

# Primjena kemometrije i umjetnih neuronskih mreža u karakterizaciji in- vitro procesa probave multivitaminskih dodataka prehrani

---

**Morduš, Josip**

**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:159:348685>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2019.

Josip Morduš  
1060/N

**PRIMJENA KEMOMETRIJE I  
UMJETNIH NEURONSKIH  
MREŽA U KARAKTERIZACIJI  
*in-vitro* PROCESA PROBAVE  
MULTIVITAMINSKIH  
DODATAKA PREHRANI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom 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.

Izrazito se zahvaljujem svome mentoru, doc.dr.sc Davoru Valingeru kao i doc.dr.sc. Maji Benković koji su svojom velikom voljom, upornošću, strpljenjem, ali i visokom profesionalnošću, znanjem i iskustvom sudjelovali u izradi ovog rada. Također zahvaljujem se svim djelatnicima laboratorija koji su uvijek bili na raspolaganju za sva pitanja. Ovu priliku koristim i da zahvalim svim svojim dragim ljudima bez kojih ne bih uspio privesti kraju ovaj predivan period studiranja.

## 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

### PRIMJENA KEMOMETRIJE I UMJETNIH NEURONSKIH MREŽA U KARAKTERIZACIJI *in-vitro* PROCESA PROBAVE MULTIVITAMINSKIH DODATAKA PREHRANI

*Josip Morduš, 1060/N*

#### **Sažetak:**

Multivitaminski dodaci prehrani predstavljaju jedan od najkonzumiranijih oblika tih proizvoda i na tržištu se mogu naći u brojnim izvedbama. Jedan od takvih oblika je i multivitaminski prah koji se konzumira kao napitak nakon miješanja s vodom. Velik je izazov provesti suvremene računalne analize probavljivosti u kontekstu antioksidativne aktivnosti te brojnih drugih svojstava u svrhu karakterizacije potencijalnog zdravstvenog učinka, a upravo takva metoda je primjenjivana u ovom radu. Cilj ovoga rada bio je, uz određivanje fizikalnih (raspodjela veličine čestica, nasipna gustoća, svojstva tečenja, sadržaj vlage, električna vodljivost i ukupne otopljene tvari) i kemijskih (antioksidacijski kapacitet, sadržaj šećera) svojstava multivitaminskih dodataka prehrani, tijekom *in-vitro* probave napraviti modele umjetnih neuronskih mreža (ANN), na temelju prethodno napravljene analize glavnih komponenata (PCA), koji bi povezali uzorke snimljene blisko infracrvenom spektroskopijom (NIR) i ultraljubičasto-vidljivom (UV/VIS) spektroskopijom s dobivenim rezultatima. Kreirani ANN model *in-vitro* procesa probave puno se bolje pokazao u slučaju NIR spektroskopije gdje su vrijednosti koeficijenata determinacije za predviđanja vrijednosti električne vodljivosti, refrakcijskog indeksa, stupnja Brix-a te antioksidativne aktivnosti bile u rasponu 0,930 – 0,997 dok su za UV/VIS spektroskopiju bile u rasponu 0,115 -0,449.

**Ključne riječi:** *multivitamin, dodatak prehrani, umjetne neuronske mreže (ANN), in-vitro probava*

**Rad sadrži:** 50 stranica, 12 slika, 18 tablica, 47 literaturnih 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. Maja Benković*
4. *Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević*

**Datum obrane:** 25. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Process Engineering  
Laboratory for measurement, control and automation

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

### APPLICATIONS OF CHEMOMETRICS AND ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS IN CHARACTERIZATION *in-vitro* DIGESTION PROCESS OF MULTIVITAMIN DIETARY SUPPLEMENTS

*Josip Morduš, 1060/N*

#### Abstract:

Multivitamin dietary supplements represent one of the most consumed types of those products, which can be found on the market in numerous forms. One of these forms is a multivitamin powder which is consumed as a beverage after mixing it with water. It is challenging to perform modern computational analyses of digestibility in the context of antioxidant activity and many other properties to characterize the potential health effect, and in this thesis, that exact method is used. The aim of this study was to determine the physical (particle size distribution, bulk density, flow properties, moisture content, electrical conductivity, and total dissolved solids) and chemical (antioxidant capacity, sugar content) properties of multivitamin supplements, additionally to create artificial neural network (ANN) models during *in-vitro* digestion, based on previously performed principal component analysis (PCA), which would connect samples recorded by near-infrared (NIR) spectroscopy and ultraviolet-visible (UV/VIS) spectroscopy with the obtained results. Created ANN model of the *in-vitro* digestion process proved much better in the case of NIR spectroscopy where the values of the coefficients of determination for the predictions of the values of electrical conductivity, refractive index, degree of Brix and antioxidant activity were ranged from 0,930 to 0,997 while for UV/VIS spectroscopy were ranged from 0,115 to 0,449.

**Keywords:** *multivitamin, dietary supplement, artificial neural network (ANN), in-vitro digestion*

**Thesis contains:** 50 pages, 12 figures, 18 tables, 47 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis 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 Maja Benković, Assistant professor*
4. *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor (substitution)*

**Thesis defended:** September 25<sup>th</sup>, 2019

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. DODACI PREHRANI .....	2
2.2. ANTIOKSIDANSI KAO DODACI PREHRANI.....	3
2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH I FRAP METODOM4	
2.3.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	4
2.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	5
2.4. ANALIZA PRAHOVA .....	6
2.4.1. Nasipna gustoća.....	7
2.4.2. Raspodjela veličine čestica multivitaminskih zrnaca .....	7
2.4.3. Indeks kohezije.....	8
2.4.4. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača .....	8
2.4.5. PFSD TEST (eng. <i>Powder Flow Speed Dependency Test</i> - procjena stabilnosti prahova).....	9
2.5. PCA (eng. <i>Principal component analysis</i> - analiza glavnih komponenata).....	10
2.6. ANN (eng. <i>Artificial neural networks</i> - umjetne neuronske mreže) .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
3.1. MATERIJALI .....	13
3.1.1. Otapala i reagensi .....	13
3.1.2. Aparatura i pribor .....	14
3.2. METODE .....	16
3.2.1. Fizikalna svojstva početnih uzoraka i otopina .....	16
3.2.1.1. Nasipna gustoća.....	16
3.2.1.2. Raspodjela veličine čestica multivitaminskih zrnaca .....	16
3.2.1.3. Sadržaj vlage i suhe tvari multivitaminskih zrnaca i bombona.....	16
3.2.1.4. Električna vodljivost i ukupne otopljene tvari .....	17
3.2.1.5. Priprema početnih uzoraka .....	17
3.2.2. Analiza multivitaminskih prahova .....	18
3.2.2.1. Indeks kohezije.....	18
3.2.2.2. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača .....	18
3.2.2.3. PFSD TEST (eng. <i>Powder Flow Speed Dependency Test</i> - procjena stabilnosti prahova).....	18
3.2.3. Kemijska svojstva početnih uzoraka i otopina te in-vitro simulacija probave multivitaminskih dodataka prehrani .....	18



3.2.3.1. Udio šećera .....	19
3.2.3.2. In-vitro simulacija probavnog sustava .....	19
3.2.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	20
3.2.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	21
3.2.3.5. Blisko infracrvena spektroskopija (NIRS) i ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektroskopija.....	22
3.2.4. Statistička obrada podataka: PCA (eng. <i>Principal component analysis</i> - analiza glavnih komponenta) i ANN (eng. <i>Artificial neural networks</i> -umjetne neuronske mreže) .....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
4.1. Fizikalna svojstva početnih uzoraka i otopina .....	25
4.1.1. Nasipna gustoća.....	25
4.1.2. Raspodjela veličina čestica.....	26
4.1.3. Sadržaj vlage i suhe tvari.....	27
4.1.4. Električna vodljivost i ukupne otopljene tvari .....	28
4.1.5. Analiza multivitaminskih prahova .....	30
4.2. Kemijska svojstva početnih uzoraka i otopina te in-vitro simulacija probave multivitaminskih dodataka prehrani .....	32
4.2.1. Udio šećera .....	32
4.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	34
4.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	36
4.3. Statistička obrada podataka: PCA (eng. <i>Principal component analysis</i> - analiza glavnih komponenta) i ANN (eng. <i>Artificial neural networks</i> -umjetne neuronske mreže).....	39
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>45</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>46</b>

# 1. UVOD

Dodaci prehrani sve se više konzumiraju u svijetu pa tako podaci govore da je svaki drugi odrasli Amerikanac stariji od 20 godina, konzumirao dodatak prehrani unutar 30 dana od dana ispitivanja (Kantor i sur., 2016). Od dodataka prehrani, u jednom istraživanju na velikom broju američke populacije najkonzumiraniji dodatak prehrani je multivitamin (Radimer i sur., 2004). U Europskoj uniji, podaci iz 2000 godine prema European Journal of Clinical Nutrition (2009) govore da je konzumacija dodataka prehrani različita ovisno o zemlji članici unije pa se tako dodaci prehrani najviše konzumiraju u Skandinavskim zemljama, a najmanje u Grčkoj (Skeie i sur., 2009). Također veći dio populacije koji konzumiraju dodatke prehrani predstavljaju žene. Najdominantniji razlog konzumacije dodataka prehrani među općom populacijom navodi se poboljšanje zdravlja te nadopunjavanje nutritivnog unosa u cilju ispunjavanja dnevnih preporučenih doza nutrijenata koji se zbog nepravilne prehrane ne uspiju unijeti hranom (Dickinson i Mackay, 2014). Važno je napomenuti da je najzdraviji način podmirivanja nutritivnih potreba pravilna prehrana. Na tržištu se nalaze razni dodaci prehrani, vitamini i minerali, omega-3 masne kiseline, antioksidansi, biljni i životinjski ekstrakti te brojni drugi, a jedan zaseban dio se odnosi na ergogena sredstva- dodatke prehrani koji imaju funkciju poboljšati sportsku izvedbu. Multivitamin je definiran prema autorima kao dodatak prehrani koji sadrži tri ili više od tri vitamina, a u njega ne moraju nužno biti dodani minerali (Dickinson i Mackay, 2014). Upravo je cilj ovog rada bio istražiti fizikalna i kemijska svojstva multivitaminskog praha s okusom limuna kao i multivitaminskog komprimiranog bombona također s okusom limuna. Analiza prahova također je jedan od ključnih elemenata ovog diplomskog rada iako ti podaci ne sudjeluju u kreiranju umjetne neuronske mreže. Za izradu idealnog modela umjetne neuronske mreže, koja ima svrhu predvidjeti određene fizikalne i kemijske parametre dodataka prehrani nalik ovima ispitivanim u radu, osim brojnih kemometrijskih metoda provedena je i *in-vitro* simulacija probave gdje je ispitan antioksidacijski učinak, kao jedan od parametara čiji su podaci korišteni za izradu modela umjetne neuronske mreže. Također antioksidacijski učinak kroz probavni sustav zanimljiv je sa zdravstvenog aspekta jer daje odgovore na pitanja o potencijalnom pozitivnom zdravstvenom učinku. Kreiranju umjetne neuronske mreže prethodila je analiza glavnih komponenti (PCA) koja je spregnuta s ANN kako bi dobili što točniji model, stoga ovaj rad predstavlja inovativnu analizu više različitih varijabli u cilju karakterizacije procesa *in-vitro* probave multivitaminskih dodataka prehrani s okusom limuna.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. DODACI PREHRANI**

Vrijednost tržišta dodataka prehrani u stalnom je usponu, a zadnji podaci govore o ukupnoj vrijednosti tržišta od 101,38 milijarde USD (Anonymus 1, 2019). Geografski gledano najveće tržište dodataka prehrani je Kina, a najveće rastuće tržište je Azija i Pacifik gdje većinom dominiraju ajurvedski dodaci prehrani. Dodaci prehrani spadaju u široki spektar proizvoda, a cilj im je očuvati zdravlje, odnosno ostvariti povoljni učinak na zdravlje pojedinca. Prema definiciji iz važećeg pravilnika dodacima prehrani smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja (Pravilnik, 2013). Pravilnikom su propisani uvjeti u vezi sastava, označavanja i stavljanja na tržište te se ne odnose na lijekove, koji su određeni svojim zakonom. Hranjive tvari u toj definiciji smatraju se vitaminima i mineralima, a druge hranjive tvari predstavljaju grupu koje mogu činiti aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna i ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom (Pravilnik, 2013). Dodaci prehrani na tržište se mogu stavljeti isključivo zapakirani i to pojedinačno ili u kombinaciji, a oblici su kapsule, pastile, tablete i slično gdje je količina već dozirana, ili u prahu, granulama, tekućinama i ostalim oblicima koje se samostalno mora uzeti u odmjerenim količinama propisanim od strane proizvođača. Iz svega navedenog zaključujemo da dodaci prehrani egzistiraju negdje između hrane i lijeka pa vrlo često dolazi do nesuglasica kod shvaćanja i interpretiranja njihove primjene i učinkovitosti, a glavni razlog je slabija regulativa nego što je to slučaj kod lijekova. Osim dileme o učinkovitosti na temelju određenih znanstvenih spoznaja, drugi problem s kojim se potrošači nose su kvaliteta i sigurnost, jer neupitno dolazi do variranja u sastavu između proizvodnih serija, a problem predstavljaju i moguće kontaminacije. Istraživanje o konzumaciji dodataka prehrani u Europskoj uniji provedena je na 36034 ispitanika kroz 5 godina, završetkom 2000. godine, a rezultati pokazuju da dodatke prehrani više konzumiraju žene (Skeie i sur., 2009). Također puno je veća konzumacija dodataka prehrani u Skandinavskim zemljama npr. Danska (51 % kod muškaraca, 65,8 % kod žena, a dosta niža u Grčkoj (2 % kod muškaraca, 6,7 % kod žena). Konzumacija se uvelike razlikuje od zemlje do zemlje, a najviše se konzumiraju vitamini i minerali te njihove kombinacije (multivitamini s ili bez minerala) (Skeie i sur., 2009). Zanimljivo je da pravilnikom

nije propisana definicija dodatka prehrani pod nazivom multivitamin, koji se ujedno i najviše konzumira. Najčešća kombinacija dodataka prehrani koji se deklariraju kao multivitamini je od 13 vitamina uz dodatak određene količine mineralnih tvari. Zdravstveni sustavi na globalnoj razini traže način kako smanjiti prevalenciju kroničnih nezaraznih bolesti i stoga velike nade polažu u efikasnu strategiju prevencije istih. Malnutricija predstavlja stanje kada ne dolazi do unosa odgovarajuće količine nutrijenata te je vrlo ovisna o zdravstvenom stanju pojedinca. Malnutricija definitivno utječe na razvoj bolesti te se procjenjuje da je broj osoba koji ne zadovoljavaju nutritivni unos za određeni nutrijent otprilike oko 2 milijarde, od kojih najveći broj predstavlja nedostatak željeza (IFPRI, 2015). Anemija, pogađa 43 % djece, 38 % trudnica i 29 % žena nereproduktivne dobi (WHO, 2015). Dosta često malnutricija i nutritivni deficit nastupa zbog neadekvatne prehrane koja ovisi isključivo o odabiru pojedinca i ne ovise o demografskim obilježjima. Baš iz tog razloga brojni pojedinci odlučuju se za konzumaciju dodataka prehrani na svoju odgovornost zbog toga što smatraju da se ne hrane adekvatno te da će tako, unosom dodataka prehrani, pozitivno djelovati na svoje zdravlje. Kada u kontekst stavljamo određene nutrijente te prevenciju i liječenje kroničnih nezaraznih bolesti kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, hipertenzija te druge bolesti poput osteoporoze, rezultati takvih studija su često oprečni te se toj temi treba pristupiti vrlo oprezno, što često nije slučaj u industriji dodataka prehrani. U ovom radu neće biti previše riječi o dodacima prehrani te prevenciji i liječenju bolesti, ali to predstavlja budućnost istraživanja u biomedicinskom području znanosti.

## **2.2. ANTIOKSIDANSI KAO DODACI PREHRANI**

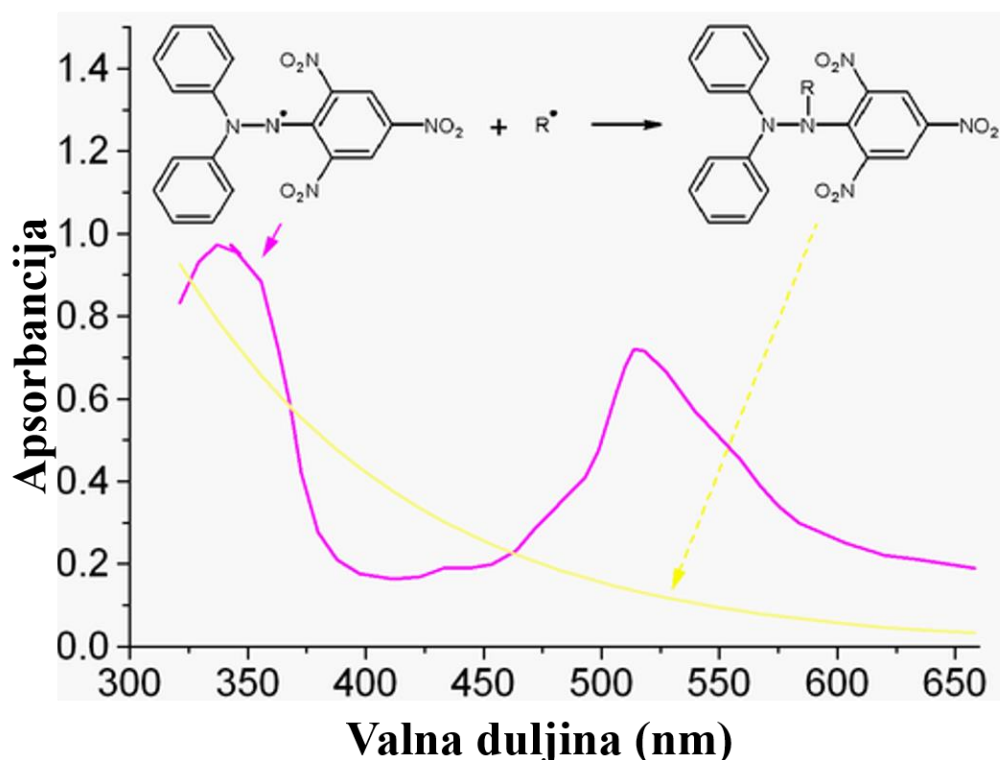
Antioksidansi uglavnom neselektivno djeluju na slobodne radikale te ih neutraliziraju, a samim time djeluju protektivno na organizam. Mehanizmi kojima oni djeluju su neutralizacija već postojećih radikala, sprječavanje nastanka slobodnih radikala, sudjeluju u popravku oštećenja nastalim slobodnim radikalima te u uklanjanju oštećenih stanica (Štefan i sur., 2007). Antioksidacijski mogu djelovati enzimi, vitamini, minerali (selen), glutation, koenzim Q, polifenoli, urati, bilubirin i transferin te se većina njih može naći u dodacima prehrani. U ovom se radu govori o antioksidacijskom učinku multivitamina stoga će i biti riječ isključivo o njima. Vitamini koji najsnažnije djeluju antioksidacijski su vitamin C, vitamin E te provitamin vitamina A;  $\beta$ -karoten. Antioksidacijski učinak vitamina C djeluje mehanizmom doniranja elektrona, vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) kidanjem lanca djeluje antioksidacijski, dok  $\beta$ -karoten

uklanja singletni kisik i slobodne radikale (Sies i sur.,1992; Štefan i sur., 2007). Vitamin C regenerira vitamin E te mu omogućuje daljnje djelovanje. Kombinacija vitamina u dodacima prehrani, odnosno multivitamini koji su najčešći oblik konzumiranih dodataka prehrani, posljedica su želje potrošača da nadomjeste unos nutrijenata zbog neadekvatne prehrane. Učinak konzumacije multivitamina kroz 43 mjeseca testirana je meta-analizom randomiziranih kontroliranih studija čiji rezultati ne pokazuju utjecaj njihove konzumacije na rizik od smrtnosti, stoga je vrlo diskutabilno tvrditi da postoje jaki učinci na poboljšanje zdravlja koji mogu nadjačati učinke drugih faktora koji djeluju na rizik od smrtnosti (Macpherson i sur., 2013).

## **2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH I FRAP METODOM**

### **2.3.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom**

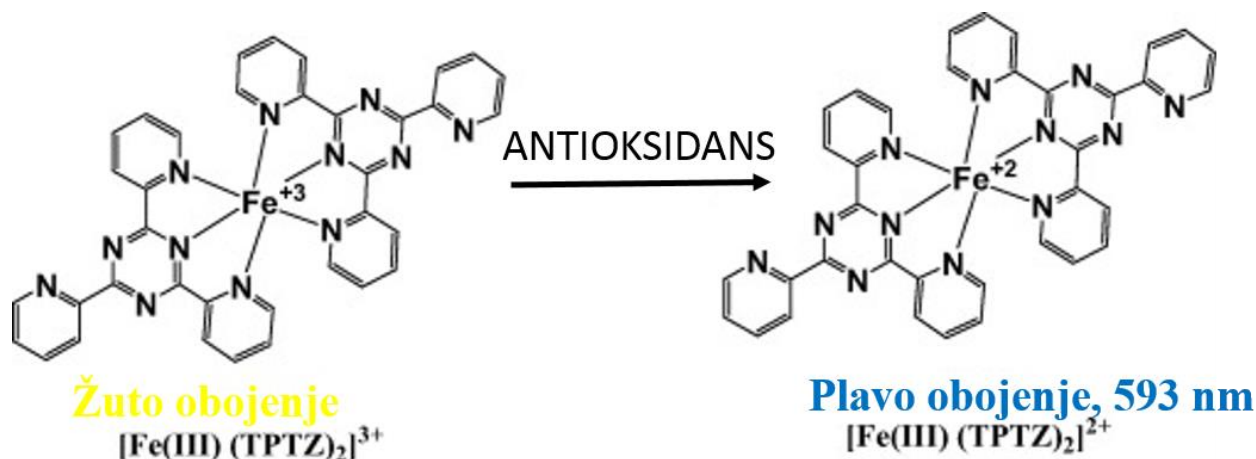
DPPH metoda vrlo često se koristi pri ispitivanju antioksidacijske sposobnosti promatranih uzoraka. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je dušikov radikal koji ima ljubičasto obojenje, komercijalno je dostupan i zbog toga je jedan od najčešće korištenih radikala za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Na slici 1. prikazana je ovisnost apsorbancije DPPH pri kemijskoj reakciji antioksidacije zajedno s kemijskom strukturom. Kada je DPPH radikal otopljen u metanolu pokazuje visoke vrijednosti apsorbancije na valnoj duljini od 515 nm (515-528 nm), dok se dodatkom antioksidansa, elektron donora, pri sparivanju elektrona i stabilizaciji radikala boja mijenja u žutu zbog nastanka hidrazina (Pyrzynska i Pekal, 2013). Mjerenje promjene apsorbancije pri istoj valnoj duljini nakon vremena inkubacije od 30 minuta uspoređuje se u odnosu na isti učinak standardiziranog antioksidansa-reducensa Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2- karboksilne kiseline) koji je analog u vodi topljivog vitamina E. Mjerenje apsorbancije izvodi se u odnosu na slijepu probu - otopinu 0,094 mM DPPH u metanolu bez dodatka uzorka. Vrijednost apsorbancije uzoraka se dobivaju nakon oduzimanja izmjerene apsorbancije od apsorbancije slijepa probe koja pokazuje najveće vrijednosti apsorbancije jer u njoj nije došlo do antioksidacijske reakcije te se izražava kao promjena apsorbancije DPPH radikala ( $\Delta A$ ). Nakon mjerenja uzorka konstruira se baždarni dijagram na temelju mjerenja sa standardnim koncentracija Trolox-a.



Slika 1. Ovisnost apsorbancije DPPH pri kemijskoj reakciji antioksidacije zajedno s kemijskom strukturom DPPH radikala (Anonymous 2, 2019).

### 2.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power* – antioksidativna moć redukcije željeza) metoda zasniva se na redukciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) od strane reducensa-antioksidansa pri čemu dolazi do promjene obojenja u plavo koje pokazuje maksimum apsorpcije na valnoj duljini 593 nm (Benzie i Strain, 1996). Na slici 2. prikazana je ovisnost apsorbancije TPTZ pri kemijskoj reakciji antioksidacije zajedno s kemijskom strukturom. Prijenos elektrona uzrokuje promjenu kompleksa  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  kompleks koji dovodi do promjene obojenja kompleksa. Do reakcije prijenosa elektrona dolazi jako brzo, pa je tako vrijeme inkubacije 4 minute što je ujedno i prednost i nedostatak metode. Mjerenje apsorbancije se izvodi u odnosu na slijepu probu koja se priprema tako da se umjesto uzorka doda 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Svaki uzorak mjeri se u dvije paralele. Od apsorbancije izmjerenih uzorka oduzima se vrijednost apsorbancije slijepa probe te se izražava kao promjena apsorbancije TPTZ radikala ( $\Delta A$ ). Slijepa proba ima najmanju vrijednost apsorbancije jer nema antioksidacijske reakcije i ne dolazi do promjene obojenja u plavo. Nakon mjerenja uzorka konstruira se baždarni dijagram na temelju mjerenja sa standardnim uzorcima  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ .



Slika 2. Ovisnost apsorbancije TPTZ pri kemijskoj reakciji antioksidacije zajedno s kemijskom strukturom (Pérez-Cruz i sur., 2018).

## 2.4. ANALIZA PRAHOVA

Prahovi se uglavnom definiraju kao smjese od pojedinačnih čestica i strukture manje od 150  $\mu\text{m}$ . Definicija protjecanja prahova prema radu Ilari iz 2002 godine može se okarakterizirati kao lakoća pomicanja čestica ili nakupine čestica te njihovo ponašanje u tom procesu. Tipična karakterizacija predstavlja određena fizikalna i kemijska svojstva, a osim njih izrazito su važna svojstva tečenja zbog optimizacije procesa prerade. Prahovi zbog svoje velike primjene zahtijevaju karakterizaciju zbog optimizacije tehnološkog procesa, a najčešći parametri koji se za to koriste su nasipna gustoća, svojstva tečenja, raspodjela veličine čestica te mikroskopske karakteristike prahova (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Samo protjecanje ovisi o više parametara, a osim osobine prahova koje utječu na protjecanje neizostavan je i utjecaj opreme i njenih karakteristika (Ilari, 2002, Prescott i Barnum, 2000). Faktori koji utječu na svojstva tečenja prikazani su u Tablici 1. U ovom radu na multivitaminskim prahovima provedeni su testovi PFSD TEST (eng. *Powder Flow Speed Dependency Test*- procjena stabilnosti prahova), test procjene sposobnosti stvaranja čvrstog kolača te QUICK TEST (eng-brzi test).

Tablica 1. Svojstva sipkih (praškastih) materijala (Freeman, 2007, Bobinac, 2009).

**1. Fizička svojstva čestica: masa, oblik, raspon veličina, elastičnost, tvrdoća, porozitet, tekstura, uglatost i interakcije među česticama**

**2. Faktori okoliša koji utječu na svojstva sipkih materijala, sadržaj vlage i zrak, vibracije te vanjski pritisak. Ovi faktori utječu na fizičku raspodjelu i poredak čestica u masi praha.**

**3. Promjene pojedinih čestica zbog trenja, kemijskih promjena, elektrostatskih naboja i aglomeracije.**

#### 2.4.1. Nasipna gustoća

Nasipna gustoća prahova ili svakog drugog promatranog materijala jednaka je omjeru mase suhog materijala i ukupnog volumena materijala, dok je volumen materijala jednak zbroju volumena čvrste tvari, volumena pora i volumena šupljina. O vremenu sabijanja, odnosno broju vibracija ovisit će nasipna gustoća rastresitog stanja i nasipna gustoća zbijenog stanja (Hausner, 1981). Kod vibracija dolazi do sabijanja praha uzduž vertikalne osi koje uzrokuje istiskivanje zraka i samo smanjenje volumena praha koja rezultira povećanjem nasipne gustoće (Werner i sur., 2007a; Werner i sur., 2007b).

#### 2.4.2. Raspodjela veličine čestica multivitaminskih zrnaca

Distribucija veličina čestica parametar je koji se na navedenom uređaju analizira, a metoda se vrši mjerenjem laserske difrakcije, odnosno mjeri se kutna varijacija u intenzitetu raspršene svjetlosti usred prolaska laserske zrake kroz uzorak (Sennoga i sur., 2012). Mjerenje se provodi tako da se praškasti uzorci usipaju u kadnicu na uređaju koji sitom uzrokuje razbijanje aglomerata i ujednačava brzinu dotoka praha u jedinicu za mjerenje. Prije samog mjerenja uzorka provodi se analiza slijepe probe-odnosno analiza čestica samog zraka koji struji kroz mjernu jedinicu. Zasićenje laserske zrake potrebno je podesiti na 2-6 % uz provedbu tri paralelna mjerenja kroz 10 sekundi. Dobiveni podaci o difrakciji koriste se za izračun pomoću računalne Mie teorije o raspršivanju svjetlosti kako bi se okarakterizirala veličina koja dovodi do takvog načina raspršivanja (Fu i Sun, 2001). Rezultati raspodjele veličine čestica prikazuje se vrijednostima  $d(0,5)$  i  $D[3,2]$  te rasponu veličina čestica u mikrometrima. Parametar  $d(0,5)$  označava srednji promjer raspodjele volumena čestica, a izražava se u mikrometrima. Parametar  $D[3,2]$  predstavlja Sauterov promjer, odnosno površinski srednji promjer (Stojanović i Uskoković, 2010).



### 2.4.3. Indeks kohezije

Svojstvo kohezivnosti predstavlja afinitet prijanjanja čestica i nakupljanja u aglomerate, nakupine više čestica. Analize su provedene na TA.HD.Plus Texture Analyser uređaju u kombinaciji s analizatorom tečenja prahova Powder Flow Analyser-om navedenom u poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor. Rotirajuća oštrica vrši ispitivanje kretanjem prema gore ili dolje kroz uzorak uz rotaciju. Krećući se dolje mjeri se svojstvo sabijanja, a krećući se prema gore najvećom brzinom od 50 mm s<sup>-1</sup> vrši se mjerenje koeficijenta kohezije. Ispituju se svojstva zbijanja i svojstva kohezije. Koeficijent kohezije prikazan je kao površina ispod negativnog dijela krivulje, a indeks kohezije se izračunava ručno: kao kvocijent koeficijenta kohezije i mase uzorka. Vrijednost koja se koristi za interpretaciju rezultata je apsolutna vrijednost indeksa kohezije. Kategorizacija svojstva prahova temeljem indeksa kohezije prikazana je u tablici 2.

Tablica 2 . Kategorizacija svojstva prahova temeljem indeksa kohezije (Shah i sur., 2008; Janjatović, 2011; Benković i sur., 2013).

Indeks kohezije	Svojstvo tečenja praha
> 19	<b>Izrazito kohezivan</b>
16 – 19	<b>Vrlo kohezivan</b>
14 – 16	<b>Kohezivan</b>
11 – 14	<b>Lako teče</b>
< 11	<b>Slobodno teče</b>

### 2.4.4. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača

Test je također proveden koristeći uređaj TA.HD.Plus Texture Analyser-a u kombinaciji s analizatorom tečenja prahova Powder Flow Analyser-om navedenom u poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor. Sama oštrica prilagođava se visini kolone i nakon toga prolazi kroz kolonu prema dnu brzinom 20 mm s<sup>-1</sup> i sabija prah silom od 750 g. Brzina kretanja oštrice kroz uzorak na zadanoj sili je 10 mm s<sup>-1</sup>, a postupak se ponavlja 4 puta. Nakon zadnjeg ciklusa, oštrica

mijenja smjer i reže prah koji je nakon 5 ciklusa formiran u oblik nalik „kolaču“. Uređaj bilježi promjene visine stupca nakon sabijanja uzorka, a rezultati se spremaju kao prosječna čvrstoća „kolača“ u mjernoj jedinici [g mm] (Abu-Hardan i Hill, 2010).

#### 2.4.5. PFSD TEST (*eng. Powder Flow Speed Dependency Test- procjena stabilnosti prahova*)

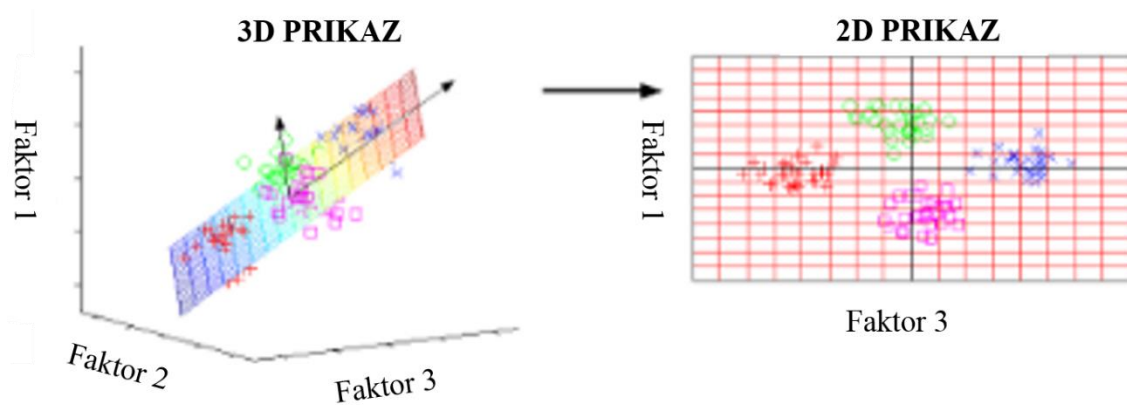
Svojstva tečenja prahova ovisna su o promjeni brzine tečenja kao jednom od parametara koji na to svojstvo utječe. Test se provodi kako bi se izmjerio rad koji je potrebno svladati da prah teče pri različitim brzinama. Test je također proveden koristeći uređaj TA.HD.Plus Texture Analyser-a u kombinaciji s analizatorom tečenja prahova Powder Flow Analyser-om navedenom u poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor. Protok se u navedenom testu mijenja djelovanjem rotirajuće oštrice u dva ciklusa po pet serija. Prva serija provodi se brzinom od  $10 \text{ mm s}^{-1}$ , dok se sljedeće serije izvode brzinama od 20, 50 i  $100 \text{ mm s}^{-1}$ , a zadnja dva ciklusa izvode se brzinom od  $10 \text{ mm s}^{-1}$  (Benković i Bauman, 2009). Sabijanje praha vrši se kretanjem oštrice prema dnu. Vrijednosti koje se bilježe su pri kretanju oštrice prema dolje je pozitivna sila, a negativna sila se bilježi pri kretanju gore. Površina ispod pozitivnog dijela krivulje sila izražava se kao koeficijent sabijanja, suprotno od koeficijenta kohezije, koji se bilježi ispod negativnog dijela krivulje. Indeks stabilnosti izračunava se tako da se podjeli vrijednost koeficijenta sabijanja izmjerenih u prvoj seriji ispitivanja na brzini od  $10 \text{ mm s}^{-1}$  s vrijednostima koeficijentom sabijanja zadnje dvije serije pri istoj brzini od  $10 \text{ mm s}^{-1}$  (Benković i Bauman, 2009). Ako su vrijednosti indeksa sabijanja različite od 1 to ukazuje na promjene svojstva praha. Promjene koje mogu nastupiti su u obliku čestica ili kristalnoj strukturi, razbijanje čestica ili aglomerata. Tumačenje vrijednosti prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Promjene svojstva tečenja prahova ovisno o indeksu sabijanja (Benković i Bauman, 2009).

Indeks sabijanja	Svojstvo tečenja praha
1	nema promjena svojstava praha prilikom testiranja
>1	teže protjecanje praha porastom brzine protoka
<1	lakše protjecanja praha porastom brzine protoka

## **2.5. PCA (eng. *Principal component analysis*- analiza glavnih komponenata)**

Analiza glavnih komponenata predstavlja pouzdanu multivarijatnu analitičku metodu koja ima brojnu primjenu u različitim granama znanosti. Opisana je davne 1901. godine od strane Karla Pearsona, gdje ju je on primijenio na svega dvije ili tri varijable. Multivarijatna analiza podrazumijeva istovremeno analiziranje velikog broja varijabli i mjerenja, a njezinom analizom dobivaju se saznanja o višestrukim zavisnim i nezavisnim varijablama i njihovom međusobnom odnosu (Halmi, 2003). Glavna funkcija analize glavnih komponenata je da omogućuje provedbu kvalitativne analize te podatke grupira ne koristeći fizički model. Drugim riječima sažima podatke zbog što jasnije interpretacije istih. Ušteda vremena prije detaljnije kvantitativne analize nekog uzorka ili promatranja nekog procesa jedna je od prednosti PCA (Jednačak i Novak, 2013). Ono što je generalna funkcija PCA je to da uočava najznačajnije odnose među analiziranim varijablama gdje se brojne varijable svode na određene faktore, odnosno komponente, čiji je broj manji od broja varijabli te se proces analize pojednostavljuje. Također ono što se krajnje dobije korištenjem PCA je regresijska jednadžba koja opisuje temeljne procese analizom promatranih varijabli ili rezultat testiranja hipoteze o njihovoj prirodi. Kada matematički sagledamo, PCA daje linearne kombinacije analiziranih varijabli koja se svodi na faktor. Faktor je linearna kombinacija intenziteta određenog svojstva analiziranog uzorka koji predstavlja određenu i relativnu važnost za taj model (Valinger i sur., 2017). Dobiveni faktori zbrajaju obrasce korelacija u analiziranoj matrici korelacija te daju mogućnost, određene efikasnosti, reprodukcije analizirane korelacijske matrice (Jolliffe, 2002). Grupacija uzoraka u glavne komponente i opisivanje njihova odnosa temelj su metode. Također sama metoda omogućuje grafički prikaz odnosa uzoraka, gdje će se uzorci koji su međusobno slični grupirati zajedno, dok će se udaljenost uzoraka odnosno objekata povećavati s njihovom različitosti. Grafički prikaz predstavlja pozicioniranje uzoraka u kvadrante ili u 3D prostoru kao što je primjerom prikazano na slici 3. Za kvalitetnu PCA od iznimne je važnosti jaka korelacija među varijablama koja može biti ili pozitivna ili negativna (Jolliffe, 2002.) Također, za kvalitetno provođenje PCA dovoljno je uzeti u obzir dvije ili tri komponente, odnosno faktora, a ostali se mogu zanemariti. Tako se analiziranje podataka pojednostavljuje, a gubitak podataka je zanemariv. Prva glavna komponenta, odnosno faktor, uključuje najveći dio ukupne varijance te svaka druga predstavlja najveći dio preostale varijance.

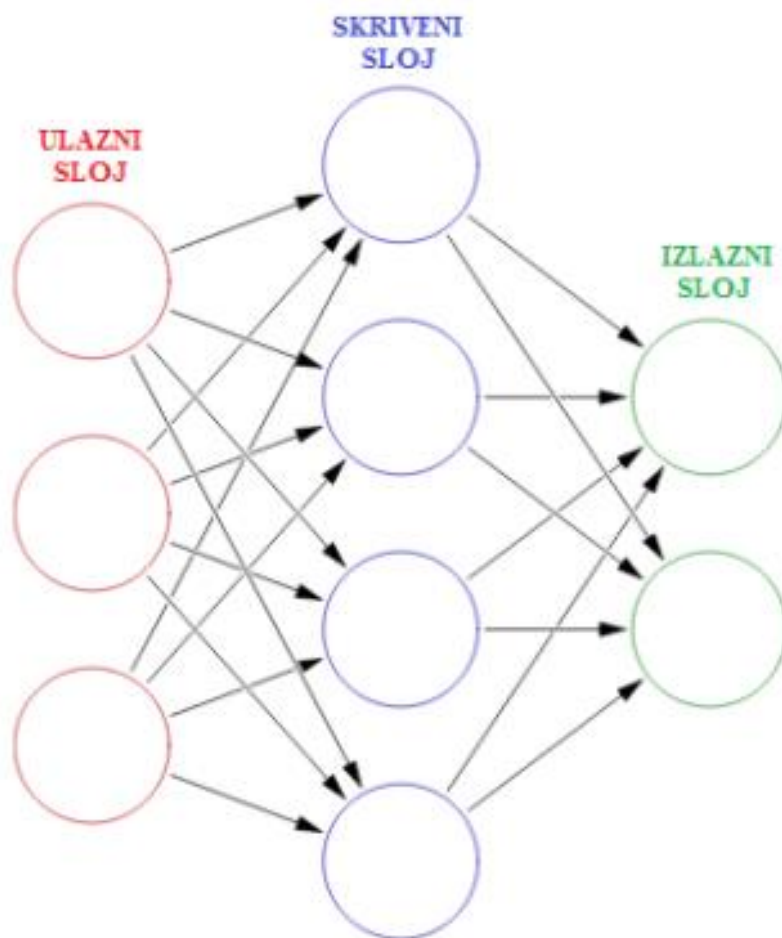


Slika 3. Primjer prikaza rezultata dobivenih PCA (eng. *Principal component analysis*- analiza glavnih komponentata) u 3D i 2D obliku (Anonymous 3, 2019).

## 2.6. ANN (eng. *Artificial neural networks* - umjetne neuronske mreže)

Umjetne neuronske mreže predstavljaju metodu umjetne inteligencije, odnosno alat koji se koristi matematičkim algoritmom bi se prevladala nelinearnost. ANN su nastale kao pokušaj modeliranja sustava koji bi što više nalikovao na ljudski neuron, odnosno mreža oponaša funkciju ljudskog mozga. Umjetna neuronska mreža ima sposobnost učenja iz primjera i iskustva, kao i ljudski mozak te tako ima sposobnost izvesti razne kompleksne nelinearne funkcije, koje bi se vjerojatno uz veliki napor matematički opisati. One se također samoprilagođavaju i samoorganiziraju što je također zajedničko biološkim neuronima. Mrežna arhitektura umjetne neuronske mreže sastoji se od neurona, odnosno čvorova. Čvorove dijelimo u tri sloja, "ulazni sloj", "skriveni sloj" i "izlazni sloj" svaki sa svojom specifičnom funkcijom u mreži te su shematski prikazani na slici 4. Sloj ulaza podataka, odnosno sloj preko kojeg se podaci šalju prema mreži predstavlja "ulazni sloj" i to mu je osnovna funkcija. On prihvaća ulazne signale iz okoline i prijenos te signale na sve neurone skrivenog sloja. Slojevi s odgovorima, ili jednim odgovorom, ovisno o broju kvantificiranih parametara, nalaze se s druge strane i nazivaju se "izlazni sloj". Između njih se nalazi "skriveni sloj" koji se razlikuje po broju čvorova ovisno o prirodi problema kojeg opisuje. Skriveni sloj ne prikazuje, odnosno skriva svoj najbolji izlaz te se ne mogu promatrati kroz ulazno/ izlazno ponašanje mreže. Za obuku višeslojne mreže napajanja naprijed, od svih umjetnih neuronskih mreža, najčešće se koristi

nadgledni algoritam za širenje unatrag. Neto pogreška izračunava se u fazi napajanja na ulaznom uzorku, a zatim se ta izračunata pogreška koristi mijenjanjem vrijednosti težine u smjeru unatrag kroz skrivene slojeve. Vrijeme treninga skraćuje se smanjenjem broja ulaznih neurona te tako omogućuje određivanje više mrežnih rješenja u jedinici vremena što je poželjno (Dou i sur. 2005). Analiza glavnih komponenti (PCA) često se koriste kao ulazi ANN, umjesto izvornih podataka čime se smanjuje broj ulaznih čvorova, a samim time i vrijeme treninga. Takve mreže nazivamo PC-ANN, a prednost im je to što se isključuju slučajne pogreške uporabom PCA kao ulaznih komponenata. ANN predstavljaju snažan alat koji ima brojnu primjedbu, ali neki od nedostataka su dugo trajanje vremena obuke, mukotrpnost i kompleksna interpretacija te snažna ovisnost prediktivnih svojstava ANN o topologiji mreže i parametrima učenja. Kako bi se taj problem minimalizirao, kao ulazne varijable koriste se faktori dobiveni PCA. Metoda PC-ANN korištena u ovom radu solidan je odabir za što učinkovitije modeliranje ne-linearnih sustava (Dou i sur. 2005).



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz modela umjetne neuronske mreže.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

- Multivitaminska zrnca, dodatak prehrani sa šećerom i sladilima s okusom limuna, limete te limuna i bazge
- Multivitaminska zrnca, dodatak prehrani sa sladilima, bez šećera s okusom limuna
- Multivitaminski komprimirani bomboni, dodatak prehrani sa šećerom i sladilima s okusom limuna

##### 3.1.1. Otapala i reagensi

Sljedeća otapala i reagensi su korišteni u eksperimentalnom radu:

- Destilirana voda
- Dinatrijev hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- Natrijev acetat-trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox,  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina (HCl),  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Paris, Francuska)
- Koncentrirana octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- $\alpha$  amilaza (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Natrijev klorid (NaCl) (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Pepsin (Fisher Scientific UK, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)

- Pankreatin (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Željezo (II)-sulfat-heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Žučne soli (SigmaAldrich, Auckland, Novi Zeland)

### 3.1.2 Aparatura i pribor

Sljedeće aparature i pribor korišteni su u eksperimentalnom radu:

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Göttingen, Njemačka)
- Analizator tečenja prahova (Powder Flow Analyser, Stable Micro Systems, London, Velika Britanija)
- Analizator veličine čestica (Malvern Mastersizer 2000, Malvern, Velika Britanija)
- Aparatura za vakuum filtraciju (Rocker 300 – LF 30, New Taipei City, Taiwan)
- Centrifuga (Hettich EBA 8, Föhrenstr, Švicarska)
- Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- Konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Zagreb, Hrvatska)
- Magnetska mješalica (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  Control Development inc., Philadelphia, SAD)
- pH metar (Jenco 601A, Dallas, SAD)
- Potenciometar (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska)
- Refraktometar ABBE, 2WAJ (Bluewave Industry Co.,Ltd., Shanghai, Kina)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, London, Engleska)
- Računalni program Statistica 10 (StatSoft, Round Rock, United States)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Łódź, Poljska)

- Uljna kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Düsseldorf, Njemačka)
- Vibracioni volumetar (laboratorijska izrada)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Pus, Riga, Latvija)

Pribor:

- Aluminijske posudice s poklopcem
- Eppendorf kivete
- Falkon kivete 15 ml
- Filter papir od celuloze (veličina pora 20  $\mu\text{m}$ )
- Kiveta od kvarcnog stakla
- Menzura volumena 250 mL
- Metalna špatulica
- Mikropipete volumena 100  $\mu\text{L}$  i 500  $\mu\text{L}$
- Mikrofilteri CA 0,20  $\mu\text{m}$  (LLG Labware, Njemačka)
- Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL
- Pasteur pipeta
- Pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 500 mL
- Staklene epruvete
- Staklene pipete volumena 10 mL
- Stakleni ljevak
- Stalak za epruvete
- Šprica



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Fizikalna svojstva početnih uzoraka i otopina

#### 3.2.1.1. Nasipna gustoća

Analiza nasipne gustoće uzoraka multivitaminskih prahova u ovom radu provodila se na način da se uzorak usipao u menzuru ukupnog volumena 250 mL do određenog volumena koji se evidentira, u našem slučaju otprilike do 100 mL te se prah izvaže. Na vibracionom volumetru laboratorijske izrade fiksira se menzura te se provodi ciklus od 10 vibracija u 4 sekunde (s) zatim drugi ciklus od 100 vibracija unutar 20 sekundi uz koje se bilježi volumen. Postupak se provodi u 2 paralelna mjerenja. Vrijednosti nasipne gustoće izražavaju se u mjernoj jedinici  $\text{g mL}^{-1}$  nakon 0 (0s), 10 (4 s) i 100 (20 s) broja vibracija.

#### 3.2.1.2. Raspodjela veličine čestica multivitaminskih zrnaca

Mjerenje raspodjele veličine čestica provodi se na uređaju *Analizator veličine čestica Mastersizer 2000* uz pripadajuću jedinicu za suhu disperziju *Scirocco 2000* (Malvern, Velika Britanija) na kojem se provodila analiza multivitaminskih prahova. Rezultati raspodjele veličine čestica prikazuje se vrijednostima  $d(0,5)$  i  $D[3,2]$  te rasponu veličina čestica u mikrometrima

#### 3.2.1.3. Sadržaj vlage i suhe tvari multivitaminskih zrnaca i bombona

Postupak se provodi odvagom (približno 3 g) praha multivitaminskih zrnaca te dva jednaka multivitaminska bombona u aluminijsku posudicu s poklopcem. Proces sušenja se provodi u trajanju od 3 sata pri temperaturi od  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz otvorene posudice i pripadajuće poklopce. Nakon sušenja, posudice se poklope i premještaju u eksikator na hlađenje. Nakon hlađenja, zatvorene posudice s uzorcima na sobnoj temperature, važu se te se prema tablici 4 izračunava udio vode i sadržaj suhe tvari uzoraka. Nizak sadržaj vlage povezan je sa produljenjem trajnosti proizvoda, ali i s ekonomskom isplativosti skladištenja i transporta. Sadržaj vlage i suhe tvari izražava se kao postotak.

Tablica 4. Postupak izračuna suhe tvari.

[1]	$\% \text{ vode} = (a - b) \cdot 100 / m$
[2]	$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode}$
	<b>a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)</b>
	<b>b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)</b>
	<b>m – masa uzorka (g)</b>

#### 3.2.1.4 Električna vodljivost i ukupne otopljene tvari

Električna vodljivosti i ukupne otopljene tvari pripremljenih uzoraka prije, tijekom i nakon procesa probave izmjerene su konduktometrom navedenom u poglavlju 3.1.2 (Aparatura i pribor) u tri paralelna mjerenja. Rezultati su prikazani kao električna provodnost u mjernim jedinicama  $\mu\text{S cm}^{-1}$  i  $\text{mS cm}^{-1}$  te kao TDS (eng. *Total dissolved solids*- ukupne otopljene tvari) u mjernoj jedinici  $\text{mg L}^{-1}$  i  $\text{g L}^{-1}$ . Električna vodljivost predstavlja sposobnost tvari da provodi električnu energiju, dok ukupne otopljene tvari pripadaju gravimetriji i proporcionalno ovise o električnoj vodljivosti otopina jer su otopljene tvari uglavnom ioni koji provode električnu energiju.

#### 3.2.1.5. Priprema početnih uzoraka

Početni uzorci za analize pripremljeni su otapanjem određene mase multivitaminskih dodataka prehrani u vodi prema tablici 5

Tablica 5. Priprema početnih uzoraka: označava odgovarajuću količinu dodataka prehrani otopljenom u odgovarajućoj količini vode prema preporukama proizvođača s deklaracije proizvoda.

Uzorak multivitaminskog dodatka prehrani	Masa uzoraka multivitaminskog dodatka prehrani (g)	Volumen vode u kojem je dodatak prehrani otopljen (mL)
broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna	0,3800	5
broj 2 multivitaminski prah s okusom limete	0,3800	5
broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge	0,3800	5
broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera	0,0550	10
broj 5 multivitaminski bombon s okusom limuna	1,3666	5

### 3.2.2. Analiza multivitaminskih prahova

#### 3.2.2.1. Indeks kohezije

Analize su provedene na TA.HD.Plus Texture Analyser uređaju u kombinaciji s analizatorom tečenja prahova Powder Flow Analyser-om navedenom u poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor. Multivitaminska zrnca se prenesu u posudu za mjerenje volumena otprilike oko 160 mL uz prethodno vaganje. Uzorak se fiksira na predviđeno mjesto te se pokrene protokol za *QUICK TEST*. Rezultati ispitivanja pohranjuju se u Excel datoteci generiranoj iz programa uređaja.

#### 3.2.2.2. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača

Multivitaminska zrnca se prenesu u posudu za mjerenje volumena otprilike oko 160 mL uz vaganje. Uzorak se fiksira na predviđeno mjesto te se pokrene protokol za *CAKING TEST*. Postupak mjerenja sastoji se od početna dva ciklusa kondicioniranja. Rezultati ispitivanja pohranjuju se također u Excel datoteci generiranoj iz programa uređaja.

#### 3.2.2.3. PFSD TEST (eng. Powder Flow Speed Dependency Test- procjena stabilnosti prahova)

Multivitaminska zrnca se prenesu u posudu za mjerenje volumena otprilike oko 160 mL uz vaganje. Uzorak se fiksira na predviđeno mjesto te se pokrene protokol za *PFSD TEST*. Rezultati ispitivanja pohranjuju se također u Excel datoteci generiranoj iz programa uređaja.

### 3.2.3. Kemijska svojstva početnih uzoraka i otopina te in-vitro simulacija probave multivitaminskih dodataka prehrani

Početni startni uzorci otopljeni su prema preporučenom načinu konzumacije od strane proizvođača, preračunato na volumen od 5 ili 10 mL vode kao što se vidi u tablici 5. Dodatak prehrani u obliku bombona također je otopljen u 5 mL vode na sobnoj temperaturi. Tako pripremljeni uzorci analizirani su metodama navedenim u radu, također analizirani su i uzorci pohranjeni tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave. Svi uzorci, izuzev multivitaminskog praša s okusom limuna bez šećera, koji je pripremljen prema uputama i preračunati na volumen od

10 mL, pripremljeni su na volumen od 5 mL te su kao tako pripremljeni uzorci bili podvrgnuti u proces *in-vitro* probave.

### 3.2.3.1. Udio šećera

Udio šećera u pohranjenim uzorcima mjerio se na refraktometru ABBE, 2WAJ navedenom u poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor u dva paralelna mjerenja. Bilježile su se vrijednosti stupnja Brix-a te indeksa refrakcije. Stupanj Brix-a odgovara količini od 1 g disaharida saharoze otopljenom u 100 g otopine, dok je za indeks refrakcije potrebno kreirati baždarni dijagram kako bi se koncentracija šećera mogla izračunati.

### 3.2.3.2. In-vitro simulacija probavnog sustava

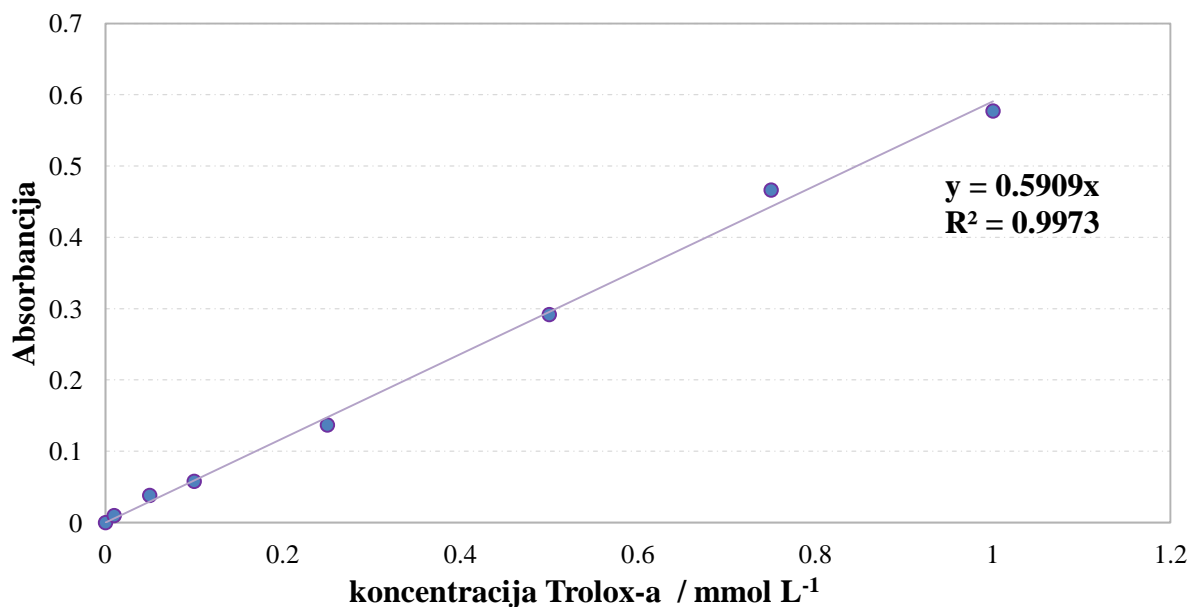
Početak probave počinje u ustima pa je tako najprije za probavu potrebno podesiti uvjete koji prevladavaju u ustima. Prvo se 40 mg  $\alpha$ -amilaze otopi u 40 mL fosfatnog pufera te se dodaju soli da koncentracija otopine bude 0,04 % NaCl-a i 0,004 % CaCl<sub>2</sub>. Otopina se zagrije na 37 °C u kupelji te se u nju dodaje 4 mL prethodno pripremljenih uzoraka dodatka prehrani (prah ili bomboni). Inkubacija traje 5 minuta. Volumen uzorka od 2 mL potrebno je zatim ohladiti i pohraniti. Nakon procesa u ustima potrebno je podesiti uvjete u želucu. Smjesa uzorka zakiseljava se na vrijednosti pH = 2 dodajući koncentriranu HCl. U smjesu uzorka se zatim doda otopljen pepsin. Otopina pepsina se priređuje tako da se 60 mg enzima pepsina otopi u 4 mL 0,01 mol L<sup>-1</sup> HCl. Inkubacija traje 2 sata također pri fiziološkoj temperaturi od 37 °C. Volumen uzorka od 2 mL potrebno je zatim ohladiti i pohraniti. Nakon želuca potrebno je podesiti uvjete za probavu u tankom crijevu djelovanjem enzima iz gušterače. Uzorak se nakon inkubacije i probave u želucu neutralizira s NaHCO<sub>3</sub> na pH = 6,5. U smjesu uzorka se zatim doda otopina pankreatina pripremljenoj tako da se 0,08 grama pankreatina otopi u 10 mL fosfatnog pufera te suspenzije žučnih soli pripremljenoj tako da se 0,5 g žučnih soli u 10 mL fosfatnog pufera. Inkubacija također traje 2 sata pri 37 °C. Nakon inkubacije uzima se 2 mL uzorka. Svaki pohranjeni uzorak potrebno je ohladiti te filtrirati kroz mikro filtere. Na uzorcima se provode analize antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom, mjerenje električne vodljivosti, ukupnih otopljenih tvari te se mjeri udio šećera. Prije analize antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP uzorci su razrijeđeni 5 ili 10 puta zbog podešavanja adekvatnog raspona koncentracije za navedene metode, kao što je navedeno u tablici 6.

Tablica 6 . Razrjeđenje uzorka prije mjerenja antioksidacijske aktivnosti.

Uzorak multivitaminskog dodatka prehrani	Razrjeđenje
<b>broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna</b>	<b>10</b>
<b>broj 2 multivitaminski prah s okusom limete</b>	<b>10</b>
<b>broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge</b>	<b>5</b>
<b>broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera</b>	<b>10</b>
<b>broj 5 multivitaminski bombon s okusom limuna</b>	<b>5</b>

### 3.2.3.3 Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

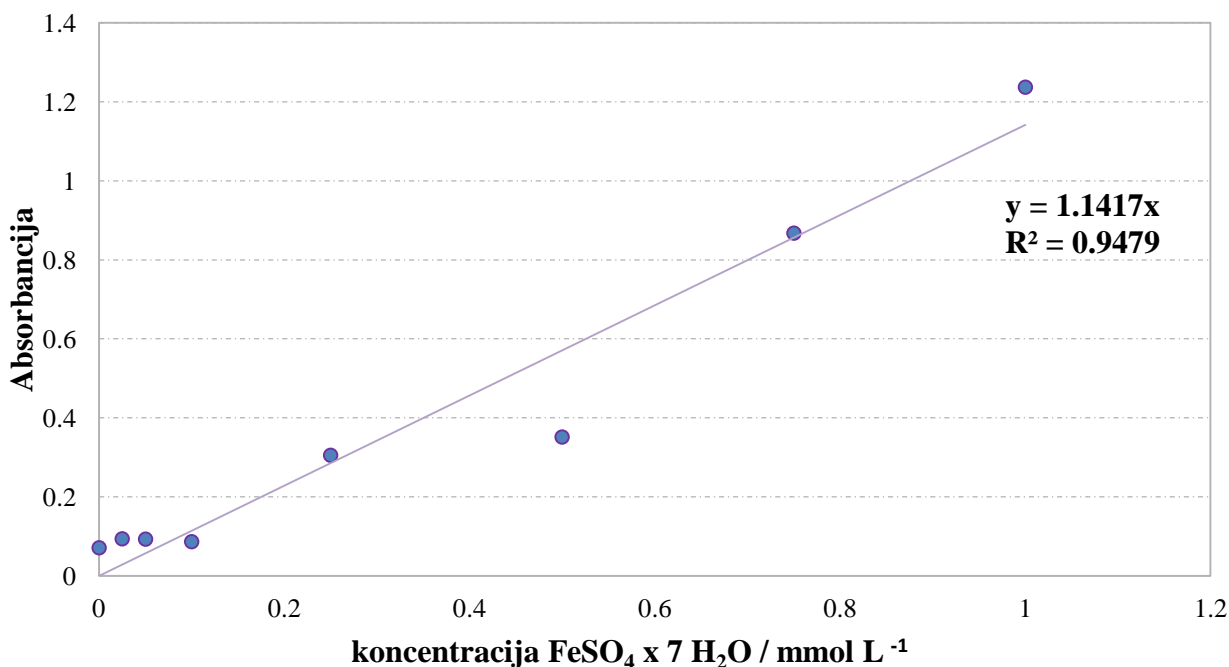
Postupak se izvodi pripremom 0,094 mM otopine DPPH u metanolu. Određivanje antioksidacijske aktivnosti provedeno je na prethodno pripremljenim uzorcima pohranjenim prije, tijekom i nakon procesa probave, a uzorci su se prije mjerenja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom razrijedili 5 ili 10 puta kao što se vidi u tablici 6. U 3,9 mL tako pripremljene otopine doda se 100  $\mu$ L ispitivanog uzorka te vrijeme inkubacije traje 30 minuta, a reakcija se odvija u mraku. Svaki uzorak mjeri se u dvije paralele. Baždarni dijagram prikazan je na Slici 5. Vrijednosti promjene apsorbancije uzoraka ( $\Delta A$ ) preračunavaju se na temelju jednadžbe baždarnog dijagrama na slici 5 u vrijednosti standardizirane koncentracije  $\text{mmol L}^{-1}$  Trolox ekvivalenta, a izražavaju se kao maseni udjel ( $\mu\text{g g}^{-1}$  uzorka) ekvivalenta Troloxa, kao molarni udjel ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) ili kao samu koncentraciju  $\text{mmol L}^{-1}$  Trolox ekvivalenta. Apsorbancija se mjeri na spektrofotometru navedenom u poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor.



Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje antioksidacijske aktivnosti (DPPH).

#### 3.2.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Određivanje antioksidacijske aktivnosti provedeno je na pripremljenim uzorcima prije, tijekom i nakon procesa probave, a pohranjeni uzorci su se prije mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom razrijedili 5 ili 10 puta kao što je prikazano u tablici 6. Postupak se izvodi pripremom FRAP reagensa za kojeg je potrebno prirediti acetatni pufer koncentracije 300 mmol L<sup>-1</sup>, 10 mmol L<sup>-1</sup> otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) te 20 mmol L<sup>-1</sup> vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata (FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O). FRAP reagens priprema se miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, u omjeru 10:1:1. U kiveti se pomiješa 950 μL FRAP reagensa i 50 uzorka te se točno nakon 4 minute inkubacije mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm. Nakon mjerenja uzoraka konstruira se baždarni dijagram na temelju mjerenja sa standardnim uzorcima FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O koncentracija 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mmol L<sup>-1</sup>. Vrijednosti (ΔA) preračunavaju se na temelju jednadžbe baždarnog dijagrama na slici 6, a izražavaju se kao molarni mmol g<sup>-1</sup> ili maseni udio μg g<sup>-1</sup> uzorka ekvivalenta FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O. Apsorbancija se mjeri na spektrofotometru u navedenom poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor.



Slika 6. Baždarni dijagram za određivanje antioksidacijske aktivnosti (FRAP).

### 3.2.3.5. Blisko infracrvena spektroskopija (NIRS) i ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektroskopija

NIR (eng. *Near-Infrared Spectroscopy* - bliskoinfracrvena spektroskopija) mjeri vrijednosti apsorbancije elektromagnetske energije uzorka u rasponu valnih duljina od 800 do 2500 nm, odnosno od 12 500 do 4000 cm<sup>-1</sup>. Vrijednosti apsorbancije rezultat su rastezanja O—H, C—H, i N—H veza (Kradjel, 1991). Ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektroskopija analizira vrijednosti apsorbancije na valnim duljinama od 200-800 nm, a ovisi o elektronskim prijelazima molekula za određenu vrstu veze u molekuli. Postupak snimanja NIRS i UV-VIS spektara provodi se na NIR spektrometru te UV/VIS spektrofotometru koji su prikazani u navedenom poglavlju 3.1.2 Aparatura i pribor. Snimanje je provedeno na pripremljenim uzorcima prije, tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave. Uzorak se prebacuje u kvarcnu kivetu te se mjeri na NIR-u u tri paralelna mjerenja, a na UV-VIS spektrofotometru u dva paralelna mjerenja. Početni startni uzorci otopljeni su prema preporučenom načinu konzumacije od strane proizvođača, preračunato na volumen od 5 ili 10 mL vode. Tako pripremljeni uzorci analizirani su metodama navedenim u radu. Također analizirani su i uzorci pohranjeni tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave. Dobiveni spektralni podaci dalje se obrađuju kompjuterski pomoću PCA analize te umjetnih neuronskih mreža u programu *Statistica 10.0* (StatSoft, Round Rock, SAD).

### 3.2.4. Statistička obrada podataka: PCA (eng. *Principal component analysis*- analiza glavnih komponentata) i ANN (eng. *Artificial neural networks*-umjetne neuronske mreže)

Podaci dobiveni NIR i UV-VIS spektroskopijom statistički su obrađeni metodama PCA (eng. *Principal component analysis* - analiza glavnih komponentata) i ANN (eng. *Artificial neural networks* - umjetne neuronske mreže). U ovom radu svrha PCA je brojne podatke o fizikalnim i kemijskim svojstvima koji predstavljaju brojne varijable svesti na nekoliko glavnih komponenti ili faktora tj. u ovom radu na njih 10. Navedeni faktori koriste se kako bi grafički predočila različitost i sličnost uzoraka na temelju podataka dobivenih brojnim mjerenjima te za daljnje korištenje u kreiranju ANN. Za kreiranje ANN odabrani su početne uvjete razvijanja mreže s 4-13 neurona u skrivenom sloju. Za ulazne varijable neuronske mreže u ovom radu korišteno je 10 faktora dobivenih analizom glavnih komponentata. Navedeni faktori predstavljaju 99,99 % varijabilnosti provjerenih nakon analize glavnih komponentata. Izlazne varijable ANN predstavljaju podaci dobiveni mjerenjem fizikalnih svojstava: TDS-a, vodljivosti te kemijskih svojstava: udjela šećera, antioksidacijske aktivnosti dobiveni FRAP i DPPH metodama. Omjeri učenja, testa i validacije ANN provedeni su u omjeru 60:20:20 te 70:15:15, a parametri „*networks to train*“, „*networks to retrain*“ i „*seed for sampling*“ postavljeni su na 500, 200 i 1000. Modeli ANN korišteni su za predviđanje fizikalnih svojstava uzoraka multivitaminskih dodataka prehrani: TDS-a, vodljivosti te kemijskih svojstava: udjela šećera, te antioksidacijske aktivnosti za metode FRAP i DPPH. PCA. Prilikom kreiranja ANN modela korišten je program *Statistica 10.0* (StatSoft, Round Rock, SAD).



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedene su analize fizikalnih i kemijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani u obliku prahova i bombona s okusom limuna te probavljivost tih pripravaka tijekom *in vitro* simulacije probave. Zbog samih dodataka prehrani koji sadrže brojne vitamine s antioksidacijskim aktivnostima u značajnim količinama, interes za provjeru potencijalnih teoretskih učinaka jedan je od ciljeva ovog rada. Također brojne kemijske i fizikalne analize na dodacima prehrani provedene su u cilju same analize navedenih uzoraka za evaluaciji samih proizvoda. Vrlo važan dio ovog rada je i analiza prahova na suvremenom uređaju koji donosi iznimno važne podatke bez čije primjene industrijska proizvodnja istih ne bi bila moguća. Stoga ovaj rad ima i tu svrhu, analize svojstava prahova standardnim i usporedivim testovima te potencijalno korištenje tih podataka u kreiranju novih dodataka prehrani jednake ili bolje kvalitete. Također navedene analize korištene su s ciljem kreiranja umjetnih neuronskih mreža koje će poslužiti kao alat za predviđanje fizikalnih i kemijskih parametara nekih budućih sličnih dodataka prehrani. Za bolje uočavanje razlika uzoraka, kao i uočavanja razlika u procesu prije, tijekom i nakon procesa probave provedena je i analiza glavnih komponenata koja je nužna za kreiranje adekvatne umjetne neuronske mreže

## 4.1. Fizikalna svojstva početnih uzoraka i otopina

### 4.1.1. Nasipna gustoća

U tablici 7 prikazani su rezultati nasipne gustoće uzoraka multivitaminskih prahova nakon 0, 10 i 100 udaraca.

Tablica 7. Nasipna gustoća multivitaminskih prahova s okusom limuna prikazana kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 2$ ) nakon 0, 10 i 100 udaraca.

Uzorak multivitaminskog praha	početna nasipna gustoća ( $\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 0 udaraca	nasipna gustoća ( $\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 10 udaraca	nasipna gustoća ( $\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 100 udaraca
<b>broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna</b>	$0,627 \pm 0,006$	$0,667 \pm 0,007$	$0,696 \pm 0,007$
<b>broj 2 multivitaminski prah s okusom limete</b>	$0,619 \pm 0,010$	$0,656 \pm 0,011$	$0,683 \pm 0,002$
<b>broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge</b>	$0,613 \pm 0,008$	$0,639 \pm 0,007$	$0,683 \pm 0,009$
<b>broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera</b>	$0,717 \pm 0,031$	$0,759 \pm 0,012$	$0,782 \pm 0,013$

Iz tablice 7 vidljivo je da je došlo do povećanja nasipne gustoće nakon 100 udaraca što je i očekivano kod prahova. Takvo ponašanje opisano je i u literaturi (Hausner, 1981; Werner i sur., 2007a; Werner i sur., 2007b). Najveće povećanje gustoće primijećeno je kod uzorka broj 3 s  $0,613$  na  $0,683 \text{ g mL}^{-1}$ , dok je najmanje povećanje zabilježeno kod uzorka broj 2 s  $0,619$  na  $0,683 \text{ g mL}^{-1}$ . Uzorci s manjom promjenom nasipne gustoće prihvatljiviji su i poželjniji u tehnološkim procesima kao što je pakiranje, skladištenje i transport. Stoga možemo zaključiti da gledajući isključivo samo nasipnu gustoću, najbolju kvalitetu praha prikazuje granulirani multivitaminski prah s okusom limete, a najlošiju multivitaminski prah s okusom bazge i limuna. U uvjetima proizvodnje proizvoda koji su pod visokom kontrolom moguće je podesiti proizvodni proces na uvjete koji će rezultirati željenim parametrima veličine čestica i nasipne gustoće, a samim time i dobrim svojstvima tečenja (Benković i sur., 2015).

#### 4.1.2. Raspodjela veličina čestica

Tablica 8. Raspodjela veličine čestica multivitaminskih prahova s okusom limuna prikazana kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 3).

Uzorak multivitaminskog praha	d (0,5) ( $\mu\text{m}$ )	D [3, 2] ( $\mu\text{m}$ )	Raspon ( $\mu\text{m}$ )
<b>broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna</b>	209,674 $\pm$ 4,728	106,302 $\pm$ 1,949	2,246 $\pm$ 0,097
<b>broj 2 multivitaminski prah s okusom limete</b>	322,511 $\pm$ 78,231	173,513 $\pm$ 38,877	2,273 $\pm$ 0,273
<b>broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge</b>	261,580 $\pm$ 17,724	160,810 $\pm$ 9,170	2,302 $\pm$ 0,076
<b>broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera</b>	275,739 $\pm$ 9,029	106,503 $\pm$ 3,553	1,863 $\pm$ 0,015

Raspodjela veličine čestica prikazana je u tablici 8 te se karakterizira pomoću parametara d (0,5), D [3,2] i raspona raspodjele. Promatrajući samo vrijednost d (0,5) koja govori o srednjem promjeru čestica možemo zaključiti da najveću srednju vrijednost promjera u mikrometrima ima uzorak broj 2, multivitaminski prah s okusom limete i iznosi 322,511  $\mu\text{m}$ , dok suprotno, najmanji promjer pokazuje uzorak broj 1, multivitaminski prah s okusom limuna i iznosi 209,674  $\mu\text{m}$ . Prema literaturnom navodu veličine čestica oko 200  $\mu\text{m}$  pokazuju poželjna svojstva tečenja prahova te tako možemo zaključiti da najpoželjniju veličinu čestica pokazuje uzorak 1 (Barbosa-Canovas, 2005). Kada promatramo samo parametar D [3,2] iz tablice možemo zaključiti da je najveći Sauterov promjer ima također uzorak 2, multivitaminski prah s okusom limete i iznosi 173,513  $\mu\text{m}$ , dok je najmanji primijećen kod također kod uzorka broja 1, multivitaminskog prah s okusom limuna i iznosi 106,302  $\mu\text{m}$ . Zadnji parametar, raspon, pokazuje najmanje vrijednosti kod uzorka broj 4. multivitaminski prah bez šećera s okusom limuna i iznosi 1,863  $\mu\text{m}$ , dok je najveća vrijednost zabilježena kod uzorka broj 1, multivitaminskog prah s okusom limuna i iznosi 2,246  $\mu\text{m}$ . Raspon veličina čestica veći je od većine često konzumiranih prehrambenih prahova, a to je vjerojatno posljedica nejednolike aglomeracije čestica (Benković i sur., 2013).

#### 4.1.3. Sadržaj vlage i suhe tvari

Tablica 9. Sadržaj vlage i suhe tvari multivitaminških prahova i bombona s okusom limuna prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 3).

<b>Uzorak multivitaminškog praha</b>	<b>% suhe tvari</b>
<b>broj 1 multivitaminški prah s okusom limuna</b>	99,163 $\pm$ 0,144
<b>broj 2 multivitaminški prah s okusom limete</b>	98,416 $\pm$ 0,362
<b>broj 3 multivitaminški prah s okusom limuna i bazge</b>	99,368 $\pm$ 0,149
<b>broj 4 multivitaminški prah s okusom limuna bez šećera</b>	98,408 $\pm$ 0,331
<b>broj 5 multivitaminški bombon s okusom limuna</b>	96,371 $\pm$ 0,328

Udjeli suhe tvari u uzorcima prikazani su u tablici 8. Uočljivo je da je udio suhe tvari u visokom rasponu, veći od 98 % kod svih multivitaminških prahova, dok je manji kod multivitaminškog bombona gdje iznosi 96,371 %. U svim uzorcima udio suhe tvari veći je od 10 % što je u skladu sa pravilnom proizvodnjom prehrambenih prahova ili njihovih komprimata. Na nutritivnim deklaracijama uzoraka može se vidjeti da većinu suhe tvari čine šećeri.

#### 4.1.4. Električna vodljivost i ukupne otopljene tvari

Tablica 10. Električna vodljivost multivitaminskih prahova i bombona s okusom limuna prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 2$ ). Uzorci su analizirani prije, tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave.

Uzorak multivitaminskog dodatka prehrani	električna vodljivost ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) startnih uzoraka	električna vodljivost ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) uzoraka nakon ustiju	električna vodljivost ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) nakon želuca	električna vodljivost ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) uzoraka nakon crijeva
<b>broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna</b>	1,263 $\pm$ 0,004	8,055 $\pm$ 0,005	18,34 $\pm$ 0,030	15,060 $\pm$ 0,160
<b>broj 2 multivitaminski prah s okusom limete</b>	1,946 $\pm$ 0,009	8,515 $\pm$ 0,035	16,265 $\pm$ 0,035	13,915 $\pm$ 0,065
<b>broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge</b>	1,126 $\pm$ 0,002	8,245 $\pm$ 0,035	17,88 $\pm$ 0,040	14,605 $\pm$ 0,055
<b>broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera</b>	1,012 $\pm$ 0,003	8,530 $\pm$ 0,000	17,450 $\pm$ 0,010	14,675 $\pm$ 0,025
<b>broj 5 multivitaminski bombon s okusom limuna</b>	0,568 $\pm$ 0,001	9,250 $\pm$ 0,040	17,265 $\pm$ 0,005	15,000 $\pm$ 0,110

Iz tablice 10 koja prikazuje prosječne vrijednosti električne vodljivosti uzoraka multivitaminskih prahova i bombona s okusom limuna prije, tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave možemo zaključiti da se vrijednosti električne vodljivosti višestruko povećavaju u procesu simulacije probave. Razlog tomu je dodavanje soli NaCl i CaCl<sub>2</sub> za simuliranje uvjeta u ustima te zakiseljavanje uzorka koncentriranom HCl uz dodavanje otopljenog pepsina u uzorak za simuliranje uvjeta u želucu. Također za simuliranje uvjeta u crijevu dodavao se i NaHCO<sub>3</sub>. Dodavanje navedenih spojeva povećava ukupnu količinu iona koji utječu na vrijednosti električne vodljivosti te ih povećavaju. Također iz tablice 10. vidljivo je i da je vrijednost električne vodljivosti startnih uzoraka najmanja kod uzorka multivitaminskog bombona okusa limuna, a najmanje vrijednosti električne vodljivosti od multivitaminskih

prahova pokazuje uzorak broj 4, multivitaminski prah bez šećera s okusom limuna, a mogući razlog tomu je razlika u pripremi napitka.

Tablica 11. TDS (eng. *Total dissolved solids*- ukupne otopljene tvari) multivitaminskih prahova i bombona s okusom limuna prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD ( $n = 2$ ). Uzorci su analizirani prije, tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave.

Uzorak multivitaminsko g dodatka prehrani	TDS (g L <sup>-1</sup> ) startnih uzoraka	TDS (g L <sup>-1</sup> ) startnih uzoraka nakon ustiju	TDS (g L <sup>-1</sup> ) startnih uzoraka nakon želuca	TDS (g L <sup>-1</sup> ) startnih uzoraka nakon crijeva
<b>broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna</b>	0,632 $\pm$ 0,003	4,025 $\pm$ 0,005	9,175 $\pm$ 0,015	7,62 $\pm$ 0,03
<b>broj 2 multivitaminski prah s okusom limete</b>	0,973 $\pm$ 0,004	4,255 $\pm$ 0,015	8,135 $\pm$ 0,015	6,96 $\pm$ 0,03
<b>broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge</b>	0,536 $\pm$ 0,001	4,12 $\pm$ 0,02	8,940 $\pm$ 0,02	7,305 $\pm$ 0,025
<b>broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera</b>	0,506 $\pm$ 0,002	4,265 $\pm$ 0,005	8,725 $\pm$ 0,005	7,340 $\pm$ 0,01
<b>broj 5 multivitaminski bombon s okusom limuna</b>	0,284 $\pm$ 0	4,630 $\pm$ 0,02	8,635 $\pm$ 0,005	7,505 $\pm$ 0,055

Rezultati mjerenja ukupnih otopljenih tvari u tablici 11 pokazuju rezultate koji uvelike koreliraju s električnom vodljivošću iz tablice 10, kao što je i očekivano jer velik dio ukupnih otopljenih tvari čine ioni (Rusydi, 2017). Vrijednosti TDS-a višestruko rastu u uzorcima koji su analizirani nakon *in-vitro* probave jer su u tri navrata uzorcima dodavani drugi supstrati potrebni za simulaciju probave koji su glavnim razlogom povećanja TDS-a. Također uzorak broj 5, multivitaminski bombon s okusom limuna pokazuje najmanje ukupne vrijednosti TDS-a, što je posljedica drugačijeg sastava te pripreme uzorka.

#### 4.1.5. Analiza multivitaminskih prahova

##### 4.1.5.1. Indeks kohezije

Tablica 12. Indeks kohezije te svojstvo tečenja multivitaminskih prahova s okusom limuna prikazani kao srednja vrijednost (n = 3).

Uzorak multivitaminskog praha	Koeficijent kohezije (mm g)	Indeks kohezije (mm)	Svojstvo tečenja praha
<b>broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna</b>	-1043,02 ± 21,708	10,433	Slobodno teče
<b>broj 2 multivitaminski prah s okusom limete</b>	-1000,88 ± 131,53	10,186	Slobodno teče
<b>broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge</b>	-697,425 ± 7,554	7,183	Slobodno teče
<b>broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera</b>	-1321,52 ± 31,393	12,055	Lako teče

U tablici 12 prikazane su vrijednosti indeksa kohezije te koeficijenta kohezije. Koeficijent kohezije ne treba posebno komentirati jer se iz njega izračunava indeks kohezije koji je standardni pokazatelj svojstva tečenja prahova. Prema skali prikazanoj u tablici 2, uzorak broj 4, multivitaminski prah bez šećera s okusom limuna pokazuje lako tečenje, dok svi ostali uzorci pokazuju svojstvo slobodnog tečenja (Shah i sur., 2008; Janjatović, 2011; Benković i sur., 2013). Razlika u vrijednosti indeksa kohezije uzorka broj 4 u odnosu na ostale uzorke vrlo vjerojatno je zbog toga što ne sadrži šećer nego sladila i zbog toga ima drugačija svojstva tečenja. Svojstva tečenja prahova svih uzoraka na temelju ovih mjerenja zadovoljavajuća su za tehnološke potrebe industrije.

#### 4.1.5.2. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača

Tablica 13. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača multivitaminških prahova s okusom limuna prikazana kao srednje vrijednosti čvrstoće kolača te prosječne čvrstoće kolača (n = 3).

Uzorak multivitaminškog praha	Prosječna čvrstoća kolača (g)
<b>broj 1 multivitaminški prah s okusom limuna</b>	70,237
<b>broj 2 multivitaminški prah s okusom limete</b>	80,328
<b>broj 3 multivitaminški prah s okusom limuna i bazge</b>	92,181
<b>broj 4 multivitaminški prah s okusom limuna bez šećera</b>	78,765

Rezultati procjene sposobnosti stvaranja čvrstog kolača prikazani su u tablici 13., a uzorci pokazuju najmanje vrijednosti od 70,237 g za uzorak broj 1, multivitaminški prah s okusom limuna do najviše vrijednosti 92,181 g za uzorak broj 3, multivitaminški prah s okusom bazge i limuna. Sabijanjem svih uzoraka izmjerene su niske vrijednosti prosječne čvrstoće kolača što ukazuje na pogodna svojstva tehnološkog rukovanja u industrijskim uvjetima.

#### 4.1.5.3 PFSD TEST (eng. Powder Flow Speed Dependency Test- procjena stabilnosti prahova)

Tablica 14. Rezultati PFSD testa ispitivanih multivitaminških prahova s okusom limuna prikazani kao indeks stabilnosti tečenja.

Uzorak multivitaminškog praha	Indeks sabijanja
<b>broj 1 multivitaminški prah s okusom limuna</b>	0,4
<b>broj 2 multivitaminški prah s okusom limete</b>	0,95
<b>broj 3 multivitaminški prah s okusom limuna i bazge</b>	0,96
<b>broj 4 multivitaminški prah s okusom limuna bez šećera</b>	0,94

Iz tablice 14. koja prikazuje rezultate indeksa sabijanja dobivenih PFSD testom možemo zaključiti da su svi uzorci ovisni o brzini tečenja, jer su im vrijednosti indeksa sabijanja različiti



od 1 kao što je vidljivo u tablici 3. Razlike mogu nastupati zbog promjene u obliku čestica ili kristalnoj strukturi te razbijanje čestica ili aglomerata. Vrijednosti manje od 1 ukazuju na lakše tečenje praha porastom brzine tečenja, a to vrijedi za sve uzorke, dok izdvajamo uzorak 1, multivitaminski prah s okusom limuna, koji pokazuje najniže vrijednosti indeksa sabijanja 0,4 (Benković i Bauman, 2009). Takvi rezultati mogu biti posljedica promjene oblika čestica te razbijanja aglomerata ili čestica (Shah i sur., 2008).

## 4.2. Kemijska svojstva početnih uzoraka i otopina te in-vitro simulacija probave multivitaminskih dodataka prehrani

### 4.2.1. Udio šećera

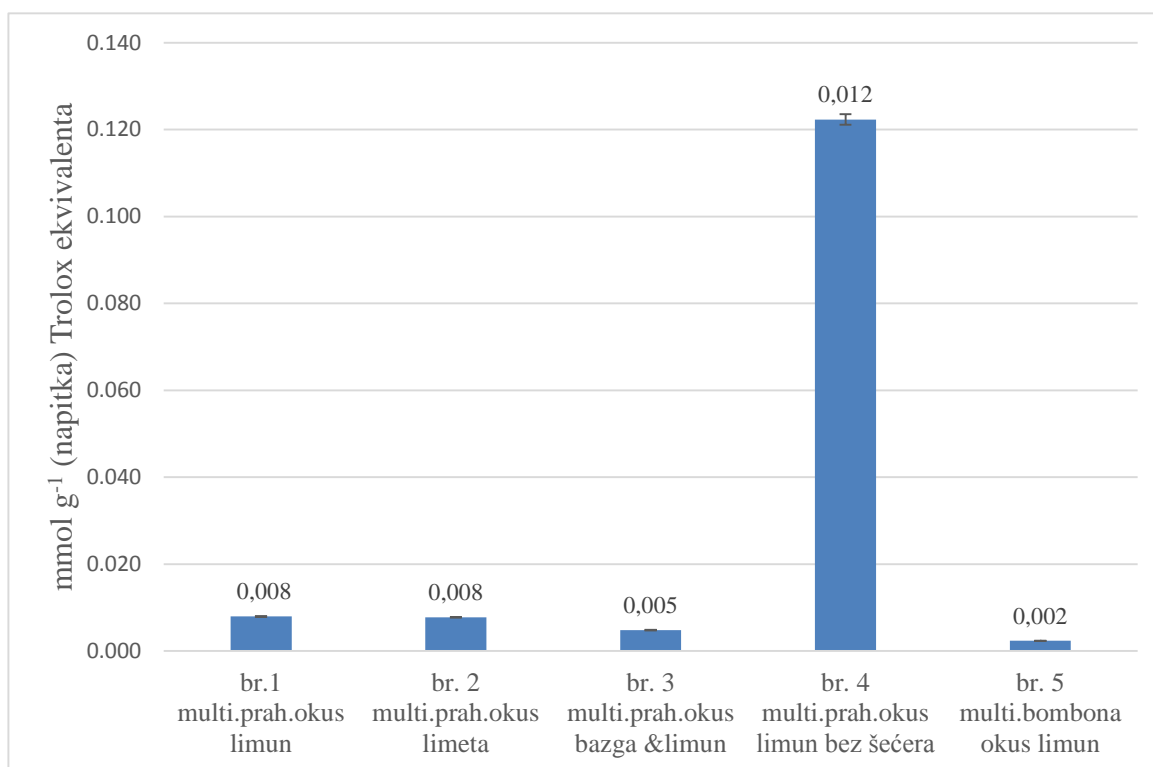
Tablica 15. Udio šećera u multivitaminskim dodacima prehrani s okusom limuna prikazani kao srednja vrijednost udjela šećera na temelju vrijednosti indeksa Brix-a ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) izražena kao g(Š-šećera) u 100 g(U-uzorka) ( $n = 2$ ). Srednje vrijednosti indeksa refrakcije ( $nD$ ) također su prikazane u tablici ( $n = 2$ ). Stupanj Brix-a odgovara 1 g šećera saharoze na 100 grama otopine.

Uzorak multiv. dodatka prehrani	$^{\circ}\text{Bx}$ , g(Š)/ g <sup>-1</sup> (U), nD startnih uzoraka	$^{\circ}\text{Bx}$ , g(šećera) g <sup>-1</sup> (otopine), nD startnih uzoraka nakon ustiju	$^{\circ}\text{Bx}$ , g(šećera) g <sup>-1</sup> (otopine), nD startnih uzoraka nakon želuca	$^{\circ}\text{Bx}$ , g(šećera) g <sup>-1</sup> (otopine), nD startnih uzoraka nakon crijeva
<b>broj 1</b> multivitaminski prah s okusom limuna	7 ± 0, 7g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,34 ± 0	2,25 ± 0 2,25g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,337 ± 0	1,875 ± 0,125, 1,875g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,336 ± 0	2,375 ± 0,125, 2,375g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,337 ± 0
<b>broj 2</b> multivitaminski prah s okusom limete	6,625 ± 0, 6,625g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,343 ± 0	3,125 ± 0,125, 3,125g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,338 ± 0	1,625 ± 0,125, 1,625g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,35 ± 0	2,375 ± 0,125, 2,375g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,337 ± 0
<b>broj 3</b> multivitaminski prah s okusom limuna i bazge	7,125 ± 0,125, 7,125g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,343 ± 0	2,375 ± 0,0,375 2,375g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,337 ± 0	2,00 ± 0,250 2,00g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,336 ± 0,001	2,375 ± 0,125 2,375g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,337 ± 0
<b>broj 4</b> multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera	0,125 ± 0,125, 0,125g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,343 ± 0	1,875 ± 0,125, 1-875g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,336 ± 0	1,375 ± 0,125, 1,375g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,335 ± 0	2,50 ± 0,250, 2,50g(Š)100 g <sup>-1</sup> (U), 1,337 ± 0

<b>broj 5</b>	20,500 ± 0,00,	3,250 ± 0,250,	3,375 ± 0,125,	4,000 ± 0,00,
<b>multivitaminski</b>	20,500g(Š)100	3,250g(Š)100	3,375g(Š)100	4,000g(Š)100
<b>bombon s okusom</b>	g <sup>-1</sup> (U),	g <sup>-1</sup> (U),	g <sup>-1</sup> (U)	g <sup>-1</sup> (U),
<b>limuna</b>	1,365 ± 0	1,338 ± 0	,1,338 ± 0	1,339 ± 0

U tablici 15. prikazane su vrijednosti udjela šećera u startnim uzorcima kao i vrijednosti udjela šećera kroz proces simulacije probave. Vrijednosti udjela šećera kroz simulaciju probave mijenjaju se i opadaju zbog dodavanja različitih otopina te tako dolazi do promjene volumena uzorka, a samim time i koncentracije šećera u istim. Udjeli šećera startnih uzoraka prikazani su u prvom stupcu te su iskazane u vrijednosti indeksa Brix-a (°Bx) izražena kao g (Š-šećera) u 100 g (U-uzorka) s odgovarajućim indeksima refrakcije. Kao što je i očekivano, uzorak broj 4, multivitaminski prah bez šećera s okusom limuna, pokazuje najmanje vrijednosti udjela šećera 0,125 g(Š) u 100 g(U), što je približno vrijednostima na nutritivnoj deklaraciji. Uzorak broj 5, multivitaminski bombon s okusom limuna pokazuje otprilike 3 puta veće vrijednosti šećera od multivitaminskih prahova zbog toga što su uzorci pripremljeni različito kao što se vidi u tablici 5. Vrijednosti udjela šećera multivitaminskih prahova odgovara nutritivnim deklaracijama, gdje je deklariran udio šećera na 100 mL napitka 6.4 g, a izmjerene vrijednosti uzorka su u rasponu od 6,625 do 7,125 g. Također nutritivna deklaracija uzorka broj 5, multivitaminskog bombona s okusom limuna približno odgovara izmjerenoj vrijednosti, 1.29 g naspram 1,025 g.

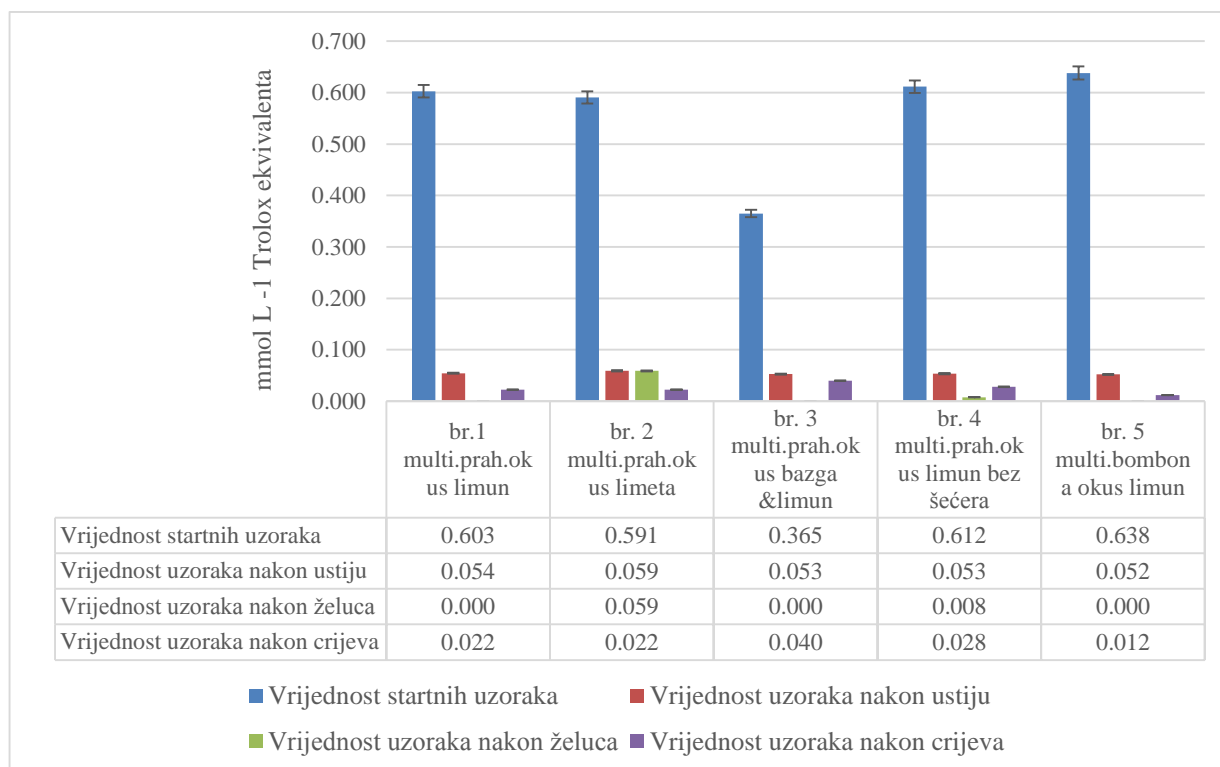
#### 4.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom



Slika 7. Antioksidacijska aktivnost početnih uzoraka dobiveni DPPH metodom izraženih kao koncentracija u jedinici ekvivalenta mmol Trolox-a g<sup>-1</sup> napitka. Standardna devijacija iznosi <2%.

Slika broj 7 prikazuje antioksidacijski učinak pripremljenih otopina multivitaminskih prahova prema uputama proizvođača te multivitaminskih bombona DPPH metodom. Kao što se vidi iz navedene slike, generalno uzorci multivitaminskih prahova pokazuju veći antioksidacijski učinak od multivitaminskog bombona, koji ima najmanji antioksidacijski učinak. Također podaci ukazuju na najveći antioksidacijski učinak uzorka broj 4, multivitaminski prah bez šećera s okusom limuna. U obzir se i mora uzeti drugačiji način pripreme napitka među uzorcima, a to se može vidjeti u tablici broj 5. Deklaracija nutritivnog sastava analiziranih multivitaminskih prahova i bombona pokazuju da od vitamina dominiraju vitamini B skupine. Podaci iz literature govore da najveći antioksidacijski učinak izmjeren TEAC (eng. *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*) metodom koja je usporediva s DPPH metodom, od ukupnih vitamina B skupine pokazuje tiamin (B<sub>1</sub>), a slijede ga folna kiselina i forme B<sub>6</sub> vitamina (Gliszczyn´ska-S´wigło, 2005). Vitamin C (askorbinska kiselina) pokazuje najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene od svih vitamina topljivih u vodi TEAC i FRAP metodom.

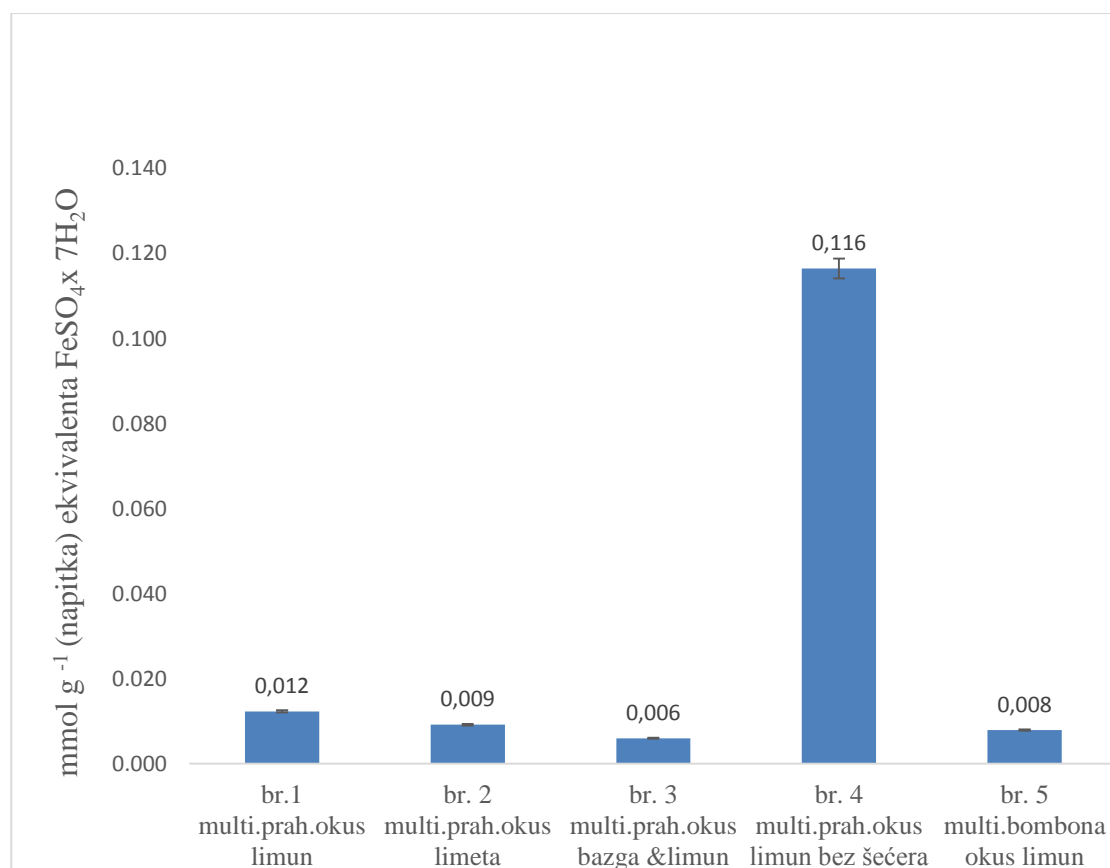
Kada uspoređujemo metode određivanja antioksidacijske aktivnosti, veća antioksidacijska aktivnost analiziranih uzoraka u ovom radu zabilježena je FRAP metodom, čiji su rezultati prikazani na slici 9, kao što je i slučaj u literaturi, gdje je uspoređivana antioksidacijska aktivnost raznih napitaka TEAC i FRAP metodama (Queirós i sur., 2013). Uzorak broj 5. multivitaminski bombon s okusom limuna pokazuje najniže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta što je i očekivano s obzirom na razlike u nutritivnoj deklaraciji, odnosno uzorak broj 5 sadrži najmanje vitamina koji bi imali antioksidacijski učinak, dok suprotno, uzorak broj 4, multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera, prema nutritivnoj deklaraciji ima 7,5 puta veću količinu dodanog vitamina C po gramu od multivitaminskih prahova s dodanim šećerom (uzorak broj 1, 2 i 3). A kako smo ranije u radu spomenuli antioksidativnu snagu vitamina C, to je i objašnjenje zašto je antioksidacijski učinak u tom uzorku najviši.



Slika 8. Antioksidacijska aktivnost uzoraka multivitaminskih dodataka prehrani tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave dobivena DPPH metodom izraženih kao koncentracija u jedinici mmol L<sup>-1</sup> Trolox ekvivalenta. Standardna devijacija iznosi < 2%.

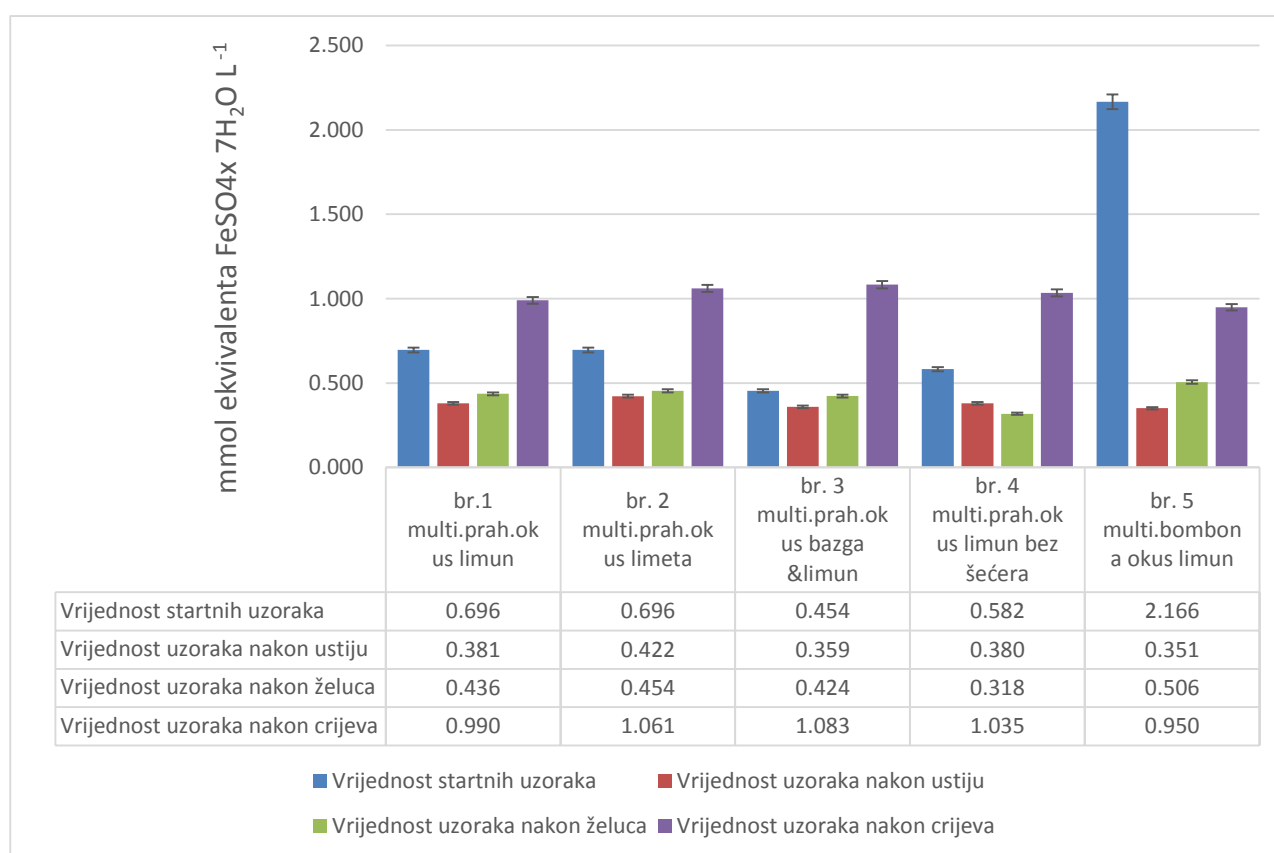
U procesu probave, antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom drastično opada u odnosu na startne uzorke kao što je vidljivo na slici 8, što znači da je do gubitka antioksidacijske aktivnosti došlo zbog određenih djelovanja supstrata koji su se dodali u uzorak kako bi se simulirali uvjeti koji prevladavaju u ustima. U uzorak je u ustima dodana  $\alpha$ -amilaza u fosfatnom puferu uz NaCl te  $\text{CaCl}_2$ , iako ti supstrati nemaju degradirajuće djelovanje na vitamine koji imaju antioksidacijski učinak. U daljnjim koracima simulacije probave došlo je do još većeg smanjenja antioksidacijskog kapaciteta stoga možemo zaključiti da je u crijevima antioksidacijski učinak multivitaminskih dodataka prehrani analiziranih u ovom radu skroman i manji od očekivanog. Antioksidansi gube svoju aktivnost zbog razgradnje u probavnom sustavu te i samog razrijeđenja u biološkim tekućinama. Tako podaci iz literature govore da samo 5% ukupne količine vitamina C ostane u aktivnoj formi nakon procesa probave u prvom dijelu tankog crijevca (43).

#### 4.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom



Slika 9. Antioksidacijska aktivnost početnih uzoraka dobiveni FRAP metodom izraženih kao koncentracija u jedinici ekvivalenta  $\text{mmol FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O g}^{-1}$  napitka. Standardna devijacija iznosi <2%.

Na slici 9, koja prikazuje rezultate antioksidacijskog učinka početnih otopina FRAP metodom, najveći antioksidacijski učinak ima također uzorak broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera, ali nije uočljiva puno manji antioksidacijski karakter multivitaminskog bombona u odnosu na prah, kao što je slučaj kod DPPH metode, ali rezultati su omjerima vrlo slični onima na slici 7, koji prikazuju antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom. Također jasno je da uzorak broj 5, multivitaminski bombon s okusom limuna ima prosječno manju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ostale multivitaminske prahove (uzorak 1, 2 i 3).



Slika 10. Antioksidacijska aktivnost uzoraka multivitaminskih dodataka prehrani tijekom i nakon procesa *in-vitro* probave dobivena FRAP metodom izraženih kao koncentracija u jedinici  $\text{mmol FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O L}^{-1}$ .

Rezultati na slici 10, koji prikazuju antioksidacijski učinak multivitaminskih dodataka prehrani također kroz proces probave, ali mjerene FRAP metodom ukazuju na povećanje

antioksidacijske aktivnosti svih uzoraka, osim uzorka broja 5, multivitaminskog bombona s okusom limuna, nakon procesa *in-vitro* probave. Uzorak broj 5 jedini pokazuje istu tendenciju pada antioksidacijske aktivnosti kroz proces *in-vitro* probave objema metodama. Taj učinak može se također objasniti različitim pripremanjima početnih otopina, kao i razlikama u sastavu, prvenstveno razlikama u dodanim vitaminima koji djeluju antioksidacijski. Navedeni rezultati antioksidacijske aktivnosti nakon procesa *in-vitro* dobiveni FRAP metodom pokazuju na kontradiktorne rezultate u odnosu na DPPH metodu te je iz ovih podataka nemoguće zaključiti je li zapravo, nakon procesa *in-vitro* probave došlo do značajnog smanjenja pozitivnog antioksidacijskog učinka u crijevu ili je zapravo došlo do povećanja u odnosu na startne uzorke. Razlike u dobivenim rezultatima tih dviju metoda moguće je objasniti različitim faktorima koji utječu na rezultate tih dvaju metoda, a to su prisutnosti šećera te proteina iz enzima (Csepregi i sur., 2016). Također FRAP i DPPH metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti zahtjeva različite vrijednosti pH za optimalno mjerenje. Uzorci su mjereni na pH 6,5 jer su podešeni na tu vrijednost kako bi bili što sličniji biološkoj kiselosti u crijevima, a zapravo bi bilo idealno kada bi za DPPH metodu oni bili na 7,0-7,4, a za FRAP 3,6 (Gupta, 2015). Rast antioksidacijske aktivnosti kroz proces probave zabilježen je kod spojeva iz skupine flavonoida –flavonoidi glikozidi i to zbog razgradnje glikozidne veze u kiselom ili lužnatom medija te se tako povećava njihova koncentracija i samim tim antioksidacijski kapacitet, ali to ne može biti objašnjenje u ovom radu, jer se nisu mjerili ukupni polifenoli niti koncentracija vitamina i/ili polifenola kroz proces probave (Ortega i sur., 2011). Ono što se može zaključiti da je u određenoj mjeri, kao što je i očekivano, određeni postotak antioksidacijske aktivnosti početnih otopina ostao sačuvan i nakon procesa *in-vitro* probave.

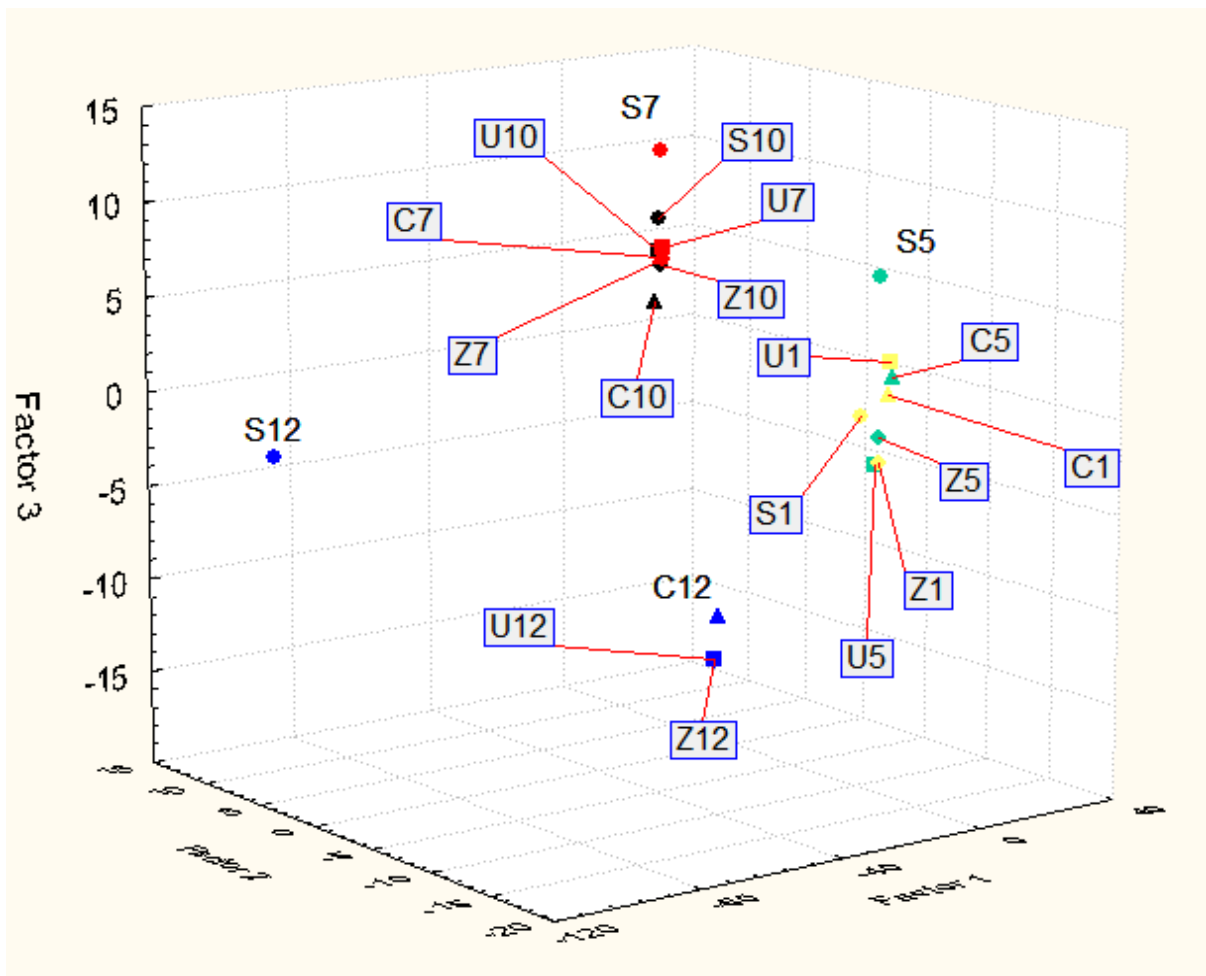
### 4.3. Statistička obrada podataka: PCA (eng. Principal component analysis- analiza glavnih komponentata) i ANN (eng. Artificial neural networks-umjetne neuronske mreže

Tablica 16. Uzorci s odgovarajućim kraticama potrebni za interpretaciju 3D prikaza PCA analize prikazanih na slikama 11 i 12.

Uzorak multivitaminskog dodatka prehrani	startni uzorak s odgovarajućom kraticom	uzorak nakon procesa probave u ustima s odgovarajućom kraticom	uzorak nakon procesa probave u želucu s odgovarajućom kraticom	uzorak nakon procesa probave u crijevima s odgovarajućom kraticom
<b>broj 1 multivitaminski prah s okusom limuna</b>	<b>S5</b>	<b>U5</b>	<b>Z5</b>	<b>C5</b>
<b>broj 2 multivitaminski prah s okusom limete</b>	<b>S1</b>	<b>U1</b>	<b>Z1</b>	<b>C1</b>
<b>broj 3 multivitaminski prah s okusom limuna i bazge</b>	<b>S10</b>	<b>U10</b>	<b>Z10</b>	<b>C10</b>
<b>broj 4 multivitaminski prah s okusom limuna bez šećera</b>	<b>S7</b>	<b>U7</b>	<b>Z7</b>	<b>C7</b>
<b>broj 5 multivitaminski bombon s okusom limuna</b>	<b>S12</b>	<b>U12</b>	<b>Z12</b>	<b>C12</b>

U tablici 16 prikazane su uzorci s odgovarajućim kraticama potrebni za interpretaciju 3D prikaza PCA analize prikazanih na slikama 11 i 12.

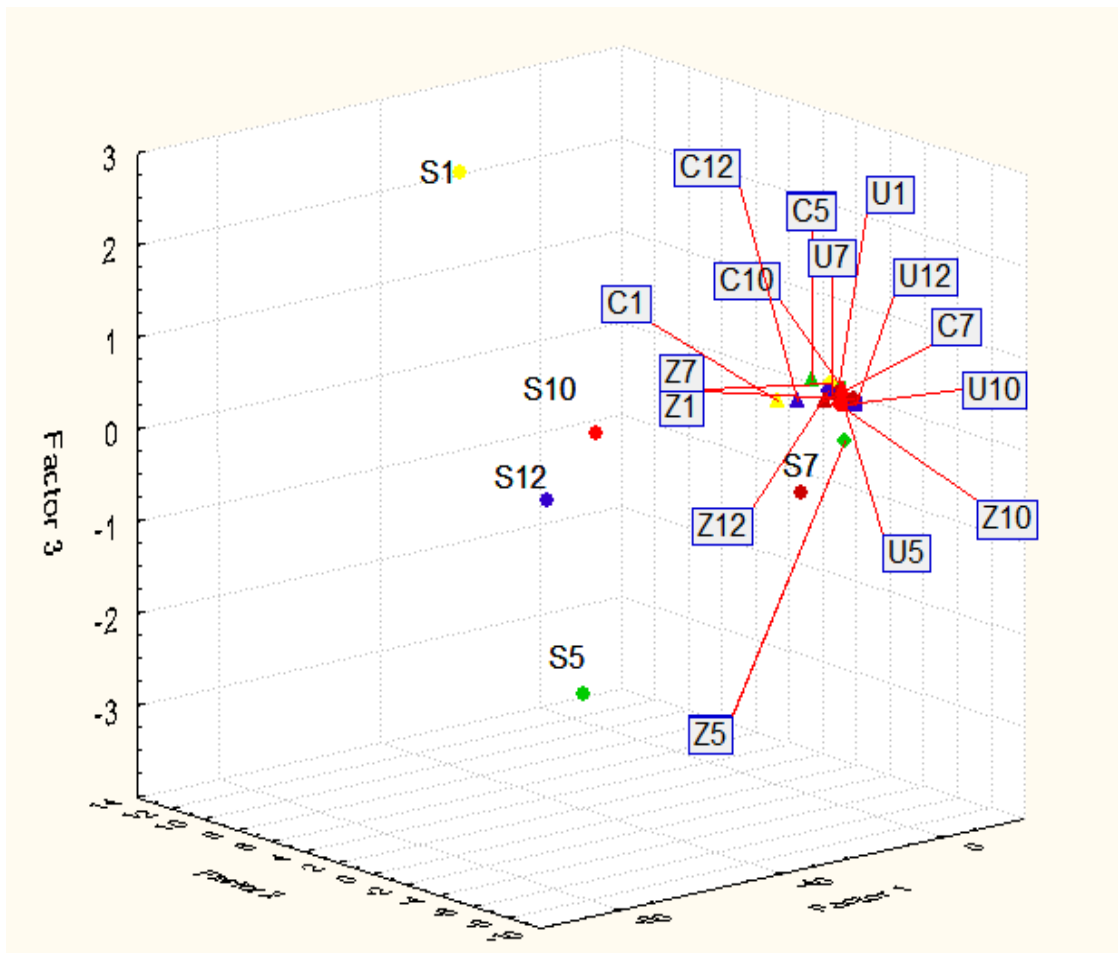




Slika 11. 3D prikaz PCA analize prvih triju faktora dobivenih snimanjem uzoraka multivitaminskih dodataka prehrani NIR spektroskopijom.

Slike 11 i 12 prikazuju grafički 3D prikaz PCA analize prvih triju faktora dobivenih snimanjem NIR spektara. Prva tri faktora predstavljaju 99 % varijabilnosti provjerenih nakon analize glavnih komponenti. Kratice naziva uzoraka prikazane su u tablici 16. Na slici su istim bojama prikazani isti uzorci kroz probavni sustav, kao i startni uzorci. 3D prikaz bolje razdvaja uzorke od 2D prikaza stoga smo se u ovom radu odlučili za takav prikaz podataka. Na slici 11 jasno je vidljivo razdvajanje startnog uzorka pod brojem 12, multivitaminskog bombona s okusom limuna od ostalih startnih uzoraka multivitamina u prahu. To je i očekivano jer su uočene značajne razlike u odnosu na druge uzorke pri mjerenju TDS-a, električne vodljivosti, udjela suhe tvari i šećera kao i antioksidacijske vrijednosti mjerene objema metodama (plava boja). Također je vidljivo i potpuno izdvajanje uzorka pod brojem 12 kroz cijeli proces simulacije

probave. Vidljivo je i grupiranje uzorka pod brojem 7 (multivitaminog praša bez šećera s okusom limuna) i uzorka pod brojem 10 (multivitaminog praša s okusom limuna i bazge) te uzorka pod brojem 5 (multivitaminog praša s okusom limuna) i 1 (multivitaminog praša s okusom limete). Na slici 12 jasno je vidljivo izdvajanje svih startnih uzoraka, dok se ostali uzorci teško mogu grupirati. Važno je napomenuti da je za snimanje UV-VIS-om broj uzastopnih mjerenja bio 2 puta, dok je NIR-om broj uzastopnih mjerenja bio 3 puta te se NIR pokazao kao točniji i precizniji pokazatelj pri razlikovanju uzoraka u ovom radu korištenjem ANN što je prikazano kasnije u tekstu.



Slika 12. 3D prikaz PCA analize prva tri faktora dobiveni snimanjem uzoraka multivitaminških dodataka prehrani UV-VIS spektroskopijom.

Tablica 17. Modeli odabranih ANN razvijeni u svrhu predviđanja vrijednosti električne vodljivosti, refrakcijskog indeksa, stupnja Brix-a te antioksidativne aktivnosti dobivene FRAP odnosno DPPH metodom pomoću mjerenja NIR i UV-VIS metodama. ANN prikazane crvenom bojom pokazuju najbolje slaganje s eksperimentalnim podacima.

Naziv mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivac. funkcija	Izlazna aktivac. funkcija
<b>NIR 60:20:20</b>								
10-13-6	0,992	0,003	0,992	0,007	0,956	0,006	Exponential	Logistic
10-12-6	<b>0,997</b>	<b>0,001</b>	<b>0,995</b>	<b>0,004</b>	<b>0,973</b>	<b>0,005</b>	<b>Exponential</b>	<b>Logistic</b>
10-9-6	0,996	0,002	0,993	0,006	0,972	0,005	Exponential	Logistic
10-12-6	0,991	0,004	0,991	0,008	0,959	0,006	Exponential	Logistic
10-12-6	0,991	0,004	0,991	0,006	0,932	0,007	Exponential	Logistic
<b>UV-VIS 70:15:15</b>								
10-13-6	0,902	0,054	0,707	0,179	0,329	0,304	Exponential	Identity
10-12-6	0,907	0,054	0,768	0,111	0,328	0,241	Exponential	Identity
10-4-6	<b>0,907</b>	<b>0,053</b>	<b>0,815</b>	<b>0,079</b>	<b>0,308</b>	<b>0,304</b>	<b>Exponential</b>	<b>Exponential</b>
10-4-6	0,897	0,065	0,541	0,179	0,358	0,276	Tanh	Logistic
10-12-6	0,907	0,054	0,767	0,112	0,328	0,241	Exponential	Identity

Iz tablice 17 vidljivo je odabranih 5 neuronskih mreža označenih crvenom bojom, svake zasebno za snimanje NIR-om te UV-VIS-om. Mreže koje su izabrane imale su najveće koeficijente determinacije za učenje, testiranje i validaciju uz najmanje pogreške za ispitivane uzorke prije, tijekom i nakon simulirane probave. Uloga razvoja ANN je ta da se pomoću njih mogu predvidjeti druge vrijednosti bez mjerenja. U tablici 18 u 1. stupcu vidljive su varijable koji su nakon PCA bile korištene za izradu ANN s parametrima mjerenja pomoću NIR-a i UV-VIS-a. Raspodjela učenja, testiranja i validacije za kreiranje mreže iznosila je 60:20:20, a za UV-VIS 70:15:15, iako su isprobani i ostali omjeri, ali navedeni omjeri u tablici 17 dali su najbolju ANN. Najbolja neuronska mreža odabrana je na temelju najveće  $R^2$  vrijednost uz najmanju pogrešku. Najbolja ANN temeljem tih parametara prikazana je crvenom bojom u tablici 17 za mjerenje NIR instrumentom.  $R^2$  vrijednosti odabrane mreže prikazane su u tablici

18 i pripadaju čvrstim vezama, odnosno, možemo zaključiti da je model mreže precizan. Ima 10 neurona u ulaznom sloju, 12 u skrivenom te 6 u izlaznom. Za mjerenje UV-VIS instrumentom najbolja moguća mreža je također prikazana crvenom bojom, ali je značajno lošija od mreže pomoću NIR-a te ima veći raspon pogreške (Tablica 17) i znatno manje vrijednosti  $R^2$  (tablica 18). Jačina veze u rasponu je od srednje do čvrste. Zadovoljavajuća ANN može se dalje koristiti za analize predviđanja izlaznih varijabli navedenim u tablici 18 (1 stupac) za multivitaminske dodatke prehrani u obliku prahova ili bombona s okusom limuna.

Tablica 18. Analiza rezultata ANN predviđanja vrijednosti električne vodljivosti, refrakcijskog indeksa, stupnja Brix-a te antioksidativne aktivnosti dobivene FRAP odnosno DPPH metodom pomoću mjerenja NIR i UV-VIS metodama.

Varijabla	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
<b>ANN 10-12-6 - Exponential, Logistic</b>			
<b>TDS</b>	0,999	0,996	0,989
<b>Električna vodljivost</b>	0,999	0,997	0,986
<b>Indeks refrakcije</b>	0,997	0,996	0,986
<b>Stupanj Brix-a</b>	0,994	0,987	0,948
<b>AO aktivnost (FRAP)</b>	0,992	0,995	0,930
<b>AO aktivnost (DPPH)</b>	0,998	0,996	0,997
<b>ANN 10-4-6 - Exponential, Exponential</b>			
<b>TDS</b>	0,867	0,871	0,431
<b>Električna vodljivost</b>	0,865	0,884	0,429
<b>Indeks refrakcije</b>	0,974	0,995	0,246
<b>Stupanj Brix-a</b>	0,936	0,991	0,180
<b>AO aktivnost (FRAP)</b>	0,835	0,192	0,449
<b>AO aktivnost (DPPH)</b>	0,962	0,958	0,115

Podaci u tablici 18 također nam mogu ukazati da se značajno točnija i preciznija predviđanja mogu ostvariti mjerenjem pomoću NIR-uređaja u odnosu na UV-VIS metodu mjerenja. Varijablu koju je moguće najpreciznije predvidjeti na temelju ovog modela (pomoću ANN 10-12-6) je TDS i električna vodljivost, a slijedi ju antioksidacijska aktivnost DPPH metodom jer pokazuju najviše koeficijente determinacije (tablica 18, stupac 1). NIR spektroskopija uz

korištenje PCA pokazala se efikasna za kreiranje dobrog modela ANN koji može poslužiti kao vrlo ekonomičan, ali i efikasan alat predviđanja različitih svojstava u brojnim znanstvenim granama, a ponajviše je primjenu našao u prehrambenoj industriji zbog svoje neinvazivnosti (Huang i sur., 2007).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju analize svojstva prahova, multivitaminski dodaci prehrani s okusom limuna pokazuju poželjna i povoljna svojstva tečenja temeljem indeksa kohezije te raspodjele veličina čestica i kategoriziramo ih u prahove koji lako teku. PFSD test istih prahova pokazao je svojstva ovisnosti o brzini tečenja uz prisutnost lomova ili promjene oblika čestica.
2. Otopinama pripremljenim od uzoraka prahova multivitaminskih dodataka prehrani s okusom limuna izmjerene su visoke vrijednosti električne vodljivosti i TDS-a koje koreliraju.
3. Antioksidacijski učinak vrlo se razlikuje među analiziranim uzorcima te je višestruko veći kod uzorka koji ne sadržava šećer u odnosu na ostale uzorke koje u svom sastavu imaju i šećere.
4. Analiza *in-vitro* sustava probave i antioksidacijskog učinka pokazuje drastično smanjenje antioksidacijskog učinka kroz faze probave izmjerenih DPPH metodom.
5. Analize glavnih komponenata provedena na podacima izmjerenih putem NIR i UV-VIS spektroskopije uspješno je razdvojila startne uzorke multivitaminskih dodataka prehrani od uzoraka prikupljenih kroz različite faze *in-vitro* sustava probave.
6. Kreirana umjetna neuronska mreža može poslužiti kao alat za statistički zadovoljavajuće predviđanje fizikalnih (električne vodljivosti, refrakcijskog indeksa, stupnja Brix-a, TDS-a) i kemijskih (antioksidativne aktivnosti) svojstava sličnih multivitaminskih dodataka prehrani u početnom stanju, ali i u fazama *in-vitro* probave.
7. Kreirani ANN model *in-vitro* procesa probave puno se bolje pokazao u slučaju NIR spektroskopije gdje su vrijednosti koeficijenata determinacije za predviđanja vrijednosti električne vodljivosti, refrakcijskog indeksa, stupnja Brix-a te antioksidativne aktivnosti bile u rasponu 0,930 – 0,997 dok su za UV/VIS spektroskopiju bile u rasponu 0,115 -0,449.

## 6. LITERATURA

Abu-Hardan, M., Hill, S.E. (2010) Handling properties of cereal materials in the presence of moisture and oil. *Powder Technol.* **198**, 16-24.

Anonymous 1 (2019) Mordor intelligence; Dietary supplements market - growth, trends, and forecast (2019 - 2024), < [https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/dietary-supplement-market?gclid=CjwKCAjwmZbpBRAGEiwADrmVXgzxvjSHGKvpII YuiQy546Nn9i-HRN7n0pej0WP0ficm6-OcWzHZRoCklYQAvD\\_BwE](https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/dietary-supplement-market?gclid=CjwKCAjwmZbpBRAGEiwADrmVXgzxvjSHGKvpII YuiQy546Nn9i-HRN7n0pej0WP0ficm6-OcWzHZRoCklYQAvD_BwE) >. Pristupljeno 07. rujna 2019.

Anonymous 2 (2019) Grafički prikaz ovisnost apsorbancije DPPH pri kemijskoj reakciji antioksidacije zajedno s kemijskom strukturom DPPH radikala, < <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/60/DPPHreact.png/500px-DPPHreact.png> >. Pristupljeno 07. rujna 2019.

Anonymous 3 (2019) Primjer prikaza rezultata dobivenih PCA (eng. *Principal component analysis*- analiza glavnih komponenata) u 3D i 2D obliku, < [http://www.nl pca.org/pca\\_principal\\_component\\_analysis.html](http://www.nl pca.org/pca_principal_component_analysis.html) >. Pristupljeno 07. rujna 2019.

Barbosa-Canovas, G., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H. (2005) Food powders. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Benković, M., Bauman, I. (2009) Flow characteristics of powdered infant formula. *J. Process Energ. Arg.* **13(1)**, 67-70.

Benković, M., Srećec, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Bauman, I. (2013) Flow properties of commonly used powders and their mixtures. *Food. Bioprocess. Technol.* **6**, 2525-2537.

Benković, M., Jurinjak Tušek, A., Belščak-Cvitanović, A., Lenart, A., Domian, E., Komes, D., Bauman, I. (2015) Artificial neural network modelling of changes in physical and chemical properties of cocoa powder mixtures during agglomeration. *J. Food Sci. Technol.* **64**, 140-148.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Bobinac, I. (2009) Određivanje karakteristika protoka mlijeka u prahu. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Csepregi, K., Neugart, S., Schreiner, M., Hideg, E. (2016) Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules*. **21**, 2-208.

Dickinson, A., MacKay, D. (2014) Health habits and other characteristics of dietary supplement users: a review. *Nutr. J.* [online] **13**, 14, < <https://nutritionj.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1475-2891-13-14> >. Pristupljeno 07. rujna 2019.

Dou, Y., Sun, Y., Ren, Y., Ren, Y. (2005) Artificial neural network for simultaneous determination of two components of compound paracetamol and diphenhydramine hydrochloride powder on NIR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*. **528**, 55-61.

Freeman, R. (2007) Measuring the flow properties of consolidated, conditioned and aerated powders — A comparative study using a powder rheometer and a rotational shear cell. *Powder Technol.* **174**, 25–33.

Fu, Q., Sun, W. (2001) Mie Theory for Light Scattering by a Spherical Particle in an Absorbing Medium. *Appl. Optics*. **40**, 1354-1361.

Gliszczynska-Swigło, A. (2006) Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food. Chem.* **96**, 131-136.

Gupta, D. (2015) Methods for Determination of Antioxidant Capacity: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **6**, 546–566.

Halmi, A. (2003) Multivarijatna analiza u društvenim znanostima, Alinea, Zagreb.

Hausner, H., H. (1981) Powder characteristics and their effect on powder processing. *Powder Technol.* **30**, 3-8.

Huang, Y., Kangas, L. J., Rasco, B. A. (2007) Applications of Artificial Neural Networks (ANNs) in food science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **47**, 113–126.



IFPRI (2015) Global Nutrition Report 2015: Actions and accountability to advance nutrition and sustainable development, International Food Policy Research Institute, Washington, <<http://ebrary.ifpri.org/utills/getfile/collection/p15738coll2/id/129443/filename/129654.pdf>>. Pristupljeno 07. rujna 2019.

Ilari, J.I. (2002) Flow properties of industrial powder. *Dairy. Sci. Technol.* **82**, 383-399.

Janjatović, D. (2011) Ispitivanje značajki tečenja sipkih koncentrata juha. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Jednačak, T., Novak P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kemija u Industriji.* **62** 71-80.

Jolliffe, I. T. (2002.) Principal component analysis, Springer-Verlag, New York.

Kantor, ED., Rehm, C.D., Du, M., White, E., Giovannucci, E.L. (2016) Trends in Dietary Supplement Use among US Adults From 1999–2012. *JAMA-J. AM. MED. ASSOC.* **316**. 1465-1674.

Kradjel, C. (1991) An overview of near infrared spectroscopy: from an application's point of view. *Fresen. J. Anal. Chem.* **339**, 65-67.

Macpherson, H., Pipingas, A., Pase., M.P. (2013) Multivitamin-multimineral supplementation and mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* **97**, 437-444.

Ortega, N., Macià, A., Romero M., Reguant, J., Motilva, M. (2011) Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food. Chem.* **124**, 65–71.

Pérez-Cruz, K., Moncada-Basualto, M., Morales-Valenzuela, J., Barriga-González, G., Navarrete-Encina P., Núñez-Vergara, L., Squella, J.A., Olea-Azar, C. (2018) Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins, *AraB. J. Chem.* **11**, 525-537.

Pravilnik o dodacima prehrani (2013) *Narodne novine* **126**, Zagreb.

Prescott, J.K., Barnum, R.A. (2000) On powder flowability. *Pharm. Technol.* **24**, 60 –84.

Pyrzynska, K., Pekal, A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal. Method.* **5**, 4288-4295.

Queirós, R.B.T., Sales, P., Maria Goreti. (2013) Assessing and comparing the total antioxidant capacity of commercial beverages: Application to beers, wines, waters and soft drinks using TRAP, TEAC and FRAP methods. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. **16**, 22-31.

Radimer, K., Bindewald, B., Hughes, J., Ervin, B., Swanson, C., Picciano, M.F. (2004) Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am. J. Epidemiol.* **160**, 339-349.

Rusydi1, A. F. (2017) Correlation between conductivity and total dissolved solid in various type of water: A review. *IOP. Conf.* 118, 1-6.

Sennoga, C.A., Yeh, J.S., Alter, J., Stride, E., Nihoyannopoulos, P., Seddon, JM., Haskard, D.O., Hajnal, J.V., Tang, M.X., Eckersley, R.J. (2012) Evaluation of methods for sizing and counting of ultrasound contrast agents, *Ultrasound. Med. Biol.* **38**, 834-845.

Shah, R.B., Tawakkul, M.A., Khan, M.A. (2008) Comparative Evaluation of Flow for Pharmaceutical Powders and Granules, *AAPS. Pharm.Sci.Tech.* **9**, 250-258.

Shah, R.B., Tawakkul, M.A., Khan, M.A. (2008) Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* **9**, 250-258.

Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A.R. (1992) Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **669**, 7-20.

Skeie, G., Braaten, T., Hjartåker, A., Lentjes, M., Amiano, P., Jakszyn, P., Pala, V., Palanca, A., Niekerk, EM., Verhagen, H., Avloniti, K., Psaltopoulou, T., Niravong, M., Touvier, M., Nimptsch, K., Haubrock, J., Walker, L., Spencer, EA., Roswall, N., Olsen, A., Wallström, P., Nilsson, S., Casagrande, C., Deharveng, G., Hellström, V., Boutron-Ruault, MC., Tjønneland, A., Joensen, AM., Clavel-Chapelon, F., Trichopoulou, A., Martinez, C., Rodríguez, L., Frasca, G., Sacerdote, C., Peeters, PH., Linseisen, J., Schienkiewitz, A., Welch, AA., Manjer, J., Ferrari, P., Riboli, E., Bingham, S., Engeset, D., Lund, E., Slimani, N. (2009) Use of dietary supplements in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition calibration study, *Eur. J. Clin. Nutr.* **63**, 226-238.

Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina.* 43, 84-93.

Stojanović, Z., Uskoković, D. (2010) Merenje raspodele veličina čestica metodom difrakcije laserske svetlosti. *Tehnika*. **19**, 1-15.

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. *PTEP*. **21**, 17-22.

Werner, S.R.L., Jones, J.R., Peterson, A.H.J., Archer, R.H., Pearce, D.L. (2007a) Air-suspension coating in the food industry: Part II-microlevel process approach. *Powder Technol.* **171(1)**, 34-45.

Werner, S.R.L., Jones, J.R., Peterson, A.H.J., Archer, R.H., Pearce, D.L. (2007b) Air-suspension particle in the food industry: Part I-microlevel process approach. *Powder Technol.* **171(1)**, 25-33.

WHO (2011) The global prevalence of anaemia in 2011, World Health Organization, Geneva,

<

[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/177094/9789241564960\\_eng.pdf?sequence=](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/177094/9789241564960_eng.pdf?sequence=1)

[1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/177094/9789241564960_eng.pdf?sequence=1) >. Pristupljeno 07. rujna 2019.

## 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.



ime i prezime studenta