

Primjena NIR spektroskopije u detekciji patvorenja češnjaka u prahu

Barlović, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:330878>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Tena Barlović

**PRIMJENA NIR
SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI
PATVORENJA ČEŠNJAKA U
PRAHU**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Benković.

ZAHVALA

*Želim izraziti iskrenu zahvalnost mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Benković na vodstvu i pomoći, prenesenom znanju i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.
Veliko hvala mojoj obitelji i bližnjima.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

PRIMJENA NIR SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI PATVORENJA ČEŠNJAKA U PRAHU

Tena Barlović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213212

Sažetak: Problemi patvorenja hrane uzrokuju nepoštenu konkurenciju, negativno utječu na kvalitetu proizvoda, povjerenje potrošača i njihovo zdravlje. Cilj ovog rada bio je ispitati primjenu blisko infracrvene spektroskopije (engl. *Near Infrared Spectroscopy*, NIRs) u detekciji patvorenja češnjaka u prahu škrobom. Analizirana su slijedeća svojstva uzoraka: raspodjela veličine čestica, nasipna gustoća, Hausnerov omjer, aktivitet vode, vlaga, boja, vodljivost, ukupne otopljene tvari, pH, koncentracije polifenola i škroba, a isti su podvrgnuti i mikrosposkoj analizi. Snimljeni NIR spektri praškastih uzoraka podvrgnuti su multivarijantnoj analizi glavnih komponenta (engl. *Principal Component Analysis*, PCA). Temeljem rezultata PCA analize i eksperimentalnih podataka razvijeni su PLS (engl. *Partial Least Squares*) modeli koji su pokazali da se NIR spektroskopija može koristiti za kvantitativno određivanje: percentila raspodjele $d(0,5)$ i $D[3,2]$, aktiviteta vode, Hunterovih koordinata boja a^* i b^* , tona boje, kuta boje, ukupne promjene boje, vodljivosti, ukupnih otopljenih tvari, pH, koncentracija ukupnih polifenola i škroba.

Ključne riječi: češnjak u prahu, škrob, patvorenje, NIR spektroskopija, kemometrija

Rad sadrži: 83 stranice, 39 slika, 6 tablica, 117 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Benković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek(predsjednica)
2. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (mentorica)
3. doc. dr. sc. Tamara Jurina (članica)
4. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević(zamjenska članica)

Datum obrane: 27. studenog 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Section for Fundamental Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

APPLICATION OF NIR SPECTROSCOPY IN THE DETECTION OF GARLIC POWDER ADULTERATION

*Tena Barlović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213212*

Abstract: Food adulteration creates unfair competition, harming product quality, consumer trust, and safety. Spices, such as garlic powder are frequent targets for adulteration, they can be easily substituted with any white powder. The aim of this study was to investigate the application of near-infrared spectroscopy (NIRs) in the detection of garlic powder adulteration with starch. Analyzed properties included: particle size distribution, bulk density, Hausner ratio, water activity, moisture, color, conductivity, total dissolved solids (TDS), pH, concentrations of polyphenols and starch, with microscopic analysis. NIR spectra of powdered samples were recorded and subjected to principal component analysis (PCA). Models, derived from PCA and experimental data using the partial least squares (PLS) method showing that NIR spectroscopy can be used for the quantitative determination of: particle size distribution $d(0,5)$ and $D[3,2]$, water activity, Hunter color coordinates a^* and b^* , color tone, color angle, total color change, conductivity, TDS, pH and total polyphenol/starch concentrations.

Keywords: *garlic powder, starch, adulteration, NIR spectroscopy, chemometrics*

Thesis contains: 83 pages, 39 figures, 6 tables, 117 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Maja Benković, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Ana, Jurinjak Tušek, Associate professor(president)
2. Maja, Benković, Associate professor (mentor)
3. Tamara, Jurina, Assistant professor (member)
4. Danijela, Bursać Kovačević, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 27, November 2023.

Sadržaj

1. UVOD.....	5
2. TEORIJSKI DIO.....	7
2.1. ZAČINI.....	7
2.2. ČEŠNJAK.....	7
2.2.1. Opća morfologija i povijest	7
2.2.2. Karakteristike češnjaka.....	8
2.2.3. Češnjak u prahu.....	9
2.3. PATVORENJE ZAČINA.....	10
2.3.1. Patvorenje češnjaka u prahu	11
2.4. METODE OTKRIVANJA PATVORENJA ZAČINA.....	13
2.4.1. NIR spektroskopija.....	14
2.4.2. Kemometrija	15
2.4.3. Primjena NIR spektroskopije u patvorenju hrane	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Otapala i reagensi.....	18
3.1.2. Aparatura i pribor.....	18
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Priprema čistog praha češnjaka.....	20
3.2.2. Priprema uzoraka patvorenih škrobom.....	20
3.3. ANALIZA PRAHOVA.....	21
3.3.1. Mikroskopska analiza čestica	21
3.3.2. Raspodjela veličine čestica laserskom difrakcijom.....	21
3.3.3. Nasipna gustoća	22
3.3.4. Aktivitet vode.....	23
3.3.5. Vlaga	24
3.3.6. Boja	24
3.4. ANALIZA EKSTRAKATA	25
3.4.1. Priprema ekstrakata	25
3.4.2. Vodljivost i ukupne otopljene tvari.....	25
3.4.3. pH.....	26
3.4.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC).....	26
3.4.5. Određivanje koncentracije škroba.....	27
3.5. NIR SPEKTROSKOPIJA.....	28

3.6.	OBRADA REZULTATA I MODELIRANJE	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1.	SVOJSTVA PRAHA	31
4.1.1.	Mikroskopska analiza čestica	31
4.1.2.	Raspodjela veličine čestice laserskom difrakcijom.....	33
4.1.3.	Nasipna gustoća i Hausnerov omjer.....	35
4.1.4.	Aktivitet vode.....	37
4.1.5.	Vlaga	38
4.1.6.	Boja	40
4.2.	SVOJSTVA EKSTRAKATA.....	42
4.2.1.	Vodljivost i ukupne otopljene tvari.....	42
4.2.2.	pH.....	45
4.2.3.	Udio ukupnih polifenola (TPC)	46
4.2.4.	Koncentracija škroba.....	47
4.3.	NIR SPEKTROSKOPIJA I KEMOMETRIJA.....	49
4.3.1.	NIR spektroskopija.....	49
4.3.2.	PCA analiza	51
4.3.3.	PLS modeli	52
5.	ZAKLJUČCI	74
6.	LITERATURA	75

1. UVOD

Prehrana igra ključnu ulogu u svakodnevnom životu ljudi, a sve je veća svjesnost o utjecaju hrane na opće zdravlje te je pitanje sigurnosti i autentičnosti hrane postalo ključno u današnjem svijetu u kojem se sve češće suočavamo s problemima vezanim uz patvorenje hrane.

Patvorenje hrane poznato je još iz povijesti, čovječanstvu su poznati brojni događaji i skandali vezani uz hranu. U povijesti uzroci prijevara s hranom se mogu objasniti zbog slabe obrazovanosti, ograničenog razvoja znanosti, ali i financijskom dobiti. Danas, većina prijevara s hranom motivirana je ekonomskim interesima. Patvorenje hrane se obično događa kroz djelomičnu zamjenu, neovlašteno mijenjanje sastojaka hrane i lažno označavanje zemljopisnog podrijetla (Khodabakhshian i sur., 2021). Posljedično, velik problem je gubitak povjerenja potrošača koji proizlazi iz incidenta prevara s hranom (Moyer i sur., 2017), osim toga ovi problemi mogu predstavljati i zdravstvene i sigurnosne probleme potrošačima. Iako je kontrola hrane postala sve stroža, krivotvorenje ostaje izazov s kojim se suočavaju proizvođači, regulatori i potrošači sve do danas. Hrana i sastojci hrane često povezani s pojavom patvorenja uključuju maslinovo ulje, ribu, med, mlijeko i mliječne proizvode, mesne proizvode, proizvode od žitarica, voćne sokove, vino i alkoholna pića, organsku hranu, začine, kavu i čaj, te neke visoko prerađene proizvode (Johnson, 2014). Prehrambeni proizvod se smatra autentičnim ako udovoljava regulativama, sastavu sastojaka, predviđenim postupcima proizvodnje i tehnološkim praksama te genetskom identitetu (Huck i sur., 2016).

Glavna motivacija patvorenja začina je ekonomska, bilo dodatkom jeftinijih patvorina ili dodatkom patvorina u svrhu maskiranja loše kvalitete originalnog proizvoda, rezultat je isti - povećanje cijene proizvoda (Galvin-King i sur., 2018). Mogućnosti za patvorenjem začina mogu se pojaviti na svakom koraku dugog i složenog opskrbnog lanca. Ovakva prijevara općenito ima loš utjecaj na gospodarstvo kao i povjerenje potrošača, postoji mogućnost i zdravstvenog rizika. Ovo su neki od glavnih razloga potrebe za brzom i jednostavnom tehnikom provjere otkrivanja kao i sprječavanja patvorenja u industriji prije nego li je proizvod došao na tržište. Kako tehnologija napreduje sve više se u tu svrhu koriste spektroskopske tehnike uz upotrebu kemometrije.

U ovom radu provedeno je istraživanje na češnjaku u prahu patvorenim vodotopljivim škrobom s ciljem određivanja prikladnosti primjene blisko infracrvene spektroskopije (engl. *Near Infrared spectroscopy*, NIRs) u detekciji patvorenja. Također, određivane su i praćene fizikalne (mikroskopska analiza čestica, raspodjela veličine čestica, nasipna gustoća, Hausnerov

omjer, vlaga, boja, vodljivost i TDS) i kemijske (aktivitet vode, pH, koncentracija ukupnih polifenola i koncentracija škroba) promjene u ovisnosti o koncentraciji patvorine (škroba) u češnjaku u prahu. Procijenjena je prikladnost NIR spektroskopije kao metode za praćenje svih tih kemijskih i fizikalnih parametara odnosno mogućnosti detekcije patvorenja prema tim parametrima. Na kraju, snimljeni NIR spektri podvrgnuti su analizi glavnih komponenata (engl. *Principal Components Analysis*, PCA) te su primjenom parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) razvijeni modeli za predviđanje kvalitativnog i kvantitativnog prisustva patvorine prema određivanim fizikalnim i kemijskim svojstvima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZAČINI

Upotreba različitih vrsta začina poznata je iz davne prošlosti te je najviše povezana s njihovom bojom i okusom. Začinsko bilje osim u kulinarstvu može se koristiti i u druge svrhe kao sastojci u parfemima i raznim vrstama kozmetike. Začinsko bilje može se upotrebljavati u svježem ili sušenom obliku te se zbog toga na tržištu nalazi širok raspon proizvoda začinskog bilja. U obradi je moguće koristiti sve dijelove biljke: korijen, list, cvijet, sjeme i koru (Josipović i sur., 2016). Antioksidacijska, protuupalna i imunomodulatorna svojstva raznih začina potvrđena su u brojnim istraživanjima (Nilius i Appendino, 2013). U prehrambenoj industriji začini su iznimno cijenjeni kao izvori prirodnih boja i aroma.

2.2. ČEŠNJAK

2.2.1. Opća morfologija i povijest

Češnjak, botanički poznat kao *Allium sativum* je višegodišnja cvjetnica koja raste iz lukovice (Slika 1). Rod *Allium* obuhvaća velik broj višegodišnjih zeljastih biljaka rasprostranjenih uglavnom u umjerenim područjima. Češnjak je začinska biljka iz porodice lukovki (Alliaceae). Biljku karakterizira visoka, uspravna stabljika koja može narasti do 1 m, na vrhu stabljike se razvijaju izgledom karakteristični cvjetovi češnjaka. Cvjetovi češnjaka su sitni i bijeli te obično rastu u obliku kugle na samom vrhu stabljike. Listovi su ravni, čvrsti i široki, a završavaju oštrim vrhom, a obično rastu izravno iz lukovice. Lukovica ima karakterističan miris, vanjski sloj lukovice čine tanki omotani listovi koji okružuju unutarnju ovojnicu koja okružuje češnjeve. Prosječna lukovica obično sadrži između 10 i 20 češnjeva koji su nepravilnog oblika, osim onih koji su bliže središtu (WHO, 2005).

Češnjak je bio poznat starim Indijcima, Kinezima, no isto tako starim Grcima i Rimljanima, čak postoje dokazi o njegovoj upotrebi i na području Egipta i Mediterana koji datiraju iz vremena prije Krista (Block, 2010). U današnje vrijeme, češnjak je druga najčešće uzgajana biljna vrsta iz porodice Alliaceae, odmah iza luka i uzgaja se širom svijeta. Iako se češnjak razmnožava samo vegetativnim putem, dokazane su velike raznolikosti između različitih ekotipova u raznim područjima uzgoja. Različitosti su vidljive u morfološkom izgledu: u veličini lukovice i lista, boji i obliku, prisutnosti stapke i njene visine te boji cvijeta i

plodnosti (Wang i sur., 2014). Također, postoje i određene biokemijske razlike između ekotipovima (Baghalian i sur., 2005).



Slika 1. Češnjak (Anonymous 1, 2023)

2.2.2. Karakteristike češnjaka

Proizvodi od češnjaka su veoma popularni posljednjih godina te su na tržištu prisutni raznovrsni kulinarški i farmaceutski pripravci (Baghalian i sur., 2005).

Češnjak se uzgaja i zbog svojih ljekovitih svojstava. Od davnina su poznata njegova antibakterijska, antivirusna, antifungalna i antioksidacijska svojstva (Goff i Klee, 2006). Znanje o njegovim ljekovitim svojstvima seže iz davnih vremena, tako su Hipokrat i Galen opisali njegova blagotvorna svojstva u liječenju respiratornih problema, loše probave i poboljšanju općeg stanja organizma (Dumičić i sur., 2015). Danas su potvrđena njegova pozitivna svojstva pri snižavanju ukupnog kolesterola u plazmi, krvnog tlaka te smanjenju agregacije trombocita (Baghalian i sur., 2005). Također, pomaže u borbi protiv ateroskleroze, taloženja masti te kod neravnoteže lipoproteina (Wang i sur., 2014). Češnjak je bogat izvor različitih biološki aktivnih spojeva poput vitamina, minerala, aminokiselina i enzima. Bogat je manganom, selenom, fosforom, vitaminom C i vitaminom B6 (Dumičić i sur., 2015). Eterična ulja češnjaka sadrže spojeve sumpora koji pridonose karakterističnom mirisu češnjaka, posebno spoj alicin, a osim toga, fenolni spojevi utječu na okus i aromu češnjaka te imaju značajnu antioksidacijsku aktivnost koja pridonosi očuvanju zdravlja (Dumičić i sur., 2015).

2.2.3. Češnjak u prahu

Na tržištu, osim u svježem stanju, češnjak se nalazi i u obliku proizvoda poput vodenih ekstrakata, dehidriranih prahova ili paste. Brojna istraživanja pokazala su da proizvodi od češnjaka imaju niz bioloških prednosti za preživace (Yang i sur., 2021; Zafarian i Manafi, 2013). Lukovice češnjaka cijenjene su zbog svojeg okusa i imaju široku primjenu u hrani (Mishra i sur., 2011; Puranik i sur., 2011; Dewi i sur., 2011) kao i zbog svojih antimikrobnih, antifungalnih, insekticidnih i antioksidacijskih svojstava (El-Saber i sur., 2020).

Najpopularniji, a i u kulinarstvu najviše korišten je češnjak u prahu kao začín (Puranik i sur., 2012). U sadašnje vrijeme kulinarstvo se ne bi moglo ni zamisliti bez ovog aromatičnog začina ljutog okusa i intenzivnog mirisa (Dumičić i sur., 2015). Uz navedene karakteristike okusa i mirisa, češnjak u prahu sadrži gotovo sve esencijalne aminokiseline potrebne životinjama; najzastupljenija aminokiselina je arginin, a slijede ga aspartat i glutamat (Kodera i sur., 2002). Dominantni ugljikohidrati u češnjaku su polisaharidi, najzastupljeniji je fruktan koji čini više od 75 % sadržaja suhe tvari u režnju češnjaka (Yan i sur., 2020). Što se tiče bioaktivnih spojeva, svježe ili osušene lukovice češnjaka bogate su organosumpornim spojevima. Jedno od istraživanja ukazuje da se ukupni sadržaj organosumpornih spojeva u češnjaku u prahu kreće od 0,56 % do 0,80 % na bazi suhe tvari (Micová i sur., 2018). Alin je glavna aktivna komponenta ovih organosumpornih spojeva koji čine više od 90 % ukupnih organosumpornih spojeva u češnjaku u prahu (Zhai i sur., 2018). Naime, kada se lukovice sirovog češnjaka zgnječe, izrežu ili samelju, enzim alinaza pretvara alin u dialil tiosulfínat (alícin) (Shin i sur., 2017). Upravo se alícin smatra odgovornim za antibakterijsko, antifungalno, antiparazitsko i antikancerogeno djeovanje (Omidifar i sur., 2020; Roseblade i sur., 2017). Uz to, češnjak sadrži i saponine, polisaharide i flavonoide, ovi bioaktivni spojevi također su poznati po pozitivnom utjecaju na zdravlje (Shang i sur., 2019).

Prah češnjaka dobiva se usitnjavanjem i sušenjem očišćenih češnjeva koji se zatim melju u prah, a nakon otapanja praha u vodi oslobađaju se nutritivno značajni spojevi češnjaka poput vitamina, fitokemikalija, alícina i ostalih (O'gara i sur., 2000; Mariam i Usha Devi, 2016; Puranik i sur., 2012). Osim što je sušenje važan korak u proizvodnji ovog proizvoda, sam proces sušenja smatra se jednom od najučinkovitijih metoda koje se koristi za smanjenje sadržaja vlage u češnjaku kako bi se produljio rok trajanja češnjaka (Zhou i sur., 2017). Ključan korak u proizvodnji češnjaka u prahu je dehidratacija, na kvalitetu dehidriranog proizvoda utječu brojni čimbenici, a ovisi o kvaliteti korištene sirovine, načinu pripreme, obradi i uvjetima

sušenja (Puranik i sur., 2012). Ako se za dehidraciju koriste toplinski postupci obrade dolazi do razgradnje nutritivnog sadržaja kao i arome po kuhanom, dok netermički procesi kao suvremenije metode obrade usmjerene su na očuvanje hrane, izazivaju malu razgradnju nutritivnih i senzorskih svojstava (Puranik i sur., 2012). Utjecaj metode sušenja na kvalitetu češnjaka istraživali su Puranik i suradnici (2012): proučavali su sušenje vrućim zrakom, sušenje u fluidiziranom sloju, mikrovalno zagrijavanje i sušenje zamrzavanjem. U pogledu dobivanja proizvoda sa željenim svojstvima, kvalitete i maksimalnim uklanjanjem vlage uz minimalne troškove obrade najbolje rezultate pokazali su sušenje zamrzavanjem uz kombinaciju sušenja u fluidiziranom sloju. Dok kod klasične metode, sušenje vrućim zrakom, utvrdili su kako je uklanjanje vlage prilično učinkovito, ali se u većoj mjeri smanjila kvaliteta češnjaka u prahu, posebice pri višim temperaturama. Uspoređujući gubitak vlage i ukupnu ocjenu senzorske kvalitete u ovisnosti o temperaturi za konstantno razdoblje sušenja od 3 sata utvrđeno je kako temperatura od 60 °C optimalna za sušenje češnjeva češnjaka.

2.3. PATVORENJE ZAČINA

Začini i osušeno bilje na Europskom tržištu prodaju se najčešće u maloprodaji, dio trgovine čini ugostiteljstvo i najveći udio trgovine čini prehrambena industrija odnosno daljnja proizvodnja hrane (International Trade Centre, 2006). Njihovo korištenje u stalnom je rastu, kako zbog inovacija hrane i rasta gastronomskih ponuda tako i zbog svjesnosti pozitivnog utjecaja na zdravlje određenih vrsta začina i bilja.

Uz svakodnevna pitanja sigurnosti hrane kao što su mikrobiološka, fizikalna i kemijska opasnost u prehrambenom lancu (Bouzembrak i Marvin, 2016) javlja se sve veća opasnost od krivotvorenja različitih vrsta prehrambenih proizvoda pa tako i raznih vrsta začina.

Krivotvorenje (patvorenje) se definira kao proces kojim se namjerno umanjuje razina kvalitete nekoga proizvoda na način da se određena tvar oduzme, doda ili zamijeni nekom drugom tvari nižega stupnja kvalitete radi ostvarivanja dobiti, odnosno svako namjerno zavaravanje potrošača zbog financijske dobiti (The European Food Information Council, 2013). Uz navedeno, krivotvorenje hrane može imati utjecaj na zdravlje potrošača generiranjem različitih simptoma kao što su mučnina i dijareja, a može izazvati probleme u gastrointestinalnom traktu, jetri, koži i plućima (Galvin-King i sur., 2018). Jačina i trajanje simptoma ovisi o vrsti patvorine kao i učestalosti konzumiranja, patvorina koja je namijenjena za konzumaciju neće imati utjecaja na zdravlje potrošača, međutim, velik broj patvorina su

štetne tvari koje su nezdrave i mogu dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema. Također, problem predstavlja i teškoća mjerljivosti pojava prijevare s hranom budući da potrošač vjerojatno neće primijetiti da je proizvod koji je kupljen krivotvoren (Johnson, 2014). Prijevare s hranom će se uglavnom događati neopaženo sve dok se ne dogodi neki javni incident. U današnje vrijeme prijevare s hranom su u porastu zbog velikih ekonomskih dobitaka i tržišne konkurencije (Petrakis i sur., 2015).

Postoji veći poticaj za krivotvorenjem skupljih prehrambenih proizvoda s jeftinijim alternativama (Lakshmi, 2012), a kako su začini vrijedan proizvod imaju tendenciju veće mogućnosti krivotvorenja u odnosu na neke pristupačnije namirnice. Uz navedeno, začini su zastupljeni u velikoj i raznovrsnoj količini proizvoda na tržištu, važan su dio lanca opskrbe hranom i generalno ljudskom prehranom, široko su prisutni u hrani, pićima, lijekovima i kozmetici (Yan i sur., 2021). Također, lanac proizvodnje začina osjetljiv je na prijevare jer postoji visoki rizik krivotvorenja u svakoj proizvodnoj fazi zbog lakog pristupa kao i malog broja kontrolnih mjera (Silvis i sur., 2017). Kako se začini uglavnom pojavljuju u obliku praha, njihovo krivotvorenje često je s nekim drugim sličnim prahom uz zadržavanje izvornog oblika, boje i mirisa začina s ciljem smanjenja troškova, a ujedno povećanja prihoda (Yu i sur., 2022). Drugim riječima, miješanje začina s bilo kojom vrstom tvari smatra se krivotvorenjem hrane što izaziva veliku zabrinutost industrije, Vlade i Međunarodne organizacije za standardizaciju (Jahanbakhshi i sur., 2021). Istraživanje sa 75 uzoraka začina s različitih tržišta pokazalo je da njih 25 % sadržava jednu ili više patvorina, a tri od pet uzoraka začina patvoreno je tvarima potencijalno štetnim za zdravlje (Black i sur., 2016). Brojni primjeri patvorenja začina kao i njihove posljedice su javno poznate. Na primjer, 1990-ih mađarsko Ministarstvo poljoprivrede otkrilo je da približno 5,8 % od 3432 nasumično uzorkovanih uzoraka crvene paprike u prahu sadrži vrlo toksičan spoj Pb_3O_4 , konzumacija takvog začina uzrokovala je smrt nekoliko ljudi, dok su se mnogi teško otrovali (Daszykowski i sur., 2023). Crni papar patvori se sjemenkama papaje zbog strukturne sličnosti, niske cijene i lake dostupnosti (Dhanya i sur., 2009). Također, u origanu se često mogu pronaći listovi masline i mirte (Black i sur., 2016).

2.3.1. Patvorenje češnjaka u prahu

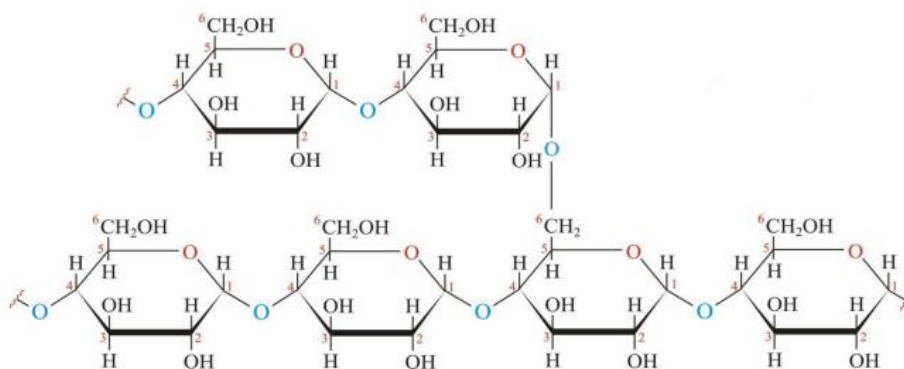
Poticaj krivotvorenju češnjaka je smanjenje prinosa usjeva. U Kini 2015. godine dolazi do skoka cijene češnjaka zbog obilnih kiša, a potom i snijega koji su uništili usjev zasađen za žetvu 2016. godine (Terazono i sur., 2016). Dok par godina ranije, 2010. godine do povećanja

cijene češnjaka dolazi zbog brojnih razloga poput uvjerenja da češnjak može zaštititi od svinjske gripe, zbog smanjenja površina namijenjenih uzgoju češnjaka kao i loši vremenski uvjeti (Branigan, 2010). Međutim, ukoliko nakon smanjenja prinosa usjeva cijene češnjaka ostanu stabilne to izaziva određene sumnje. Odnosno, problem je što se čini da češnjaka ima više nego što je zaista proizvedeno, kada bilanca mase upućuje na moguću prijevaru (Brehaut, 2017).

Češnjak u prahu smatra se osjetljivim na patvorenje jer ga je lako imitirati stoga će se patvorina najvjerojatnije pojaviti u obliku praha. Češnjak u prahu ima potencijal biti krivotvoren s bilo kojim bijelim prahom, tako je otkriveno krivotvorenje s talkom i kredom (Brehaut, 2017) kao i škrobom (Lohumi sur., 2015a; Lee i sur., 2014). Uz navedeno, potencijalne patvorine su i kukuruzno, krumpirovo, bijelo kukuruzno i rižino brašno, maltodekstrin i kasava (Daszykowski i sur., 2023).

Kreda se dobiva usitnjavanjem neklastične karbonatne sedimentne stijene (Fried i McDonnell, 2000). Bijele je do sivkaste boje, a sadrži do 99 % kalcijevog karbonata s malim količinama silicija, minerala glaukonitne gline i kalcijevih fosfata. Istraživanje provedeno na komercijalnom prahu krede pokazuje da su sumpor, kalcij i ugljik glavni sastojci, a pronađene su i male količine magnezija (Zhang i sur., 2015). Kao patvorina, prah krede pronađen je u češnjaku u prahu i to u koncentraciji od 23,2 % (Perkin Elmer, 2018). Njegovo prisustvo ima negativan utjecaj na zdravlje potrošača, javljaju se simptomi poput kašlja, probavnih problema, groznice, pospanosti i razdražljivosti (Martínez i sur., 2008), a kada se konzumira u velikim količinama može uzrokovat razvoj tumora (Dudeja i sur., 2016).

Istraživanje Lohumi i sur. (2014) pokazuje da je škrob polukristalni polimer sastavljen od dva polisaharida: amiloze i amilopektina. Amiloza je linearni polimer s oko 300 molekula glukoze međusobno povezanih α -1,4-glikozidnim vezama, dok je amilopektin visoko razgranati polimer s nekoliko tisuća molekula glukoze međusobno povezanih α -1,4-glikozidnim vezama, on sadrži i pobočne glukozne lance s kojima je povezan α -1,6-glikozidnim vezama. Molekularna struktura škroba prikazana je na slici 2.



Slika 2. Kemijska struktura škroba (prema Chaplin, 2007)

Kukuruzni škrob ima visoku potrošnju u svijetu budući da se nalazi kao prirodna rezerva u kukuruzu, a ima i vrlo nisku cijenu (Zhu, 2018). Upravo je on jedan od najčešćih patvorina u začinima jer ima slične fizikalne karakteristike kao što je granulometrija, lako je dostupan, bez mirisa i okusa, a njegovu prisutnost teško je vizualno razlučiti jer su varijacije boja neprimjetne kod začina kao što je češnjak (Osman i sur., 2019; Su i Sun, 2018; Lee i sur., 2015; Lohumi i sur., 2014; Ebnesajjad, 2013). U još jednom istraživanju koje su proveli Daszykowski i sur. (2023), proučavali su kukuruzni škrob i kukuruzno brašno kao patvorinu u češnjaku u prahu; ove patvorine su lako dostupni materijali na globalnoj razini, mogu se nabaviti u značajnijoj količini, a da ne pobude sumnju, njihova konzumacija ne predstavlja opasnost za zdravlje. Ove patvorine imaju sličnost u izgledu i teksturi s osušenim i mljevenim češnjakom, imaju neutralan okus i miris, nadalje, veličina čestica, gustoća i volumen miješanih materijala su usporedivi. Posljedično, miješanje češnjaka u prahu s kukuruznim brašnom ili kukuruznim škrobom u različitim omjerima je jednostavno, a dobivaju se patvoreni proizvodi slične gustoće i volumena pakiranja. Svi ovi atributi pozicioniraju brašno i škrob visoko na popisu mogućih patvorina u češnjaku u prahu.

2.4. METODE OTKRIVANJA PATVORENJA ZAČINA

Kako začine karakterizira njihova izrazita kemijska složenost otkrivanje prisutnosti patvorina i njihova kvantifikacija vrlo su izazovni zbog toga utvrđivanje autentičnosti začina zahtjeva praćenje svih kemijskih i fizikalnih parametara s učinkovitim analitičkim metodama. Neke od metoda koje su preporučene za otkrivanje patvorina u hrani temelje se na gustoći,

fizikalnim svojstvima, mikroskopskom ispitivanju i kemijskoj analizi (Lohumi i sur., 2015b). Ove metode zahtijevaju korištenje skupih i opasnih reagensa što dovodi do povećanja kontaminacije zbog naknadnog otpada (Patarroyo-León i sur., 2022), a i za dobivanje rezultata potreban je duživremenski period. Zbog rastućeg trenda patvorenja začina, potrebna je brza i pouzdana metoda za provjeru autentičnosti i osiguranja proizvoda. Blisko infracrvena spektroskopija u kombinaciji s kemometrijom prihvaćena je u poljoprivredno-prehrambenoj industriji kao korisna tehnika za detekciju nepoželjnih spojeva u hrani, karakterizira ju ekološka prihvatljivost, neinvazivna je metoda s pouzdanim, brzim, točnim i sigurnim rezultatima kao i niskim troškovima (de Lima i sur., 2020; Jamshidi, 2020).

2.4.1. NIR spektroskopija

Blisko infracrvena spektroskopija (engl. Near-infrared spectroscopy, NIRs) vrsta je vibracijske spektroskopije koja se temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih duljina 750 - 2500 nm, što odgovara energijama fotona od $2,65 \cdot 10^{-19}$ do $7,96 \cdot 10^{-20}$ J (Pasquini, 2003). Vibracijska spektroskopija u infracrvenom djelu spektra temelji se na svojstvu molekula da apsorbiraju zračenje valnih duljina koje odgovaraju energiji potrebnoj za prijelaz između kvantiziranih vibracijskih energetske razina (Metrohm, 2013). NIR uređaj sastoji se od izvora zračenja, monokromatora, reflektora, detektora, transmitera i računala. Princip rada je takav da se materijal koji se analizira postavi između detektora i izvora svjetlosti, svjetlost zatim prolazi kroz monokromator koji propušta samo svjetlost određenih valnih duljina odnosno omogućava selektivno mjerenje apsorpcije svjetlosti na različitim valnim duljinama. Detektor mjeri propusnost (količina svjetlosti koja prolazi kroz uzorak) i apsorbanciju (količina svjetlosti koju apsorbira uzorak). Svjetlost koja prolazi kroz uzorak detektira se i pretvara pomoću transmitera u informacije koje se očitavaju na računalu te se rezultati ispisuju u obliku NIR spektara. Kako je atom vodika najlakši podložan je najjačim vibracijama tako da glavne vrpce NIR spektra odgovaraju vezama koje sadrže vodik i druge lakše atome (prvenstveno C-H, N-H, O-H i S-H) (Blanco i Villarroja, 2002).

NIR spektroskopija ima široku primjenu, brza je (dobivanje spektara u desetinki sekunde) i nedestruktivna metoda pogodna za in-line upotrebu (Pasquini, 2003) koju karakterizira točnost i pouzdanost (Huang i sur., 2008). Za ovu analizu potrebna je minimalna priprema uzorka kao i mala količina uzorka za samu analizu, također nema utroška kemijskih reagensa (Metrohm, 2013) što je velika prednost u smislu smanjenja troškova analize i količine

otpada. Ova metoda omogućuje istovremeno mjerenje i određivanje fizikalnih i kemijskih parametara i može se primijeniti za širok raspon uzoraka, a za rukovanje NIR instrumentima potreban je minimalni trening i nadzor. Uz navedene prednosti postoje i određeni nedostaci poput niske osjetljivosti, osjetljivost tehnike drastično pada pri koncentracijama nižim od 0,1 % (Cen i He, 2007). Također, dolazi do pojave šumova i dugotrajne obrade podataka nakon skeniranja. NIR spektri sadrže kemijske, fizikalne i strukturne karakteristike svih tvari prisutnih u uzorku, prema tome vrlo su kompleksni i sadrže široke apsorpcijske vrpce koje se u nekim slučajevima i preklapaju (Metrohm, 2013). Nadalje, sve varijable moraju se uzeti u obzir kako bi se razvio dobar kalibracijski model odnosno sve dobivene podatke potrebno je obraditi multivarijatnim metodama analize (Jednačak i Novak, 2013). A svaka promjena u sustavu ili pojava nepoznate varijable utječe na pouzdanost modela (Vivek i sur., 2017).

Kao što je već navedeno NIR spektar čini velika količina podataka, a kako bi se utvrdilo između kojih uzoraka postoji razlika NIR spektri kombiniraju se s kemometrijskim metodama.

2.4.2. Kemometrija

Kemometrija je pojam koji se odnosi na upotrebu matematike, statistike i računala u kemijskoj analizi (Agelet i Hurburgh, 2010). Jedne od kemometrijskih tehnika su analiza glavnih komponenata (PCA) i parcijalni najmanji kvadrati (PLS).

PCA (engl. *Principal Component Analysis*) ili analiza glavnih komponenti je metoda multivarijatne statističke analize. Glavna svrha PCA analize je prepoznavanje i izdvajanje najvažnijih informacija iz izmjerenih spektara čime se smanjuje količina podataka koji opisuju neko svojstvo (Abdi i Williams, 2010). Koristi se u kvalitativnoj analizi za prepoznavanje uzoraka u skupu podataka (Metrohm, 2013), grupiranje kao i procjenu strukture podataka (Jednačak i Novak, 2013).

PCA analiza snimljene spektre uzorka obrađuje na način da veliku količinu spektralnih podataka svodi na ortogonalne varijable koje se zovu glavne komponente (engl. *Principal Components* ili PC) ili „faktori“ za svaki uzorak koji su linearna kombinacija intenziteta određene karakteristike uzorka koji je od relativne važnosti za model (Valinger i sur., 2017). Pri tome su uvjeti da prva glavna komponenta (PC-1) predstavlja najveću moguću varijaciju u podacima (Abdi i Williams, 2010), a svaka sljedeća glavna komponenta mora biti ortogonalna u odnosu na prethodnu (s matematičkog gledišta PC su vektori) i takva da predstavlja sljedeću najveću varijaciju u podacima (Metrohm, 2013). Faktori su pozicionirani u kvadrantima na

grafu, a kako je faktor ovisan i izračunat na temelju spektralnih karakteristika, uzorci koji su prema određenim komponentama slični biti će prikazani blizu jedan drugoga na grafu, a što se više razlikuju biti će udaljeniji (Valinger i sur., 2017).

Ako se NIR spektroskopija koristi za kvantitativne analize uzoraka, prvo treba provesti kalibraciju, koristeći multivarijatne metode linearne ili nelinearne kalibracije. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS) jedna je od metoda multivarijatne analize koja se koristi za izradu kalibracijskih modela. PLS metoda (engl. *Partial Least Squares*) je tehnika koja kombinira karakteristike iz PCA analize i višestruke linearne regresije (Abdi i Williams, 2010). Upotrebljava se za predviđanje skupa zavisnih varijabli (Y) iz skupa nezavisnih varijabli (prediktori, X) (Jurina i sur., 2018). Prvenstveno se radi kalibracijski model, on podrazumijeva sakupljanje određenog broja podataka iz snimljenog spektra, sadrži sve kemijske i fizičke varijacije koje se kasnije mogu očekivati u nepoznatim uzorcima, a koristi se za izgradnju PLS modela. Ostali podaci koriste se za validaciju, odnosno za procjenu sposobnosti modela za primjenu na nepoznatim uzorcima. Analiziraju se podaci iz kalibracijskog modela s ciljem identifikacije komponenata koji su najkorisniji za predviđanje ciljanih varijabli, odnosno na tim podacima koristi linearnu regresiju kako bi stvorio model koji povezuje te podatke s ciljanim varijablama. Za procjenu točnosti i preciznosti modela koriste se razni statistički parametri. Jedne od njih uključuju da se na temelju izračunatog koeficijenta determinacije procijeni ispravnost PLS regresije R^2 za kalibraciju i validaciju modela i srednja vrijednost korijena kvadratne vrijednosti pogreške (engl. *Root Mean Square Error*, RMSE) (Bendelja i sur., 2019).

2.4.3. Primjena NIR spektroskopije u patvorenju hrane

Primjenjivost NIR spektroskopije u detekciji patvorine pokazana je u brojnim znanstvenim istraživanjima. Folli i sur. (2022) istraživali su prikladnost NIR spektroskopije za identificiranje/kvantificiranje nečistoća u hrani uz upotrebu komemotrije, navedeno su provodili na ekstra djevičanskom maslinovom ulju, medu, mlijeku i jogurtu. To su namirnice koje imaju visoku prehrambenu i komercijalnu vrijednost i zato je važna brza i pouzdana identifikacija prisutnih patvorina, a upravo navedeno istraživanje potvrđuje prikladnost ove metode. S visokom točnošću u medu su kvantificirani nektar, glukoza i melasa šećerne trske, u ekstra djevičanskom maslinovom ulju ulje sjemenke pamuka, ulje uljane repice, suncokretovo ulje, kukuruzno ulje i sojino ulje dok je laktoza kvantificirana u mlijeku i jogurtu bez laktoze. Izvedivost ove tehnike prikazna je i u istraživanju iz 2019. godine u kojem su uz korištenje NIR

spektroskopije razvijeni PLS modeli za brzu identifikaciju crnog papra s različitim patvorinama, sjemenkama papaje, čilijem, ali i tvari iz same biljke crnog papra, poput ljuske (Wilde i sur., 2019). Sličan primjer klasifikacije korišten je u istraživanju Cantarelli-a i sur. (2020) za cimet, naime pravi cimet - *Cinnamon verum*, krivotvoren je s cimetom - *Cinnamon cassia* zbog njegove niske komercijalne vrijednosti, također on sadrži visoke vrijednosti kumarina (1 %). Kumarin je skupina spojeva koja sadrži strukture 1,2-benzopirona koje su prisutne samo u minimalnim količinama u kori *Cinnamon verum* (0,04 %). Zbog hepatotoksičnog učinka kumarina važno je postojanje brze i pouzdane metode za njegovu identifikaciju i kvantifikaciju, a ovo istraživanje potvrđuje prikladnost ove metode.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao materijali u ovom radu korišteni su:

- Svježi domaći češnjak kupljen u nespecijaliziranoj prodavaonici (Interspar, Zagreb, Hrvatska), berba 2023.
- Škrob, vodotopljivi (Fisher Scientific, Loughborough, UK)

3.1.1. Otapala i reagensi

Sljedeća otapala i reagensi su korišteni u eksperimentalnom radu:

- Destilirana voda
- Etanol, 96% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3), (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, 98 % (Acros Organics, Pittsburgh, SAD)
- Jod (Fluka, Flughofstrasse, Švicarska)
- Kalijev jodid (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Laboratorijski sušionik (Inkolab ST605, Zagreb, Hrvatska)
- Mlin (Tube Mill control, IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- Analitička vaga (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Mikroskop i kamera (Motic B series, Motic Europe, Barcelona, Španjolska)
- Analizator veličine čestica (Mastersizer 2000, Malvern, UK)
- Aw metar (Rotronic, Bassersdorf, Švicarska)
- Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- Kolorimetar PCE-CSM3 (PCE Instruments, Hong Kong, Kina)
- NIR spektrometar Avantes, AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO (Avantes, South Band, SAD)

- Uljna kupelj (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- Konduktometar (Seven Compact, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- pH metar (Metrohm, Zofingen, Švicarska)
- Magnetna miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, UK)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, UK)
- Digitalni vortex IsWIX VT (Neuation, Gujarat, Indija)
- Laboratorijski volumetar (laboratorijska izvedba)

Pribor:

- Falcon epruvete volumena 50 mL
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklena pipeta volumena 10 mL
- Mikropipete volumena 10 - 1000 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Kivete
- Odmjerna tikvica volumena 10 mL, 100 mL
- Laboratorijske čaše volumena 50 mL, 80 mL, 250 mL, 500 mL
- Metalna špatula
- Aluminijske posudice s poklopcima za sušenje
- Aluminijske posude za pečenje
- Filter papir
- Menzura 5 mL, 50 mL, 100 mL i 500 mL
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić
- Kiveta od kvarcnog stakla
- Eppendorf kivete volumena 2 mL
- Mikroskopsko stakalce

3.2. METODE

3.2.1. Priprema čistog praha češnjaka

Svježi češnjak se očisti i nareže se na ploške što uniformnije debljine. Ploške se poslože na aluminijske posude za pečenje i stave na sušenje u laboratorijski sušionik (Inkolab, Zagreb, Hrvatska) na 60 °C tijekom 8 sati. Nakon sušenja, ohlađeni materijal melje se u prah pomoću mlina (IKA, Staufen Njemačka) pri brzini okretaja oštrice od 15000 rpm u vremenu od 20 sekundi te naknadnim pojačavanjem brzine okretaja oštrice na 20000 rpm dodatno još 5 sekundi. Mljeveni prah češnjaka skladišti se u dobro zatvorenim plastičnim posudicama za prahove, pri sobnoj temperaturi, do daljnje upotrebe.

3.2.2. Priprema uzoraka patvorenih škrobom

Pripremi se po 20 g svakog uzorka sa određenom količinom patvorine (škroba). Omjeri čistog češnjaka i škroba potrebnih za uzorke definirani su u tablici 1. Uzorci se pripremaju u Falcon epruvetama ukupnog volumena 50 mL, dobro se izmiješaju i zatvore. Uzorci se čuvaju u eksikatoru (Normax, Marinha Grande, Portugal) do daljnjih analiza.

Tablica 1. Uzorci patvoreni škrobom

Oznaka uzorka	Čisti češnjak u prahu(%)	Škrob (%)
1	100	0
2	97,5	2,5
3	95	5
4	90	10
5	85	15
6	80	20
7	70	30
8	60	40
9	50	50
10	40	60
11	30	70
12	20	80
13	10	90
14	0	100

3.3. ANALIZA PRAHOVA

3.3.1. Mikroskopska analiza čestica

Prahovi se snimaju pod mikroskopom s ugrađenom kamerom (Motic, Barcelona, Španjolska). Prije snimanja mikrografa samog uzorka potrebno je snimiti mikrograf kalibracijskog stakalca. Uzorak se rasporedi po mikroskopskom stakalcu što tanje, tako da je dobro raspršen kako bi se što jasnije vidjele čestice češnjaka i dodanog škroba.

3.3.2. Raspodjela veličine čestica laserskom difrakcijom

Analiza veličine čestica laserskom difrakcijom temelji se na činjenici da čestice prolazom kroz izvor svjetlosti raspršuju svjetlo pod određenim kutom koji ovisi o veličini

čestica. Čestice manjeg promjera raspršuju svjetlo pod većim kutom i slabijim intenzitetom dok čestice većeg promjera raspršuju svjetlo pod manjim kutom i većim intenzitetom. Za određivanje raspodjela veličine čestica koristi se Malvern Mastersizer 2000 (Mastersizer, Malvern, UK) uređaj sa suhom disperzijskom jedinicom (Scirocco 2000). Sva mjerenja provode se pri tlaku 1 bar i stupnju snabdijevanja ćelije uzorkom od 60 %. Svaki uzorak se snima tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD, izraženi kao percentili raspodjele:

- $d(0,1)$ - veličina čestica od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka
- $d(0,5)$ (mass median diameter) - predstavlja promjer čestica za koji vrijedi da 50 % ukupnog broja čestica ima veći, odnosno manji promjer od tog promjera
- $d(0,9)$ - veličina čestica od koje je manje 90 % čestica cijelog uzorka te,
- $D[3,2]$ (surface weighted mean) ili Sauterov promjer - predstavlja promjer čestica čiji je omjer volumena i površine isti kao kod cijelog uzorka
- $D[4,3]$ (volume weighted mean) - pokazatelj koje veličine čestica čine većinu volumena
- Raspon (span) - računa se iz vrijednosti percentila raspodjele,

$$\text{Raspon} = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad [1]$$

gdje je :

- $d(0,1)$ - veličina čestica od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka (μm)
- $d(0,5)$ - promjer čestica za koji vrijedi da 50 % ukupnog broja čestica ima veći, odnosno manji promjer od tog promjera (μm)
- $d(0,9)$ - veličina čestica od koje je manje 90 % čestica cijelog uzorka (μm).

3.3.3. Nasipna gustoća

Za određivanje nasipne gustoće u Eppendorf kivetu volumena 2 mL kvantitativno se prenese uzorak u količini da popuni predviđeni volumen, uzorcima se izmjeri masa na analitičkoj vagi (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka). Uzorci se postavljaju na laboratorijski volumetar (laboratorijska izvedba), uređaj se upali, nakon 2 sekunde prilikom koje su uzorci bili

podloženi sa 10 udaraca aproksimativno se očitava promjena volumena ako je do nje došlo. Zatim se uređaj ponovno upali na 18 sekundi, odnosno ukupno vrijeme je 20 sekundi prilikom kojeg su uzorci podvrgnuti sa 100 udaraca, aproksimativno se očitava promjena volumena. Postupak se ponavlja, vrijeme se nastavlja do 4 minute, na taj način uzorci su podvrgnuti sa 1250 udaraca nakon čega se aproksimativno očitava promjena volumena.

Iz dobivenih vrijednosti nasipnih gustoća određuje se Hausnerov omjer (HR):

$$HR = \frac{\rho_{\text{vibraciona(1250)}}}{\rho_{\text{slobodna(0)}}} \quad [2]$$

gdje je:

- $\rho_{\text{vibraciona(1250)}}$ – nasipna gustoća nakon 1250 udaraca (kg/m^3)
- $\rho_{\text{slobodna(0)}}$ – početna gustoća (kg/m^3).

Hausnerov omjer se koristi kao brza i jednostavna metoda za predviđanje svojstva tečenja praha. Svojstva tečenja praha izražena Hausnerovim omjerom prikazana su u tablici 2 (The European Pharmacopoeia, 2019).

Tablica 2. Svojstva tečenja i odgovarajuće vrijednosti Hausnerovog omjera (The European Pharmacopoeia, 2019)

Svojstvo tečenja praha	Hausnerov omjer
Odlično	1,00 - 1,11
Dobro	1,12 - 1,18
Zadovoljavajuće	1,19 - 1,25
Moguće	1,26 - 1,34
Loše	1,35 - 1,45
Vrlo loše	1,35 - 1,45
Izuzetno loše	> 1,60

3.3.4. Aktivitet vode

Aktivitet vode u uzorcima analizira se Rotronic a_w metrom (Rotronic, Bassersdorf, Švicarska). Uzorak se stavi u plastičnu posudicu do otprilike jedne trećine volumena, posudica se stavi u komoru za mjerenje, pokrije se i pokrene se a_w metar. Provode se dva paralelna mjerenja po uzorku, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.3.5. Vlaga

Na analitičkoj vagi (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) izvaže se 2 g uzorka u aluminijskoj posudici za sušenje s poklopcem. Sušenje se provodi u laboratorijskoj sušari Inkolab (INKOlab, Zagreb, Hrvatska) pri temperaturi 105 ± 2 °C, 3 sata (AOAC, 1999). Nakon provedenog sušenja, uzorci se premještaju u eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal) gdje se hlade na sobnu temperaturu i zatim se uzorci važu. Za svaki uzorak provode se dva paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Postotak vlage u uzorku računa se prema formuli:

$$\% \text{ vlage} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \quad [3]$$

gdje je:

- m_1 = masa prazne posudice za sušenje (g)
- m_2 = masa posudice i uzorka smjese prije sušenja (g)
- m_3 = masa posudice i uzorka smjese nakon sušenja (g)

3.3.6. Boja

Boja prahova određuje se primjenom PCE-CSM3 kolorimetra (PCE Instruments, Hong Kong, Kina), uz prethodnu kalibraciju na bijelu ploču. Određuje se pet parametara boje, Hunterove koordinate boje:

- L^* - svjetlina, interval od 0 (crno) do 100 (bijelo)
- a^* - komponenta crvene/zelene boje (> 0 crvena boja, < 0 zelena boja)
- b^* - komponenta žute/plave boje (> 0 žuta boja, < 0 plava boja)
- Chroma - ton (zasićenost) boje
- Hue - kut boje, definira crveno-ljubičastu (0°), žutu (90°), plavo-zelenu (180°) i plavu boju (270°).

Za svaki uzorak provode se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Kako bi se opisala promjena boje iz izmjerenih vrijednosti L^* , a^* i b^* , određuje se ukupna promjena boje (ΔE). ΔE prikazuje koliko se boja tretiranog uzorka razlikuje od referentne boje, čistog češnjaka (tablica 3) (Mokrzycki i Tatol, 2011), a računa se prema jednadžbi:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2} \quad [4]$$

gdje su:

- L^*, a^*, b^* - vrijednosti određene za patvorene uzorke (/)
- L_0, a_0, b_0 - vrijednosti određene za kontrolni uzorak koji nije patvoren (/).

Tablica 3. Značenje promjene boje, vrijednosti ΔE (Mokrzycki i Tatol, 2011)

ΔE	Značenje
$0 < \Delta E < 1$	promatrač ne vidi razliku
$1 < \Delta E < 2$	razliku primjećuje iskusni promatrač
$2 < \Delta E < 3,5$	razliku primjećuje i neiskusni promatrač
$3,5 < \Delta E < 5$	jasno uočljiva razlika boja
$5 < \Delta E$	promatrač uočava dvije različite boje

3.4. ANALIZA EKSTRAKATA

3.4.1. Priprema ekstrakata

Izvaže se 1 g uzorka i doda u 30 mL ekstrakcijskog otapala (vode) prethodno termostetiranog na 80 °C. Ekstrakcija se provodi u vodenoj/uljnoj kupelji (IKA, Staufen, Njemačka) na temperaturi 80 °C, 30 minuta u pokrivenim Falcon epruvetama, kako bi se spriječilo isparavanje otapala (Thach, 2022). Dobiveni ekstrakt se filtrira kroz filter papir i spremi u Falcon kivete od 15 mL. Uzorci se čuvaju u zamrzivaču do provođenja analiza.

3.4.2. Vodljivost i ukupne otopljene tvari

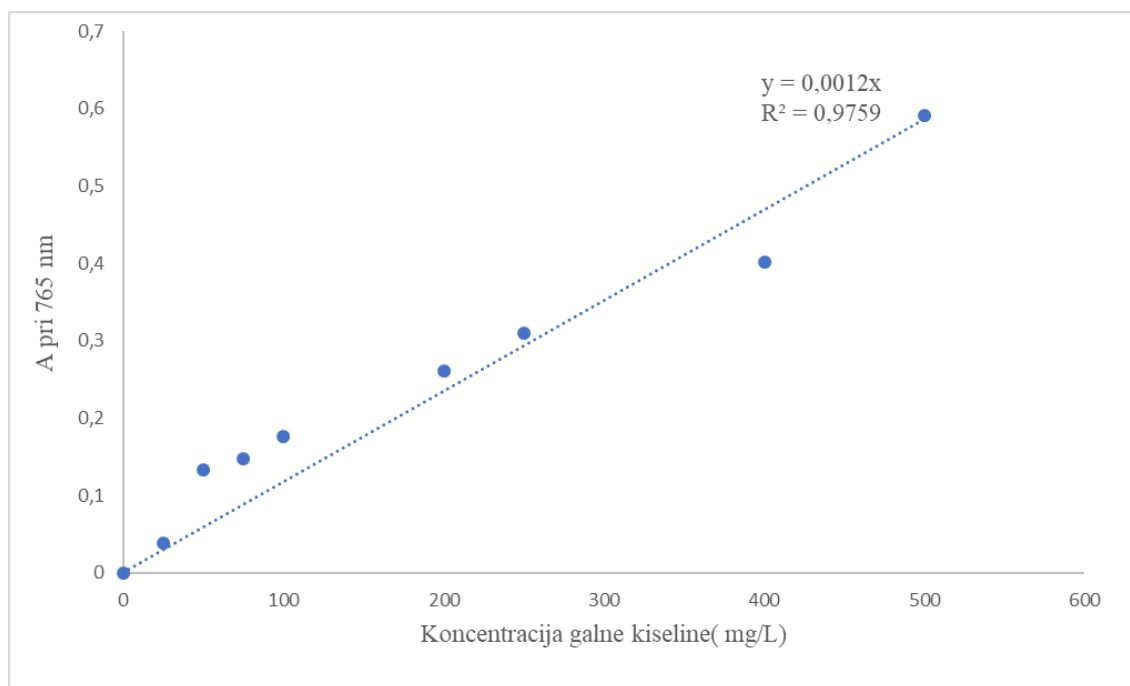
Vodljivost i ukupne otopljene tvari (TDS) određuju se pomoću Seven Compact konduktometra (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) uranjanjem sonde u pripremljeni ekstrakt. Za svaki uzorak provode se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.4.3. pH

pH vrijednost određuje se pomoću pH metra (Metrohm, Zofingen, Švicarska), direktnim uranjanjem pH sonde u pripremljene ekstrakte. Prije mjerenja potrebno je izbaždariti pH metar standardnim otopinama. Za svaki uzorak provode se tri paralelna mjerenja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.4.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC)

Ukupni polifenoli (engl. *Total Phenolic Content*, TPC) kao velika skupina organskih spojeva određuju se spektrofotometrijski uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa koji reagira s fenolima u kolorimetrijskoj reakciji. Folin-Ciocalteu reagens sastoji se od fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, u reakciji Folin-Ciocalteu reagens reagira s fenoksid ionom iz uzorka koji se oksidira, pri čemu se Folin-Ciocalteu reagens reducira do pojave plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Postupak određivanja ukupnih polifenola započinje pipetiranjem 3,95 mL destilirane vode, 50 μ L uzorka, 250 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 750 μ L 20 %-tne otopine Na_2CO_3 u epruvetu. Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Cambridge, UK) na 765 nm. Uz uzorke priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži 50 μ L destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Udio polifenolnih spojeva računa se na osnovi baždarnog pravca galne kiseline (0 – 100 mg/L) te se rezultati izraze kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L ili g uzorka.



Slika 3. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0012x \quad [5]$$

gdje je:

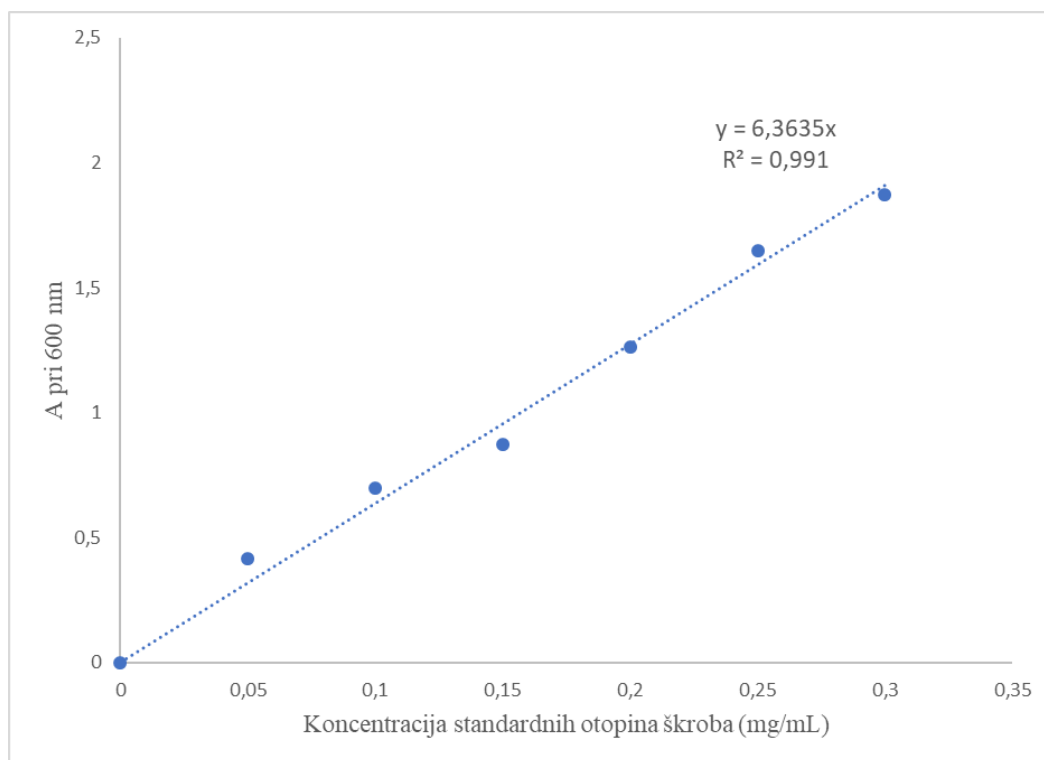
x-koncentracija otopine galne kiseline (mg/L)

y-izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (/).

3.4.5. Određivanje koncentracije škroba

Škrob je ugljikohidrat, glavna uloga mu je kao izvor energije u biljkama. Postoje dvije vrste škroba: amiloza (jako topljiv u vodi) i amilopektin (slabo topljiv u vodi). Prisutnost škroba određuje se uz pomoć joda; škrob i jod tvore tamnoplavi kompleks. Eksperiment se provodi tako da se pripremi otopina joda otapanjem 0,3 g KI i 0,254 g I₂ u 10 mL destilirane vode. Tako pripremljen reagens se još 10 puta razrijedi destiliranom vodom i čuva u hladnjaku do korištenja. Postupak određivanja škroba započinje dodavanjem 3 mL otopine uzorka i 90 µL otopine joda. Smjesa se dobro vorteksira te se određuje apsorbancija razvijenog tamnoplavog obojenja spektrofotometrijski pri 600 nm. Uz uzorke priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što se umjesto uzorka dodaje 3 mL destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost

± SD. Udio škroba računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca standardnih otopina škroba (0 – 0,3 mg/mL), a rezultati se izražavaju kao mg škroba po g suhe tvari uzorka.



Slika 4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije škroba

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 6,3635x \quad [6]$$

gdje je:

x-koncentracija standardnih otopina škroba (mg/mL)

y-izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 600 nm (/).

3.5. NIR SPEKTROSKOPIJA

Metoda se temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u blisko infracrvenom području spektra primjenom NIR spektrometra Avantes, AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO (Avantes, South Band, SAD). Sustav za snimanje NIR spektara sastoji se od računala s instaliranim softverom, polikromatskog izvora svjetlosti, optičkih kablova i sonde. Postupak snimanja provodi se tako da se sonda uroni u Eppendorf kivetu s uzorkom i snimi se apsorpcijski spektar uzorka, a rezultat snimanja je NIR spektar u rasponu valnih duljina 1000 -

2500 nm. Svaki uzorak snima se tri puta iz čijih vrijednosti se računa srednja vrijednost $\pm$ SD kako bi se smanjile različitosti i minimizirala odstupanja spektra. Na kraju, snimljeni uzorci analiziraju se primjenom kemometrijskih metoda, u ovom slučaju korištena je PCA analiza.

3.6. OBRADA REZULTATA I MODELIRANJE

S dobivenim eksperimentalnim podacima provodi se kemometrijska analiza u vidu analize glavnih komponentata (PCA analiza) te se razvijaju kalibracijski modeli metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) pomoću kojih se utvrđuje mogućnost postojanja linearne zavisnosti NIR spektara i ostalih analiziranih varijabli. Kao ulazni parametri PLS modela koriste se NIR spektri, a kao izlazni parametri raspodjele veličine čestica ($d(0,1)$, $d(0,5)$, $d(0,9)$, $D [3,2]$, $D [4,3]$ i raspon), boja (L^* , a^* , b^* , Chroma i Hue), vlaga, aktivitet vode, nasipna gustoća, Hausnerov omjer, vodljivost, TDS, pH, koncentracija škroba i ukupnih polifenola. Kemometrijska analiza i razvoj PLS modela provodi se upotrebom softverskog paketa CAMO Unscrambler X (Camo software, Oslo, Norveška). Prikladnost modela procijenjena je vrijednošću koeficijenta determinacije (R^2) prema Chadockovoj ljestvici (tablica 4) kao i RMSE (engl. *Root Mean Square Error*-pogreška srednjeg kvadratnog odstupanja) pogreškama razvijenih modela.

Tablica 4. Chadockova ljestvica

R^2	Značenje
0	Odsutnost veze
0,01 - 0,25	Slaba veza
0,25 - 0,64	Veza srednje jakosti
0,64 - 1	Čvrsta veza
1	Potpuna veza

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživana je primjena NIR spektroskopije u detekciji patvorenja češnjaka u prahu, uz škrob kao patvorinu. Za istraživanje je pripremljeno 14 uzoraka češnjaka u prahu patvorenog škrobom kao i njihovih 14 ekstrakata koji se međusobno razlikuju po postotku patvorine koju sadrže.

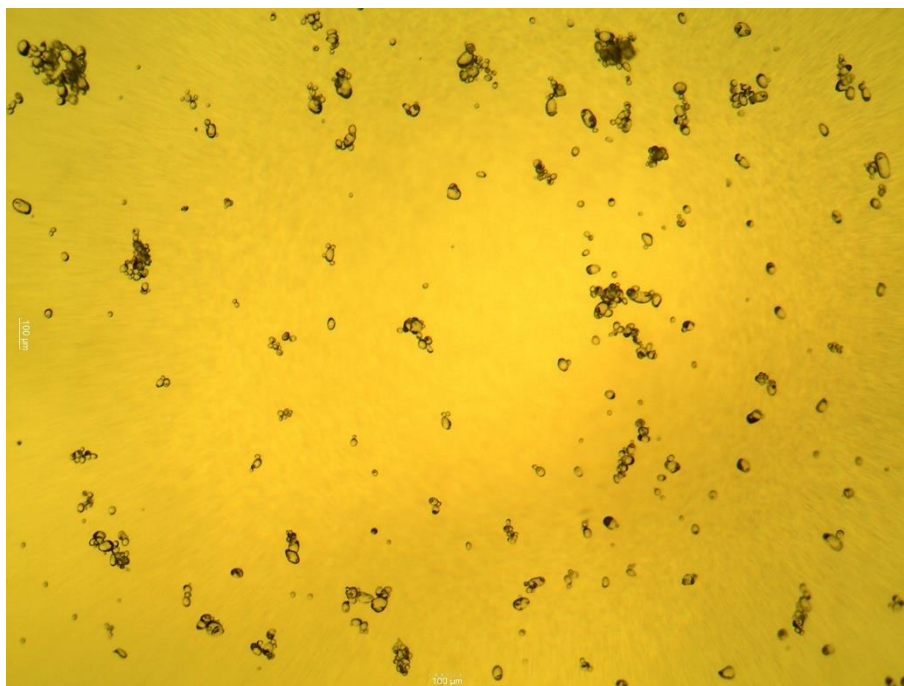
Mikrografi uzoraka škroba, češnjaka u prahu kao i češnjaka u prahu patvorenog škrobom (50 % češnjaka u prahu i 50 % škroba) prikazani su na slikama 5 - 7. Izmjerene srednje vrijednosti raspodjele veličine čestica uzoraka češnjaka patvorenih škrobom prikazane su u tablici 5, a slika 8 prikazuje grafički prikaz istog. Grafički prikaz izmjerenih vrijednosti nasipne gustoće uzoraka prikazan je na slici 9, a za njim slijedi i Hausnerov omjer na slici 10. Kako se kretao aktivitet vode uzoraka ovisno o koncentraciji patvorine prikazan je grafički na slici 11, a vlaga na slici 12. Parametri boje uzoraka kao i vrijednosti njihove ukupne promjene boje prikazani su u tablici 6. Ekstraktima su se određivala svojstva vodljivosti prikazana na slici 13, TDS-a na slici 14, a vrijednosti pH uzoraka prikazana su na slici 15. Rezultati kemijskih analiza u vidu određivanja škroba i polifenola prikazani su na slikama 16 i 17.

Također, uzorcima prahova snimani su NIR spektri primjenom NIR spektrometra Avantes, spektar svih uzoraka prikazan je na slici 18, a zatim se s dobivenim eksperimentalnim podacima provela kemometrijska analiza. PCA analiza grafički je prikazana na slici 19. Razvijeni PLS modeli koji povezuju NIR spektre sa svima određivanim fizikalnim i kemijskim parametrima grafički su prikazani na slikama 20 - 39.

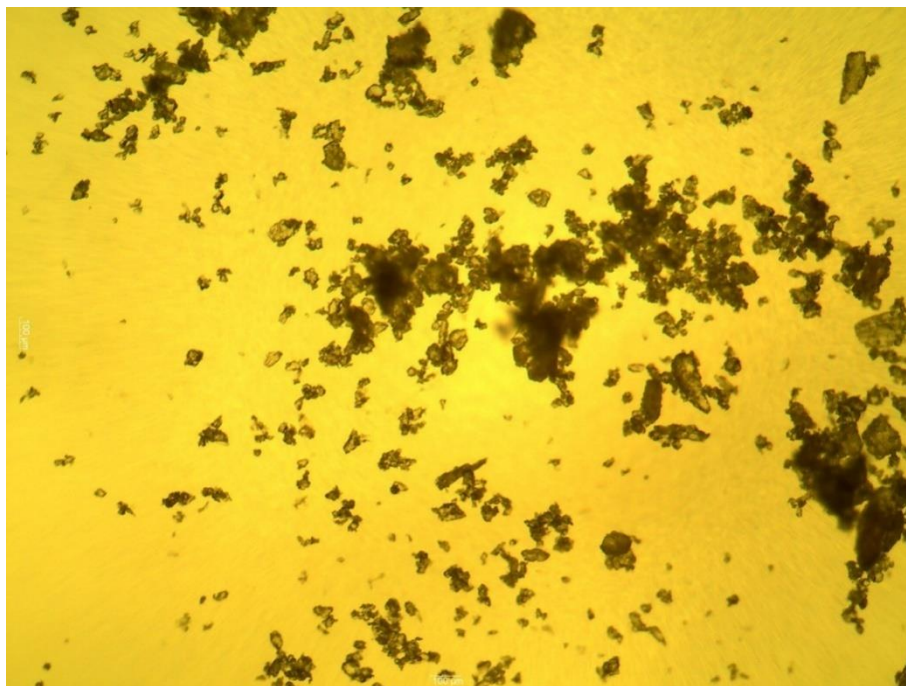
4.1. SVOJSTVA PRAHA

4.1.1. Mikroskopska analiza čestica

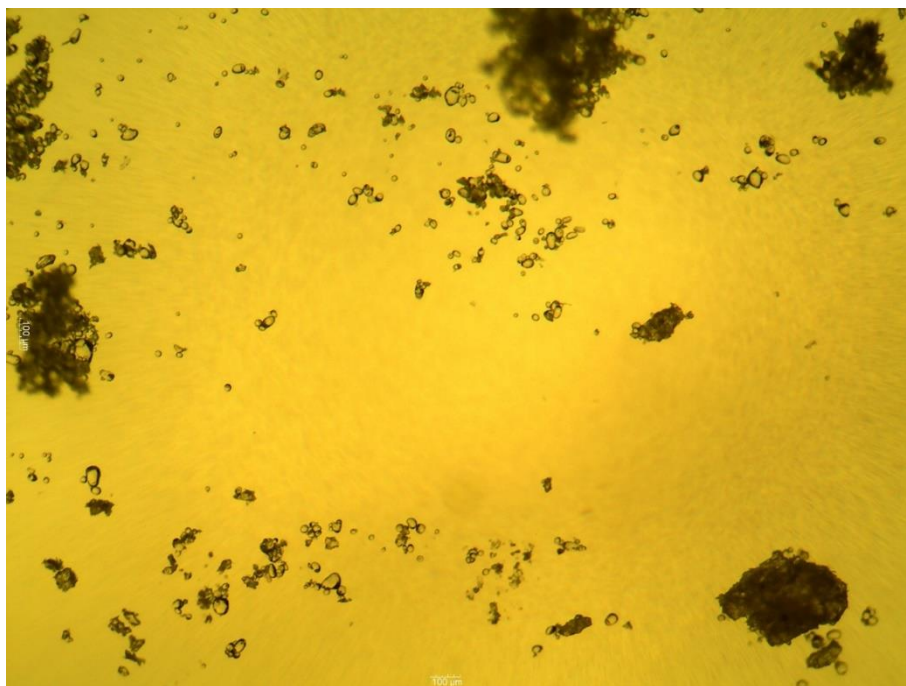
Prema mikrografima vidljivo je da čestice češnjaka i čestice škroba imaju karakterističan mikroskopski izgled. Čestice škroba su uniformnog, ovalnog oblika i bezbojne su, također imaju karakteristični tamniji dio uz rub stjenke što je vidljivo na slici 5. Na slici 6 vidljivo je kako za razliku od čestica škroba, čestice češnjaka imaju nepravilniji oblik, tamne su boje te su na njima vidljivi grubi rubovi nastali kao rezultat mljevenja. Slika 7 prikazuje mikrograf uzoraka češnjaka patvorenog škrobom te je uočljivo kako se mikroskopskom analizom čestica jako dobro razlučuju i uočavaju i čestice škroba kao i čestice češnjaka. Zaključno, mikroskopska analiza čestica dobra je metoda za kvalitativno određivanje patvorenosti češnjaka sa škrobom, ali ne i kvantitativno.



Slika 5. Mikrograf čestica škroba



Slika 6. Mikrograf čestica mljevenog sušenog češnjaka



Slika 7. Mikrograf uzorka češnjaka patvorenog škrobom

4.1.2. Raspodjela veličine čestice laserskom difrakcijom

Veličina čestica praškastih proizvoda koji su proizvedeni procesom mljevenja ovisi o: uređaju za mljevenje, vremenu trajanja mljevenja kao i o samim svojstvima materijala koji se melje (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Korištena je metoda mljevenja češnjaka primjenom oštrice, također vrijeme mljevenja je identično za svaku šaržu mljevenja te se na temelju toga može zaključiti kako svojstva samog češnjaka i svojstva dodane industrijski samljevene patvorine škroba u različitim omjerima utječu na razlike u veličini čestica smjesa. Rezultati mjerenja raspodjele veličine čestica prikazani su tablici 5.

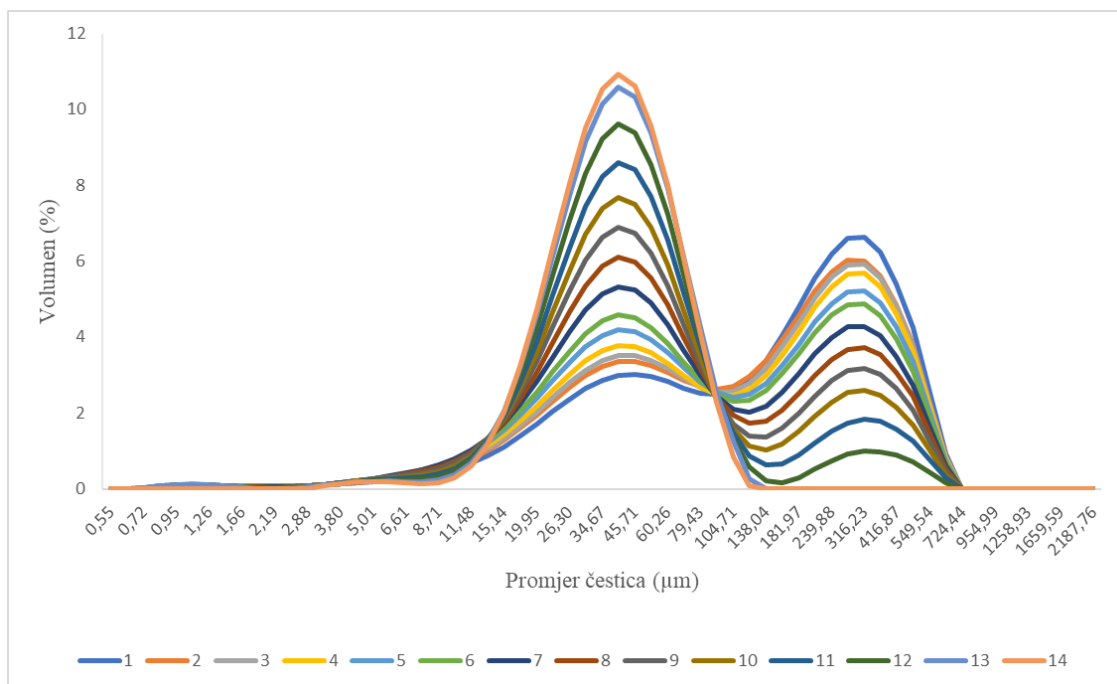
Tablica 5. Izmjerene srednje vrijednosti raspodjele veličine čestica uzoraka češnjaka patvoreni škrobom prikazani kao srednja vrijednost ($N=3$) $\pm$ SD

Uzorak	d(0,1) (μm)	d(0,5) (μm)	d(0,9) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)	Raspon (μm)
1	22,21 $\pm$ 0,84	154,39 $\pm$ 10,96	392,45 $\pm$ 6,29	50,84 $\pm$ 2,49	180,23 $\pm$ 6,21	2,4 $\pm$ 0,14
2	20,33 $\pm$ 0,27	132,19 $\pm$ 1,26	381,22 $\pm$ 1,32	45,2 $\pm$ 0,53	167,94 $\pm$ 0,91	2,73 $\pm$ 0,02
3	19,62 $\pm$ 0,12	125,76 $\pm$ 1,85	380,07 $\pm$ 1,49	42,50 $\pm$ 0,36	165,16 $\pm$ 1,08	2,87 $\pm$ 0,03
4	18,83 $\pm$ 0,29	112,89 $\pm$ 11,75	375,83 $\pm$ 7,15	40,46 $\pm$ 1,00	159,62 $\pm$ 5,93	3,18 $\pm$ 0,28
5	17,95 $\pm$ 0,09	90,01 $\pm$ 2,27	367,57 $\pm$ 3,28	37,07 $\pm$ 0,22	150,09 $\pm$ 1,91	3,89 $\pm$ 0,06
6	17,49 $\pm$ 0,25	75,48 $\pm$ 2,97	359,07 $\pm$ 3,97	35,23 $\pm$ 0,86	142,29 $\pm$ 2,8	4,53 $\pm$ 0,13
7	17,02 $\pm$ 0,21	59,45 $\pm$ 1,68	344,37 $\pm$ 4,69	32,52 $\pm$ 0,56	129,16 $\pm$ 2,87	5,51 $\pm$ 0,08
8	17,14 $\pm$ 0,14	51,53 $\pm$ 0,88	329,34 $\pm$ 5,23	31,34 $\pm$ 0,36	117,19 $\pm$ 2,48	6,06 $\pm$ 0,01
9	17,20 $\pm$ 0,08	46,36 $\pm$ 0,52	309,02 $\pm$ 4,72	30,28 $\pm$ 0,27	104,82 $\pm$ 2,07	6,29 $\pm$ 0,04
10	17,40 $\pm$ 0,02	43,02 $\pm$ 0,15	280,13 $\pm$ 5,77	29,33 $\pm$ 0,12	92,08 $\pm$ 1,51	6,11 $\pm$ 0,12
11	17,51 $\pm$ 0,02	40,16 $\pm$ 0,03	224,96 $\pm$ 3,88	28,08 $\pm$ 0,03	76,56 $\pm$ 0,5	5,17 $\pm$ 0,09
12	17,54 $\pm$ 0,10	37,67 $\pm$ 0,37	85,70 $\pm$ 6,24	26,20 $\pm$ 0,31	58,71 $\pm$ 3,29	1,81 $\pm$ 0,15
13	17,65 $\pm$ 0,22	35,92 $\pm$ 0,06	66,36 $\pm$ 0,48	25,07 $\pm$ 0,13	39,29 $\pm$ 0,08	1,36 $\pm$ 0,02
14	18,28 $\pm$ 0,37	35,74 $\pm$ 0,64	64,57 $\pm$ 0,85	29,7 $\pm$ 0,67	38,92 $\pm$ 0,62	1,30 $\pm$ 0,01

Raspon kretanja vrijednosti za d(0,1) je od 17,02 $\pm$ 0,21 μm do 22,21 $\pm$ 0,84 μm . Kod vrijednosti d(0,5) i d(0,9) vidljiv je pad veličine čestice povećanjem udjela škroba, za d(0,5) kreće se od 154,39 $\pm$ 10,96 μm do 35,74 $\pm$ 0,64 μm , dok za d(0,9) od 392,45 $\mu\text{m} \pm$ 6,29 do 64,57 $\pm$ 0,85 μm . Uzorak 1 (100 % češnjak) ima najveću vrijednost D[3,2] u iznosu 50,84 $\pm$ 2,49 μm , a uzorak 13 (10 % češnjak i 90 % škrob) ima najmanju vrijednost 25,07 $\pm$ 0,13 μm , dok uzorak 14 (100 % škrob) ima veću vrijednost 29,7 $\pm$ 0,67 μm . Raspon kretanja vrijednosti za D[4,3] je u padu povećanjem udjela škroba, od 180,23 $\pm$ 6,21 μm do 38,92 $\pm$ 0,62 μm .

Također, na slici 8 vidljiv je i grafički prikaz raspodjele veličine čestica uzoraka na kojem se jasno vidi da se radi se o bimodalnoj raspodjeli što je i očekivano s obzirom da su u

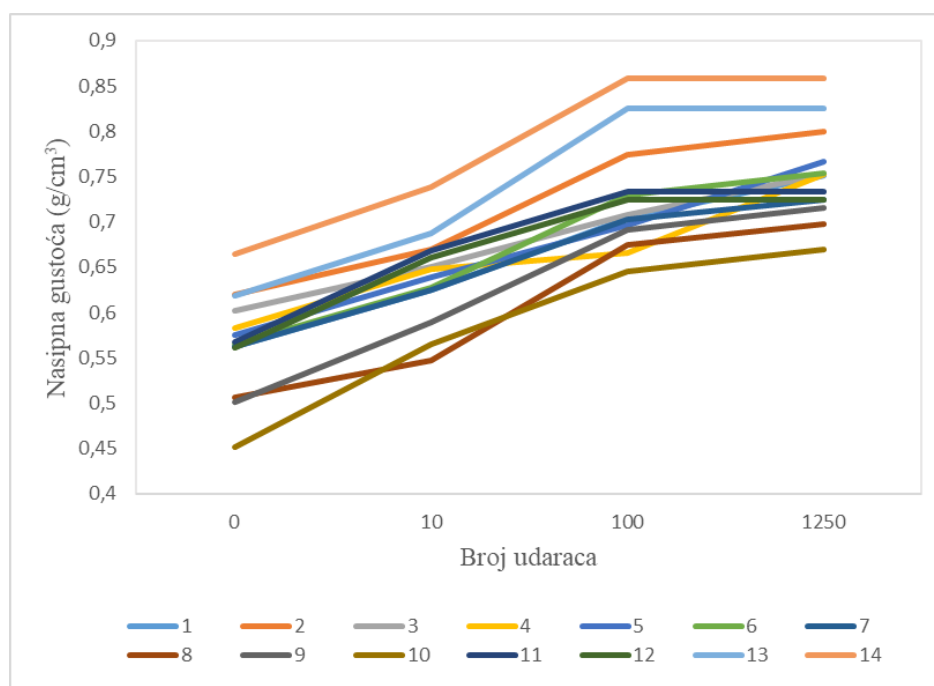
različitim omjerima miješane čestice manjih dimenzija (škrob) sa česticama većih dimenzija (mljeveni sušeni češnjak). Uočava se kako dodatkom veće količine patvorine dolazi do povećanja udjela malih čestica, odnosno dolazi do pomaka krivulje raspodjele prema malim veličinama čestica. Prema tome, laserskom difrakcijom može se odrediti postojanje patvorine u uzorku. Ove zaključke potvrđuju i brojčane vrijednosti prikazane u tablici 5.



Slika 8. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti raspodjele veličine čestica uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

4.1.3. Nasipna gustoća i Hausnerov omjer

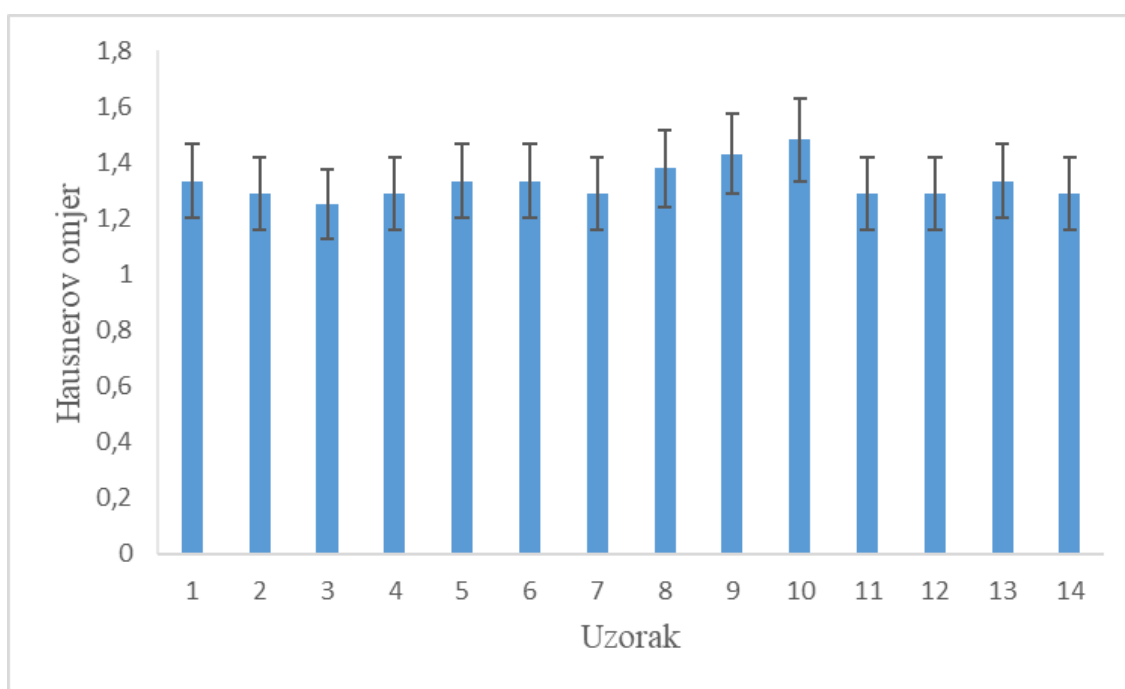
Nasipna gustoća je bitno svojstvo u raznim fazama proizvodnog procesa, prerade, pakiranja, skladištenja i distribucije prahova te je jedan od važnijih svojstava koji se koriste u specifikaciji konačnog proizvoda dobivenog sušenjem. Vrijednost nasipne gustoće ovisi o veličini čestice i obliku kao i praznom prostoru između čestica. Kod manjih veličina čestica koje imaju veću kontaktnu površinu s okolinom i veći homogeni oblik dolazi do smanjenja prostora između čestica i povećanja nasipne gustoće (Zhao i sur., 2010). Smanjenjem praznog prostora između čestica smanjuje se vjerojatnost nastanka oksidacijskih procesa i na taj način se povećava stabilnost praha (Kurozawa i sur., 2009). Dok s druge strane prilikom deklariranja ukoliko nasipna gustoća konačnog proizvoda prelazi raspon specifikacije, proizvod će zauzeti manji dio volumena predviđene pakovine što daje dojam nedostatka proizvoda iako je neto masa točna. S druge strane ukoliko je nasipna gustoća manja od specificirane, proizvod će zauzeti veći volumen od same pakovine, a rezultat toga je pakovina s manjom neto masom od deklarirane (Barbosa-Canovas i sur., 2005).



Slika 9. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti nasipne gustoće pri 0, 10, 100 i 1250 udaraca uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

Svi uzorci su pokazali rast nasipne gustoće s brojem udaraca volumetra, što je rezultat

istiskivanja zraka iz međučestičnog prostora (slika 9). Najveću promjenu u vrijednosti nasipne gustoće pokazuje uzorak 14 (100 % škrob) s vrijednostima za 0 udaraca $0,6649 \text{ g/cm}^3$, za 10 udaraca $0,7388 \text{ g/cm}^3$, za 100 udaraca $0,858 \text{ g/cm}^3$ te za 1250 udaraca $0,858 \text{ g/cm}^3$. Dok kod uzorka 8 (60 % češnjak i 40 % škrob) je došlo do najmanje promjene u nasipnoj gustoći, s vrijednostima za 0 udaraca $0,5058 \text{ g/cm}^3$, za 10 udaraca $0,5468 \text{ g/cm}^3$, za 100 udaraca $0,6744 \text{ g/cm}^3$ te za 1250 udaraca $0,6977 \text{ g/cm}^3$. U ovom slučaju nije utvrđen jasan trend promjene vrijednosti nasipne gustoće s promjenom udjela patvorina u uzorku.



Slika 10. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti Hausnerovog omjera uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

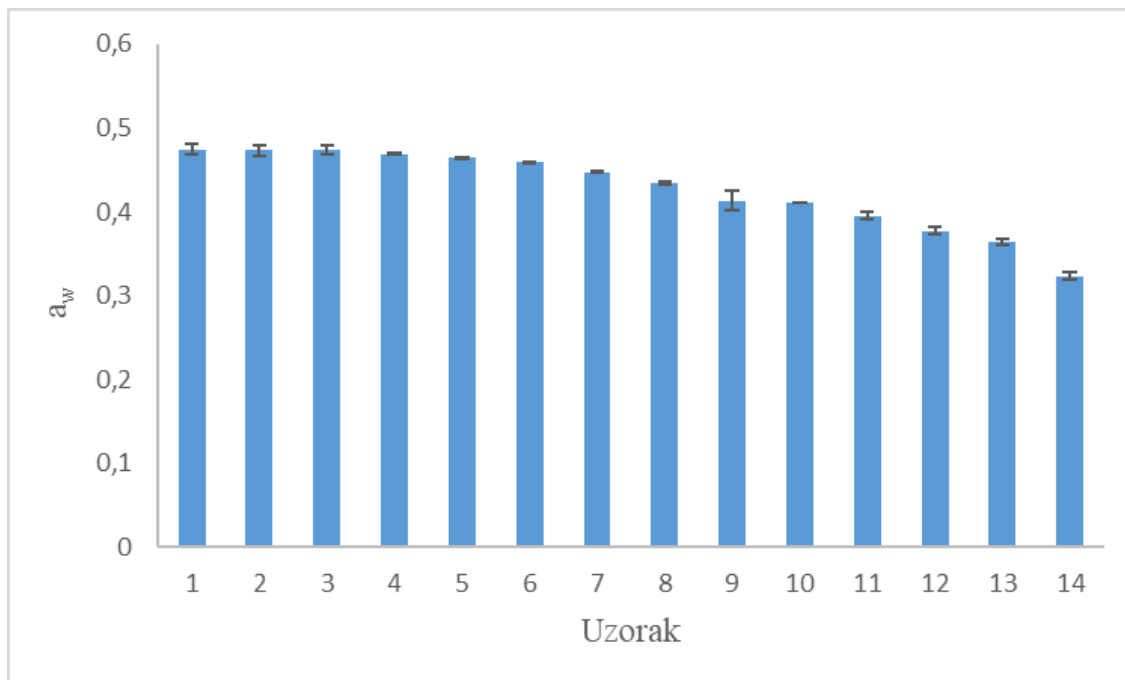
Hausnerov omjer koristi se kao mjera procjene tečenja prahova (The European Pharmacopoeia, 2019). Iz slike 10 je vidljivo da se vrijednosti Hausnerovog omjera kreću u rasponu od 1,25 za uzorak 3 (95 % češnjak i 5 % škrob) do 1,48 za uzorak 10 (40 % češnjak i 60 % škrob). Prema vrijednosti Hausnerovog omjera za sve uzorke (1 - 14) i skali prikazanoj u tablici 2 u Materijalima i metodama može se reći da imaju moguće, loše i vrlo loše tečenje. Budući da su vrijednosti Hausnerovog omjera izračunate iz vrijednosti nasipne gustoće, i u ovom slučaju nije vidljiv jasan trend promjene vrijednosti Hausnerovog omjera u odnosu na udio dodane patvorine.

U istraživanju Saker i sur. (2019) određivana su svojstva tečenja devet različitih

prahova, procjenom vrijednosti Hausnerovog omjera, korištenjem laboratorijski izvedenog vibracijskog uređaja. Svojstva tečenja određivana su na različitim vrstama prahovima, dvije vrste laktoznog praha ($1,1 \pm 0,02$, $1,31 \pm 0,02$), dvije vrste praha mikrokristalne celuloze ($1,35 \pm 0,01$, $1,44 \pm 0,01$) kao i pet komercijalnih prehrambenih prahova nepoznatog imena, dva praha od povrća ($1,27 \pm 0,01$, $1,18 \pm 0,01$), mineralni prah ($1,29 \pm 0,02$), prehrambeno vlakno u prahu ($1,27 \pm 0,01$) i proteinski prah ($1,19 \pm 0,01$). Prema vrijednosti Hausnerovog omjera za ove uzorke prahova može se reći da imaju zadovoljavajuće, moguće i loše tečenje, odnosno brojčane vrijednosti ukazuju da su rasponu vrijednosti dobivenim u ovom istraživanju.

4.1.4. Aktivitet vode

Aktivitet vode je parametar koji objašnjava dinamiku dvosmjernog prolaza vode, on je pokazatelj one količine vode kojom mikroorganizam raspolaže u reakcijama metabolizma (Adams i Moss, 2008). Aktivitet vode u hrani je mjera prisutne slobodne vode, prema tome pomoću aktiviteta vode može se kontrolirati rast i razvoj mikroorganizama u prehrambenim namirnicama. Na slici 11 prikazani su udjeli slobodne vode dostupne za biološke funkcije u uzorcima češnjaka patvorenih škrobom.

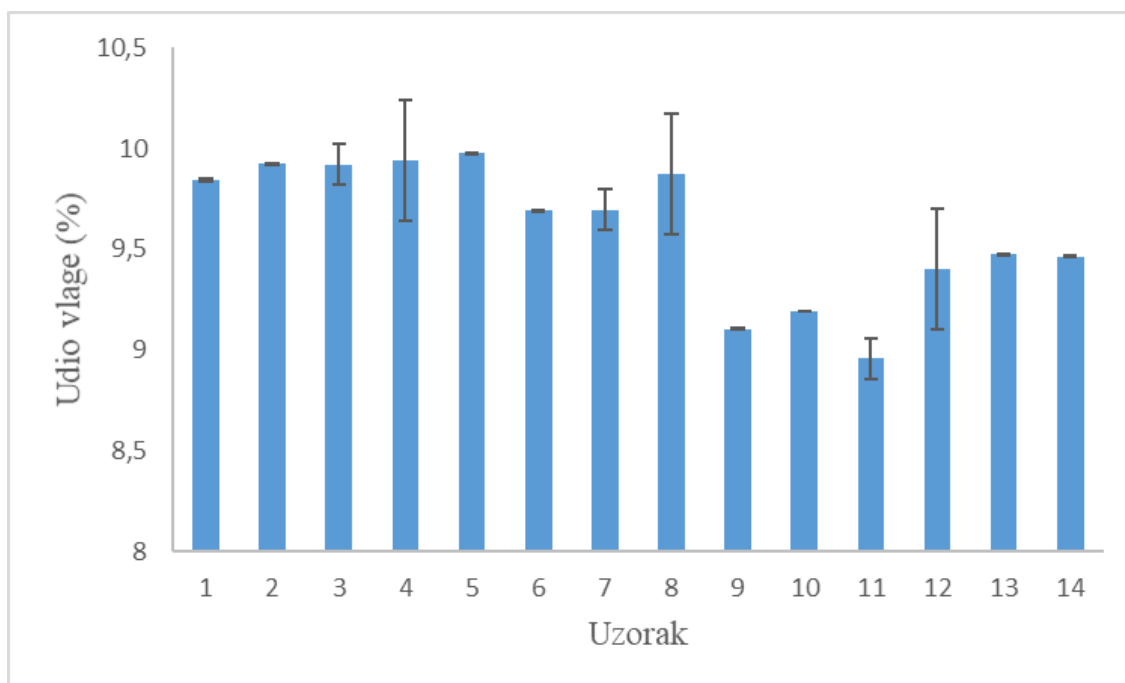


Slika 11. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti aktiviteta vode (a_w) uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

Iz rezultata vidljivo je kako povećanjem udjela škroba, vrijednost aktiviteta vode se smanjuje. Najveću vrijednost aktiviteta vode pokazuje uzorak 1 (100 % češnjak): $0,4745 \pm 0,006$, dok uzorak 14 (100 % škrob) pokazuje najnižu vrijednost $0,3235 \pm 0,005$, pri srednjoj vrijednosti temperature $22,41 \pm 0,75$ °C. Razlog tome može biti biološko podrijetlo samog uzorka češnjaka – naime, češnjak je kupljen kao svjež i sušen sve do korištenja, čime je očuvana i niža a_w vrijednost. Također, svi uzorci imaju vrijednost aktiviteta vode (a_w) nižu od 0,6 što znači da su svi uzorci mikrobiološki sigurni (Quek i sur., 2007). U istraživanju Voelker i sur. (2020) određivane su vrijednosti aktiviteta vode za različite začine na 25 °C te a_w vrijednost češnjaka iznosi 0,31 što je niže od vrijednosti dobivene u ovom istraživanju, dok a_w vrijednost đumbira iznosi 0,69, klinčića 0,54, muškarnog oraščića 0,53, ružmarina 0,47 te luka 0,29. Vrijednosti aktiviteta vode začina su različite, naime začini se međusobno razlikuju po biološkom podrijetlu kao i načinu i uvjetima proizvodnje stoga imaju i različite vrijednosti aktiviteta vode.

4.1.5. Vlaga

Važno svojstvo svih praškastih proizvoda je postotak vlage koju sadrže. Postotak vlage u praškastim proizvodima trebao bi biti ispod 5 % jer povećan postotak vlage može smanjiti kvalitetu proizvoda, ima negativan utjecaj na senzorska svojstva, skraćuje rok trajanja i povećava kohezivnost prahova (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Na slici 12 prikazani su udjeli vode u uzorcima.



Slika 12. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti udjela vlage uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

Prema rezultatima može se uočiti kako uzorci s većim postotkom češnjaka imaju i veći udio vlage, za razliku od onih koji sadržavaju veći udio škroba i imaju niži udio vlage, što je u skladu s rezultatima za aktivitet vode. Postotak vlage u uzorcima kreće se od $8,96 \% \pm 1,08$ za uzorak 11 (30 % češnjak i 70 % škrob) do $9,98 \% \pm 1,11$ za uzorak 5 (85 % češnjak i 15 % škrob) te se zaključuje kako i škrob i češnjak imaju izrazito hidrofilni karakter.

Na postotak vlage, osim sastava smjese može utjecati proces sušenja i skladištenje, no u ovom slučaju sušenje i skladištenje svih uzoraka provedeni su pod istim uvjetima. Što se tiče pohrane uzoraka između analiza, čuvani su u eksikatoru (Normax, Marinha Grande, Portugal) i na taj način se spriječilo eventualno vezanje dodatne vlage. Nadalje, rukovanje samim uzorcima (koliko dugo je pojedini uzorak bio izložen zraku tijekom vaganja i provođenja raznih analiza, koliko su Falcon epruvete s uzorcima dobro zatvorene i izolirane od zraka) može doprinijeti vezanju dodatne vlage iz zraka stoga postoje oscilacije u linearnom padu među uzorcima.

U istraživanju Voelker i sur. (2020) vlaga uzorka češnjaka u prahu određivana je trima različitim metodama, Karl Fischer titracijom (4,8 %), destilacijom s toulenom (5,3 %) i sušenjem u vakuum sušari (3,9 %). Dobiveni rezultati niži su od vrijednosti vlage uzorka češnjaka ovog istraživanja (9,8 %), međutim, utvrđeno je kako i sama metoda određivanja udjela vlage istog uzorka utječe na njezinu vrijednost.

4.1.6. Boja

Boja predstavlja vidljivi dio spektra (dio elektromagnetskog spektra koji je vidljiv ljudskim okom), obuhvaća valne duljine od 10^{-8} do 10^{-6} m i sastoji se od svjetlosti crvene, narančaste, žute, zelene, plave i ljubičaste boje (Harvey, 2000).

Boja je bitan faktor u životu, kako utječe na svakodnevne odluke odabira tako utječe i na odabir odnosno preferenciju hrane. Boja je bitan faktor estetskih, sigurnosnih i senzorskih karakteristika svake hrane kao i prehrambene namirnice. Procjena o sigurnosti hrane ovisno o njezinoj boji vrši se prije samog odabira i konzumacije te na taj način ključna je u smanjenju potencijalnih zaraza, trovanja hranom.

U tablici 6 prikazani su određivani parametri boje kao srednja vrijednost ($N=3$) $\pm$ SD.

Tablica 6. Parametri boje uzoraka i ukupna promjena boje patvorenih škrobom prikazani kao srednja vrijednost ($N=3$) $\pm$ SD

	L^*	a^*	b^*	Chroma	Hue	ΔE
1	$84,48 \pm 0,85$	$6,10 \pm 0,22$	$19,49 \pm 0,36$	$20,42 \pm 0,41$	$72,62 \pm 0,28$	0
2	$82,01 \pm 2,87$	$6,02 \pm 0,32$	$18,14 \pm 0,65$	$19,11 \pm 0,70$	$71,65 \pm 0,59$	$3,64 \pm 2,02$
3	$82,20 \pm 0,33$	$6,52 \pm 0,04$	$19,56 \pm 0,18$	$20,62 \pm 0,18$	$71,56 \pm 0,14$	$2,34 \pm 0,72$
4	$84,51 \pm 0,25$	$6,01 \pm 0,05$	$17,97 \pm 0,13$	$18,95 \pm 0,14$	$71,51 \pm 0,11$	$1,70 \pm 0,18$
5	$85,37 \pm 0,11$	$5,50 \pm 0,03$	$16,87 \pm 0,15$	$17,75 \pm 0,14$	$71,94 \pm 0,18$	$2,91 \pm 0,49$
6	$86,09 \pm 0,45$	$5,20 \pm 0,04$	$16,41 \pm 0,22$	$17,21 \pm 0,22$	$72,41 \pm 0,11$	$3,63 \pm 0,86$
7	$87,66 \pm 0,52$	$4,22 \pm 0,09$	$14,63 \pm 0,27$	$15,23 \pm 0,28$	$73,92 \pm 0,14$	$6,11 \pm 0,75$
8	$87,82 \pm 0,57$	$3,82 \pm 0,21$	$13,84 \pm 0,39$	$14,36 \pm 0,43$	$74,56 \pm 0,37$	$6,96 \pm 0,91$
9	$86,72 \pm 0,37$	$4,36 \pm 0,09$	$13,39 \pm 0,24$	$14,09 \pm 0,21$	$71,98 \pm 0,61$	$6,74 \pm 0,36$
10	$86,6 \pm 1,05$	$3,62 \pm 0,11$	$12,55 \pm 0,32$	$13,06 \pm 0,33$	$73,92 \pm 0,08$	$7,73 \pm 0,62$
11	$88,09 \pm 0,26$	$3,16 \pm 0,08$	$10,81 \pm 0,22$	$11,26 \pm 0,23$	$73,70 \pm 0,22$	$9,86 \pm 0,79$
12	$91,23 \pm 0,19$	$1,53 \pm 0,12$	$8,47 \pm 0,16$	$8,60 \pm 0,17$	$79,76 \pm 0,65$	$13,72 \pm 0,66$
13	$91,99 \pm 0,17$	$0,98 \pm 0,06$	$7,32 \pm 0,12$	$7,39 \pm 0,13$	$82,40 \pm 0,36$	$15,31 \pm 0,61$
14	$92,14 \pm 1,75$	$-0,05 \pm 0,10$	$3,68 \pm 0,07$	$3,68 \pm 0,07$	$90,80 \pm 1,46$	$18,63 \pm 0,08$

L^* vrijednosti označavaju svjetlinu boje ispitivanog uzorka, vidljivo je kako L^* vrijednosti rastu povećanjem udjela škroba u uzorku. Za uzorak 14 (100 % škrob) L^* vrijednost iznosi $92,14 \pm 1,75$, dok za uzorak 1 (100 % češnjak) iznosi $84,48 \pm 0,85$, vrijednosti za sve ostale uzorke nalaze se između. Porast L^* vrijednosti znači da se povećava svjetlina proizvoda

pa se iz dobivenih rezultata može zaključiti kako najveću svjetlinu ima uzorak čistog škroba, a najmanju svjetlinu uzorak češnjaka s najmanjom količinom patvorine te da se procjenom L^* parametra boje može kvalitativno utvrditi sadrži li uzorak patvorinu.

Parametar a^* ima interval vrijednosti od -100 do +100, pri čemu negativne vrijednosti označavaju približavanje zelenoj boji, a pozitivne vrijednosti parametra a^* približavanje crvenoj boji. Iz tablice 6 je vidljivo kako uzorci sa većim udjelom češnjaka imaju veće vrijednosti parametra a^* , dok se povećanjem udjela škroba u uzorcima vrijednost parametra a^* smanjivala. Vrijednost parametra a^* za uzorak 1 (100 % češnjak) iznosi $6,10 \pm 0,22$, dok za uzorak 14 (100 % škrob) prelazi u negativne vrijednosti i iznosi $-0,05 \pm 0,10$. Također je vidljiv linearan trend promjene vrijednosti parametra a^* s udjelom patvorine – viši udio patvorine ujedno i znači niže vrijednosti a^* .

Parametar b^* također ima raspon vrijednosti od -100 do + 100, pri čemu negativne vrijednosti označavaju približavanje plavoj, a pozitivne vrijednosti žutoj boji. Iz tablice 6 je vidljivo kako su sve vrijednosti parametra b^* pozitivne te kako se njegova vrijednost smanjuje povećanjem udjela škroba. Vrijednost parametra b^* za uzorak 1 (100 % češnjak) iznosi $19,49 \pm 0,36$, dok je za uzorak 14 (100 % škrob) značajno niža i iznosi $3,68 \pm 0,07$. Može se zaključiti kako su uzorci s većim udjelom češnjaka žuće boje.

Chroma vrijednosti označavaju ton boje (zasićenost). Veće vrijednosti parametra Chrome ukazuje na to da je udio čistoće u boji vizualno jači. Vrijednosti se smanjuju povećanjem udjela škroba, tako da vrijednost za uzorak 1 (100 % češnjak) iznosi $20,42 \pm 0,41$, dok za uzorak 14 (100% škrob) iznosi $3,68 \pm 0,07$.

Hue, odnosno kut nagiba (h) ima vrijednosti između $71,51 \pm 0,11$ i $90,8 \pm 1,46$. Uzorci s većim udjelom škroba imaju i veći kut nagiba. Vrijednosti uzoraka kojima je kut do 90° nalaze se na crveno-ljubičastom i žutom spektru boja, dok uzorku 14 (100 % škrob) h vrijednost prelazi 90° ($90,8 \pm 1,46^\circ$) što ukazuje blagi pomak k plavo-zelenom spektru boja.

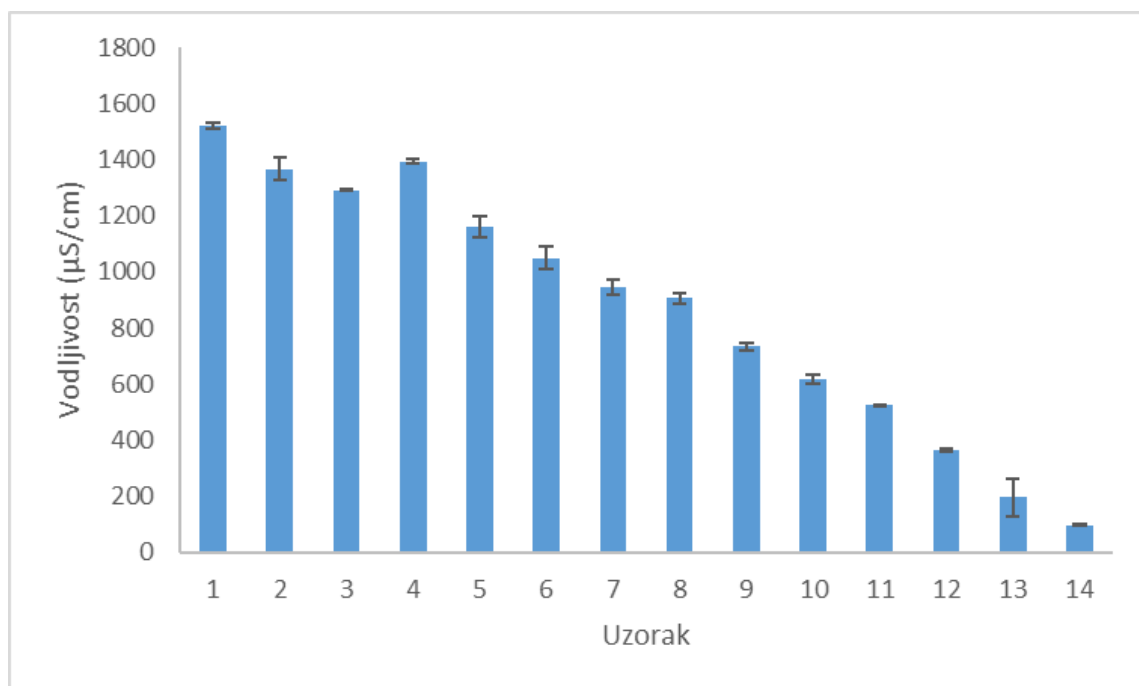
U tablici 6 izračunate su i ΔE vrijednosti, koje označavaju promjenu boje uzoraka češnjaka patvorenih različitim udjelom škroba. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako su najveće promjene, odnosno najveća odstupanja boje zabilježeni kod uzorka 14 (100 % škrob), a iznose $18,63 \pm 0,08$, dok ΔE uzorka 4 (90 % češnjak i 10 % škrob) iznosi $1,70 \pm 0,18$ i kod njega su najmanja odstupanja boje, odnosno prema Mokrzycki i Tatol (2011) tu razliku u boji primjećuje samo iskusan promatrač. Najveća odstupanja kod uzorka 4 (90 % češnjak i 10 % škrob) javljaju se zbog homogenizacije, pretpostavlja se da je u volumenu kojem se mjerila boja

zahvaćena veća čestica češnjaka ili veća nakupina škroba koja nije dovoljno razbijena miješanjem. Također, u uzorcima s nižim koncentracijama škroba ne može se utvrditi linearno smanjenje vrijednosti promjene boje zbog homogenizacije. Zaključno, kod uzorka sa što većim udjelom škroba, odstupanja boje su veće, prema Mokrzycki i Tatol (2011) promatrač jasno može uočiti dvije različite boje. Analizu promjene boje vezanu uz dodatak glukoznog sirupa kao patvorine u medu provedena je i u radu Benković i sur. (2022). U radu je utvrđeno da dodatak glukoznog sirupa dovodi do ukupne promjene boje uzoraka koja se kretala u rasponu od 0,7 do 2,28, čime je zaključeno da se promjena boje uzoraka može koristiti kao jedna od metoda preliminarne kontrole patvorenja uzoraka. I u ovom se istraživanju može zaključiti isto: budući da su razine promjene boje vidljive ljudskom oku, detekcija promjene boje može se primijeniti kao jedna od metoda detekcije patvorenja.

4.2. SVOJSTVA EKSTRAKATA

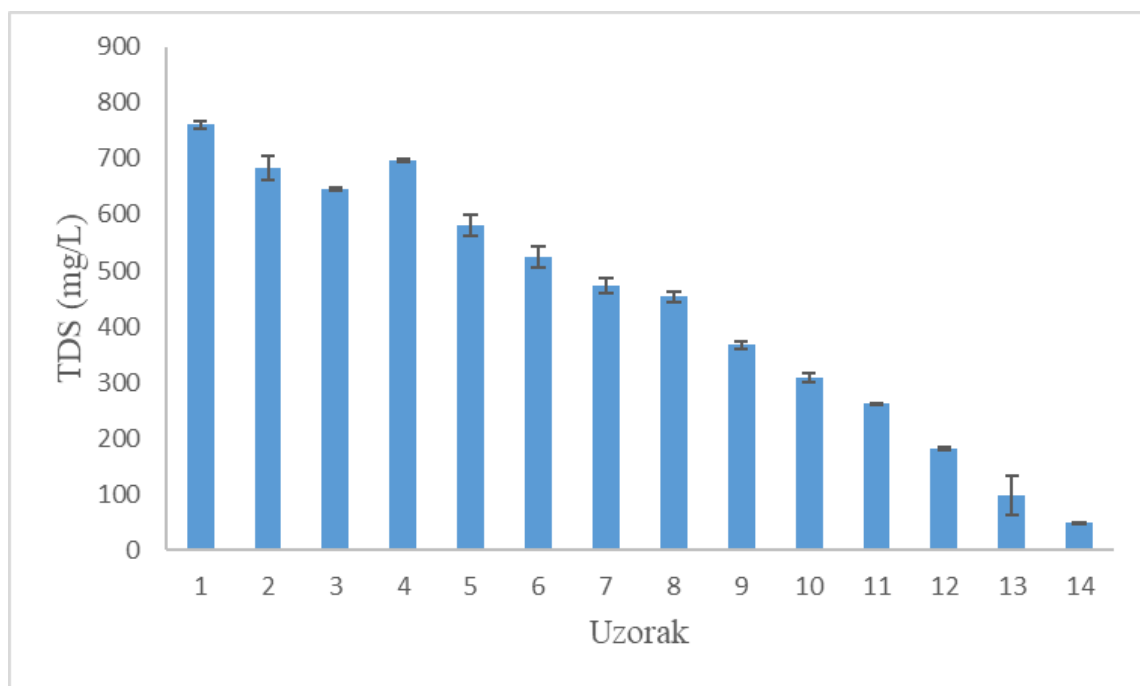
4.2.1. Vodljivost i ukupne otopljene tvari

Električna vodljivost je sposobnost otopine da provodi električnu energiju i koristi se u fizikalnom opisu svojstva tvari. Svi ioni prisutni u otopini pridonose naboju zbog toga se vodljivost može koristiti kao mjera koncentracije iona prisutnih u uzorku. TDS se definira kao gravimetrijska mjera, no kako su krute tvari u otopini uglavnom u formi iona, TDS se može izmjeriti preko električne vodljivosti. Odnos između ukupnih otopljenih tvari i električne vodljivosti je funkcija vrste i prirode otopljenih kationa i aniona u vodi (Sawyer i sur., 1994).



Slika 13. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za vodljivost uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

Kao što je prikazano na slici 13 vrijednosti vodljivosti se linearno smanjuju povećanjem količine škroba u uzorcima. Najveću vrijednost vodljivosti pokazuje uzorak 1 (100 % češnjak) $1520,33 \pm 10,96 \mu\text{S/cm}$, dok najmanju vrijednost pokazuje uzorak 14 (100 % škrob) $96,27 \pm 48,13 \mu\text{S/cm}$. Belščak-Cvitanović i sur. (2018) pretpostavili su odnos vodljivosti s različitim biljnim vrstama, kako se one razlikuju po sadržaju prevladavajućih skupina polifenola: fenolnih kiselina (hidroksicimetna kiselina) i flavonoida (flavoni i flavonoli) razlikovati će se i vrijednosti njihove vodljivosti. Prema njihovom istraživanju biljne vrste s najvećom koncentracijom ukupnih polifenola imaju i najveće vrijednosti vodljivosti.

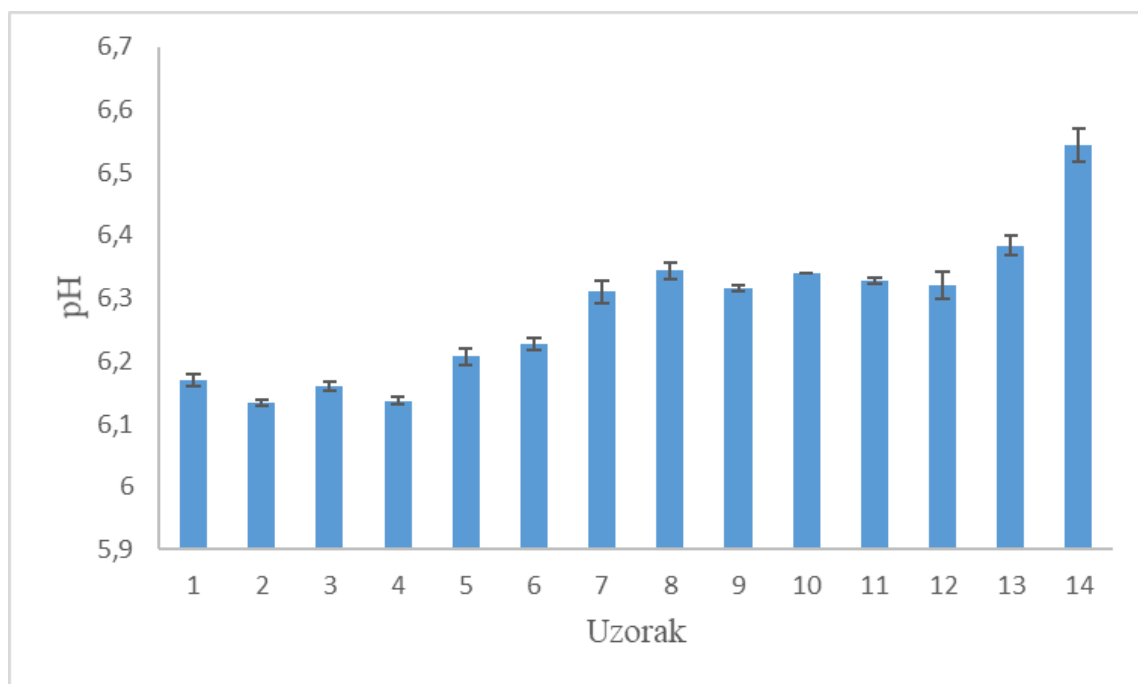


Slika 14. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za TDS uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

Mjerenjem TDS-a, što je vidljivo na slici 14 očekivano su dobiveni rezultati koji prate isti trend kao i rezultati mjerenja vodljivosti. Poznato je kako u većini vodenih ekstrakata vrijednost električne vodljivosti prati TDS vrijednost jer su značajan dio otopljenih tvari ustvari ioni koji kako znamo provode električnu struju (Bila, 2020). Izmjerene srednje vrijednosti za TDS smanjuju se povećanjem udjela škroba u uzorcima. Najveću vrijednost TDS pokazuje uzorak 1 (100 % češnjak) $760,17 \pm 5,48$ mg/L, dok najmanju vrijednost pokazuje uzorak 14 (100 % škrob) $48,13 \pm 0,73$ mg/L.

4.2.2. pH

pH vrijednost je mjera kiselosti ili lužnatosti nekog medija, određuje tijek kemijskih reakcija, a u prehrambenom i biokemijskom smislu pokazatelj je kvalitete proizvoda. Na slici 15 prikazane su izmjerene pH vrijednosti za uzorke češnjaka patvorene škrobom.

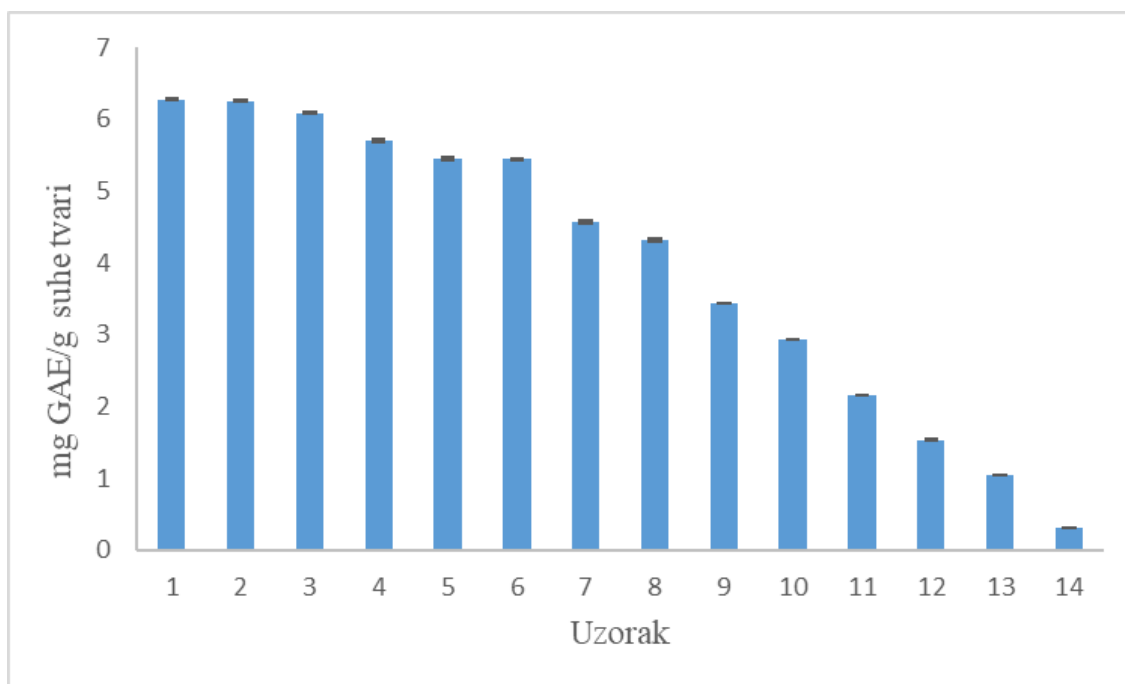


Slika 15. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za pH uzoraka češnjaka patvorenih škrobom

Iz rezultata vidljiv je porast pH vrijednosti povećanjem udjela škroba u uzorku. Vrijednosti pH kreću se od $6,13 \pm 0,00$ za uzorak 2 (97,5 % češnjak i 2,5 % škrob) do $6,54 \pm 0,03$ za uzorak 14 (100 % škrob). Može se zaključiti kako ekstrakti s većim udjelom češnjaka imaju i niže vrijednosti pH, čemu je uzrok prisutnost veće količine fenolnih spojeva u ekstraktima češnjaka. Naime, pH vrijednost polifenolnih spojeva blago je kisela (Janžić, 2015), što je dovelo i do pada pH vrijednosti ekstrakata s većom količinom češnjaka. Također, ovi rezultati su ukazali na činjenicu da se mjerenjem pH vrijednosti ekstrakata također može detektirati da li u prahu češnjaka postoji dodatak škroba kao patvorine.

4.2.3. Udio ukupnih polifenola (TPC)

Polifenoli čine jednu od najrasprostranjenijih grupa spojeva u biljkama te igraju važnu ulogu u ishrani ljudi i životinja, a njihov udio razlikuje se od biljke do biljke. Na slici 16 prikazan je sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima uzoraka češnjaka patvorenih škrobom.



Slika 16. Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima

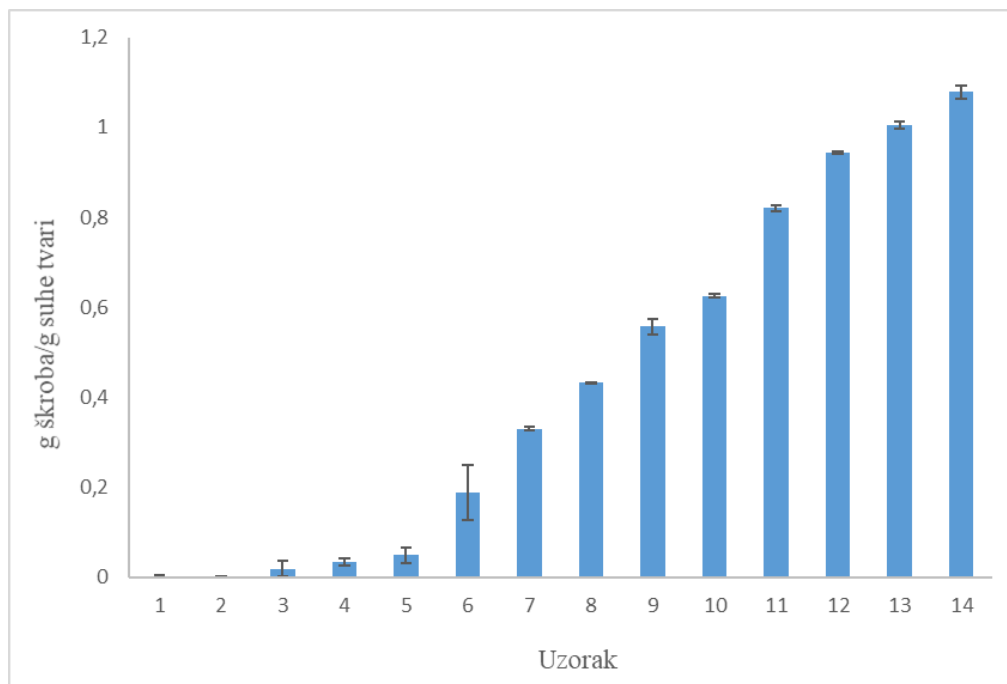
Prema rezultatima vidljivo je kako se udio ukupnih polifenola smanjuje povećanjem udjela škroba: najveći udio ukupnih polifenola sadržavao je uzorak 1 (100 % češnjak) $6,27 \pm 0,07$ mg GAE/g suhe tvari, dok je uzorak 14 (100 % škrob) sadržavao najmanji udio ukupnih polifenola $0,3 \pm 0,00$ mg GAE/g suhe tvari. Češnjak je biljka koja je literaturno poznata po svojem fenolnom sastavu, on utječe na okus i aromu, a njihova visoka antioksidacijska svojstva doprinose očuvanju zdravlja (Dumičić i sur., 2015). Ovi rezultati ukazali su na činjenicu da se mjerenjem koncentracije polifenola u ekstraktima također može detektirati da li u prahu češnjaka postoji dodatak škroba kao patvorine.

Kovačević (2021) u svome radu određivao je ukupne polifenole različitih ekotipova češnjaka Hrvatske kao i ekotipova izvan granica Hrvatske, sumirano, rezultati ovog istraživanja pokazuju prosječno kretanje udjela ukupnih polifenola češnjaka između $4,93$ mg GAE/g suhe tvari i $6,23$ mg GAE/g suhe tvari. Uspoređujući s rezultatima ovog istraživanja, uzorak 1 (100

% češnjak) sadržavao je 6,27 mg GAE/g suhe tvari što je u istim granicama. U istraživanju Beato-a i suradnika (2011) sadržaj ukupnih polifenola njihovih uzoraka češnjaka kretao se između 3,4 mg GAE/g suhe tvari i 10,8 mg GAE/g suhe tvari što se slaže s rezultatima ovog istraživanja. Istraživanje koje su proveli Gorinstein i sur. (2009) prikazuje slične rezultate: sadržaj ukupnih polifenolnih spojeva uzoraka kretao se od 6,36 mg GAE/g suhe tvari do 9,00 mg GAE/g suhe tvari. Navedeni rezultati slažu se s rezultatom mjerenja provedenih TPC metodom u sklopu ovog istraživanja. Rezultati Nuutila i sur. (2003) za udio ukupnih polifenola uzoraka češnjaka iznose između 0,075 mg GAE/g suhe tvari i 0,12 mg GAE/g suhe tvari što je značajno manje nego rezultati dobiveni ovim istraživanjem. Razlozi dobivenih nižih vrijednosti navedenog istraživanja mogu se povezati s razlikama u načinu uzgoja biljke, mikroklimatskim osobitostima lokacije, geografskom području, fizikalno-kemijskom sastavu tla te samoj vrsti češnjaka.

4.2.4. Koncentracija škroba

Škrob je polisaharid koji se sastoji od glukoznih jedinica povezanih u dva polimerna lanca: amilozu i amilopektin. Škrob je ključna komponenta u prehrani i prehrambenoj industriji zbog svojih različitih funkcija i širokog spektra primjena. Na slici 17 prikazana je ovisnost koncentracije škroba i uzoraka češnjaka patvorenih škrobom.



Slika 17. Koncentracija škroba u uzorcima

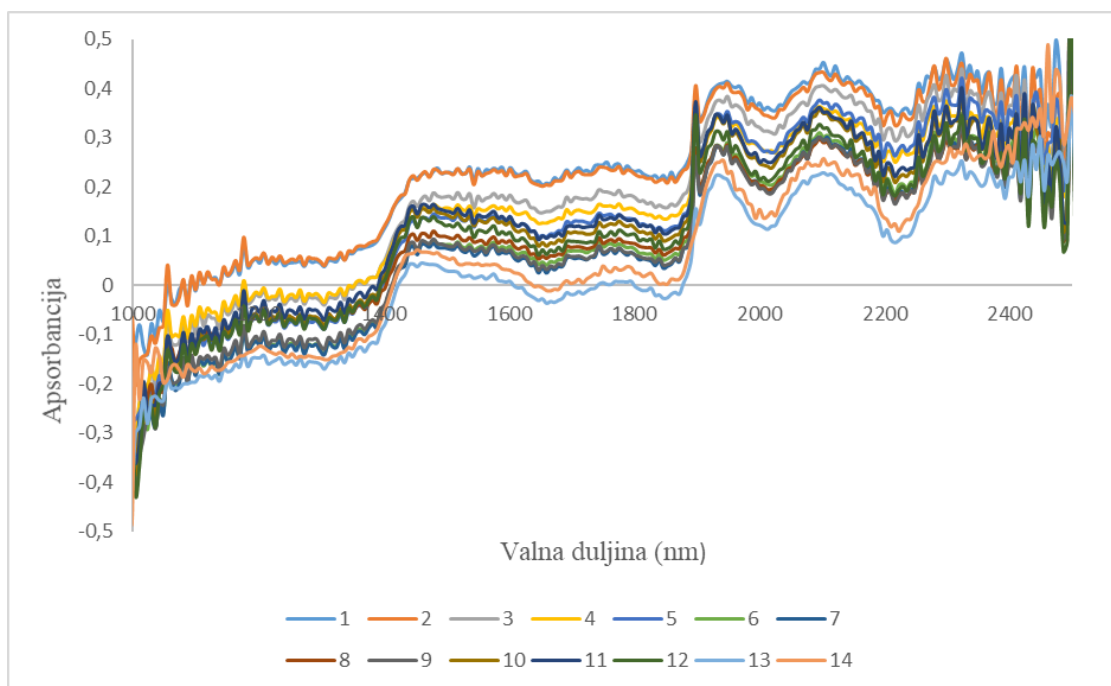
Dobiveni su očekivani rezultati, uzorak 1 (100 % češnjak) sadržavao je $9,15 \cdot 10^{-5} \pm 10^{-5}$ g škroba/g suhe tvari. Iako uzorak 1 nije patvoren škrobom, sam češnjak sadržava male količine škroba topljivog u vodi. Povećanjem udjela škroba u uzorcima, koncentracija škroba je linearno rasla, do uzorka 14 (100 % škrob) koji sadrži $1,08 \pm 0,01$ g škroba/g suhe tvari. Malo odstupanje od 1 g škroba kod uzorka 14 prepisuje se pogreškama miješanja i vaganja kao i prisustvu male količine prirodno prisutnog škroba u češnjaku, koji, prema literaturnim podacima, sadrži $< 0,06$ g/100 g svježeg češnjaka (Lisciani i sur., 2017). Također, na slici 17 vidljiva je manja osjetljivost spektrofotometrijske metode korištene za određivanje škroba u uzorcima.

Naime, pri nižim koncentracijama škroba u uzorcima vidljivo je veće raspršenje eksperimentalnih podataka i veće odstupanje od prevladavajućeg linearnog trenda, navedeno je izrazito vidljivo pri koncentracijama patvorine (škroba) 0 - 15 %, odnosno u prvih pet uzoraka koji sadržavaju: malu količinu škroba prirodno prisutnog u češnjaku, 0,02 mg, 0,05 mg, 0,10 mg i 0,15 mg. Kar i sur. (2019) istraživali su prikladnost FT-NIR spektroskopije u kombinaciji s kemometrijskim metodama za identifikaciju patvorine škroba u kurkumi u prahu. Naime, prema njihovim rezultatima također je vidljiva smanjena osjetljivost metode određivanja patvorine škroba u uzorcima s niskim koncentracijama patvorine (nižim od 1 %).

4.3. NIR SPEKTROSKOPIJA I KEMOMETRIJA

4.3.1. NIR spektroskopija

NIR spektri prahova, snimljeni s ciljem određivanja sličnosti i razlika u uzorcima prikazani su na slici 18 na kojoj je vidljiv spektar ovisnosti apsorbancije o valnim duljinama u rasponu od 1000 do 2500 nm.



Slika 18. Grafički prikaz NIR spektara za uzorke češnjaka patvorene škrobom (Avantes, South Band SAD)

Prema dobivenim spektrima vidljivo je kako su se uzorci poredali ovisno o udjelu škroba, u pravilu uzorci s većim udjelom škroba pokazuju niže apsorbancije na cijelom spektru. U svakom slučaju promatrajući spektre može se uočiti kako postoje određene razlike između snimanih uzoraka.

Literaturno, područja valnih duljina NIR spektroskopije 1950 nm i 1450 nm karakteristično je za prvi i drugi overton područja rastezanja O-H veze i H-O-H deformacije, a kako škrob uglavnom sadrži O-H veze može se pretpostaviti povezanost navedenih valnih duljina s funkcionalnim skupinama škroba (Zhong i Qin, 2016; Xu i sur., 2015; Lohumi i sur., 2014; Du i sur., 2013). Povećanje apsorbancije pri navedenim valnim duljinama vidljivo je i u ovom istraživanju na slici 18. Još jedan značajniji pik vezan uz valne duljine specifične za

funkcionalne skupine škroba su 2100 nm koja odgovara O-H vezi i C-O kombinaciji istezanja veze (Aenugu i sur. 2011), navedni pik također je vidljiv i u ovom istraživanju.

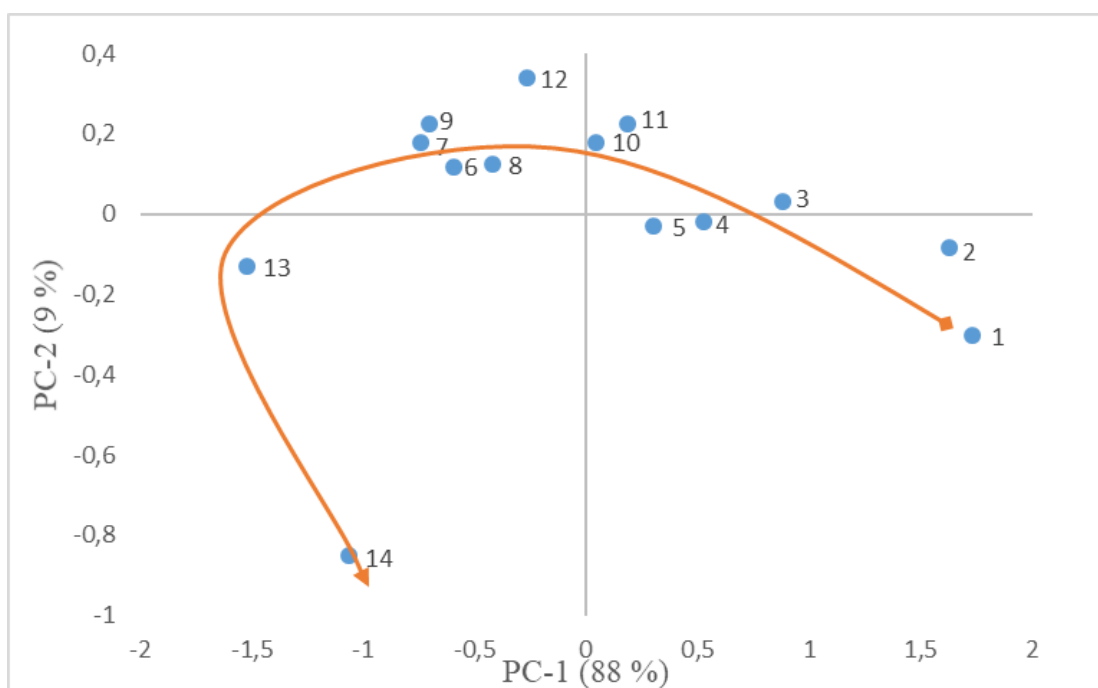
Uz navedeno NIR spektar osim raznih kemijskih informacija sadrži i podatke o fizikalnim karakteristikama uzoraka kao što su veličina čestica i gustoća. Različita veličina čestica u uzorcima utječe na pomake i razdvajanje spektara uzoraka pri čemu uzorci s većim česticama pokazuju veće apsorbancije (Metrohm, 2013). To je vidljivo i u ovom istraživanju, naime spektri uzoraka 1 (100 % češnjak) i uzorka 2 (97,5 % češnjak i 2,5 % škrob) pokazuju najviše vrijednosti apsorbancije dok spektri uzorka 14 (100 % škrob) pokazuju najniže vrijednosti apsorbancije.

Patarroyo-León i sur. (2022) istraživali su primjenu NIR spektroskopije u identifikaciji patvorina u češnjaku u prahu, tako su za škrob došli do istih rezultata, navode kako su na spektru vidljiva tri pika koja omogućuju identifikaciju navedene patvorine oko 1456,88 nm, 1944,01 nm i 2100,84 nm te spektri kukuruznog škroba ima veću apsorbanciju od spektra čistog češnjaka. Dok su za patvorinu kredu vizualizirani pikovi na približno 1402,92 nm i 1950,08 nm što odgovara kombinaciji C-H i drugom overtonu područja rastezanja C-O veze (Aenugu i sur., 2011), za razliku od škroba, čisti češnjak ima veću apsorbanciju od bijele krede. U provedenim istraživanjima potvrđuje se mogućnost razlikovanja različitih krivotvorina prema karakterističnim pikovima u spektrima pojedinih patvorina. Također, ovisno o vrsti krivotvorine, dolazi do smanjenja ili povećanja apsorbancije, što ovisi o prisutnosti i količini krivotvorine. U literaturi su vrlo česta istraživanja koja su provedena s ciljem otkrivanja patvorenja u raznim začинима upotrebom NIR spektroskopije. Oliveira i sur. (2020) proveli su istraživanje o primjeni NIR spektroskopije za brzu autentifikaciju patvorina paprike u prahu. Također, slično istraživanje proveli su i Quelal-Vásquez i sur. (2018), otkrivali su prijevaru kakao praha s brašnom od rogača upotrebom NIR spektroskopije. Rezultati svih istraživanja je uspješnost NIR spektroskopije u kvalitativnom otkrivanju patvorina, no u istraživanjima istih upotrebljavale su se i određene kemometrijske metode kako bi se kvantitativno otkrila patvorina.

Općenito, budući da NIR spektar sadrži veliku količinu podataka vezanih za brojna fizikalna i kemijska svojstva uzoraka, a kako su apsorpcijske vrpce široke i međusobno se preklapaju te ne daju dobre zaključke i rezultate, neophodna je upotreba kemometrijske metode, u ovom slučaju PCA.

4.3.2. PCA analiza

Kako bi se utvrdile sličnosti i razlike između patvorenih uzoraka, provedena je PCA analiza snimljenih spektara, čiji su rezultati prikazani na slici 19.



Slika 19. PCA analiza NIR spektara uzoraka praha. PC-1 predstavlja prvu glavnu komponentu (faktor), dok PC-2 predstavlja drugu glavnu komponentu (faktor). Plavim točkama i brojevima označeni su uzorci 1 – 14, dok narančasta linija predstavlja trend kretanja vrijednosti faktora ovisno o količinama škroba kao patvorine (1 – čisti češnjak, 14 – čisti škrob).

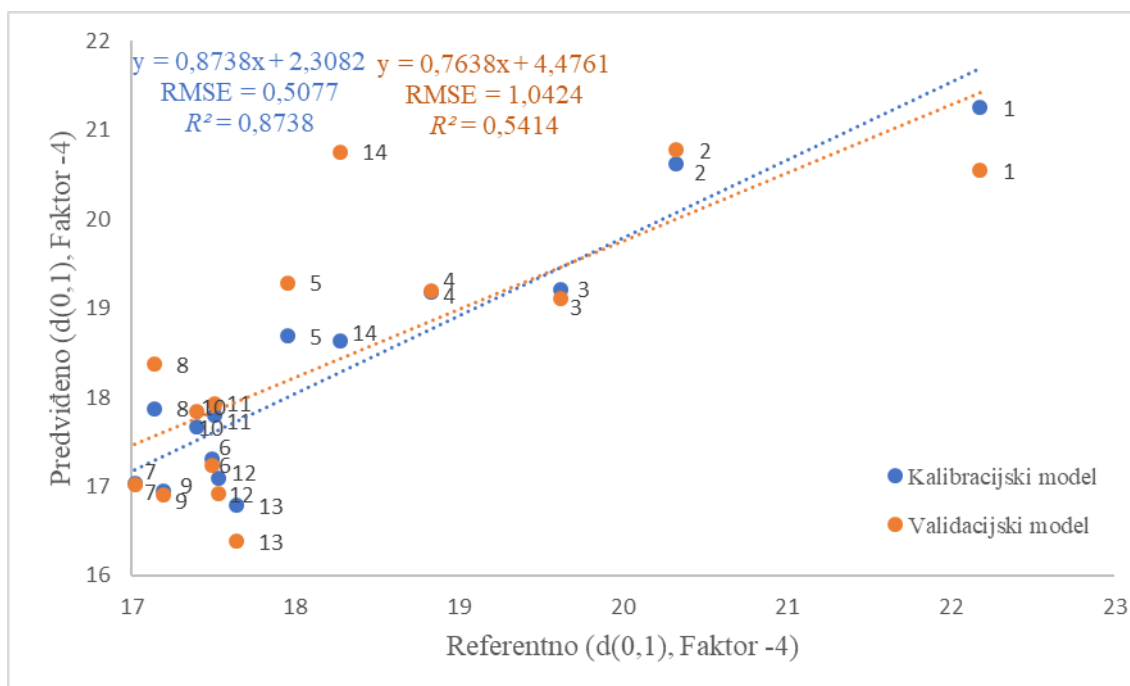
Prema dobivenim podacima vidljivo je da prvi faktor (PC-1) objašnjava 88 % razlike između uzoraka, dok drugi faktor (PC-2) objašnjava 9 % razlike. Pretpostavka je kako je PC-1 vezan uz veličinu čestica, dok je PC-2 vezan uz jedno od kemijskih svojstava – koncentraciju polifenola ili koncentraciju škroba u uzorcima, međutim, takva se pretpostavka može potvrditi tek primjenom dodatnih multivarijatnih analiza koje su provedene kasnije u ovom radu. Vidljivo je kako su uzorci s najvećom količinom češnjaka (uzorak 1 i 2) smješteni u četvrtom kvadrantu, te kako u uzorcima raste udio patvorine, tako se smještaju redom u prvi, drugi pa u treći kvadrant. Uzorci s najmanjom količinom dodane patvorine nalaze se međusobno blizu u PCA ravnini, što je dokaz njihove sličnosti. Uzorci koji sadrže veće količine dodane patvorine (primjerice uzorci 6 - 12), u PCA ravnini nalaze se dijagonalno suprotno uzorcima s najmanjom

količinom patvorine ili bez patvorine (1 - 5), što ukazuje na najveće razlike upravo između tih uzoraka. Nadalje, vidljivo je da su uzorci raspoređeni tako da međusobno prate određenu petlju koja se proteže od 4. kvadranta (uzorak 1 (100 % češnjak)) do trećeg kvadranta (uzorak 14 (100 % škrob)). PCA analiza utvrdila je kako postoje razlike u uzorcima, no ona ne može dati informaciju na temelju kojih svojstava su uzorci razdvojeni, za to je potrebno provesti daljnje modeliranje.

4.3.3. PLS modeli

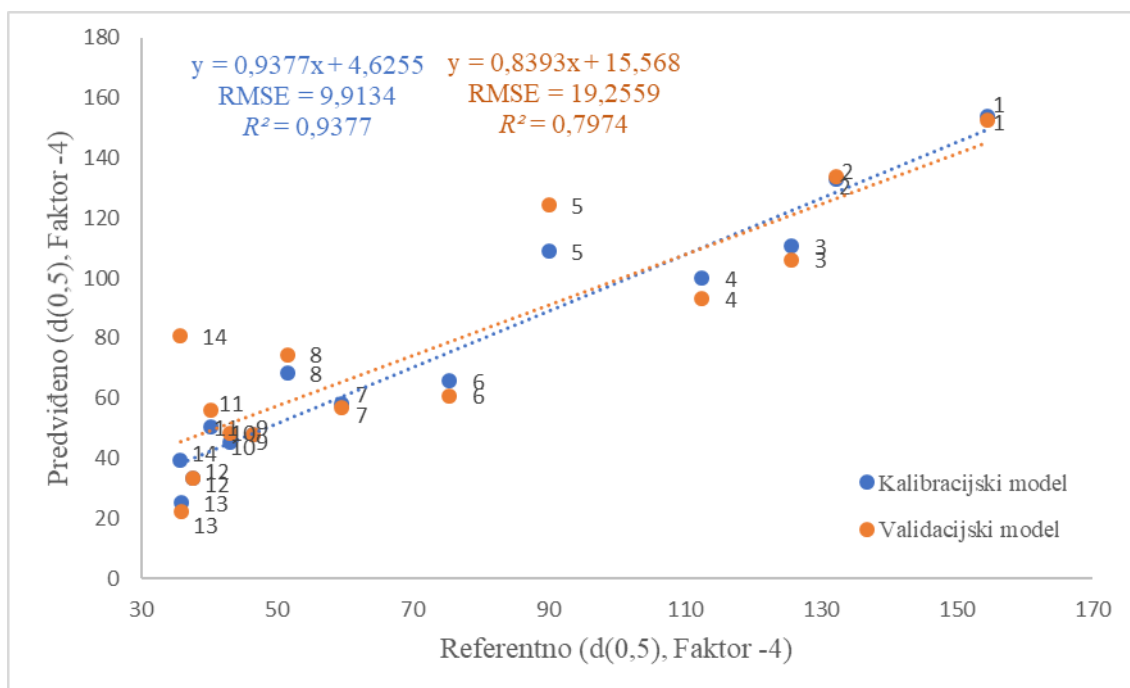
Kako bi se bolje uočile sličnosti ili razlike između uzoraka te kako bi se utvrdilo postoji li linearna ovisnost između vrijednosti apsorbancija određenih spektralnom analizom NIR spektara praha i ostalih određivanih fizikalnih i kemijskih parametara praha i ekstrakata korišteni su PLS modeli.

Dobiveni PLS modeli pokazuju linearnu regresiju između eksperimentalnih podataka. Plava linija prikazuje kalibracijski model, a narančasta validacijski. Učinkovitost modela procijenjena je na temelju R^2 i RMSE. R^2 ukazuje na uspješnost modela, vrijednosti R^2 trebaju biti što bliže 1, na temelju toga model koji dobro pristaje ima vrijednost iznad 0,8 odnosno može se koristiti za kvantitativno kao i kvalitativno razlikovanje. Vrijednosti ispod 0,8 pokazuju da se model može koristiti za kvalitativno razlikovanje bez mogućnosti korištenja u kvantitativnom predviđanju (Valinger i sur. (2018)). RMSE predstavlja statističku mjeru i koristi se za procjenu točnosti regresijskog modela ili predviđanja na način da uspoređuje stvarne vrijednosti s predviđenim vrijednostima.



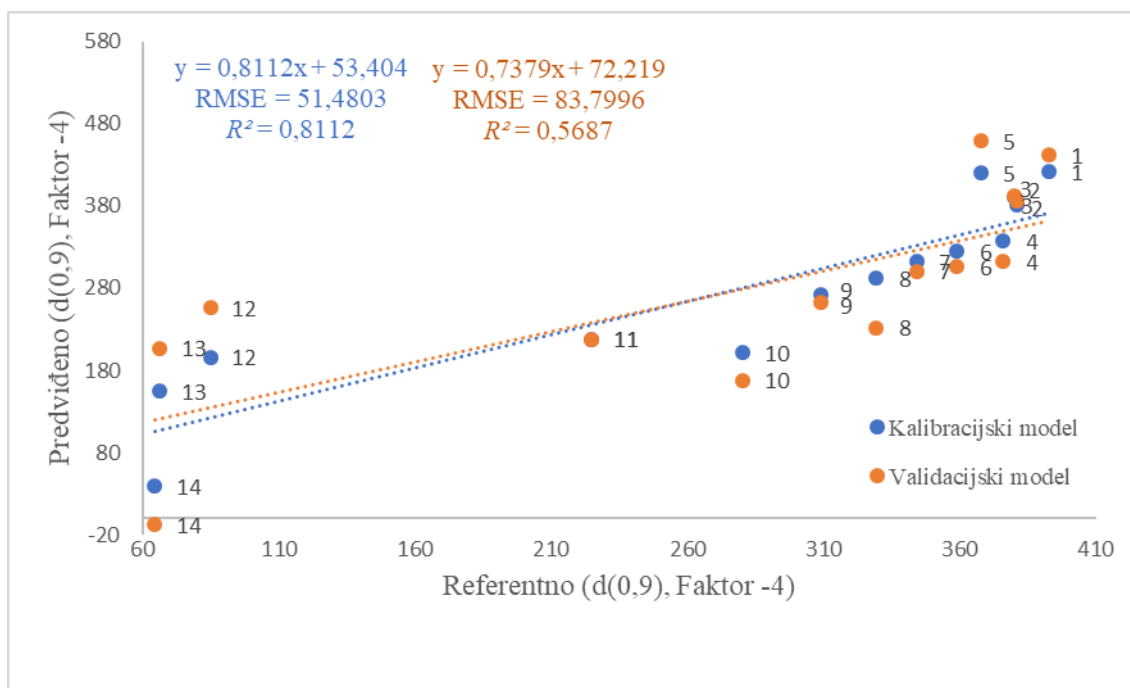
Slika 20. PLS model za raspodjelu veličine čestica, percentil raspodjele $d(0,1)$

Na slici 20 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti $d(0,1)$ te modelom predviđene vrijednosti $d(0,1)$ kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Na slici je vidljivo da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,8738$ i $RMSE=0,5077$), međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,5414$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=1,0424$). Navedene vrijednosti ukazuju na činjenicu da se $d(0,1)$ vrijednost može koristiti za kvalitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka, ali zbog niskih R^2 vrijednosti validacijskog modela, ne može se koristiti i za kvantitativno predviđanje. Naime, prema Valinger i sur. (2018), modeli čije vrijednosti R^2 prelaze 0,8 mogu se, osim za kvalitativno, koristiti i za kvantitativno predviđanje parametara.



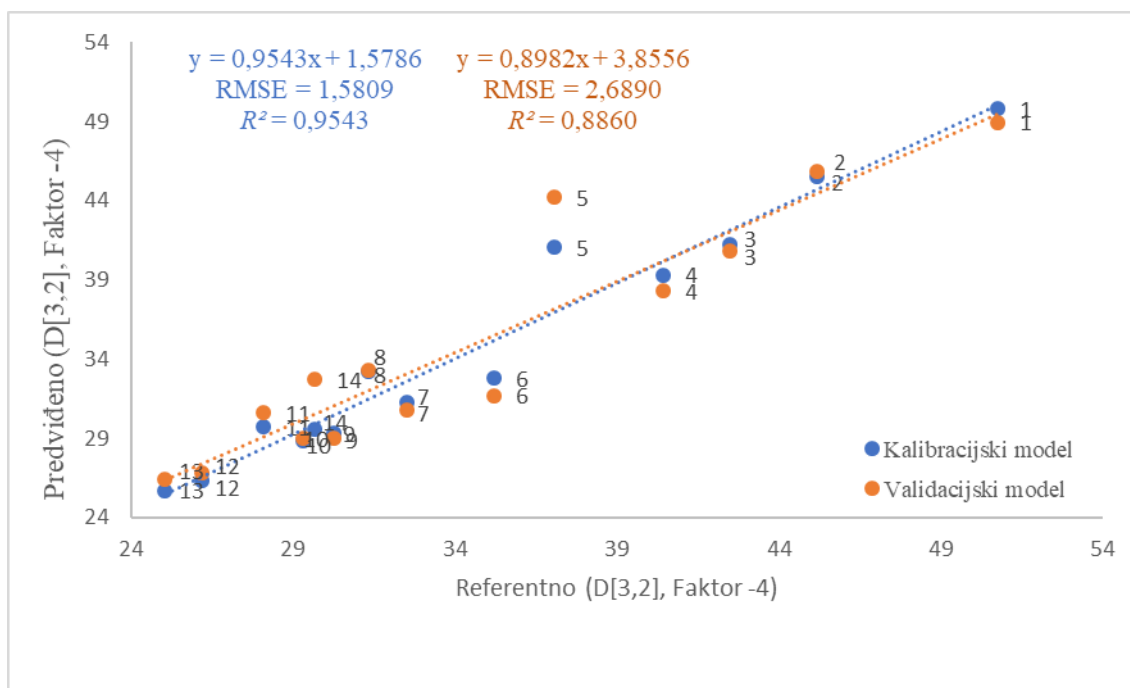
Slika 21. PLS model za raspodjelu veličine čestica, percentil raspodjele d(0,5)

Na slici 21 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti d(0,5) te modelom predviđene vrijednosti d(0,5) kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0.9377$ i $RMSE=9.9134$), međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 (0,7974) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=19.2559$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se d(0,5) vrijednost prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad 0,8. Također je vidljivo da u uzorcima s većom količinom škroba (12–14) postoji i veće raspršenje podataka. Razlog tome jest prisutnost većeg udjela čestica malih promjera, koje se, prema prikazanim rezultatima, ne mogu s visokom preciznošću detektirati primjenom NIR spektroskopije.



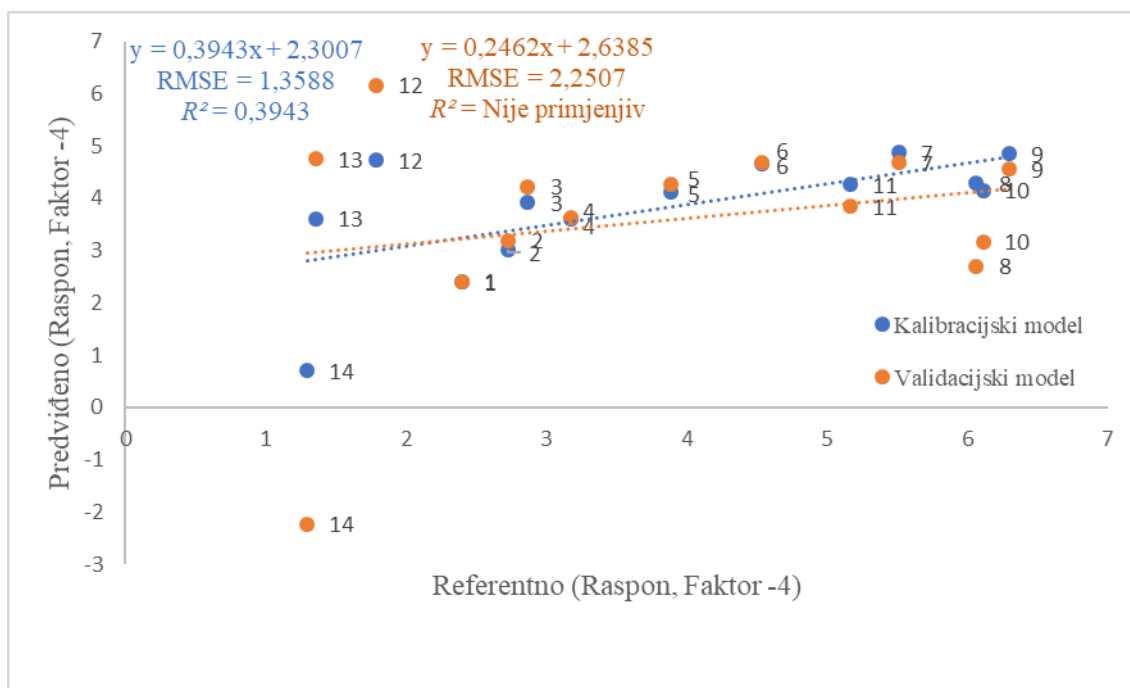
Slika 22. PLS model za raspodjelu veličine čestica, percentil raspodjele d(0,9)

Eksperimentalno određene vrijednosti d(0,9) te modelom predviđene vrijednosti d(0,9) kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela prikazani su na slici 22. I u ovom slučaju vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,8112$ i $RMSE=51,4803$), dok je u slučaju validacijskog modela vidljiv pad R^2 (0,5687) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=83,7996$). Navedene vrijednosti ukazuju na činjenicu da se d(0,9) vrijednost može koristiti za kvalitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka, ali zbog niskih R^2 vrijednosti validacijskog modela, ne može se koristiti i za kvantitativno predviđanje.



Slika 23. PLS model za raspodjelu veličine čestica, percentil raspodjele D[3,2]

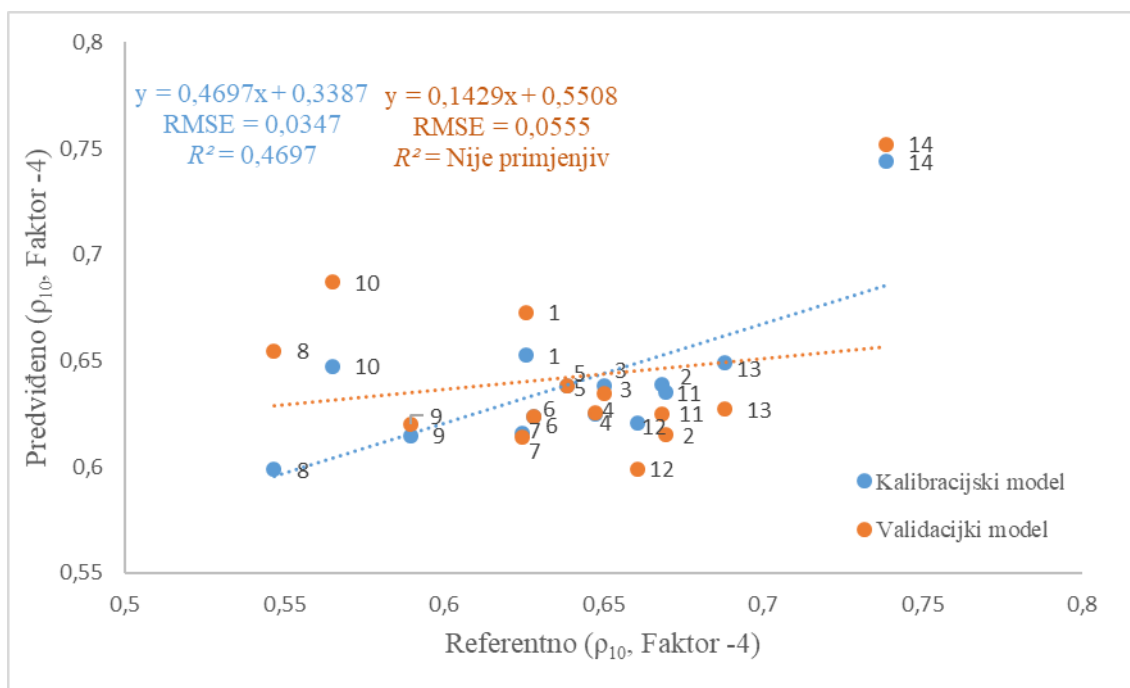
Na slici 23 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti D[3,2] te modelom predviđene vrijednosti D[3,2] kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9543$ i $RMSE=1,5809$), međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 (0,8860) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=2,6890$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se D[3,2] vrijednost prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad 0,8.



Slika 24. PLS model za raspodjelu veličine čestica, raspon

Eksperimentalno određene vrijednosti raspona te modelom predviđene vrijednosti raspona kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela prikazani su na slici 24; vidljiva je nelinearnost podataka. R^2 vrijednosti za kalibracijski model iznosi 0,3943 te RMSE 1,3588 dok se eksperimentalno dobiveni podaci nisu mogli primjeniti za razvoj validacijskog modela. PLS model ne može se koristiti za kvalitativno i kvantitativno predviđanje raspona veličine čestica.

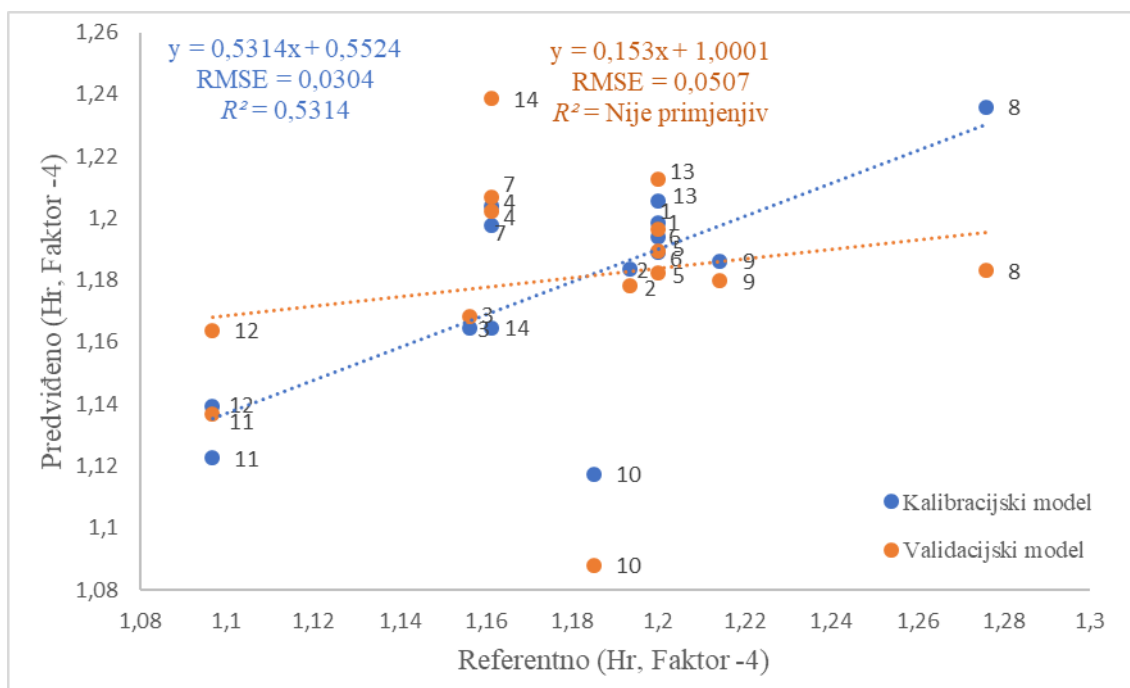
Kako se raspon računa prema matematičkoj formuli iz drugih ulaznih podataka, odnosno percentila raspodjele, sam izračun sa sobom unosi dodatnu pogrešku te se na taj način objašnjava nisko slaganje eksperimentalnih podataka sa podacima modela.



Slika 25. PLS model za nasipnu gustoću

Primjenom PLS modela utvrđeno je da ne postoji linearna ovisnost između podataka dobivenih NIR spektroskopijom i nasipne gustoće nakon 10 udaraca (slika 25), također, prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti nasipne gustoće nakon 10 udaraca te modelom predviđene vrijednosti nasipne gustoće nakon 10 udaraca kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. R^2 vrijednosti za kalibracijski model iznosi 0,4697 te RMSE 0,0347 dok se eksperimentalno dobiveni podaci nisu mogli primjeniti za razvoj validacijskog modela. PLS model ne može se koristiti za kvalitativno i kvantitativno predviđanje svojstva nasipne gustoće.

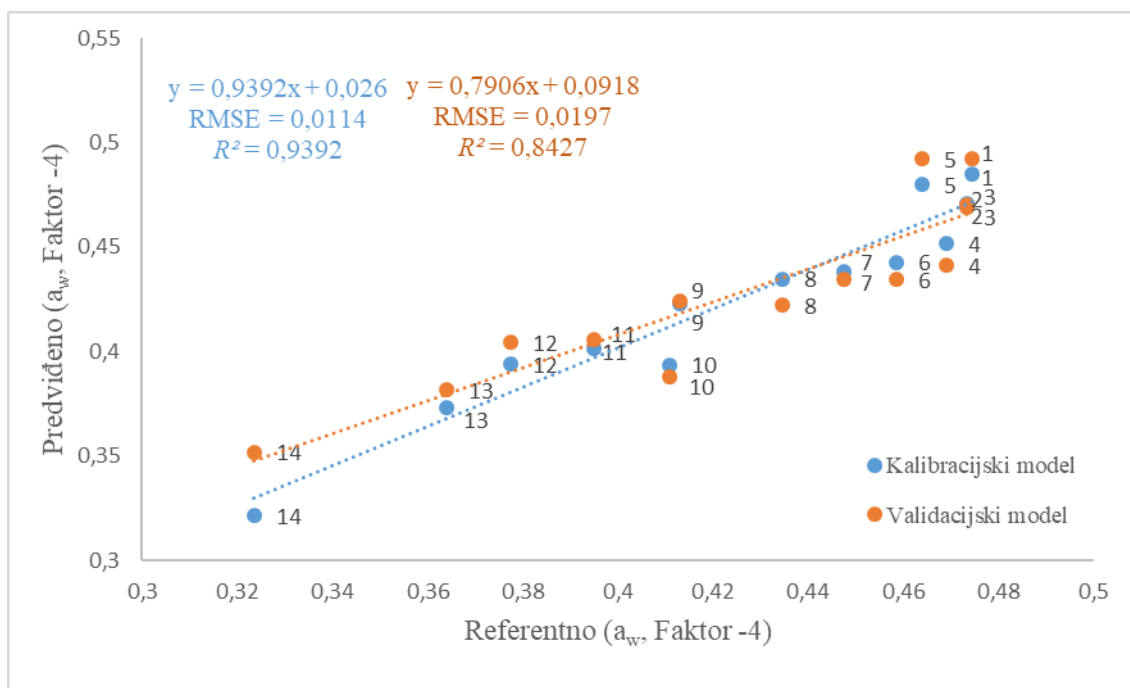
Naime, kako se nasipna gustoća određivala nestandardnom metodom koja se temelji na vizualnoj procjeni promjene volumena koja je subjektivna i nepouzdana ova metoda ne prikazuje pouzdane rezultate u takvom slučaju.



Slika 26. PLS model za Hausnerov omjer

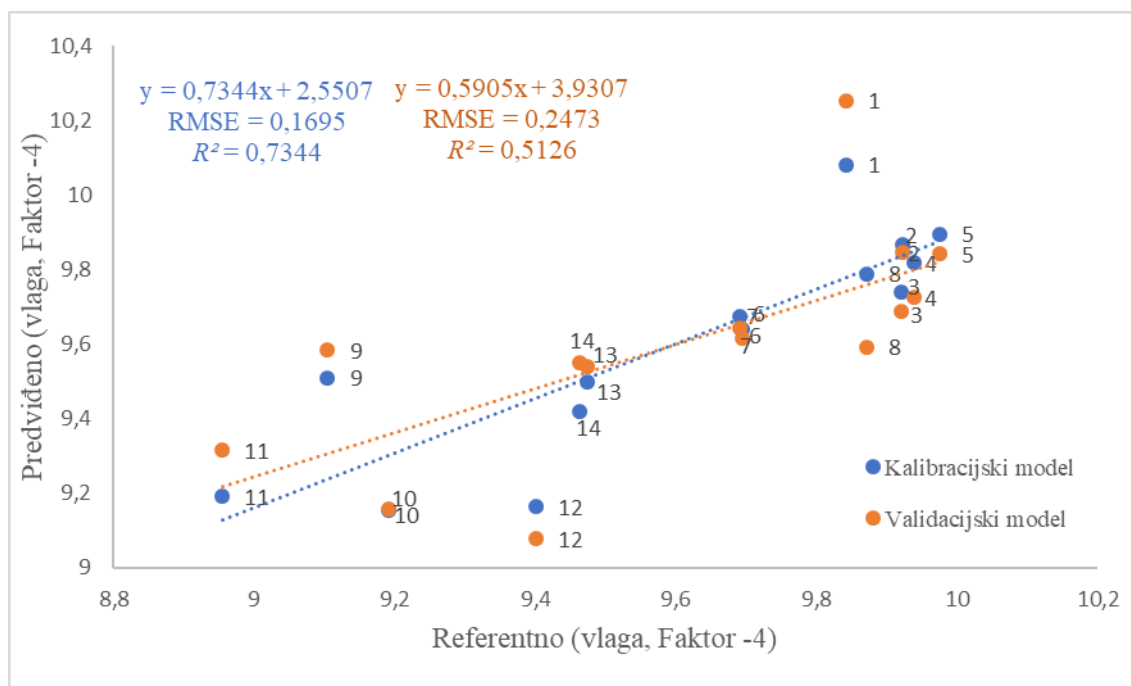
Primjenom PLS modela također je utvrđeno kako ne postoji jasna linearna povezanost između podataka dobivenih NIR spektroskopijom i Hausnerovog omjera (slika 26), također, prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti Hausnerovog omjera te modelom predviđene vrijednosti Hausnerovog omjera kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. R^2 vrijednosti za kalibracijski model iznosi 0,5314 te RMSE 0,0304 dok se eksperimentalno dobiveni podaci nisu mogli primjeniti za razvoj validacijskog modela. PLS model ne može se koristiti za kvalitativno i kvantitativno predviđanje Hausnerovog omjera.

Hausnerov omjer računa se iz vrijednosti nasipne gustoće koja se isto nije mogla predvidjeti PLS modelom stoga ovakvi rezultati za Hausnerov omjer su očekivani.



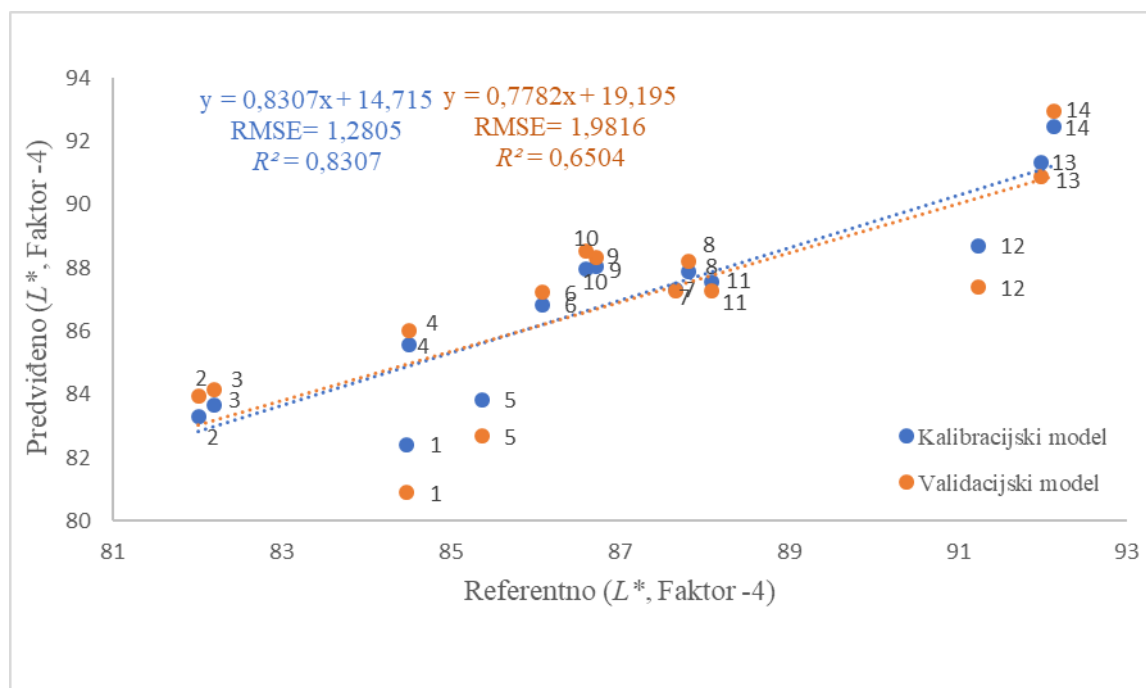
Slika 27. PLS model za aktivitet vode

Eksperimentalno određene vrijednosti aktiviteta vode te modelom predviđene vrijednosti aktiviteta vode kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela prikazani su na slici 27. U ovom slučaju vidljivo je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9392$ i $RMSE=0,0114$); u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,8427$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=0,0197$). Navedene vrijednosti ukazuju na činjenicu da se vrijednosti aktiviteta vode mogu koristiti za kvalitativno i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka. Naime, prema Valinger i sur. (2018), modeli čije vrijednosti R^2 prelaze 0,8 mogu se, osim za kvalitativno, koristiti i za kvantitativno predviđanje parametara.



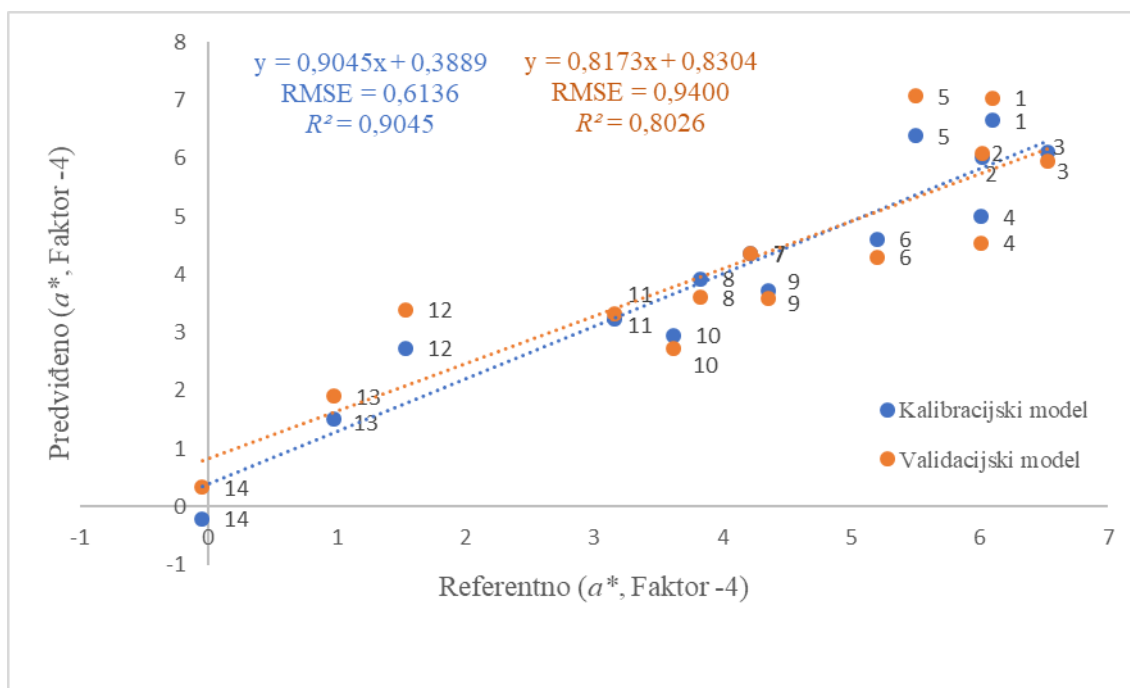
Slika 28. PLS model za vlagu

Ekperimentalno određene vrijednosti vlage te modelom predviđene vrijednosti vlage kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela prikazani su na slici 28. I u ovom slučaju vidljivo je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,7344$ i $RMSE=0,1695$); kao i u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,5126$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=0,2473$). Navedene vrijednosti ukazuju na činjenicu da se vrijednosti vlage mogu koristiti za kvalitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka, ali zbog niskih R^2 vrijednosti validacijskog modela, ne može se koristiti i za kvantitativno predviđanje. Naime, prema Valinger i sur. (2018), modeli čije vrijednosti R^2 prelaze $0,8$ mogu se, osim za kvalitativno, koristiti i za kvantitativno predviđanje parametara.



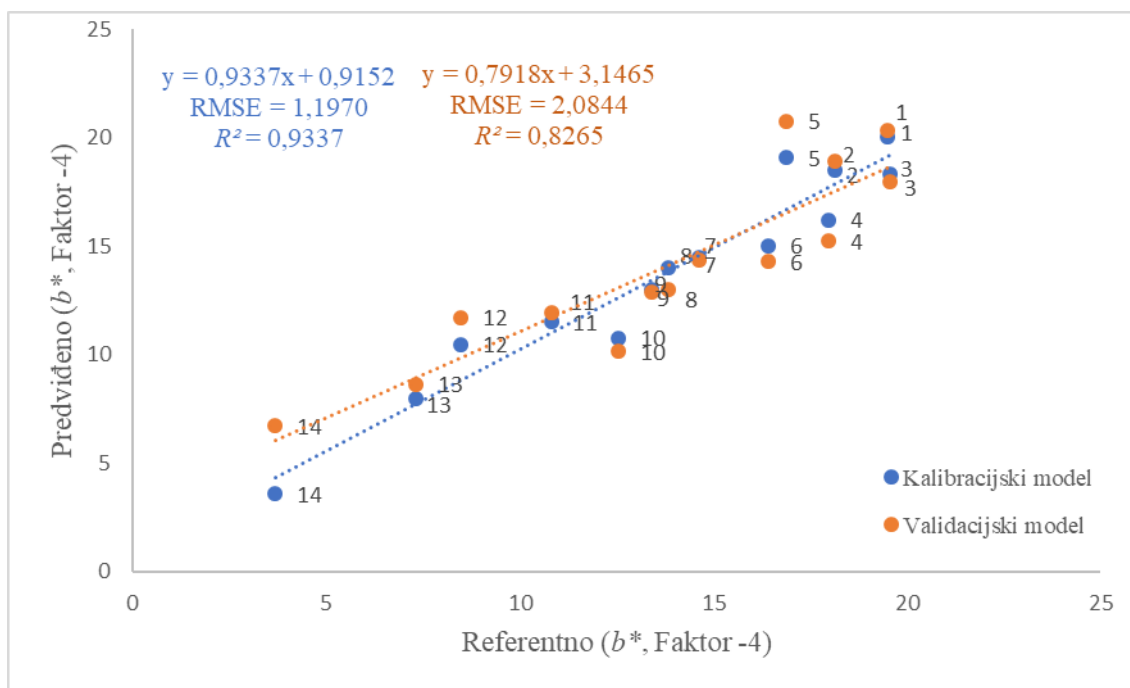
Slika 29. PLS model za Hunterovu koordinatu boje L^*

Na slici 29 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti Hunterove koordinate boje L^* te modelom predviđene vrijednosti Hunterove koordinate boje L^* kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Također i u ovom slučaju vidljivo je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,8307$ i $RMSE=1,2805$); kao i u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,6504$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=1,9816$). Navedene vrijednosti ukazuju na činjenicu da se vrijednost Hunterove koordinate boje L^* može koristiti za kvalitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka, ali zbog niskih R^2 vrijednosti validacijskog modela, ne može se koristiti i za kvantitativno predviđanje. Naime, prema Valinger i sur. (2018) modeli čije vrijednosti R^2 prelaze 0,8 mogu se, osim za kvalitativno, koristiti i za kvantitativno predviđanje parametara.



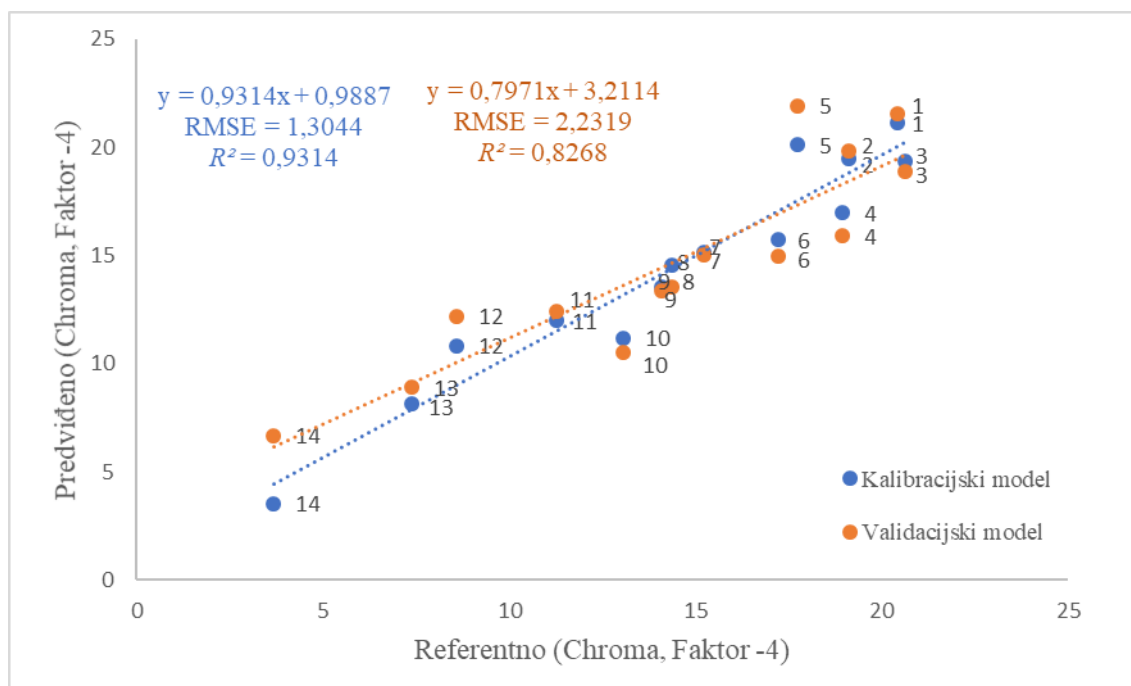
Slika 30. PLS model za Hunterovu koordinatu boje a^*

Slika 30 prikazuje eksperimentalno određene vrijednosti Hunterove koordinate boje a^* te modelom predviđene vrijednosti Hunterove koordinate boje a^* kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9045$ i $RMSE=0,6136$); u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,8026$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=0,9400$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednosti Hunterove koordinate boje a^* , prema Valinger i sur. (2018), mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad 0,8.



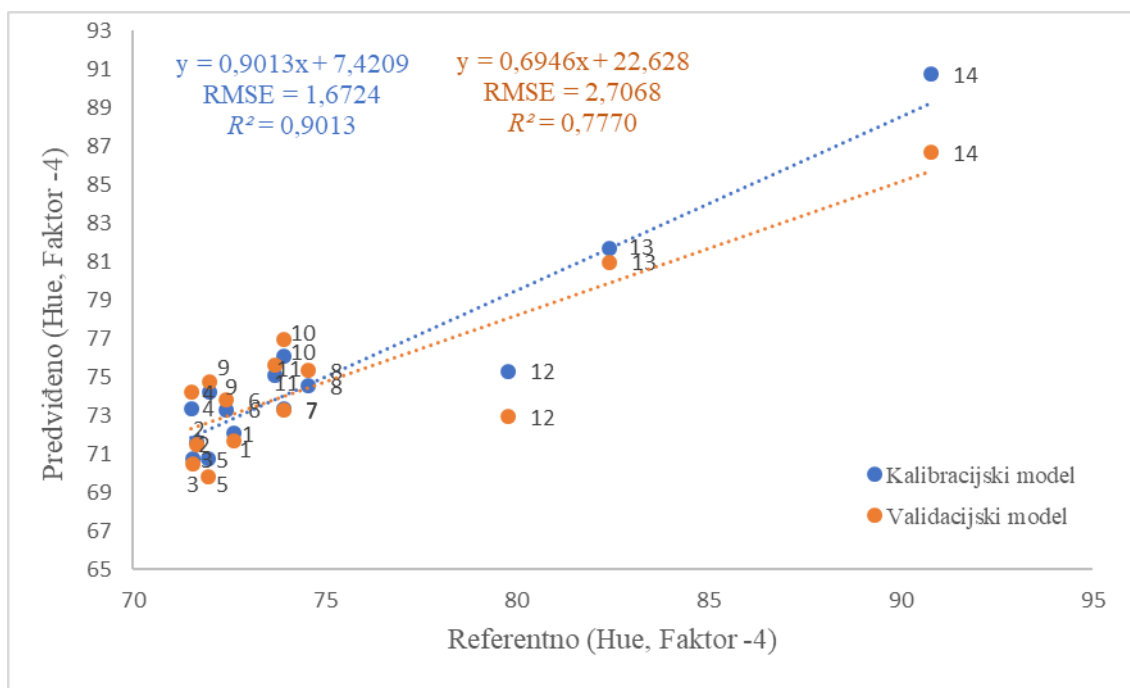
Slika 31. PLS model za Hunterovu koordinatu boje b^*

Na slici 31 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti Hunterove koordinate boje b^* te modelom predviđene vrijednosti Hunterove koordinate boje b^* kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Također i u ovom slučaju vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2 = 0,9337$ i $RMSE = 1,1970$); međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,8265$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE = 2,0844$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednosti Hunterove koordinate boje b^* prema Valinger i sur. (2018), mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad 0,8.



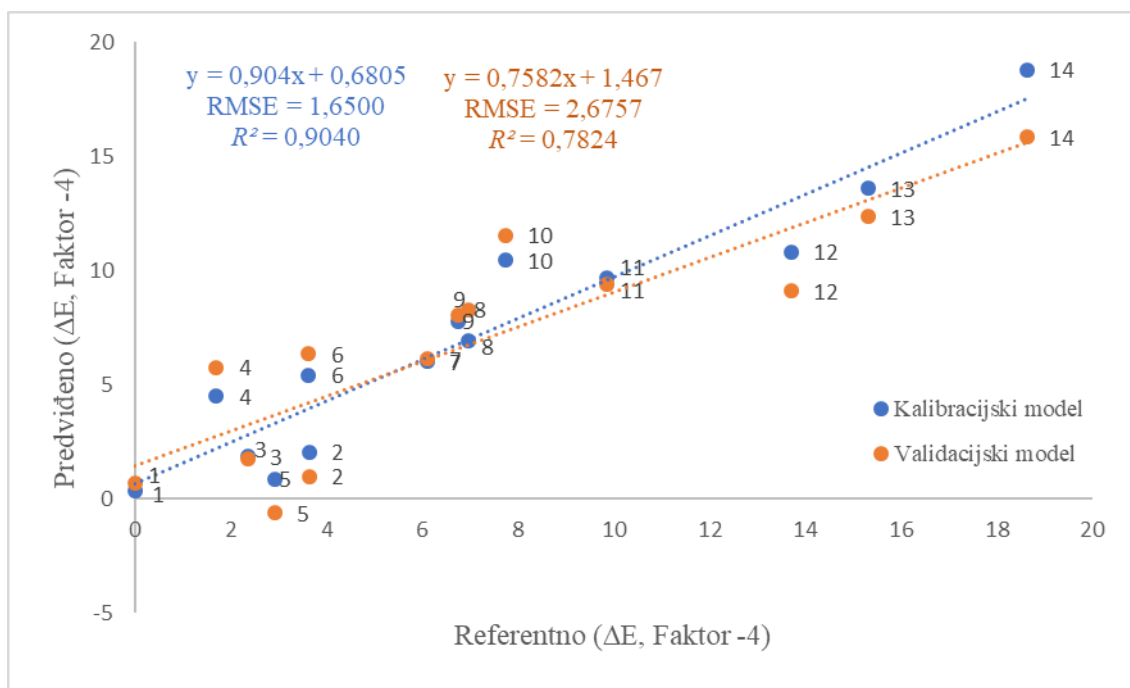
Slika 32. PLS model za ton boje, Chroma

Na slici 32 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti tona boje, Chroma te modelom predviđene vrijednosti tona boje, Chroma kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9314$ i $RMSE=1,3044$); međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 (0,8263) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=2,2319$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednosti tona boje, Chroma prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad 0,8.



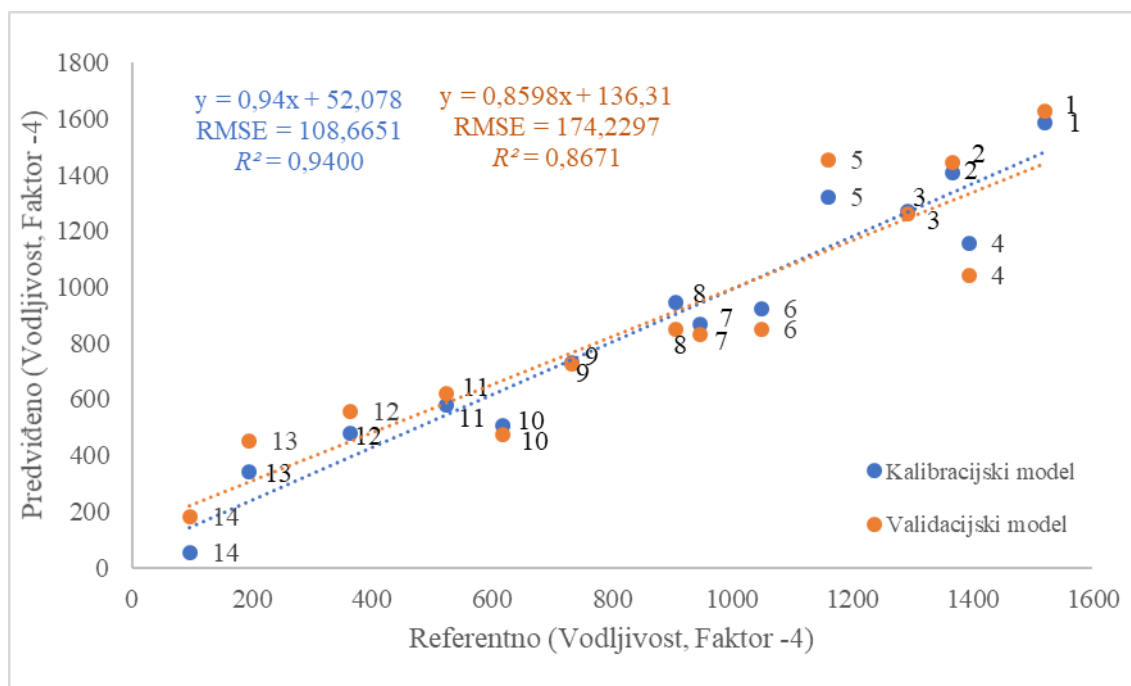
Slika 33. PLS model za kut boje, Hue

Na slici 33 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti kuta boje, Hue te modelom predviđene vrijednosti kuta boje, Hue kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9013$ i $RMSE=1,6724$); međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 (0,7770) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=2,7068$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednosti kuta boje, Hue prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno, ali ne i kvantitativno, zbog niskih vrijednosti R^2 validacijskog modela, predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 kalibracijskog modela iznose iznad 0,8.



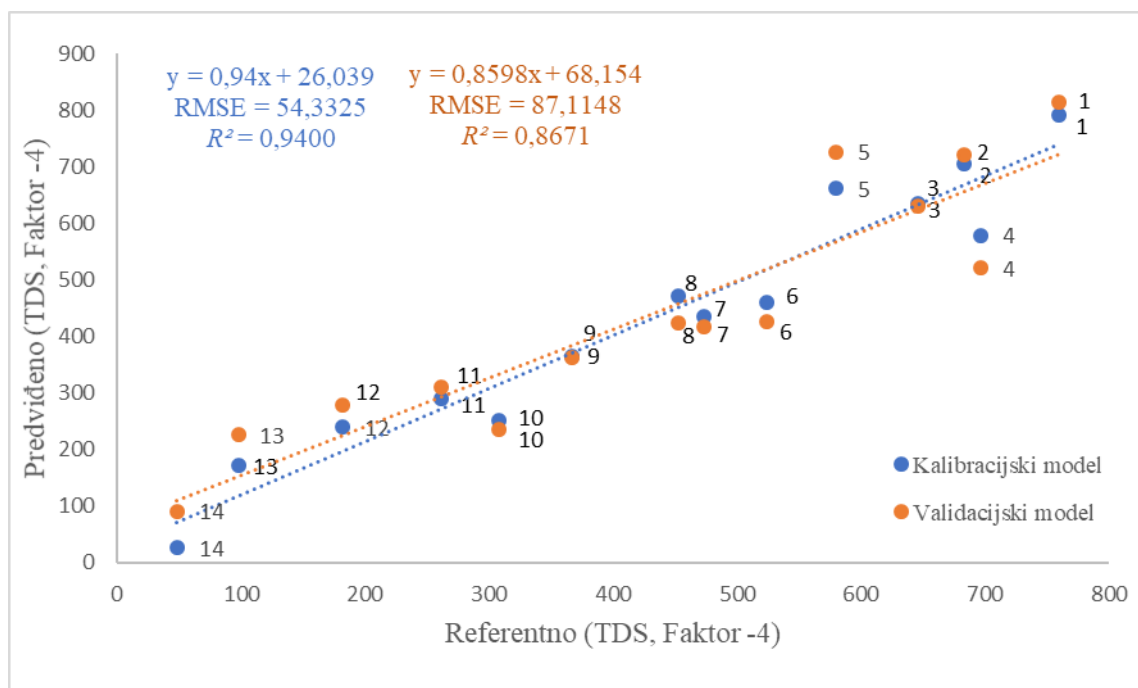
Slika 34. PLS model za ukupnu promjenu boje, ΔE

Na slici 34 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti ukupne promjene boje (ΔE) te modelom predviđene vrijednosti ukupne promjene boje (ΔE) kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9040$ i $RMSE=1,6500$), međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,7824$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=2,6757$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednosti ukupne promjene boje prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka.



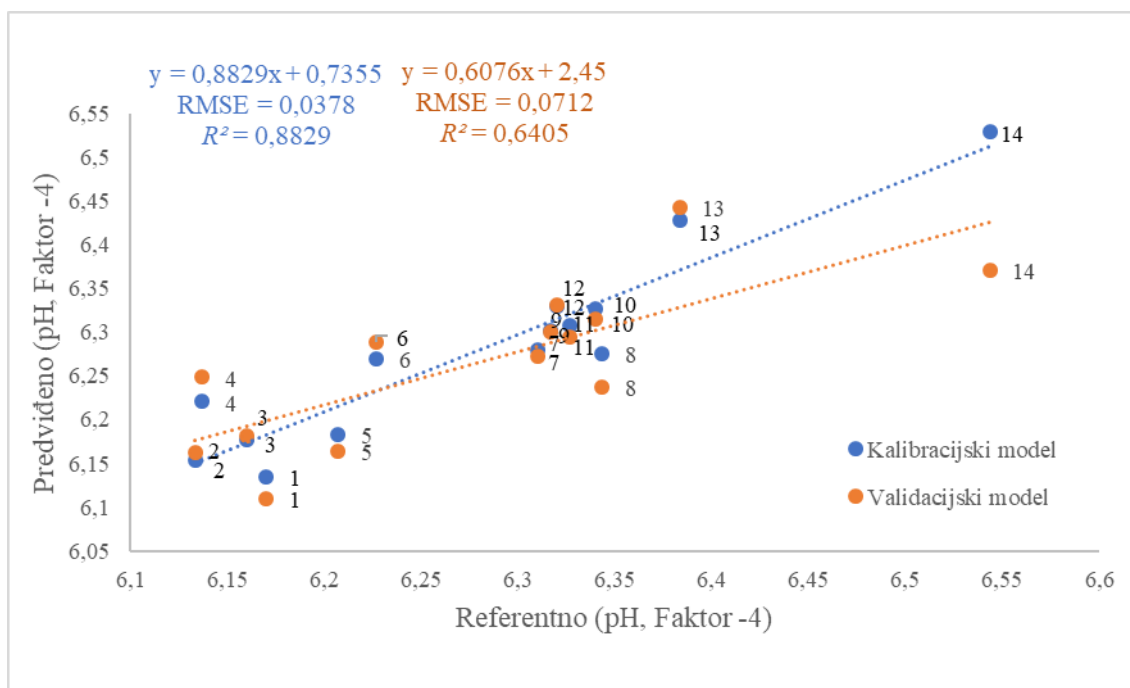
Slika 35. PLS model za vodljivost

Na slici 35 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti vodljivosti te modelom predviđene vrijednosti vodljivosti kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9400$ i $RMSE=108,6651$), međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 (0,8671) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=174,2297$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednost vodljivosti prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad 0,8.



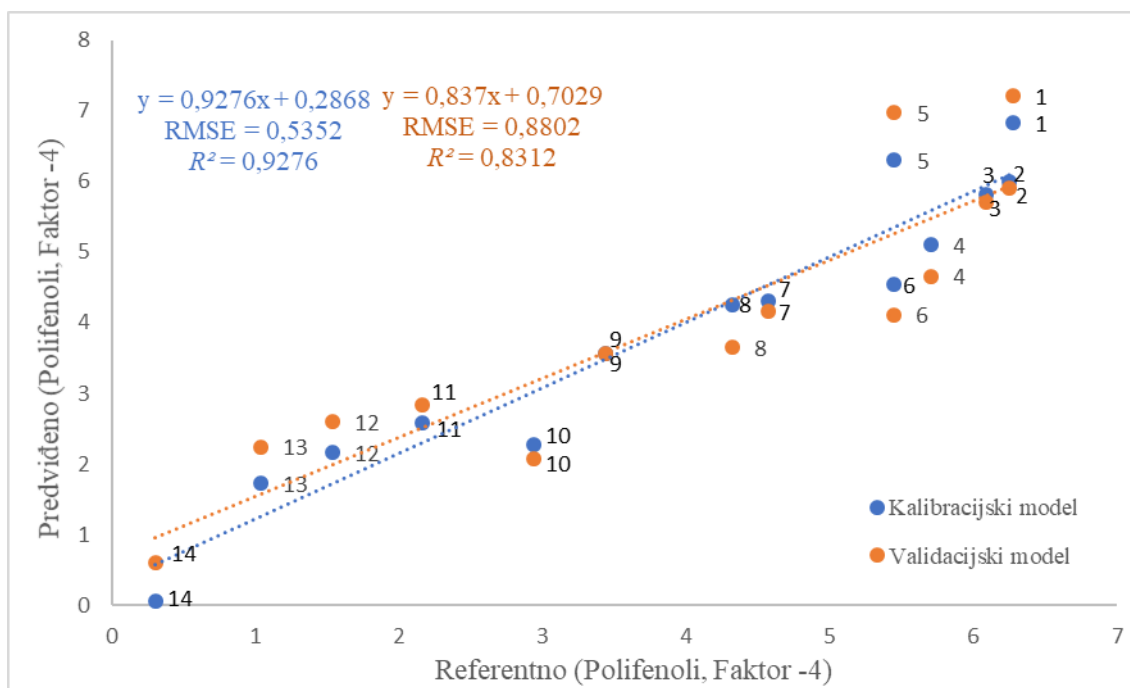
Slika 36. PLS model za TDS

Na slici 36 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti TDS-a te modelom predviđene vrijednosti TDS-a kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,9400$ i $RMSE=54,3325$), međutim, u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 (0,8671) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=87,1148$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se TDS vrijednost prema Valinger i sur. (2018) može koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad 0,8.



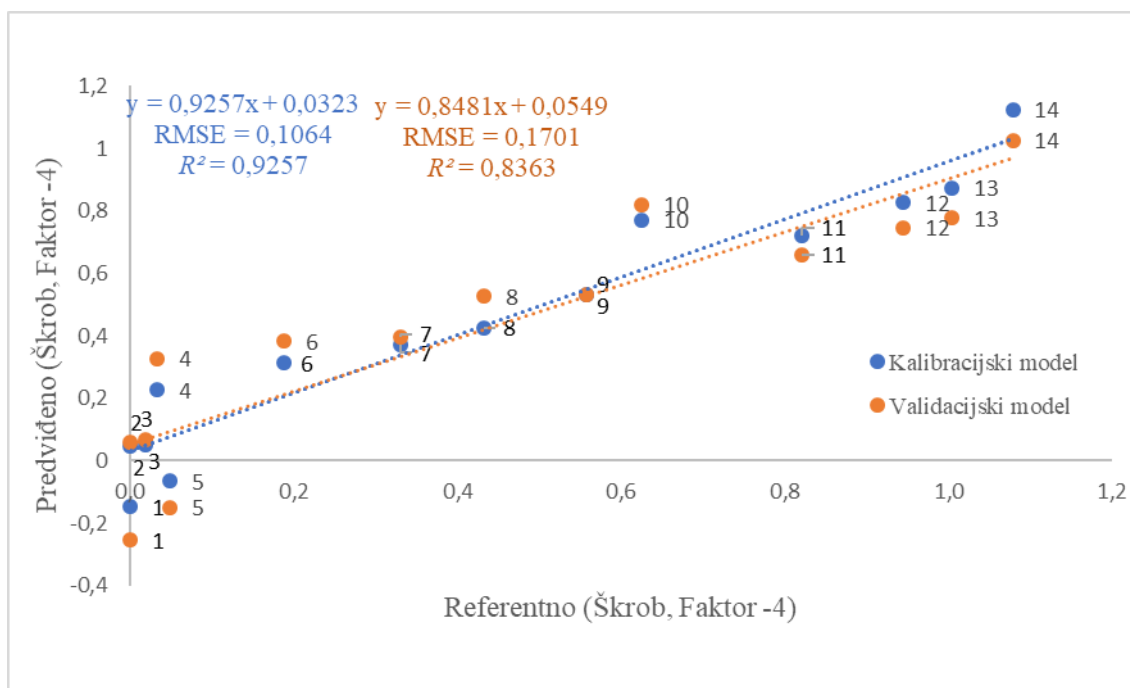
Slika 37. PLS model za pH

Na slici 37 prikazane su eksperimentalno određene pH vrijednosti te modelom predviđene pH vrijednosti kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Također i u ovom slučaju vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima kao kalibracijski model ($R^2=0,8829$ i $RMSE=0,0378$); u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,6405$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=0,0712$). Navedene vrijednosti ukazuju na činjenicu da se pH vrijednost može koristiti za kvalitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka, ali zbog niskih R^2 vrijednosti validacijskog modela, ne može se koristiti i za kvantitativno predviđanje. Naime, prema Valinger i sur. (2018) modeli čije vrijednosti R^2 prelaze 0,8 mogu se, osim za kvalitativno koristiti i za kvantitativno predviđanje parametara.



Slika 38. PLS model za koncentraciju ukupnih polifenola

Na slici 38 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola te modelom predviđene vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima dobiveno za kalibracijski model ($R^2=0,9276$ i $RMSE=0,5352$); u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,8312$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=0,8802$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednost koncentracije ukupnih polifenola prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima česnjaka jer R^2 vrijednosti iznose iznad 0,8.



Slika 39. PLS model za koncentraciju škroba

Na slici 39 prikazane su eksperimentalno određene vrijednosti koncentracije škroba te modelom predviđene vrijednosti koncentracije škroba kao i R^2 vrijednosti i pogreške (RMSE) razvijenih kalibracijskih i validacijskih modela. Vidljivo je da je puno bolje slaganje s eksperimentalnim podacima dobiveno za kalibracijski model ($R^2=0,9257$ i $RMSE=0,1064$); u slučaju validacijskog modela vidljiv je pad R^2 ($0,8363$) vrijednosti te porast pogreške ($RMSE=0,1701$). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se vrijednosti koncentracije škroba prema Valinger i sur. (2018) mogu koristiti za kvalitativno kao i kvantitativno predviđanje prisustva patvorine u uzorcima češnjaka jer vrijednosti R^2 iznose iznad $0,8$. Ono što je također vidljivo iz grafa, jest zamjetno raspršenje podataka u uzorcima koji su sadržali manje količine škroba kao patvorine (uzorci 1 - 5), što ukazuje na činjenicu da je osjetljivost primjenjene NIR spektroskopije pri jako malim promjenama koncentracija škroba jako niska, te da se zbog toga preporučuje korištenje te metode za uzorke koji sadrže veće postotke patvorine (20% i više).

Prema dobivenim rezultatima PLS grafova svih određivanih fizikalnih i kemijskih svojstava (slike 20 - 3.) sumira se kako NIR spektroskopija u kombinaciji s istima ukazuje na uspješnost korištenja u kvalitativnom i kvantitativnom predviđanju patvorenosti češnjaka u prahu uz pomoć fizikalno-kemijskih svojstava: percentila raspodjele $d(0,5)$, percentila raspodjele $D[3,2]$, aktiviteta vode, Hunterova koordinata boje a^* , Hunterova koordinata boje

b^* , tona boje, Chroma, kuta boje, Hue, ukupne promjene boje, vodljivosti, TDS-a, pH, koncentracije ukupnih polifenola i koncentracije škroba. Patvorenost se kvalitativno može predvidjeti uz pomoć: percentila raspodjele $d(0,1)$, percentila raspodjele $d(0,9)$, vlage, Hunterove koordinate boje L^* i pH. NIR spektroskopija u kombinaciji s PLS modelima nije pokazala potencijal u određivanju patvorenosti češnjaka u prahu uz pomoć fizikalnih svojstava: raspona, veličine čestica, nasipne gustoće i Hausnerovog omjera.

Provedena su brojna istraživanja s ciljem otkrivanja patvorenja različitih vrsta začina upotrebom NIR spektroskopije u kombinaciji s PLS modelima. Dasykowski i sur. (2023) istraživali su potencijalnu upotrebu FT i NIR spektroskopije u kombinaciji s kemometrijskim metodama u patvorenju češnjaka kukuruznim brašnom i škrobom te su zaključili da se navedene metode u kombinaciji s kemometrijom uspješno mogu koristiti za kvantifikaciju patvorine u uzorcima češnjaka. Patarroyo-León i sur. (2022) u svome istraživanju potvrdili su učinkovitost NIR spektroskopije u kombinaciji s kemometrijskim tehnikama za identifikaciju patvorina krede i kukuruznog škroba u uzorcima češnjaka u prahu kao i kvantifikaciju koncentracije istih. Galvin-King i sur. (2021) proveli su istraživanje u kojem su pokazali sposobnost detektiranja patvorenja češnjaka upotrebom FT i NIR spektroskopije zajedno s kemometrijom, neke od patvorina koje su se koristile u njihovom istraživanju su talk, rižino brašno, natrijev kazeinat i ostali. Uz začine, kombinacija ovih metoda pokazuje velik potencijal u otkrivanju patvorenja raznih vrsta prehrambenih proizvoda; dos Santos Pereira i sur. (2020) u svome istraživanju navedene metode koriste za identifikaciju i kvantifikaciju patvorenja kozjeg mlijeka dodavanjem kravljeg mlijeka dok ih Basri i sur. (2017) u svome istraživanju koriste za klasifikaciju i kvantifikaciju palminog ulja, a Valinger i sur. (2021) za detekciju patvorenja meda. Uz navedeno, NIR spektroskopija uz kemometriju pokazuje velik potencijal u određivanju drugih svojstava. Teye i sur. (2020) određivali su kvalitetu zrna kakaovca i proizvoda od zrna kakaovca upotrebom NIR spektroskopije i kemometrije s fokusom na predviđanje kategorizacije, autentifikacije, kemijskog sastava, senzorska svojstva, zemljopisne klasifikacije, patvorenja i sigurnosti. Castro-Reigía i sur. (2023) u svome radu istražuju potencijal NIR spektroskopije i PLS modela u određivanju stupnja fermentacije kruha u pekarskoj industriji. NIR spektroskopija i PLS modeli pokazuju i velik potencijal u kvantificiranju vlage, pepela i proteina u slatkom krumpiru (He i sur., 2023).

5. ZAKLJUČCI

:

1. Laserskom difrakcijom utvrđeno je kako u uzorcima češnjaka u prahu s dodatkom veće količine patvorine (škroba) dolazi do povećanja čestica malih promjera.
2. Mjerenjem aktiviteta vode utvrđeno je kako se povećanjem udjela patvorine škroba u češnjaku u prahu aktivitet vode smanjuje.
3. Kod uzorka s većim udjelom patvorine (škroba) u češnjaku u prahu određen je niži udio vlage, ali ne može se odrediti jasan trend.
4. Boja uzoraka češnjaka u prahu patvorenog škrobom mijenjala se ovisno o udjelu škroba: tako su se povećanjem udjela škroba u uzorku povećavale vrijednosti parametra boje L^* (svjetlina) i kuta boje Hue, dok su se smanjivale vrijednosti parametara a^* i b^* i Chroma. Također, vrijednosti ukupne promjene boje uzoraka rasle su s povećanjem udjela patvorine.
5. Vrijednosti vodljivosti i TDS-a smanjuju se s povećanjem udjela patvorine (škroba) u češnjaku u prahu.
6. Izmjerene pH vrijednosti uzoraka pokazuju blagi rast povećanjem udjela patvorine (škroba) u češnjaku u prahu.
7. Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima češnjaka u prahu patvorenog škrobom smanjuje se povećanjem udjela patvorine.
8. Modeli parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) s visokom točnošću ($R^2 > 0,8$) mogu se koristiti u predviđanju kvalitativnog i kvantitativnog prisustva patvorine prema svojstvima: percentil raspodjele ($d(0,5)$ i $D[3,2]$), aktivitet vode, Hunterove koordinate boje (a^* i b^*), ton boje (Chroma), vodljivost, TDS, koncentracija polifenola i koncentracija škroba. Ovaj model prikladan je za kvalitativno predviđanje prisustva patvorine prema svojstvima: percentil raspodjele ($d(0,1)$ i $d(0,9)$), vlaga, Hunterove koordinate boje L^* i pH, dok za predviđanje raspona, nasipne gustoće i Hausnerovog omjera PLS modeli nisu primjenjivi.
9. Kombinacija NIR spektroskopije i kemometrijskih metoda (PCA i PLS) predstavlja brzu i nedestruktivnu metodu predviđanja patvorenja začina.

6. LITERATURA

Abdi H, Williams LJ (2010) Principal component analysis. *WIREs Comput Stat* **2**, 433–459. <http://dx.doi.org/10.1002/wics.101>

Aenugu HPK, Kumar DS, Srisudharson NP (2011) Near infrared spectroscopy-an overview. *Int J Res* **3**, 825–836.

Adams MR, Moss MO (2000) Food microbiology, 2. Izd., Royal society of chemistry, London.

Agelet LE, Hurburgh JrCR (2010) A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *Crit Rev Anal Chem* **40**, 246-260. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.515468>

Anonymous 1 (2023)

<https://www.google.hr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fn1info.hr%2Flifestyle%2Fkako-pravilno-cuvati-cesnjak%2F&psig=AOvVaw0KNl7Ekz-joGpqKFESIdFz&ust=1695636625721000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBAQjRxqFwoTCNiS1OeAw4EDFQAAAAAdAAAAABAE> Pristupljeno 24. rujna 2023.

AOAC 930.15:1999 Determination of Moisture in Animal Feed.

Baghalian K, Ziai SA, Naghavi MR, Badi HN, Khalighi A (2005) Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Sci Hort* **2**, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.07.001>

Barbosa-Canovas GV, Ortega-Rivas E, Juliano P, Yan H (2005) Food Powders, Physical Properties, Processing and Functionality, 1. izd., Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Basri KN, Hussain MN, Bakar J, Sharif Z, Khir MFA, Zoolfakar AS (2017) Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy. *Spectrochim Acta, Part A* **173**, 335-342. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.028>

Beato VM, Orgaz F, Mansilla F, Montaña A (2011) Changes in Phenolic Compounds in Garlic (*Allium sativum* L.) Owing to the Cultivar and Location of Growth. *Plant Foods Hum Nutr* **3**, 218–223. <https://doi.org/10.1007/S11130-011-0236-2>

Belščak-Cvitanović A, Valinger D, Benković M, JurinjakTušek A, Jurina T, Komes D, i sur. (2018) Integrated approach for bioactive quality evaluation of medicinal plant extracts using HPLC-DAD, spectrophotometric, near infrared (NIR) spectroscopy and chemometric techniques. *Int J Food Prop* **20**, S2463–S2480. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1373122>

Bendelja I, Valinger D, Jurina T, JurinjakTušek A, Gajdoš Kljusurić J, Benković M (2019) Influence of Particle Size on UV-VIS and NIR Spectra of Aqueous Extracts of Plants from Lamiaceae Family. *J Hyg Eng Des* **27**, 61-68.

Benković M, Jurina T, Longin L, Grbeš F, Valinger D, JurinjakTušek A, i sur. (2022) Qualitative and Quantitative Detection of Acacia Honey Adulteration with Glucose Syrup Using Near-Infrared Spectroscopy. *Separations* **9**, 312. <https://doi.org/10.3390/separations9100312>

Bila Z (2020) Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata, mikrokapsula i emulzija biljaka iz porodice Lamiaceae (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Black C, Haughey SA, Chevallier OP, Galvin-King P, Elliott CT (2016) A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach. *Food Chem* **210**, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004>

Blanco M, Villarroya INIR (2002) NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends Anal Chem* **21**, 240-250. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)

Block E (2010) Garlic and Other Alliums: The Lore and The Science, 1. izd., Royal Society of Chemistry, London.

Brehaut L (2017) Is there chalk and talcum in your garlic powder? Food fraud expert warns of tainted garlic product -National Post. <https://nationalpost.com/life/food/is-there-chalk-and-talcum-in-your-garlic-powder-food-fraud-expert-is-warning-us-about-tainted-garlic-products>
Pristupljeno 23. kolovoza 2023.

Bouzembrak Y, Marvin HJ (2016) Prediction of food fraud type using data from Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) and Bayesian network modelling. *Food Control* **61**, 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.026>

Branigan T (2010) Garlic bubble leaves bad taste in Chinese mouths - The Guardian. <https://www.theguardian.com/world/2010/jul/30/garlic-chinese-commodity-bubble> Pristupljeno 25. kolovoza 2023.

Cantarelli MA, Moldes CA, Marchevsky EJ, Azcarate SM Camiña JM (2020) Low-cost analytic method for the identification of Cinnamon adulteration. *Microchem J* **159**, 105513. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105513>

Castro-Reigía D, García I, Sanllorente S, Sarabia LA, Amigo JM, Ortiz MC (2023) Bread fermentation monitoring through NIR spectroscopy and PLS-DA. Determining the optimal fermentation point in bread doughs. *J Food Eng* **361**, 111738. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111738>

Cen H, He Y (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci Tech* **18**, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.003>

Chaplin MF (2007) The memory of water: an overview. *Homeopathy* **96**, 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2007.05.006>

Daszykowski M, Kula M, Stanimirova I (2023) Quantification and Detection of Ground Garlic Adulteration Using Fourier-Transform Near-Infrared Reflectance Spectra. *Foods* **12**, 3377. <https://doi.org/10.3390/foods12183377>

de Lima ABS, Batista AS, de Jesus JC, de Silva JJ, de Araújo ACM, Santos LS (2020) Fast quantitative detection of black pepper and cumin adulterations by near - infrared spectroscopy and multivariate modeling. *Food Control* **107**, 106802. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106802>

- Dewi RS, Huda N, Ahmad R (2011) Changes in the physicochemical properties, microstructure and sensory characteristics of shark dendeng using different drying methods. *Am J Food Technol* **6**, 149-157. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.149.157>
- Dhanya K, Syamkumar S, Sasikumar B (2009) Development and application of SCAR marker for the detection of papaya seed adulteration in traded black pepper powder. *Food Biotechnol* **3**, 97-106. <https://doi.org/10.1080/08905430902873007>
- dos Santos Pereira EV, de Sousa Fernandes DD, de Araújo MCU, Diniz PHGD, Maciel MIS (2020) Simultaneous determination of goat milk adulteration with cow milk and their fat and protein contents using NIR spectroscopy and PLS algorithms. *LWT Food Sci Technol* **127**, 109427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109427>
- Dudeja P, Gupta RK, Minhas AS (2016) Food safety in the 21st century: Public health perspective. U: Attrey D P (ured.) Detection of food adulterants/contaminants, Academic Press, Cambridge, str. 129-143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801773-9.00010-8>
- Du L, Mackeprang K, Kjaergaard HG (2013) Fundamental and overtone vibrational spectroscopy, enthalpy of hydrogen bond formation and equilibrium constant determination of the methanol–dimethylamine complex. *Phys Chem Chem Phys* **15**, 10194-10206. <https://doi.org/10.1039/C3CP50243K>
- Dumičić G, Miloš B, Žanić K, Urlić B, Jukić Špika M (2015) Jadranski češnjak, 1. izd., Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split.
- Ebnesajjad S (2013) Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics. U: Sun X S (ured.) Overview of Plant Polymers: Resources, Demands, and Sustainability, William Andrew Publishing, New York, str. 1-10. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00001-X>
- El-Saber BG, Beshbishy AM, Wasef LG, Elewa YHA, Al-Sagan AA, El-Hack MEA, i sur. (2020) Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients* **12**, 872. <https://doi.org/10.3390/nu12030872>
- Folli GS, Santos LP, Santos FD, Cunha PHP, Schaffel IF, Borghi FT, i sur. (2022) Food analysis by portable NIR spectrometer. *Food Chem Adv* **1**, 100074. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100074>
- Fried B, McDonnell M (2000) Rocks and minerals (Hands-on Science Series). J Weston Walch, Portland.
- Galvin-King P, Haughey SA, Elliott CT (2018) Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. *Food control* **88**, 85-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.031>
- Galvin-King P, Haughey SA, Elliott CT (2021) Garlic adulteration detection using NIR and FTIR spectroscopy and chemometrics. *J Food Compos Anal* **96**, 103757. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103757>
- Goff SA, Klee HJ (2006) Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value?. *Science* **311**, 815-819. <https://doi.org/10.1126/science.1112614>
- Gorinstein S, Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Najman K, i sur. (2009) Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables

subjected to different processing conditions. *Food Control* **4**, 407–413. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2008.07.008>

Harvey D (2000) *Modern Analytical Chemistry*, McGraw Hill, Singapore.

He HJ, Wang Y, Wang Y, Liu H, Zhang M, Ou X (2023) Simultaneous quantifying and visualizing moisture, ash and protein distribution in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] by NIR hyperspectral imaging. *Food Chem: X* **18**, 100631. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100631>

Huang H, Yu H, Xu H, Ying Y (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *J Food Eng* **87**, 303-313. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.022>

Huck CW, Pezzeti CK, Huck-Pezzei VAC (2016) An industry perspective of food fraud. *Curr Opin Food Sci* **10**, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.07.004>

International Trade Centre (2006) *Marketing Manual and Web Directory for Organic Spices, Culinary Herbs and Essential Oils*. 2. izd., ITC, Geneva.

Jahanbakhshi A, Abbaspour-Gilandeh Y, Heidarbeigi K, Momeny M (2021) Detection of fraud in ginger powder using an automatic sorting system based on image processing technique and deep learning. *Comput Biol Med* **136**, 104764. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104764>

Jamshidi B (2020) *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Ability of near-infrared spectroscopy for non-destructive detection of internal insect infestation in fruits: Meta-analysis of spectral ranges and optical measurement modes. *Spectrochim Acta, Part A* **225**, 117479. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117479>

Janžić K (2015) Optimalni parametri uklanjanja fenolnih spojeva iz otpadne vegetacijske vode maslina metodom elektrokoagulacije (diplomski rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Johnson R (2014) Food Fraud and “Economically Motivated Adulteration” of Food and Food Ingredients, Congressional Research Service. Dostupno na: <https://sgp.fas.org/crs/misc/R43358.pdf> Pristupljeno 25. kolovoza 2023.

Jurina T, Cvetković A, Gajdoš Kljusurić J, Jurinjak Tušek A, Benković M, Valinger D (2018) Modelling and optimization of physical characteristics based on UV-VIS/NIR spectra of aqueous extracts of lavender, mint and Melissa. *SEEJSD* **2**, 51-59.

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

Josipović R, Markov K, Frece J, Stanzer D, Cvitković A, Mrvčić J (2016) Upotreba začina u proizvodnji tradicionalnih sireva. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* **66**, 12-25. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2016.0102>

Kar S, Tudu B, Jana A, Bandyopadhyay R (2019) FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate analysis for detection of starch adulteration in turmeric powder. *Food Addit Contam, Part A* **36**, 863-875. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1600746>

- Khodabakhshian R, Bayati MR, Emadi B (2021) An evaluation of IR spectroscopy for authentication of adulterated turmeric powder using pattern recognition. *Food Chem* **364**, 130406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130406>
- Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kanezawa A (2002) Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J Agric Food Chem* **50**, 622-632. <https://doi.org/10.1021/jf0106648>
- Kovačević TK (2021) Određivanje antioksidacijskog kapaciteta i udjela šećera u češnjaku (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Kurozawa LE, Park KJ, Hubinger MD (2009) Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *J Food Eng* **94**, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.025>
- Lakshmi V, Pradesh A (2012) Food Adulteration. *IJSIT* **1**, 106-113.
- Lee S, Lohumi S, Cho BK, Kim MS, Lee SH (2014). Development of Nondestructive Detection Method for Adulterated Powder Products Using Raman Spectroscopy and Partial Least Squares Regression. *J Korean Soc Nondestruct Test* **34**, 283-289. <https://doi.org/10.7779/JKSNT.2014.34.4.283>
- Lee S, Lohumi S, Lim H, Gotoh T, Cho B, Kim MS (2015) Development of a detection method for adulterated onion powder using raman spectroscopy. *J Fac Agric* **60**, 151–156. <https://doi.org/10.5109/1526312>
- Lisciani S, Gambelli L, Durazzo A, Marconi S, Camilli E, Rossetti C, i sur. (2017) Carbohydrates components of some Italian local landraces: Garlic (*Allium sativum* L.). *Sustainability* **9**, 1922. <https://doi.org/10.3390/su9101922>
- Lohumi S, Lee S, Cho BK (2015a) Optimal variable selection for Fourier transform infrared spectroscopic analysis of starch-adulterated garlic powder. *Sens Actuators, B Chem* **216**, 622-628. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.060>
- Lohumi S, Lee S, Lee H, Cho BK (2015b) A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends Food Sci Technol* **46**, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.003>
- Lohumi S, Lee S, Lee WH (2014) Detection of starch adulteration in onion powder by FT-NIR and FTIR spectroscopy. *J Agric Food Chem* **62**, 9246–9251. <https://doi.org/10.1021/jf500574m>
- Mariam MBB, Usha Devi C (2016) Chemical And Shelflife Analysis Of Dry Garlic Powder: A Golden Herb. *Int J Agric Food Sci Technol* **7**, 1-6.
- Martínez-Navarrete J, Loria-Castellanos J, Nava-Ocampo AA (2008) Accidental poisoning with “Chinese chalk”. *Acta Biomed* **79**, 36–38.
- Metrohm (2013) NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes, Metrohm Ltd., Herisau.
- Micová M, Bystrická J, Kovarovič J, Harangozo L, Lidiková A (2018) Content of bioactive compounds and antioxidant activity in garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Agric Slov* **111**, 581-595. <https://doi.org/10.14720/aas.2018.111.3.07>

Mishra P, Verma M, Mishra V, Mishra S, Rai GK (2011) Studies on development of ready to eat Amla (*Emblica officinalis*) chutney and its preservation by using class one preservatives. *Am J Food technol* **6**, 244-252. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.244.252>

Moyer DC, DeVries JW, Spink J (2017) The economics of a food fraud incident – case studies and examples including Melamine in Wheat Gluten. *Food Control* **71**, 358-364. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.015>

Mokrzycki WS, Tatol M (2011) Colour difference ΔE -A survey. *Mach Graph Vis* **20**, 383-411.

Nilius B, Appendino G (2013) Spices: the savory and beneficial science of pungency. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **164**, 1-76. https://doi.org/10.1007/112_2013_11

Nuutila AM, Puupponen-Pimiä R, Aarni M, Oksman-Caldentey KM (2003) Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem* **81**, 485–493. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00476-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00476-4)

O'Gara EA, Hill DJ, Maslin DJ (2000) Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2269-2273. <https://doi.org/10.1128/aem.66.5.2269-2273.2000>

Oliveira MM, Cruz-Tirado JP, Roque JV, Teófilo RF, Barbin DF (2020) Portable near-infrared spectroscopy for rapid authentication of adulterated paprika powder. *J Food Compos Anal* **87**, 103403. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103403>

Omidifar N, Nili-Ahmadabadi A, Gholami A, Dastan D, Ahmadimoghaddam D, Nili-Ahmadabadi H (2020) Biochemical and histological evidence on the protective effects of *Allium hirtifolium* Boiss (Persian shallot) as an herbal supplement in cadmium-induced hepatotoxicity. *Evid Based Complement Alternat Med* **2020**. <https://doi.org/10.1155/2020/7457504>

Osman AG, Raman V, Haider S, Ali Z, Chittiboyina AG, Khan IA (2019) Overview of analytical tools for the identification of adulterants in commonly traded herbs and spices. *J AOAC Int* **102**, 376–385. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0389>

Patarroyo León KJ, Triana-Fonseca LV, Sánchez-Sáenz CM (2022) Development of Models for the Identification of Adulterants in Garlic Powder Based on Near Infrared Spectroscopy. *Dostupno na*: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4260148. Pristupljeno 15. listopada 2023.

Pasquini C (2003) Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J Brazil Chem Soc* **14**, 198-219. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200006>

Perkin Elmer (2018) Safeguarding Herb and Spice Authenticity, Guide to Herb and Spice Adulteration Screening Using Near-Infrared Spectroscopy https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/gde_013641_01_nir_herbs_spices_adulteration.pdf Pristupljeno 05. listopada 2023.

- Petrakis EA, Cagliani LR, Polissiou MG, Consonni R (2015) Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chem* **173**, 890-896. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.107>
- Puranik V, Mishra V, Neelam S, Rai GK (2011) Studies on development of protein rich germinated green gram pickle and its preservation by using class one preservatives. *Am J Food Technol* **6**, 742-752. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.742.752>
- Puranik V, Srivastava P, Mishra V, Saxena DC (2012) Effect of different drying techniques on the quality of garlic: A comparative study. *Am J Food Technol* **7**, 311-319. <https://doi.org/10.3923/ajft.2012.311.319>
- Roseblade A, Ung A, Bebawy M (2017) Synthesis and in vitro biological evaluation of thiosulfinate derivatives for the treatment of human multidrug-resistant breast cancer. *Acta Pharmacol Sin* **38**, 1353-1368. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.170>
- Quek SY, Chok NK, Swedlund P, (2007) The physicochemical properties of spray- dried watermelon powders. *Chem Eng Process* **46**, 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.06.020>
- Quelal-Vásconez MA, Pérez-Esteve É, Arnau-Bonachera A, Barat JM, Talens P (2018) Rapid fraud detection of cocoa powder with carob flour using near infrared spectroscopy. *Food Control* **92**, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.001>
- Saker A, Cares-Pacheco MG, Marchal P, Falk V (2019) Powders flowability assessment in granular compaction: What about the consistency of Hausner ratio?. *Powder Technol* **354**, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.05.032>
- Sawyer CN, McCarty PL, Parkin GF (1994) Chemistry for Environmental Engineering, 4. izd., Mc Graw – Hill International Editions, New York.
- Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, i sur. (2019) Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). *Foods* **8**, 246. <https://doi.org/10.3390/foods8070246>
- Shin SS, Song JH, Hwang B, Noh DH, Park SL, Kim WT, i sur. (2017) HSPA6 augments garlic extract-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; Implication for cell cycle dysregulation, signaling pathway alteration, and transcription factor-associated MMP-9 regulation. *PLoS One* **12**, 171860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171860>
- Silvis ICJ, van Ruth SM, van der Fels-Klerx HJ, Luning PA (2017) Assessment of food fraud vulnerability in the spices chain: An explorative study. *Food Control* **81**, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.019>
- Su WH, Sun DW (2018) Fourier Transform Infrared and Raman and Hyperspectral Imaging Techniques for Quality Determinations of Powdery Foods: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **17**, 104–122. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12314>

Terazono E, Li W, Hornby L (2016) China grapples with garlic price bubble - *Financial Times*. <https://www.ft.com/content/f1c91d36-9d39-11e6-8324-be63473ce146> Pristupljeno 06. rujna 2023.

Teye E, Anyidoho E, Agbemaflle R, Sam-Amoah LK, Elliott C (2020) Cocoa bean and cocoa bean products quality evaluation by NIR spectroscopy and chemometrics: A review. *Infrared Phys Technol* **104**, 103127. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2019.103127>

Thach NA (2022) Investigation of the effects of extraction temperature and time on bioactive compounds content from garlic (*Allium sativum* L.) husk. *Front Sustain Food Syst* **6**, 1004281. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1004281>

The European Food Information Council (2013) European Union Action Plan to tackle food fraud, EUFIC, Brussels. <https://www.eufic.org/en/food-production/article/european-union-action-plan-to-tackle-food-fraud> Pristupljeno 26. kolovoza 2023.

The European Pharmacopoeia (2019) Powder flow Council of Europe, Strasbourg. <http://uspbppep.com/ep60/2.9.36.%20powder%20flow%200936e.pdf> Pristupljeno 15. listopada 2023.

Valinger D, Benković M, Jurina T, Jurinjak Tušek A, Belščak-Cvitanovi A, Gajdoš Kljusurić J, i sur. (2017) Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis for particle size control of dried medicinal plants. *J Process Energy Agric* **21**, 17-22. <https://doi.org/10.5937/JPEA1701017V>

Valinger D, Kušen M, Jurinjak Tušek A, Panić M, Jurina T, Benković M, i sur. (2018) Development of Near Infrared Spectroscopy Models for Quantitative Prediction of the Content of Bioactive Compounds in Olive Leaves. *Chem Biochem Eng Q* **32**, 535–543. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1396>

Valinger D, Longin L, Grbeš F, Benković M, Jurina T, Gajdoš Kljusurić J, i sur. (2021) Detection of honey adulteration – The potential of UV-VIS and NIR spectroscopy coupled with multivariate analysis. *LWT Food Sci Technol* **145**, 111316. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111316>

Vivek D, Renu BY, Richa A, Sachdev Y (2017) Formulation design and optimization of novel fast dissolving tablet of chlorpheniramine maleate by using lyophilization techniques. *Bull Fac Pharm Cairo Univ* **55**, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.12.001>

Voelker AL, Sommer AA, Mauer LJ (2020) Moisture sorption behaviors, water activity-temperature relationships, and physical stability traits of spices, herbs, and seasoning blends containing crystalline and amorphous ingredients. *Food Res Int* **136**, 109608. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109608>

Wang H, Li X, Shen D, Oiu Y, Song J (2014) Diversity evaluation of morphological traits and allicin content in garlic (*Allium sativum* L.) from China. *Euphytica* **2**, 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1097-1>

WHO (2005) WHO monographs on selected medicinal plants, 4. izd., WHO Publications, Salerno-Paestum.

- Wilde AS, Haughey A, Galvin-King P, Elliott CT (2019) The feasibility of applying NIR and FT-IR fingerprinting to detect adulteration in black pepper. *Food Control* **100**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.039>
- Xu L, Shi W, Cai C, Zhong W, Tu K (2015) Rapid and nondestructive detection of multiple adulterants in kudzu starch by near infrared (NIR) spectroscopy and chemometrics. *LWT Food Sci and Technol* **61**, 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.002>
- Yang Y, Wang H, Lü SJ (2021) Effects of different ratio of garlic skin on serum biochemistry, antioxidative status, and immunity of Yimeng black goats. *Feed Res* **8**, 1–5. <https://doi.org/10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2021.08.001>
- Yan JK, Wang C, Yu YB, Wu LX, Chen TT, Wang ZW (2020) Physicochemical characteristics and in vitro biological activities of polysaccharides derived from raw garlic (*Allium sativum* L.) bulbs via three-phase partitioning combined with gradient ethanol precipitation method. *Food Chem* **339**, 128081. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128081>
- Yan H, Li P, Zhou GS, Wang YJ, Bao BH, Wu QN, i sur.(2021) Rapid and practical qualitative and quantitative evaluation of non-fumigated ginger and sulfur-fumigated ginger via Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometric methods. *Food Chem* **341**, 128241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128241>
- Yu DX, Guo S, Wang JM, Yan H, Zhang ZY, Yang J, i sur. (2022) Comparison of different drying methods on the volatile components of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by HS-GC-MS coupled with fast GC e-nose. *Foods* **11**, 1611. <https://doi.org/10.3390/foods11111611>
- Zafarian R, Manafi M (2013) Effect of garlic powder on methane production, rumen fermentation and milk production of buffaloes. *Annu Res Rev Biol* **3**, 1013–1019. <https://journalarrb.com/index.php/ARRB/article/view/24989>
- Zhai B, Zhang C, Sheng Y, Zhao C, He X, Xu W, i sur. (2018) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of S-allyl-cysteine sulfoxide (alliin) in DIO mice. *Sci Rep* **8**, 3527. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21421-x>
- Zhang Y, Yang Z, Li R, Geng H, Dong C (2015) Investigation of fine chalk dust particles' chemical compositions and toxicities on alveolar macrophages in vitro. *Chemosphere* **120**, 500–506. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.009>
- Zhao X, Du F, Zhu Q, Qiu D, Yin W, Ao Q (2010) Effect of superfine pulverization on properties of *Astragalus membranaceus* powder. *Powder Technol* **203**, 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.06.029>
- Zhong J, Qin X (2016) Rapid quantitative analysis of corn starch adulteration in Konjac Glucomannan by Chemometrics-Assisted FT-NIR spectroscopy. *Food Anal Methods* **9**, 61–67. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0176-9>
- Zhou L, Guo X, Bi J, Yi J, Chen Q, Wu X, i sur. (2017) Drying of garlic slices (*Allium sativum* L.) and its effect on thiosulfinates, total phenolic compounds and antioxidant activity during infrared drying. *J Food Process & Preserv* **41**, e12734. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12734>
- Zhu F (2018) Relationships between amylopectin internal molecular structure and physicochemical properties of starch. *Trends Food Sci Technol* **78**, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.024>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Tena Barlović, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis