,998, za testiranje 0,981 i validaciju 0,990. Za TDS i vodljivost na temelju toga što su slični rezultati, dobivene su slične vrijednosti R^2 i iznose 0,999 za učenje, za testiranje 0,982, i 0,987 za validaciju kod procjene TDS-a. Prilikom učenja za vodljivost je dobivena vrijednost R^2 0,999, za test 0,984, i 0,985 za validaciju, a slaganje između eksperimentalnih podataka i modela vidljivo je na slici 15.

Prilikom učenja za % vode je dobivena vrijednost R^2 0,999 za test 0,991, i 0,960 za validaciju. Prilikom učenja za % suhe tvar je dobivena vrijednost R^2 0,998, za test 0,980, i 0,858 za validaciju, a slaganje između eksperimentalnih podataka i modela vidljivo je na slici 16. Do razlike u koeficijentima determinacije između udjela za ova dva fizikalna svojstva koji bi trebali dati što bliže brojeve došlo je vjerojatno iz razloga što je mreža uzimala različite podatke za učenje, test i validaciju. Za validaciju je vjerojatno korišteno par podataka koji odstupaju. Na Slici 15. je vidljivo odstupanje kod 0,65 % suhe tvari i vrlo je moguće da je validacija rađena upravo s tim podacima. Da su ti podatci korišteni za učenje koeficijenti determinacije bi bili prihvatljiviji, odnosno smanjila bi se malo vrijednost za učenje ali bi test i validacija bili viši, a razlika između njih manja.

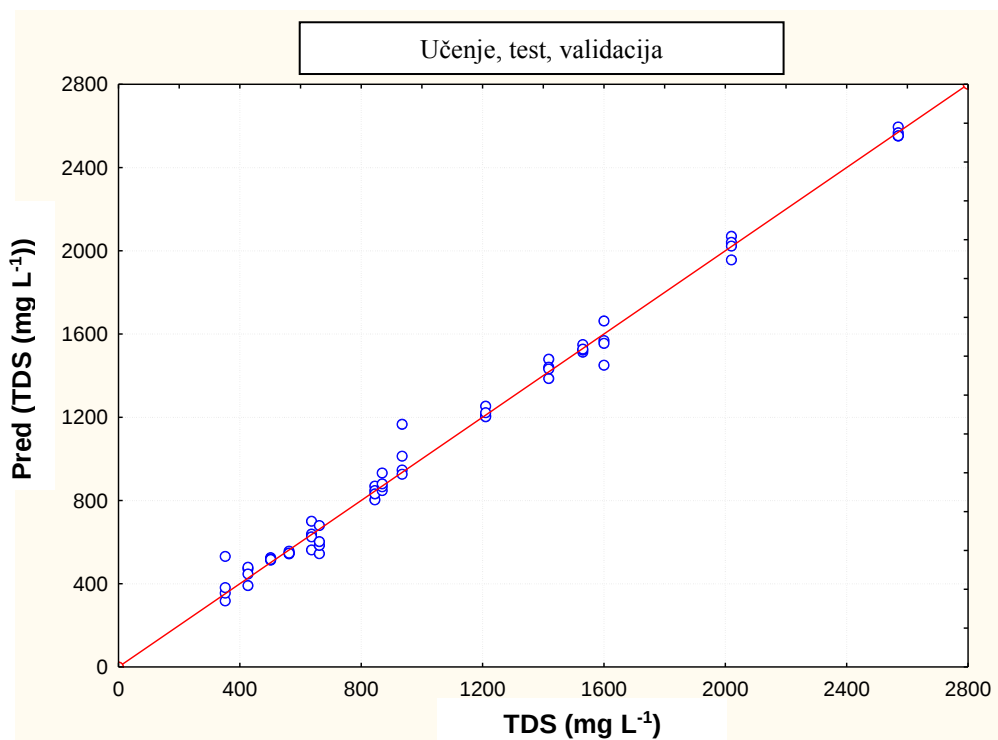
Prilikom učenja za ukupne polifenole je dobivena vrijednost R^2 0,998, za test 0,996, i 0,989 za validaciju (slika 18).

Prilikom učenja za ABTS je dobivena vrijednost R^2 0,998, za test 0,993, i 0,981 za validaciju. Prilikom učenja za DPPH je dobivena vrijednost R^2 0,998, za test 0,989, i 0,956 za validaciju. Prilikom učenja za FRAP je dobivena vrijednost R^2 0,998, za test 0,990, i 0,961 za validaciju. Slaganje eksperimentalnih podataka i modela za antioksidacijski kapacitet mjeren navedenim metodama prikazani su na slikama 19, 20 i 21.

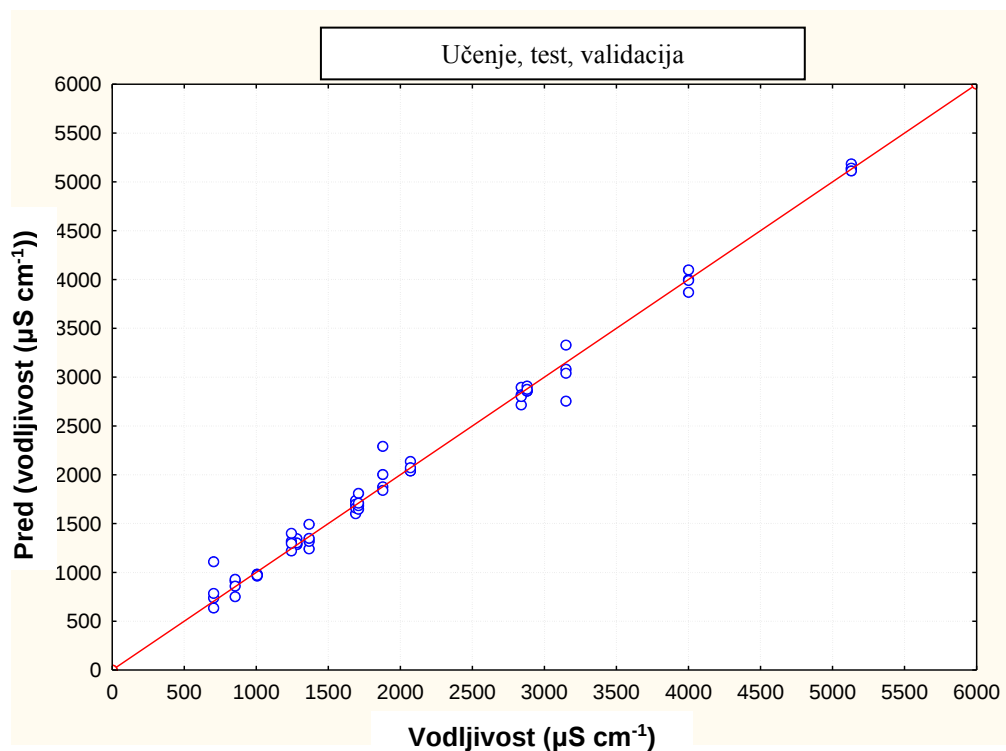
Prilikom treniranja za pepeo je dobivena vrijednost R^2 0,999, za test 0,987, i 0,993 za validaciju (slika 22).



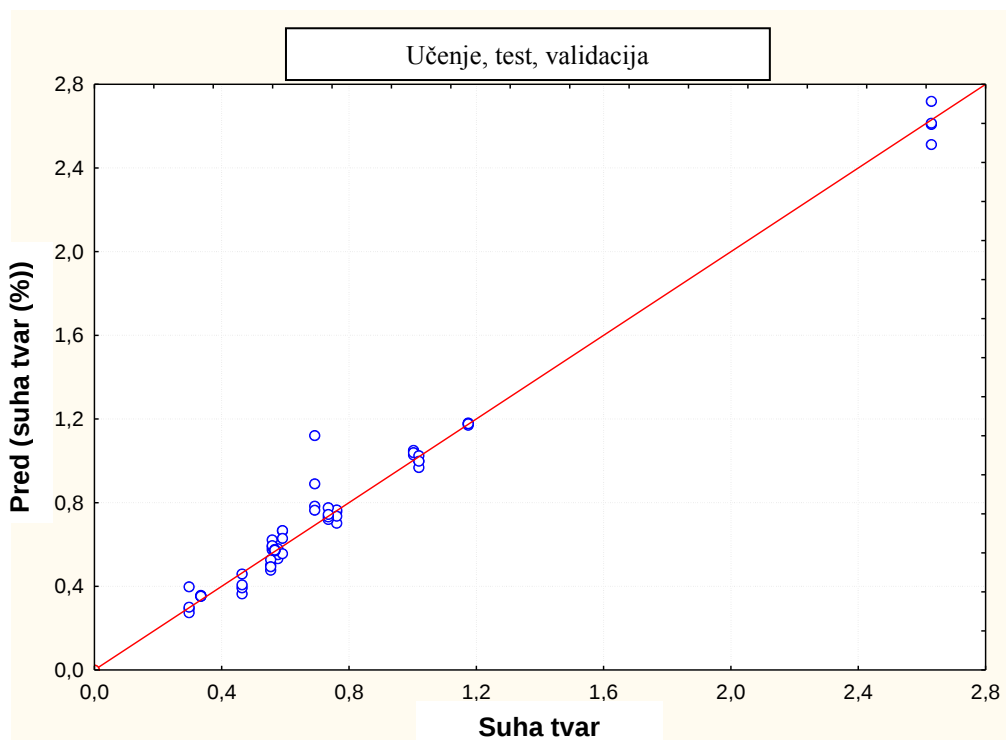
Slika 13. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za pH



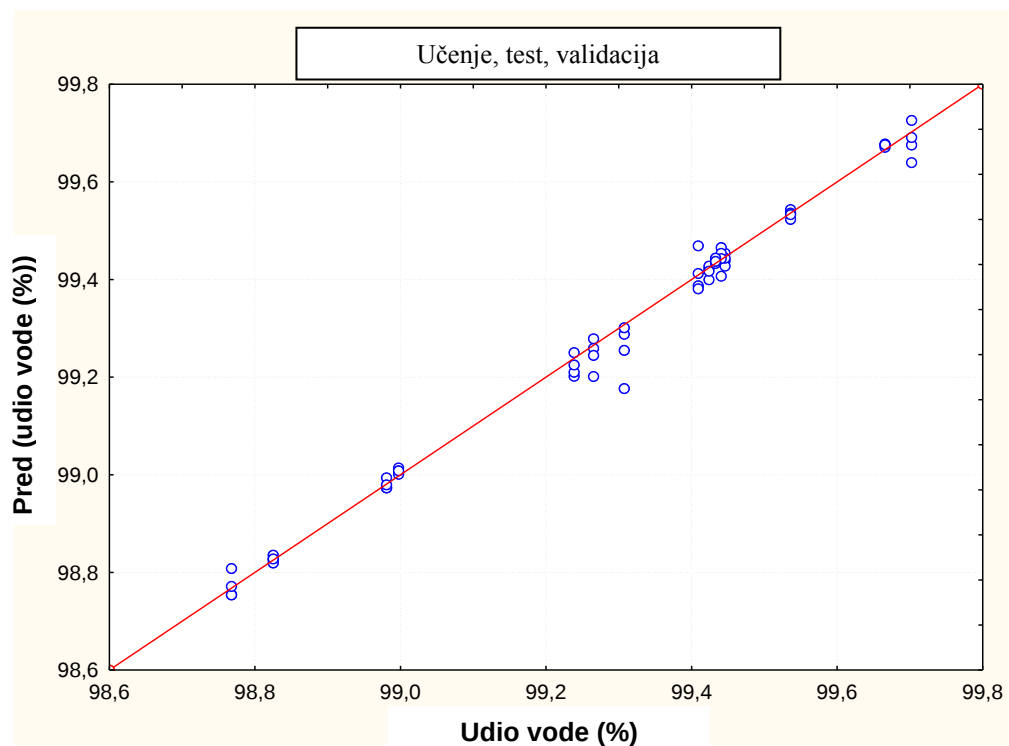
Slika 14. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za TDS



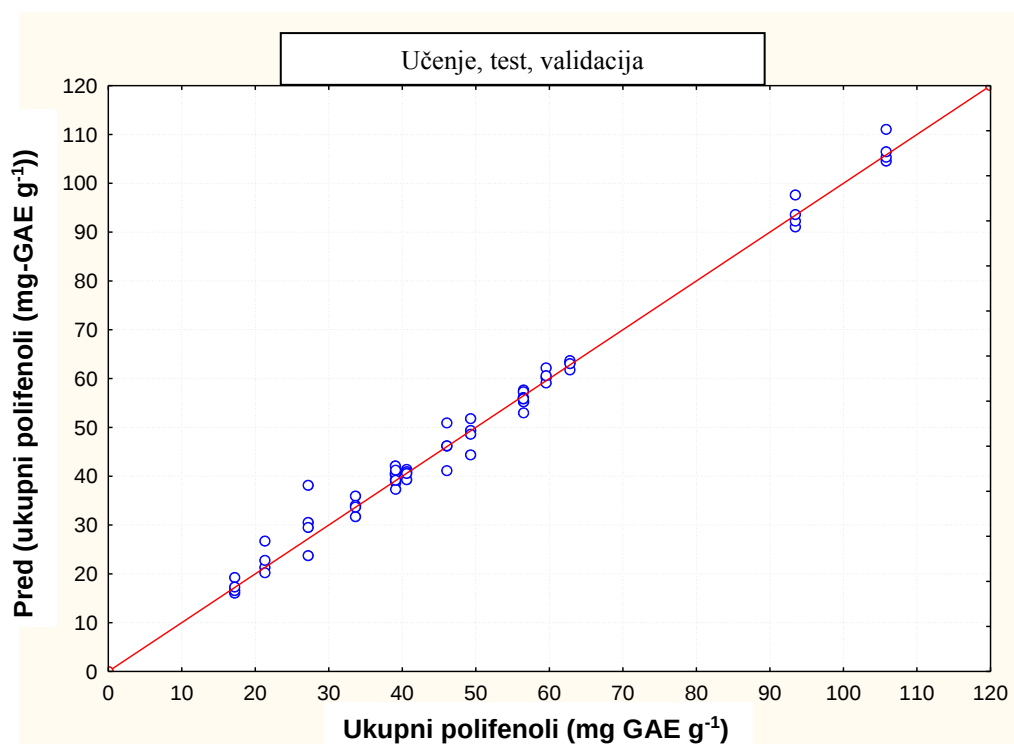
Slika 15. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za vodljivost



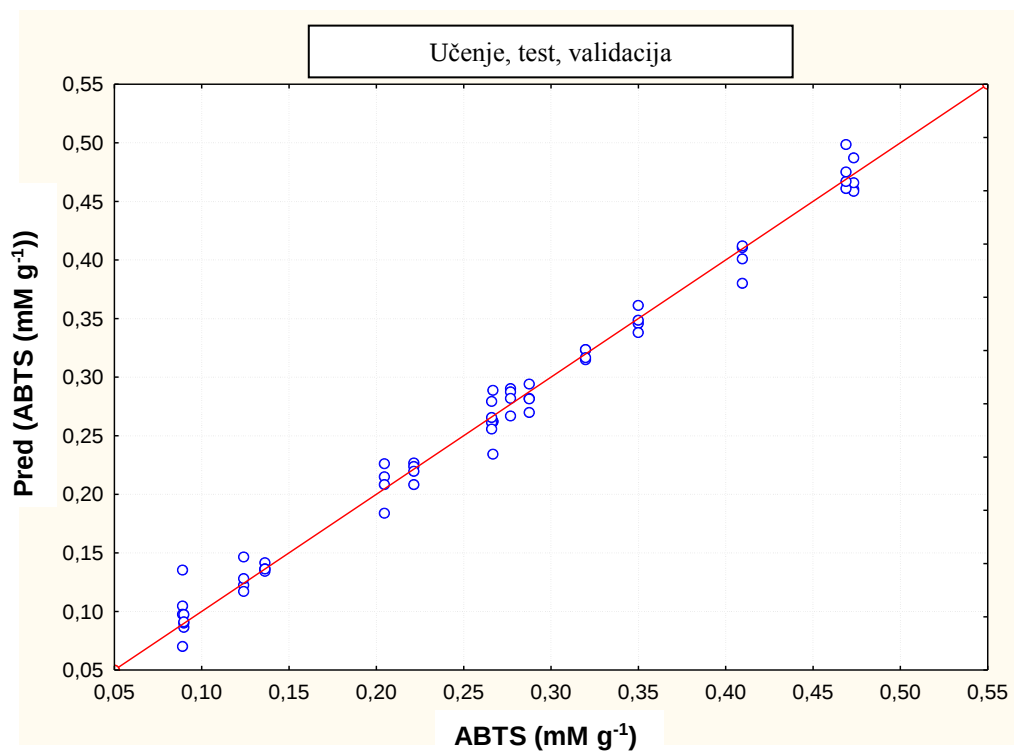
Slika 16. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za udio suhe tvari



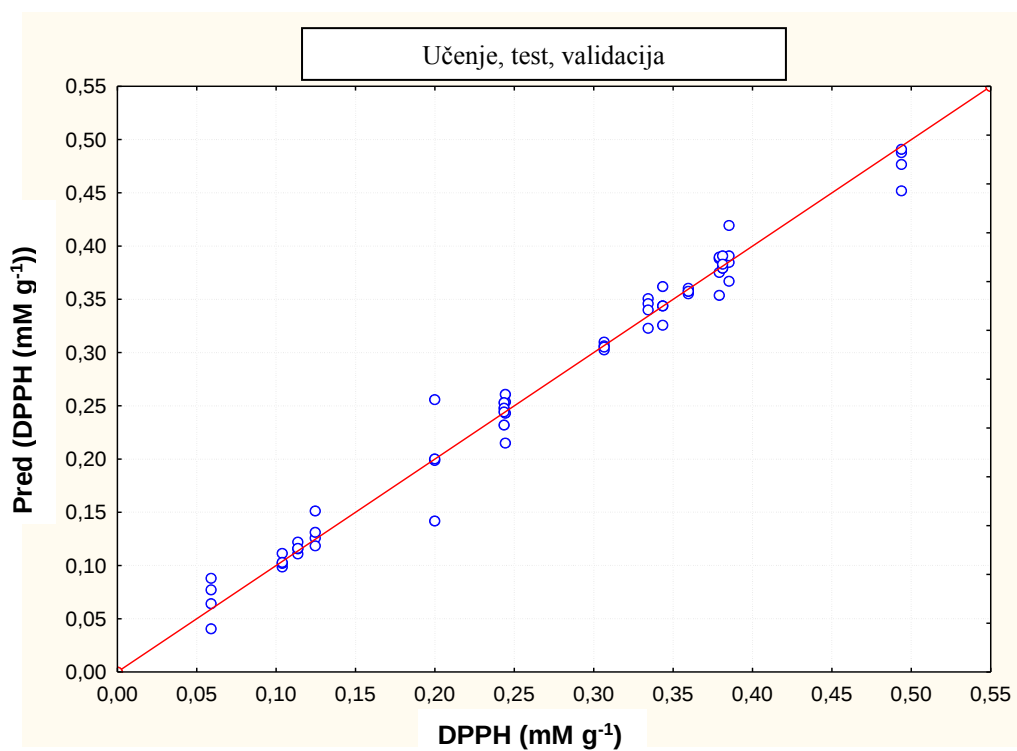
Slika 17. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za udio vode



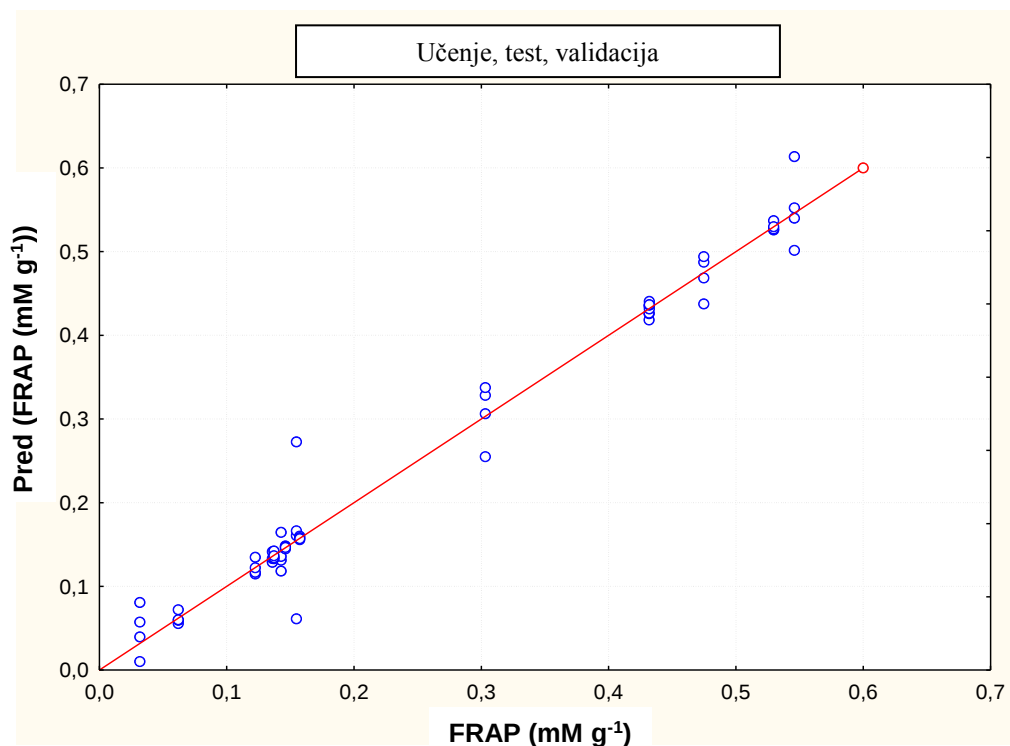
Slika 18. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za ukupne polifenole



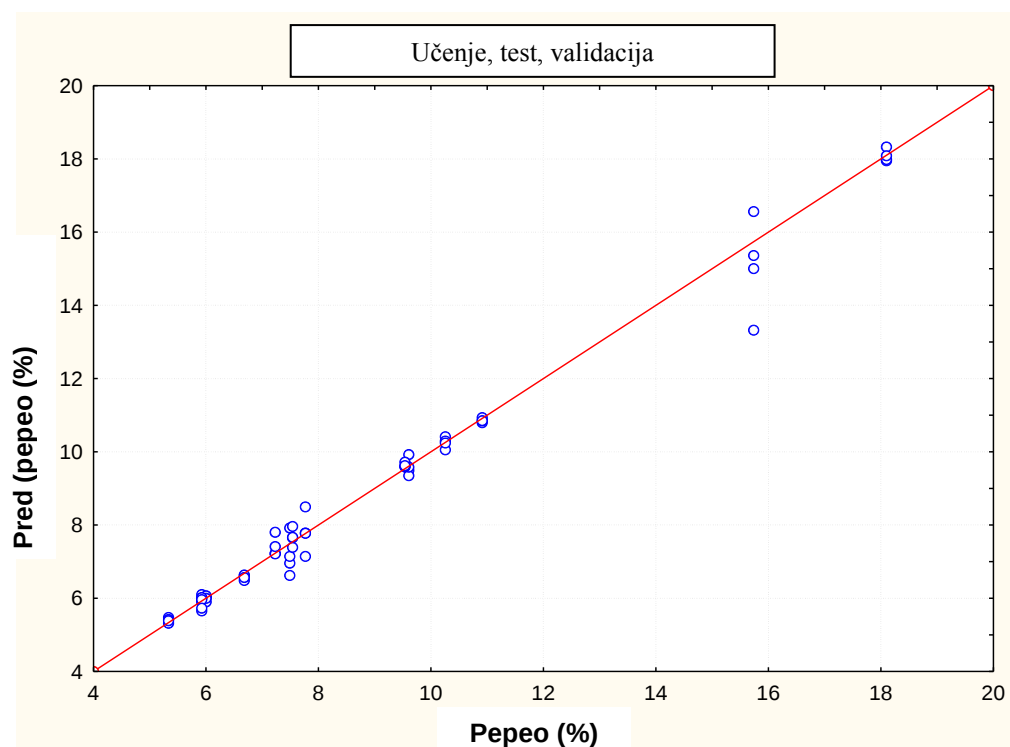
Slika 19. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za ABTS



Slika 20. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za DPPH



Slika 21. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za FRAP



Slika 22. Predikcija odabrane umjetne neuronske mreže „10-13-10“ na temelju eksperimentalnih podataka za udio pepela

Usporedbom koeficijenata determinacije PLS modela i ANN modela može se doći do zaključka da ANN model osigurava bolje slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i modelom predviđenih vrijednosti. Najveći R^2 kod PLS modela odnosio se na pH, slijede ga vodljivost i TDS, kod ANN modela najveći R^2 ima pepeo, slijede ga pH i ukupni polifenoli. Najmanje slaganje s modelom kod PLS-a vidljivo je kod ukupnih polifenola, ABTS i suhe tvari, a kod ANN taj redoslijed predstavljaju suha tvar, DPPH i voda.

5. ZAKLJUČCI

1. Razvijena neuronska mreža „10-13-10“ osigurava dobro slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i modelom predviđenih vrijednosti na razini učenja, testiranja i validacije jer su za svih 10 fizikalno kemijskih parametara koeficijenti determinacije na skoro svim razinama (učenje, testiranje, validacija) viši od 0,9. Iznimka je jedino vrijednost R^2 za validaciju kod udjela suhe tvari koja iznosi 0,858. Razvijena umjetna neuronska mreža može se koristiti za predikciju fizikalno-kemijskih parametara na temelju NIR spektra.
2. Umjetna neuronska mreža „10-13-10“ na temelju NIR spektra i PCA analize osigurala je predikciju fizikalnih parametara koji su krećući od najmanje do najveće vrijednosti koeficijenta determinacije slijedeći: Suha tvar, udio vode, električnavodljivost, TDS, pH i Pepeo. Za kemijske parametre taj redoslijed je: DPPH, FRAP, ABTS i ukupni polifenoli.
3. NIR spektri u kombinaciji s PCA analizom i PLS modeliranjem nisu pokazali tako dobru mogućnost predikcije kakva je dobivena pomoću umjetnih neuronskih mreža.

1. Abdel-Lateif, K. S., Maghrabi, I. A., Eldeab, H. A. (2016) The Plant Natural Products: Their Antioxidants, Free Radical Scavengers, DNA Protection and Antimicrobial Activities. *J. BioprocessBiotech.* **6** (9), 1-7.
2. Abdi, H. (2010) Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *Wiley interdisciplinary reviews: Computational statistics.* **2**, 97-106.
3. Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., Shahidi, F. (2001) Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1410–1416.
4. Alishahi, A., Farahmand, H., Prieto, N., Cozzolino, D. (2010) Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: A review. *Spectrochimica Acta Part A.* **75**, 1–7. DOI: 10.1016/j.saa.2009.10.001
5. Anderson, J. J., Anthony, M. S., Cline, J. M., Washburn, S. A., Garner, S. C. (1999) Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Publ. Health Nutr.* **2**, 489-504.
6. Angerosa, F., Giacinto, L. D., Vito, R., Cumitini, S. (1996). Sensory evaluation of virgine olive oils by artificial neural network processing of dynamic head-space gas chromatography data. *J. Sci. Food Agric.*, **72**(3), 323-328.
7. Anonymus 1 AMT-METRIKS (2008), <<http://www.amtmetriks.ba/cms/index.php?mjeraci-vodljivosti>>,pristupljeno 28. srpnja 2019.
8. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426-436.
9. Azwanida, N. N. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle,Strength and Limitation. *Medicinal&AromaticPlants.* **4** (196).
10. Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences.* **78**, 431-441.
11. Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (2010) Essentialoils – science: technology and applications, CRC Press, Taylor &Francis Group, New York.
12. Bašić, D., Čupić, M., Šnajder, J. (2008) Umjetne neuronske mreže . Umjetna inteligencija. Zavod za elektorniku, mikroelektroniku i inteligentne sustave, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet elektrotehnike i računarstva.
13. Bayliak, M. M., Burdyliuk, N. I., Lushchak, V. I. (2016) Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. *Open life sci.* **11**, 298-307.

14. Belščak-Cvitanović, A., Valinger, D., Benković, M., Jurinjak Tušek, A., Jurina, T., Komes, D., Gajdoš Kljusurić, J. (2018) Integrated approach for bioactive quality evaluation of medicinal plant extracts using HPLC-DAD, spectrophotometric, near infra red spectroscopy and chemometric techniques. *Int. J. Food Prop.* 1-19.
15. Bochereau, L., Bourguine, P., Palagos, B. (1992) A method for prediction by combining data analysis and neural networks: Application to prediction of apple quality using near infra-red spectra. *J. Agric. Eng. Research*, **51**, 207-216.
16. Bondet, V., Brand-Williams W., Berset C. (1997) Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Academic Press Limited*. **30**, 609-615.
17. Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
18. Cosa, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 290–302.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. (2000) Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, **24**, 1250-1319.
19. Dadić, Ž. (2001) Priručnik o temeljnoj kakvoći vode u Hrvatskoj. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb.
20. Delgado, A., Rauch, C., Park, J., Kim, Y., Gross, F., Diez, L. (2016) Artificial Neural Networks: Application in Food Processing. Reference Module in Food Science. Elsevier Inc.
21. Dobrivojević, M., <<http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor459.htm>>, pristupljeno 1.9.2019.
22. Dou, Y., Zou, T., Liu, T., Qu, N., Ren, Y. (2007) Calibration in non-linear NIR spectroscopy using principal component artificial neural networks. *Spectrochimica Acta Part A*. **68**, 1201–1206.
23. Duband, F., Carnat, A.P., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., Clair, G., Lamaison, J. L. (1992) Aromatic and polyphenolic composition of infused peppermint, *Mentha piperita* L. *Ann Pharm Fr.* **50**, 146-155.
24. Ekor, M. (2013) The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol.* **4**, 177.
- El-Sayed, S. M., Youssef, A. M. (2019) Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon*. **5** (6), 1-7.
25. Eltayeib, A. A., Hamade, H. (2014) Phytochemical and chemical composition of water extract of *Hibiscus Sabdariffa* in North Kordofan state Sudan. *Hypertension*. **2**, 4.

26. Funes, E., Allouche, Y., Beltran, G., Jimenez, A. (2015) A review: Artificial neural networks as tool for control food industry process. *J. Sensor Tech.* 5, 28 – 43.
27. Gad, H. A., El-Ahmady, S. H., Abou-Shoer, M. I., Al-Azizi, M. M. (2012) Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. *Phytochem. Analysis.* **24**, 1-24.
28. Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B.L., Maggio, R. M. (2017) Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends Food Sci. Tech.* **72**, 83-90.
29. Halberstein, R. A. (2005) Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Ann. Epidemiol.* **15**, 686–699.
30. Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy.
31. Hartmann T. (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemical.* **68**, 2831–2846.
32. Hernandez, Y., Lobo, M. G., Gonzalez, M. (2009) Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chem.* **114**, 734-741.
33. Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006) Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chem.* **98**, 136-148.
34. Huang, Y., Xiao, D., Burton-Freeman, B. M., Edirisinghe, I. (2016) Chemical Changes of Bioactive Phytochemicals during Thermal Processing. Reference Module in Food Science, Elsevier Inc.
35. Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line. *Kem. Ind.* **62**, 71-80.
36. Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Belščak Cvitanović, A., Valinger D., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J. (2016) Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from Asteraceae plants. *Ind. Crops Prod.* **91**, 205-214.
37. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* **55**, 279-290.

38. Khan, N., Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*. **81** (7), 519-533.
39. Knez, M. (2014) Antioksidansi. Završni rad. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek..
40. Kolak, I., Šatović, Z., Rukavina, H., Rozić, I. (1997) Ljekovito bilje na hrvatskim prostorima. *Sjemenarstvo*. **14** (97) 5-6, 341-353.
41. Lachman, J., Hosnedl, V., Pivec V., Orsak, M. (1998) Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. *Proceedings of Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*. **7**, 118–125.
42. Lorber, A., Wangen, L., E., Kowalski, B., R. (1978) A theoretical foundation for the PLS algorithm. *J. Chemometr.* **1**, 19-31.
43. Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **16**, 77-84.
44. Matijević, B., Blažić, M. (2008) Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo*, **58**, 151-169.
45. McClements J., 2003 < <https://people.umass.edu/~mcclemen/581Toppage.html> > pristupljeno 26. kolovoza 2019.
46. McGoverin, C. M., Weeranantanaphan, J., Downey, G., Manley, M. (2010) The application of near infrared spectroscopy to the measurement of bioactive compounds in food commodities. *J. NearInfraredSpectrosc.* **18**, 87-111.
47. Moharram, H. A., Youssef, M. M. (2014) Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *FoodSciTechnol.* **11**, 31-42.
48. Nikolić, T. (2001) The diversity of Croatian vascular flora based on the Checklist and CROFlora database. – *Acta Bot. Croatica*. **60(1)**: 49-67.
49. Ong, E. S., Cheong, J. S. H., Goh, D. (2006) Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *J. Chromatogr. A*. **1112**, 92-102.
50. Osborne, B. G. (2006) Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 1-14.
51. Pasikatan, M. C., Steele, J. L., Spillman, C. K., Haque E. (2001) Near infrared reflectance spectroscopy for online particle size analysis of powders and ground materials. *J. Near Infrared Spectrosc.* **9**, 153-164.

52. Peiris, K. H. S., Dull, G. G., Leffler, R. G., Kays, S. J. (1998). Near-infrared (NIR) spectrometric technique for nondestructive determination of soluble solids content in processing tomatoes. *J. Am. Soc. for Hortic. Sci.*, **123**(6), 1089-1093.
53. Pregiban, K. (2017) Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti. Završni rad. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek.
54. Rajurkar, N. S., Hande, S. M. (2011) Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian J. Pharm. Sci.* **73** (2), 146-151.
55. Růžicková, J., Šustová, K. (2006) Determination of Selected Parameters of Quality of the Dairy Products by NIR Spectroscopy. *Czech. J. Food Sci.* **24** (6), 255-260.
56. Scalbert, A., Johnson, I., Saltmarsh, M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 2155-2175.
57. Shadidi, F., Naczki, M. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food, *J. Chromatog. A.* **1054**, 95-111.
58. Shalaby, E. A., Shanab, S. M. M. (2013) Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J. Geo-mar. Sci.* **42**, 556-564.
59. Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphormolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
60. Smith, R.M. (2003) Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatog.* **1000**, 3-27.
61. Tapsell, L. C., Hemphill, I., Cobiaci, L., Patch, C. S., Sullivan, D. R., Fenech, M., Roodenrys, S., Keogh, J. B., Clifton, P. M., Williams, P. G., Fazio, V. A., Inge, K. E. (2006) Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Med. J. Aust.* **185**, 4-24.
62. Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, S.Y. (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem.* **99**, 835-841.
63. Valinger, D., Benković, M., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Belščak-Cvitanović, A., Gajdoš Kljusurić, J., Bauman, I. (2017) Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis for particle size control of dried medicinal plants. *Journal of processing and energy in agriculture*. **21**, 17-22.

64. Valinger, D., Kušen, M., Jurinjak Tušek, A., Panić, M., Jurina, T., Benković, M., Radojčić Redovniković, I., Gajdoš Kljusurić, J. (2018) Development of Near Infrared Spectroscopy Models for Quantitative Prediction of the Content of Bioactive Compounds in Olive Leaves. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **32** (4) 535–543.
65. Vankar, P.D. (2004) Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, 30-42.
66. Vlassides, S., Ferrier, J.G., Block, D.E. (2001) Using Historical Data for Bioprocess Optimization: Modeling Wine Characteristics Using Artificial Neural Networks and Archived Process Information. *Biotechnol Bioeng.* **73**, 55-68
67. Wold, S., Sjostrom, M., Eriksson, L. (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* **58**, 109-130.
68. Ying, D., Tingting, Z., Tong, L., Nan, Q., Yulin, R. (2007) Calibration in non-linear NIR spectroscopy using principal component artificial neural networks. *Spectrochimica Acta Part A.* **68**, 1201-1206.
69. Zheng, W., Wang, S.Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5165-5170.
70. Živko, T. (2012) Određivanje antioksidativnog učinka, ukupnih fenola i tanina u plodu rogača. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

DORIS DABIĆ

Dabić

Ime i prezime studenta