

Razvoj kemometrijskih modela za predikciju udjela patvorina, ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti meda na temelju UV-VIS spektara

Grbeš, Franjo

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:358107>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Franjo Grbeš

1147/USH

**RAZVOJ KEMOMETRIJSKIH
MODELA ZA PREDIKCIJU
UDJELA PATVORINA, UKUPNIH
POLIFENOLA I
ANTIOKSIDACIJSKE
AKTIVNOSTI MEDA NA
TEMELJU UV-VIS SPEKTARA**

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Ane Jurinjak Tušek, doc. Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za procesno inženjerstvo

Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

RAZVOJ KEMOMETRIJSKIH MODELA ZA PREDIKCIJU UDJELA PATVORINA, UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI MEDA NA TEMELJU UV-VIS SPEKTARA

Franjo Grbeš, 1147/USH

Sažetak: Cilj ovog rada bio je razviti kemometrijske modele (modele parcijalne linearne regresije i umjetne neuronske mreže) za opis i predikciju udjela patvorine (glukoza i kukuruzni sirup) te koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti meda na temelju UV-VIS spektra. U tu svrhu pripremljene su patvorine 15 uzoraka meda bagrema s glukoznim i kukuruznim sirupom u udjelu od 10 – 90 % te su im snimani UV-VIS spektri u rasponu valnih duljina $\lambda = 325 - 900$ nm i izmjerene koncentracije ukupnih polifenola i određena antioksidacijska aktivnost DPPH i FRAP metodom. Rezultati pokazuju da analiza glavnih komponenata UV-VIS spektra razdvaja patvorene uzorke meda na dvije velike skupine te da PLS modeli i modeli ANN pokazuju izvrsne predikcije udjela patvorina na temelju UV-VIS spektara s minimalnim pogreškama ($R^2 > 0,90$). U analiziranim uzorcima meda izmjerene su koncentracije ukupnih polifenola u rasponu od 13,80 do 108,40 mg_{GAE} kg⁻¹ te je uočeno da dodatak kukuruznog sirupa uzrokuje porast udjela polifenola, dok dodatak glukoznog sirupa ima za posljedicu smanjenja udjela ukupnih polifenola u pripremljenim patvorinama meda.

Ključne riječi: bagremov med, patvorenje, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost, kemometrijski modeli

Rad sadrži: 53 stranica, 11 slika, 26 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek

Pomoć pri izradi: Davor Valinger, doc.dr.sc., Tamara Jurina, doc.dr.sc., Maja Benković, doc.dr.sc.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Nada Vahčić
2. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
3. Prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
4. Doc.dr.sc. Maja Benković (zamjena)

Datum obrane: 23. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Process Engineering

Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DEVELOPMENT OF CHEMOMETRIC MODELS FOR PREDICTION OF ADULTERATION RATIO, TOTAL PHENOLS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HONEY BASED ON UV-VIS SPECTRA

Franjo Grbeš, 1147/USH

Abstract: *Aim of this article was to develop chemometric models (Partial linear regression models and Artificial neural networks) for description and prediction of adulteration ratio (glucose and corn syrup), total polyphenols content and antioxidant activity of honey samples based on UV-VIS spectra. For that purpose adulterated 15 acacia honey samples with glucose and corn syrup were prepared with adulteration ratio from 10 to 90 % and for those samples UV-VIS spectra in the wave length range $\lambda = 325 - 900$ nm were measured as well total polyphenols content and antioxidant activity with DPPH and FRAP methods. The results show that Principal component analysis (PCA) divided adulterated honey samples in two major groups and PLS as well ANN models showed excellent prediction capability of adulteration ratio based on UV-VIS spectra with minimal errors ($R^2 > 0.90$). In analyzed honey samples total polyphenols concentrations were from 13.80 to 108.40 mg_{GAE} kg⁻¹ and it was noticed that addition of corn syrup resulted in increase of total polyphenols while addition of glucose syrup resulted in decrease of total polyphenols in adulterated honey samples.*

Keywords: *acacia honey, adulteration, total phenols, antioxidant activity, chemometrics*

Thesis contains: 53 pages, 11 figures, 26 tables, 50 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Davor Valinger, Assistant professor, Tamara Jurina, Assistant professor, Maja Benković, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Nada Vahčić*, Full professor
2. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
3. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
4. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 23 July 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA MEDA	2
2.1.1. Kemijska svojstva meda.....	3
2.1.2. Polifenolni sastav meda.....	4
2.1.3. Patvorenje meda.....	6
2.2. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA	6
2.2.1. Primjena UV-VIS spektroskopije u analizi patvorenja hrane	7
2.3. KEMOMETRIJA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	8
2.3.1. Analiza glavnih komponentata (PCA).....	8
2.3.2. Umjetne neuronske mreže (ANN)	9
2.3.3. Analiza najmanjih kvadrata (PLS).....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.2. OPREMA	12
3.3. METODE RADA	13
3.3.1. Priprema uzoraka	13
3.3.2. Snimanje UV-VIS spektara	13
3.3.3. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola Folin – Ciocalteu metodom.....	14
3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	15
3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	15
3.3.6. Statistička analiza i modeliranje	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. UV-VIS SPEKTRI IZVORNIH MEDOVA I PRIPREMLJENIH PATVORINA	19
4.2. PLS MODELI ZA PREDIKCIJU UDJELA PATVORINE U MEDU NA TEMELJU UV-VIS SPEKTARA	24
4.3. MODELI UMJETNIH NEURONSKIH MREŽA ZA PREDIKCIJU UDJELA PATVORINE U MEDU NA TEMELJU UV/VIS SPEKTARA	27
4.4. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST IZVORNIH MEDOVA I PRIPREMLJENIH PATVORINA.....	32
4.5. MODELI NEURONSKIH MREŽA ZA OPIS UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST PRIPREMLJENIH PATVORINA MEDA.....	45
5. ZAKLJUČCI	49
6. LITERATURA	50

1. UVOD

Hrana je jedna od osnovnih ljudskih potreba. Ta činjenica otvara mnogobrojne mogućnosti u sektoru proizvodnje hrane, ali istovremeno upozorava na moguće prijetnje u vidu prevara odnosno patvorenja. Pošto je med namirnica relativno visoke cijene, danas se sve češće nailazi na patvorine meda koje se kemijskim sastavom razlikuju od izvornih, prirodnih medova. Stvaranje odnosno optimiziranje metoda za efektivno prepoznavanje patvorenja namirnica općenito su izazov za znanstvenike radi različitih razloga. Tijekom godina razvijene su mnogobrojne analitičke metode za detekciju patvorenja meda, svaka sa specifičnim prednostima i nedostacima. U svrhu šire i praktične primjene potrebno je razviti jednostavnu, nedestruktivnu i ponovljivu metodu. Kao jedna od takvih tijekom nekoliko godina istražuje se UV-VIS spektroskopija u kombinaciji s kemometrijskim metodama. Patvorenje hrane je danas sve češća pojava pa se metode za detekciju ubrzano razvijaju. Konkretno za medove, nešto je češća primjena Raman i NIR spektroskopije pa je literature za usporedbu rezultata u nešto manjem opsegu.

Cilj ovog rada je razviti kemometrijske modele (modele parcijalne linearne regresije i umjetne neuronske mreže) za opis i predikciju udjela patvorine (glukozni i kukuruzni sirup) te koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti meda na temelju UV-VIS spektara. Za potrebe istraživanja koristit će se bagremovi medovi (15 različitih uzoraka) iz kojih se pripremaju otopine patvorina u različitim udjelima. Svrha istraživanja je pokazati učinkovitost navedenih kemometrijskih modela za predikciju prethodno navedenih veličina te ukazati na moguću povezanost između dodatka patvorina u med i eventualnih promjena kemijskih svojstava u odnosu na čiste medove.

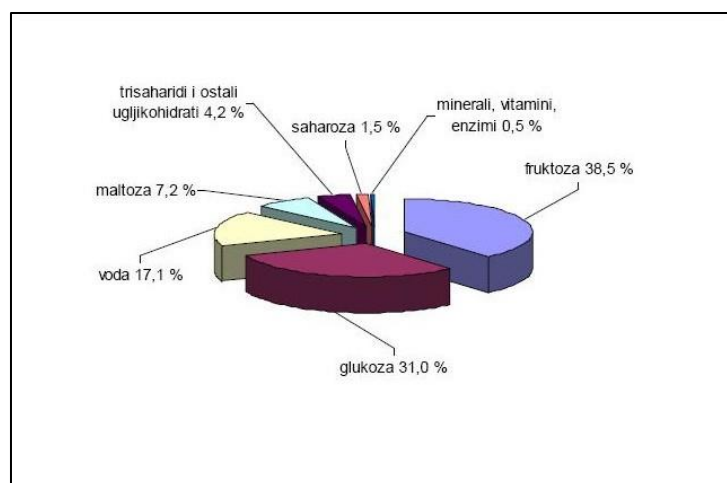
2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA MEDA

Med kao prehrambeni proizvod definiran je Pravilnikom o medu Ministarstva poljoprivrede prema kojemu je med prirodno sladak proizvod kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili pak izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, a koje pčele sakupljaju, dodaju mu specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (Pravilnik, 2015). Medovi se mogu podijeliti u dvije velike skupine prema podrijetlu te prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja. Prema podrijetlu medovi se dijele na cvjetni ili nektarni med (med dobiven od nektara biljaka) i na mediljkovac ili medun (med dobiven od izlučevina kukaca *Hemiptera* koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka). Način proizvodnje meda donosi sljedeću podjelu:

- Med u saću – med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća
- Med sa saćem ili med s dijelovima saća – med koji sadrži jedan ili više proizvoda navedenih u prethodnoj podjeli
- Cijeđeni med – dobiva se ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla
- Vrcani med – dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla
- Prešani med – dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne prelazi 45 °C
- Filtrirani med – dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog odvajanja peludi.

Istim pravilnikom (Pravilnik 2015) definirani su osnovni kriteriji sastava koje med mora ispunjavati, a osnovni kriteriji važni za ovaj rad jesu zbroj fruktoze i glukoze, količina saharoze, količina vode i drugi kriteriji. Prosječni sastav meda prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Prosječni sastav meda (Anonymous 1, 2016)

Osim što se med koristi u prehrani dugi niz godina, kao lijek za tretiranje rana med je prepoznat još u antičkoj Grčkoj zbog svojih (poslije znanstveno dokazanih) antibakterijskih i antioksidativnih svojstava (Satarupa i sur., 2014).

2.1.1. Kemijska svojstva meda

Najveći udio od prisutnih komponenti u medu zauzimaju ugljikohidrati. Ugljikohidrati čine čak 95 % od osušene mase meda (Alvarez – Suarez i sur., 2010). Najzastupljeniji ugljikohidrati u medu jesu glukoza i fruktoza koji medu daju karakterističnu slatkoću. Osim slatkoće, ovi monosaharidi imaju utjecaj na (brzo) povećanje izdržljivosti i na smanjenje umora mišića. Razgradnja ugljikohidrata u medu (posebice fruktoze i glukoze) ukazuje na prisutnost neenzimatskog posmeđivanja odnosno Maillardovih reakcija. Dva najznačajnija spoja koja ukazuju na navedenu pojavu jesu furfural i 5 – hidrokсимetilfurfural (5-HMF) (Moreira i sur., 2010). Prisutnost ovakvih reakcija i posljedično njihovih produkata ukazuje na to da je med zagrijavan, ali ukazuje i na uvjete skladištenja (Moreira i sur., 2010).

Prosječan udio proteina u medu iznosi 0,5 % (Alvarez – Suarez i sur., 2010), a sama količina proteina ovisi o vrsti medonosnih pčela (da Silva i sur., 2016) pa se prema tome udio proteina kreće od 0,1 % do čak 3,3 %. Aminokiselina s najvećim udjelom u medu jest prolin koji se koristi kao parametar za procjenu starosti meda, ali isto tako i za patvorenje šećera u medu (da Silva i sur., 2016). Upravo zbog toga je u literaturi određena minimalna vrijednost prolina kao najzastupljenije aminokiseline u medu kao pokazatelj čistoće meda, a iznosi 180 mg kg⁻¹ (Manzanares i sur., 2014). Loši uvjeti skladištenja (prvenstveno visoka temperatura) mogu

nanijeti štetu i proteinima. Naime, polifenoli prisutni u medu (o kojima će biti rečeno više u nastavku rada) se mogu jednostavno oksidirati do kinona koji se nadalje mogu kovalentno povezati s proteinima (da Silva i sur., 2016). Manji dio proteina meda jesu enzimi od kojih su najznačajniji invertaza, kisela fosfataza, diastaze i glukoza oksidaza (da Silva i sur., 2016). Za ovo istraživanje najznačajniji enzim je glukoza oksidaza iz razloga što oksidira glukozu do δ -glukonolaktona uz proizvodnju vodikovog peroksida. Nastali δ -glukonolakton dalje se hidrolizira do glukonske kiseline. Ovaj put oksidacije glukoze mogao bi utjecati na rezultate rada iako se radi o relativno malim količinama enzima.

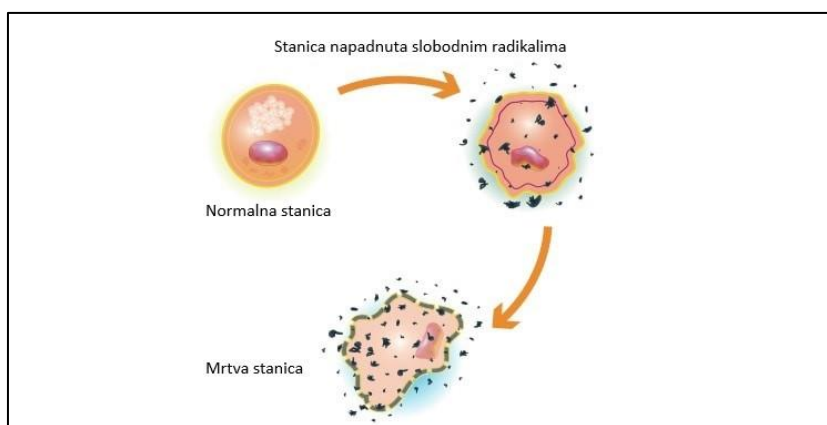
Mali udio vitamina prisutnih u medu obuhvaća vitamine B skupine kao što su tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinska (B3) i pantotenska (B5) kiselina, biotin (B8), piridoksin (B6) i folna kiselina (B9). Osim vitamina B skupine u medu je prisutan i vitamin C, askorbinska kiselina (da Silva i sur., 2016). Zbog blage kiselosti meda prisutni vitamini ostaju očuvani kroz određeno vrijeme. Prisutnost askorbinske kiseline u medu je interesantna jer doprinosi ukupnom antioksidacijskom kapacitetu meda (uz polifenolne spojeve), ali zbog svoje nestabilnosti zbog različitih utjecaja zapravo i ne pridonosi u značajnoj mjeri. Prethodno navedeni vodikov peroksid koji nastaje kao produkt reakcije katalizirane glukoza oksidazom može oksidirati askorbinsku kiselinu (da Silva i sur., 2016). Osim toga, udio askorbinske kiseline će se smanjiti i uslijed povišene temperature te izloženosti svjetlu.

Uz vitamine se često vežu i mineralne tvari zbog prisutnosti u malim količinama pa se tako i u medu može naći mineralnih tvari u rasponu od 0,04 % do 0,2 %. Od makroelemenata odnosno mikroelemenata med sadrži kalij, kalcij, magnezij, natrij, cink, selen, kobalt i mnoge druge (Alqarni i sur., 2012). Kako sastav meda uvelike ovisi o samoj vrsti meda odnosno izvoru nektara, neki znanstvenici tvrde kako bi se mineralni sastav meda mogao povezati sa tlom na kome je med proizveden (Escuredo i sur., 2013). Objašnjenje ove činjenice sastoji se od toga da biljke iz tla na kojem obitavaju crpe vodu i potrebne hranjive tvari pa na taj način u biljke dopijevaju i mineralne tvari. Na tom principu bi se medovi mogli klasificirati prema geografskom podrijetlu.

2.1.2. Polifenolni sastav meda

Sljedeća skupina spojeva prisutna u medu, a ujedno i najznačajnija za ovo istraživanje, jesu polifenoli. Općenito, polifenoli su kemijski izrazito heterogena skupina spojeva, ali se mogu podijeliti u dvije skupine: flavonoide i neflavonoide (Andersen i Markham, 2006). Značajniji spojevi za istraživanje kemijskog sastava meda jesu flavonoidi pošto su u medu prisutni u većim

količinama od ostalih polifenolnih spojeva. Neki složeni polifenolni spojevi se u medu mogu transportirati na način da pčele tijekom sakupljanja nektara s raznih biljaka u nektaru prenesu i određenu količinu takvih polifenola. Prema novijim izvorima istraživanja (Alvarez – Suarez i sur., 2012) u medu se mogu naći neki od sljedećih polifenolnih spojeva: vanilinska i kafeinska kiselina, ferulinska kiselina, kvercetin, galangin, hesperetin i mnogi drugi. Pošto se određena količina polifenola u medu prenese u isti tijekom proizvodnje, isti spojevi mogu služiti kao tzv. cvjetni markeri prema kojima se može odrediti izvor meda (da Silva i sur., 2016). Poznato je da polifenoli mogu povoljno djelovati na zdravlje čovjeka zahvaljujući svojoj strukturi zbog koje se ponašaju kao antioksidansi. Antioksidacijsku ulogu imaju zbog sposobnosti da "čiste" organizam od slobodnih radikala, iznimno reaktivnih spojeva koji mogu nanijeti štetu važnim makromolekulama (Cianciosi i sur., 2018). Uz slobodne radikale povezuje se pojam oksidativnog stresa koji označava neravnotežu između slobodnih radikala u tijelu i prisutnih antioksidanasa. Slobodni radikali mogu nastati tijekom različitih procesa u čovjeka, a najčešći izvor istih je mitohondrij koji u procesu stvaranja energije otpušta nesparene elektrone visoke energije (Gagné, 2014). Kao rezultat oksidativnog stresa pojavljuju se oštećenja makromolekula (DNA, proteina i masti) što uzrokuje citotoksičnost (Slika 2), genotoksičnost pa čak i kancerogeni učinak u slučaju da mutirane stanice proliferiraju (Gagné, 2014). Polifenoli stabiliziraju slobodne radikale na način da im doniraju svoj vodik (sa svoje hidroksilne grupe) prilikom čega nastaju stabilnije i manje toksične molekule. Na temelju toga se tvrdi da su aktivniji oni polifenoli koji imaju više hidroksilnih grupa (Rice-Evans i Miller, 1996).



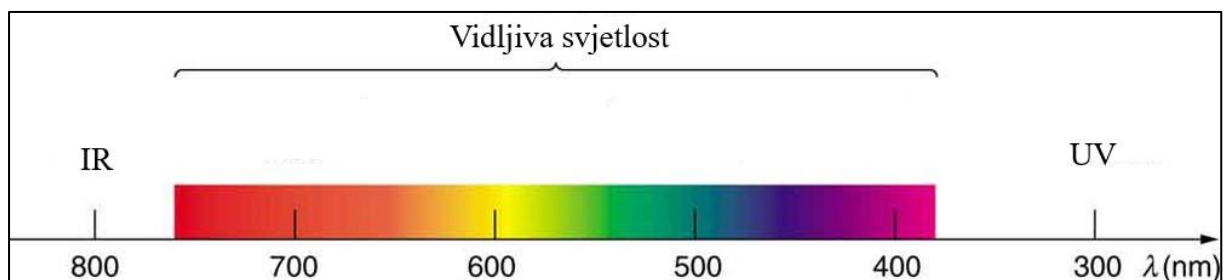
Slika 2. Djelovanje slobodnih radikala na stanice (Anonymous 2, 2018)

2.1.3. Patvorenje meda

Zbog visoke cijene med je posebice danas namirnica koja se sve češće patvori. Isto tako povećano zagađenje okoliša utjecalo je na smanjenje populacija medonosnih pčela na globalnoj razini što je uzrokovalo smanjenu proizvodnju meda (Naila i sur., 2018). Načini patvorenja meda mogu se podijeliti na direktne i indirektne. Pod direktne načine patvorenja meda podrazumijeva se dodavanje tvari za patvorenje u med, dok se kod indirektnog načina radi o hranjenju pčela medom, industrijskim šećerima te raznim kemikalijama (Naila i sur., 2018). Tvari koje se dodaju medu, a pripadaju direktnom načinu patvorenja su škrobni (kukuruzni) sirup, invertni sirup (sirup koji sadrži glukozu i fruktozu) te dodatak jeftinijeg, manje kvalitetnijeg meda (Ruiz-Navajas i sur., 2011). Pošto su tvari za patvorenje ujedno i karakteristični sastojci meda patvorenje je teško identificirati, a posebice patvorenje indirektnim načinom gdje se utječe na pčele i proizvodnju samog meda.

2.2. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

Ljudsko oko se na neki način ponaša kao spektrometar analizirajući reflektiranu svjetlost od čvrste površine ili svjetlost koja prolazi kroz tekućine koju konačno percipiramo kao određenu boju. Čovjek zapravo može prepoznati samo dio sunčeve svjetlosti budući da se ista sastoji od vidljivog dijela spektra, ultraljubičastog (UV) i infracrvenog (IR) dijela spektra (Slika 3). Elektromagnetsko zračenje koje percipiramo kao svjetlost ima pripisana svojstva vala, a dva najznačajnija svojstva vala su valna duljina i frekvencija. Valna duljina definira se kao udaljenost između dva susjedna brijega ili dola i najčešće se izražava u nanometrima (nm) dok frekvencija opisuje broj ciklusa vala u vremenskom razdoblju izraženom u hercima (Hz).



Slika 3. Dio spektra elektromagnetskog zračenja (Anonymous 3, 2017)

Pri kontaktu elektromagnetskog (EM) zračenja i nekog materijala, određeni dio zračenja materijal apsorbira dok se drugi dio reflektira o površinu istoga. Činjenica da određena tvar može apsorbirati zračenje tih valnih duljina interesantna je za znanstvenike u smislu

proučavanja kemijskih spojeva koji imaju tu sposobnost i iz kojeg razloga neki spojevi to mogu dok drugi nisu u mogućnosti. Za početak treba spomenuti na koji način molekule mogu apsorbirati zračenje. Kada se molekula izloži elektromagnetskom zračenju, apsorbirat će zračenje preuzimajući energiju zračenja ($E = h \cdot \nu$) što će posljedično uzrokovati prijelaz elektrona. Elektroni pobuđeni apsorbiranom energijom prijeći će iz najviše popunjene molekulske orbitale (eng. *Highest occupied molecular orbital*, HOMO) u najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (eng. *Lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO). Elektroni koji su najviše zaslužni za apsorpciju zračenja u polifenolima jesu tzv. π -elektroni koji su uključeni u nezasićene veze ugljikovodika. Osim njih, apsorpciji mogu pridonijeti i n-elektroni koji se ponašaju kao nevezni elektroni u atomima s neveznim elektronskim parovima (npr. kisik, dušik itd.). Dio molekule koji može apsorbirati takvo zračenje zove se kromofor. U ovom području važno je još dodati Lambert – Beerov zakon (jednadžba 1) (Nawrocka i Lamorska, 2013) prema kojemu je definirana apsorpcija zračenja, a koji glasi:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad [1]$$

gdje je: A – apsorpcija; I_0 – intenzitet ulazne zrake; I – intenzitet zrake nakon prolaska kroz uzorak; ε – molarni apsorpcijski koeficijent; c – koncentracija; l – debljina kivete.

2.2.1. Primjena UV-VIS spektroskopije u analizi patvorenja hrane

Danas se sve češće pokušava implementirati UV-VIS spektroskopija u analize patvorenja hrane zbog svoje jednostavnosti izvedbe i niske cijene. Jedna od primjena koja se pokazala uspješnom u laboratorijskom istraživanju jest kod identifikacije patvorenja pržene mljevene kave (Souto i sur., 2015). Točnije, UV-VIS spektroskopija (područje od $\lambda = 239$ do 405 nm) u kombinaciji s kemometrijskim modelom se pokazala uspješna u identifikaciji ostataka ljusaka i ostalih dijelova zrna kave u ekstraktima pripremljenim u toploj vodi.

Razlike između prirodne melase šipka i komercijalne te sirupa od datulja u jednom od istraživanja identificirane su pomoću UV-VIS spektroskopije (El Darra i sur., 2017). Razlike između navedenih melasa i sirupa ustanovljene su prema apsorpciji pri $\lambda = 280$ nm gdje su prirodne melase pokazale puno veću apsorpciju od komercijalnih melasa šipka i sirupa od datulja.

Perspektivna uloga UV-VIS spektroskopije pronađena je i u identifikaciji umjetnih bojila u raznim začinima (Di Anibal i sur., 2014). Za istraživanje su korišteni začinska paprika i čili prah u smjesama s umjetnim bojilima Sudan 1 i kombinacijom bojila Sudan 1 i Sudan 4.

Prisutnost navedenih bojila u uzorcima uspješno je identificirana i to u koncentracijama koje su komercijalno korisne. Ovo istraživanje pokazuje potencijalno korištenje UV-VIS spektroskopije kao brze i jeftine metode za provođenje ovakvih analiza, a posebice je korisno zbog toga što metaboliziranjem navedenih bojila u tijelu nastaju toksični produkti.

2.3. KEMOMETRIJA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Zbog složenosti laboratorijskih eksperimenata čije je rezultate sve teže analizirati klasičnim statističkim metodama, razvile su se novije, multivarijantne metode koje se podrazumijevaju pod pojmom kemometrije. Kemometrija kao znanstvena disciplina definira se kao povezivanje mjerenja na kemijskim sustavima odnosno procesima u organizirani sustav uz korištenje matematičkih i/ili statističkih metoda (Gad i sur., 2012). U prehrambenoj industriji dosad se primjenjuje u svrhu uočavanja sličnosti odnosno razlika među uzorcima ili radi prikazivanja uzoraka u dvo- ili trodimenzionalnom sustavu na temelju raznih karakteristika uzoraka (Granato i sur., 2017). Zbog potreba ovog istraživanja korištene su sljedeće tri metode koje će biti opisane u nastavku teksta:

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

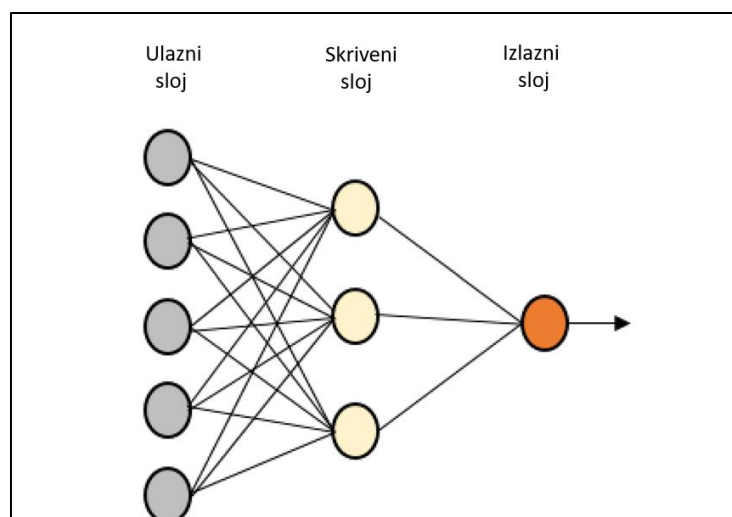
2.3.1. Analiza glavnih komponentata (PCA)

Analiza glavnih komponentata se ubraja u diskriminantne odnosno identifikacijske metode pomoću kojih se identificiraju uzorci podataka (skup podataka koji slijedi određeni niz) koji se kao takvi ne bi vidjeli *a priori* (Gad i sur., 2012). Sama analiza temelji se na analizi velikog skupa podataka kroz mali broj faktora odnosno glavnih komponentata (PC, eng. *Principal Component*) koje se koriste za vizualni pregled analize. Svaki faktor predstavlja linearnu kombinaciju originalnih podataka zadržavajući određenu korelaciju između podataka, a pojedini faktori međusobno su statistički neovisni (Granato i sur., 2017). Izračunati faktori sadrže koliko je moguće varijacija podataka iz izvornih podataka na način da faktor 1 objašnjava više varijacija podataka nego faktor 2, a faktor 2 više no faktor 3 itd. Iz tog razloga samo nekoliko faktora objašnjava varijacije velikog broja izvornih podataka (Granato i sur., 2017).

Analiza glavnih komponenata koristi se redovito za analizu većih skupova eksperimentalnih podataka, a u nastavku teksta navest će se nekoliko istraživanja gdje je primijenjena PCA analiza podataka. U istraživanju gdje su znanstvenici analizirali polifenolni sastav guave korištena je analiza glavnih komponenata uz neuronske mreže (dos Santos i sur., 2017). Razlog korištenja ove analize je velik broj uzoraka guave (čak 96 uzoraka) i količina analiziranih polifenola koja iznosi 13. Ukratko, znanstvenici su ekstrahirali fenolne spojeve koristeći smjese različitih koncentracija etanola i metanola nakon čega su polifenoli identificirani pomoću HPLC-a. Iako su dvije glavne komponente objasnile svega 60 % od varijabilnosti podataka, jasna separacija se vidi na 2D-grafičkom prikazu. Za tematiku ovog rada važnija je primjena PCA analize u istraživanjima patvorenja hrane pa se stoga dobar primjer može naći u identifikaciji patvorenja masti u pekarskim proizvodima (Üçüncüoğlu i sur., 2013). Analizirani su spektri uzoraka maslaca, margarina i smjese navedenih (u udjelima 50:50) pomoću NIR-a i Raman spektroskopije nakon čega je iz pekarskog proizvoda (torta) ekstrahirana masna frakcija čiji je spektar analiziran. Analiza glavnih komponenata pokazala se uspješnom u razdvajanju uzoraka gdje je dodan čisti maslac i onih u kojima je bila smjesa maslaca i margarina.

2.3.2. Umjetne neuronske mreže (ANN)

Prilikom razvijanja strojeva koji bi izvršavali kompleksne zadatke znanstvenici su za razvoj mehanizama inteligencije koristili i određene karakteristike ljudskog mozga. Upravo zbog toga ovaj sustav kontrole naziva se neuronskim mrežama jer strukturno slični neuronskim mrežama ljudskog mozga (Slika 4). Umjetne neuronske mreže koriste se za rješavanje problema u slučajevima kada analitičke metode zakažu ili ih je teško primijeniti za konkretni problem (Funes i sur., 2015). Osnovni princip funkcioniranja neuronskih mreža je razvijanje matematičkih algoritama koji neuronskoj mreži daju sposobnost učenja oponašajući procesiranje podataka i prikupljanje znanja ljudskog mozga (Funes i sur., 2015).



Slika 4. Osnovna struktura umjetne neuronske mreže (Granato i sur., 2018)

Neuronska mreža organizirana je pomoću linija koje povezuju pojedine slojeve, a koje se podešavaju kroz postupak treninga neuronske mreže što može rezultirati učinkovitim umjetnim neuronskim mrežama za primjerice predikciju izlaznog sloja (vrijednosti) (Jiménez i sur., 2009), aproksimaciju funkcije (Funes i sur., 2015) i neke druge postupke. Procesom treninga neuronskih mreža zapravo se određuje "težina" odnosno važnost pojedinih veza između slojeva.

Umjetne neuronske mreže našle su nekoliko primjena u industriji u ulogama kao što su kontrola, praćenje i modeliranje proizvodnog procesa. Jedan od uspješnih primjera implementacije neuronskih mreža jest u stvaranju dinamičkog modela miješanja tijesta gdje se pomoću neuronskih mreža predviđa temperatura tijesta i primijenjena sila (Lamrini i sur., 2012).

U već spomenutom radu (Jiménez i sur., 2009) neuronske mreže korištene su kao alat za predikciju određenih izlaznih parametara važnih za proces proizvodnje maslinovog ulja kao što je udio vode u krajnjem proizvodu. Za neke od parametara primjena ovog alata pokazala se zadovoljavajućom i učinkovitom uz zaključak istraživača da bi se zbog složenosti procesa trebalo provoditi kontinuirano učenje neuronske mreže kako bi se poboljšala sposobnost predikcije parametara.

Upotreba umjetnih neuronskih mreža pokazala se učinkovitijom metodom od MLR-a (eng. *Multiple linear regression*) pri predikciji parametara kvalitete kod skladištenja rezane zelene paprike (Meng i sur., 2012). Parametri kvalitete koji su praćeni jesu gubitak vode,

čvrstoća, udio vitamina C i količina žute boje. Korištenjem neuronskih mreža istraživači su ostvarili bolje odnose između ulaznog (uvjeti skladištenja) i izlaznog sloja (parametri kvalitete) (Tablica 1).

Tablica 1. Predviđene i izmjerene vrijednosti gubitka vode i čvrstoće tijekom skladištenja zelene paprike (Meng i sur., 2012)

Uzorak	Gubitak vode (%)		Čvrstoća (N)	
	Izmjerena vrijednost	Predviđena vrijednost (ANN)	Izmjerena vrijednost	Predviđena vrijednost (ANN)
1	0,40	0,44	17,66	17,60
2	0,38	0,36	15,24	15,17
3	0,64	0,68	15,13	15,08
4	1,52	1,46	14,63	14,59
5	1,57	1,55	16,55	16,50

Kad se uzmu u obzir postojeća istraživanja na temu primjene umjetnih neuronskih mreža može se zaključiti da je zasad primjena istih ograničena s obzirom na složenost procesa za koji se koristi. Primjerice, prethodno navedeni rezultati su prilično dobri s time da valja primijetiti kako je u tom slučaju (Meng i sur., 2012) u pitanju prilično jednostavan proces (praćenje skladištenja).

2.3.3. Analiza najmanjih kvadrata (PLS)

Jedna od obećavajućih multivarijantnih statističkih metoda je metoda najmanjih kvadrata koju je razvio Herman Wold. Korištenje u prirodnim znanostima sve je češće i to u ulozi kalibracijskog modela za predikciju raznih varijabli, a u tom području se pokazala uspješnijom od ostalih (Lorber i sur., 1987). Metoda najmanjih kvadrata je bilinearna metoda koja izvorne X podatke projicira u manji broj osnovnih ili "latentnih" varijabli koje se zovu PLS komponente. Y podaci se koriste za procjenu latentnih varijabli kako bi se osiguralo da su prve PLS komponente najrelevantnije za predikciju Y varijabli. Zbog toga je interpretacija povezanosti X i Y podataka pojednostavljena jer je koncentrirana na najmanji mogući broj PLS komponenti (Mouazen i Al-Walaan, 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U radu su korišteni uzorci meda bagrema (15 uzoraka) iz sezone 2018., donirani od strane članova Pčelarske udruge Krapina (Slika 5). Uz 15 izvornih medova korišteni su kukuruzni (Country Life, Francuska) i glukozni sirup (Food Colours, Poljska) kao moguća sredstva za patvorenje meda, a dodavani su u udjelima od 10 do 90 %.



Slika 5. Izvorni medovi korišteni u istraživanju

3.2. OPREMA

Spektrofotometrijska mjerenja provedena su na uređaju Biochrom Libra S11, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Prilikom priprema vodenih otopina (30 %-tne otopine) čistih medova i smjesa čistih medova i kukuruznog odnosno glukoznog sirupa korištena je analitička vaga Sartorius TE214S (Njemačka).

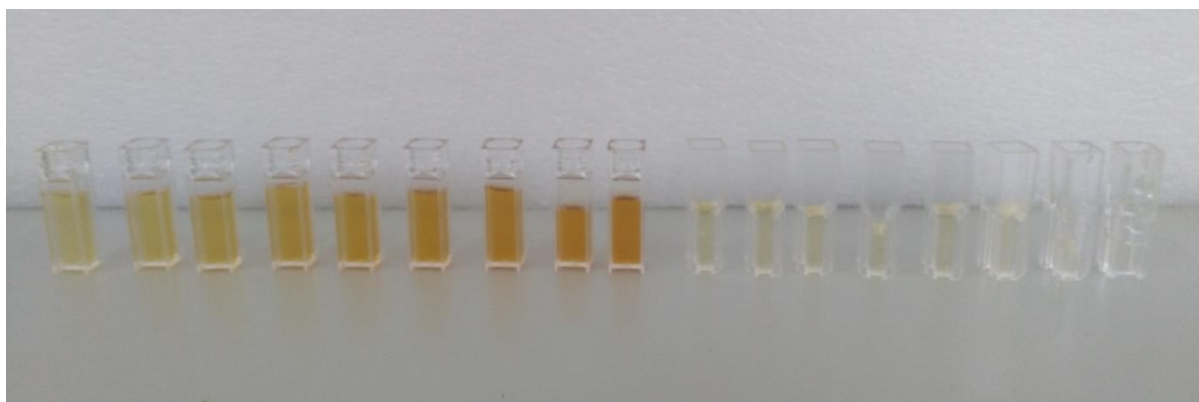
Osim korištenja analitičke vage tijekom pripreme vodenih otopina zbog praktičnosti i lakšeg rukovanja čistim medovima odnosno navedenim smjesama korištena je sušara INKO ST60 (Hrvatska).

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprema uzoraka

Uzorci medova su pripremani na dva načina: za snimanje UV-VIS spektara i za kemijske analize. Otopine su prema potrebi zagrijavane radi lakšeg prebacivanja smjesa u kivete odnosno Eppendorf epruvete.

- a) Čisti medovi miješani su s glukoznim odnosno kukuruznim sirupom koji su dodavani u udjelima od 10 do 90 % nakon čega su dobivene smjese prebačene u plastične kivete namijenjene za mjerenja na spektrofotometru (Slika 6). Ukupan broj pripremljenih uzoraka jest 285 (15 izvornih medova + svaki izvorni med pomiješan s 18 koncentracija tvari za patvorenje).
- b) Za potrebe kemijskih analiza iz smjesa čistih medova i sirupa pripremljene su 30 % vodene otopine istih u Eppendorf epruvetama od $V = 2$ mL.
- c) Radi uklanjanja mogućih interferencija glavnih šećera u medu pri analitičkim metodama napravljen je šećerni analog meda koji se sastoji od 40 % fruktoze, 30 % glukoze, 8 % maltoze i 2 % saharoze.



Slika 6. Vlastita fotografija uzoraka pripremljenih za spektrofotometrijsko mjerenje u plastičnim kivetama

3.3.2. Snimanje UV-VIS spektara

UV-VIS spektri snimani su na spektrofotometru (Biochrom Libra S11) u rasponu valnih duljina od $\lambda = 325$ do 900 nm uz razmak između mjerenja od 1 nm. Pripremljeni uzorci (čisti medovi i

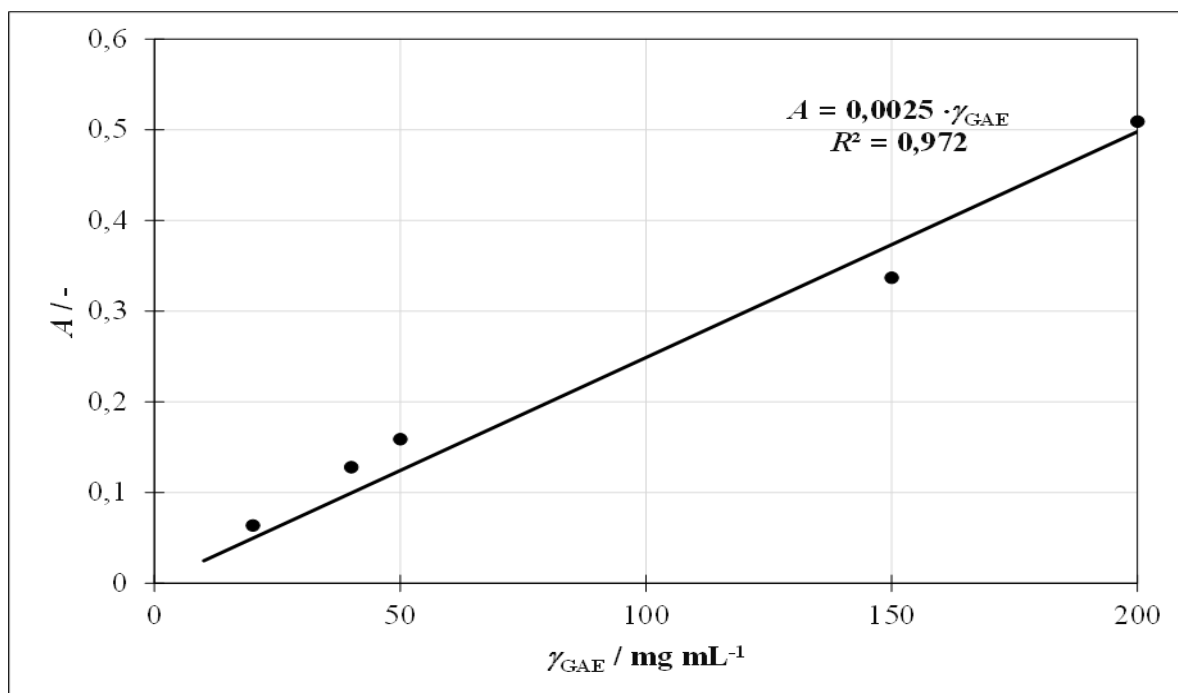
smjese s patvorinama) mjereni su na spektrofotometru (Biochrom Libra S11) u plastičnim kivetama te su za svaki uzorak provedena tri mjerenja.

3.3.3. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola Folin – Ciocalteu metodom

Koncentracija ukupnih fenola određivana je modificiranom Folin – Ciocalteu metodom (Beratta i sur., 2005) prilikom čega su korišteni uzorci vodenih otopina čistih medova i smjesa s patvorinama (način pripreme opisan u odlomku b) Pripreme uzoraka). Iz pripremljenih vodenih otopina pipetirano je $V = 100 \mu\text{L}$ otopine koja odgovara masi svježeg meda od 10 mg koja se dodaje u $V = 1 \text{ mL}$ 10 %-tne otopine Folin – Ciocalteu reagensa, uz dodatak $V = 1 \text{ mL}$ 7,5 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Za svaki uzorak, mjerenja su rađena u duplikatima. Smjesa pripremljena na ovaj način miješa se na vortexu dvije minute nakon čega su pripremljeni uzorci odloženi na tamno mjesto kroz $t = 30 \text{ min}$. Nakon $t = 30 \text{ min}$ uzorcima se mjeri absorbancija u staklenoj kiveti na valnoj duljini od $\lambda = 760 \text{ nm}$.

Slijepa proba za Folin – Ciocalteu metodu umjesto meda sadrži šećerni analog meda (priprema navedena u c) odlomku Pripreme uzoraka).

Za računanje koncentracije ukupnih polifenola u uzorcima izrađen je i baždarni pravac galne kiseline u koncentracijama od $\gamma_{\text{GAE}} = 0$ do 200 mg mL^{-1} (Slika 7). Pomoću jednadžbe dobivenog baždarnog pravca rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline po kg meda.



Slika 7. Baždarna krivulja za određivanje ukupnih polifenola

3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost određivana DPPH metodom zasnovana je na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (pri $\lambda = 515$ nm), ali u prisutnosti elektron donora (antioksidansi, polifenoli u uzorku) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona i dolazi do promjene ljubičaste boje u žutu boju. Kod DPPH metode mjeri se promjena apsorbanције reakcijske otopine u određenom vremenu u odnosu na isti učinak postignut poznatim reducensom (Trolox).

Iz pripremljenih vodenih otopina medova (priprema opisana u b) odlomku Pripreme uzoraka) otpipetira se $V = 200$ μL otopine i pomiješa se s $V = 2$ mL metanolne otopine DPPH koncentracije $c = 0,00006$ mol L⁻¹. Iz svake izvorne otopine rađene su dvije paralele. Dobivene otopine se homogeniziraju na vortexu kroz $t = 1$ min nakon čega stoje na tamnom mjestu $t = 1$ h. Mjerenje apsorbanције provodi se na valnoj duljini od $\lambda = 515$ nm u staklenoj kivetici.

Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema sljedećoj formuli (Jednadžba 2):

$$I = \frac{(A_B - A_S)}{A_B} \cdot 100 \quad [2]$$

gdje su: I – postotak inhibicije DPPH radikala; A_B – apsorbancija kontrolnog uzorka u vremenu $t = 0$; A_S – apsorbancija ispitivanog uzorka nakon vremena reakcije od $t = 1$ h (Bertoncelj i sur., 2007).

3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

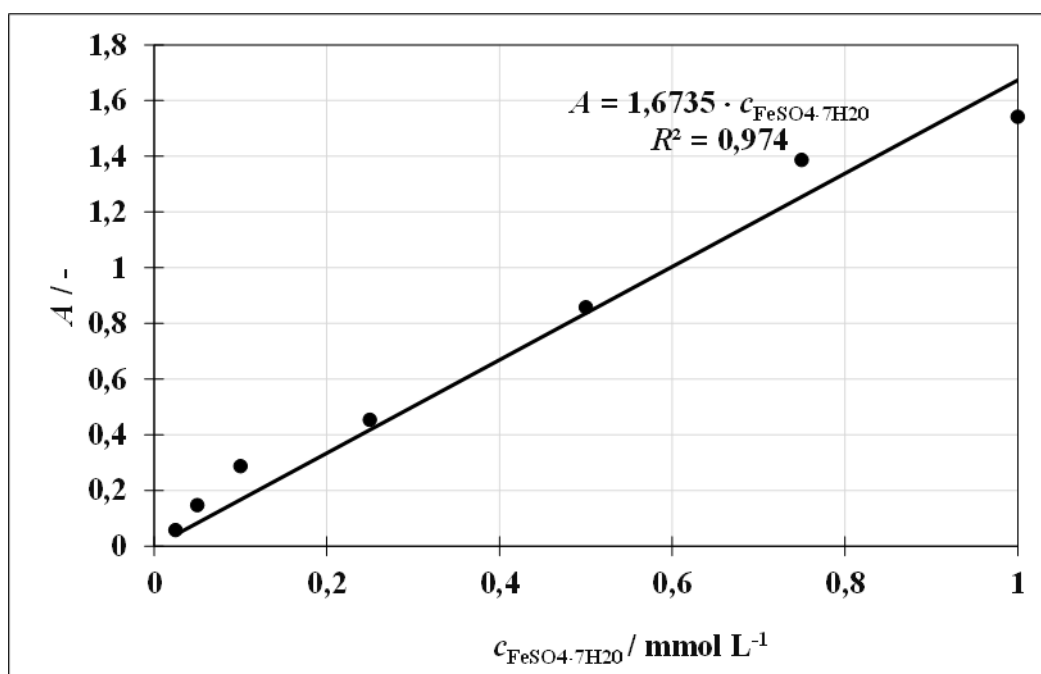
Antioksidacijska aktivnost određivana FRAP metodom temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo (III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje (24). Za pripremu FRAP reagensa pripremi se acetatni pufer koncentracije $c = 0,3$ mol L⁻¹, otopina 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) koncentracije $c = 10$ mmol L⁻¹ i vodena otopina željezo (III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) koncentracije $c = 20$ mmol L⁻¹. Otopine se miješaju u omjeru 10 : 1 : 1 i to u navedenim volumenima:

- $V = 25$ mL acetatnog pufera koncentracije $c = 0,3$ mol L⁻¹
- $V = 2,5$ mL otopine TPTZ-a koncentracije $c = 10$ mmol L⁻¹
- $V = 2,5$ mL vodene otopine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ koncentracije $c = 20$ mmol L⁻¹.

Otopine za mjerenje apsorbancije pripremljene su na način da se $V = 50 \mu\text{L}$ uzorka (pripremljen prema opisu u b) odlomku Pripreme uzoraka) pomiješa s $V = 450 \mu\text{L}$ pripremljenog FRAP reagensa prethodno zagrijanog na $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. Iz svake izvorne otopine rađene su dvije paralele. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od $\lambda = 593 \text{ nm}$ nakon što uzorci odstoje $t = 10 \text{ min}$ na tamnom mjestu.

Slijepa proba za FRAP metodu pripremljena je od šećernog analoga meda (priprema opisana u c) odlomku Pripreme uzoraka) i FRAP reagensa.

Baždarni pravac $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u koncentracijama od $c = 0$ do 1 mmol L^{-1} izrađen je za računanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka (Slika 8), a rezultat je izražen kao mmol ekvivalenta $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 %-tne vodene otopine meda (Benzie i Strain, 1996).



Slika 8. Baždarna krivulja za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

3.3.6. Statistička analiza i modeliranje

- Osnovna statistička analiza dobivenih rezultata provedena je u MS Excel 19 (Microsoft, SAD) što obuhvaća grupiranje podataka u skupine prema vrsti i količini dodane patvorine te računanje srednje vrijednosti za rezultate UV-VIS spektara (provedena su 3 mjerenja za svaki uzorak).

Isti postupak korišten je za obradu rezultata kemijskih analiza uz dodatak izrade baždarnih pravaca koji su korišteni za izračunavanje konačnih rezultata (Folin – Ciocalteu, FRAP i DPPH metoda).

- Nakon osnovne statističke obrade rezultata korišten je program TIBCO™ Statistica 13.0. (TIBCO Software Inc., SAD) u kome su rađena 2 kemometrijska modela: Analiza glavnih komponentata i Umjetne neuronske mreže. Teoretska pozadina ovih modela pojašnjena je u Teoretskom dijelu rada, a za potrebe ovog poglavlja navest će se osnovne i najvažnije činjenice.

Analiza glavnih komponentata (eng. PCA) danas se sve češće koristi kao primarna obrada podataka (u ulozi redukcije broja podataka) kod istraživanja koja sadrže veći broj mjerenja. Kao rezultat PCA metode mogu se prepoznati određeni uzorci podataka, sličnosti između istih itd. Temelji se na stvaranju glavnih komponentata koje predstavljaju linearnu kombinaciju izvornih podataka zadržavajući određenu korelaciju između podataka. Rezultati analize glavnih komponentata prikazuju se i grafičkim, 2D prikazom.

- Umjetne neuronske mreže (ANN) u ovom istraživanju se koriste za predikciju udjela patvorine u uzorku i za analizirana kemijska svojstva. Višeslojne neuronske mreže izgrađene su od neurona grupiranih u pojedine slojeve koji se označavaju brojevima od 0 do n gdje nulti sloj uključuje ulazne veličine u mrežu, a n-ti sloj označava izlazne veličine mreže. Slojevi koji se nalaze između navedenih nazivaju se skrivenim slojevima. Podaci koji su obuhvaćeni u ulazni sloj neuronske mreže su faktori analize glavnih komponentata i to prvih pet faktora jer oni podrazumijevaju značajnu korelaciju između izvornih podataka. Izlazni sloj neuronske mreže označava udio patvorine u uzorku odnosno analizirana kemijska svojstva (udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost). Za učenje, testiranje i validaciju mreže važan je omjer podataka koji se koristi za pojedinu radnju, a u ovom radu je taj omjer postavljen na 70:15:15. Optimalna neuronska mreža odabrana je na temelju linearnog korelacijskog koeficijenta R^2 (što bliži 1), srednjeg kvadratnog odstupanja RMSE (eng. *Root Mean Square Error*) te na temelju što manjeg broja neurona u skrivenom sloju.
- Metoda najmanjih kvadrata rađena je u programskom paketu Unsrcambler X 10.4 (CAMO Software AS, Norveška), a korištene su vrijednosti iz snimljenih UV-VIS

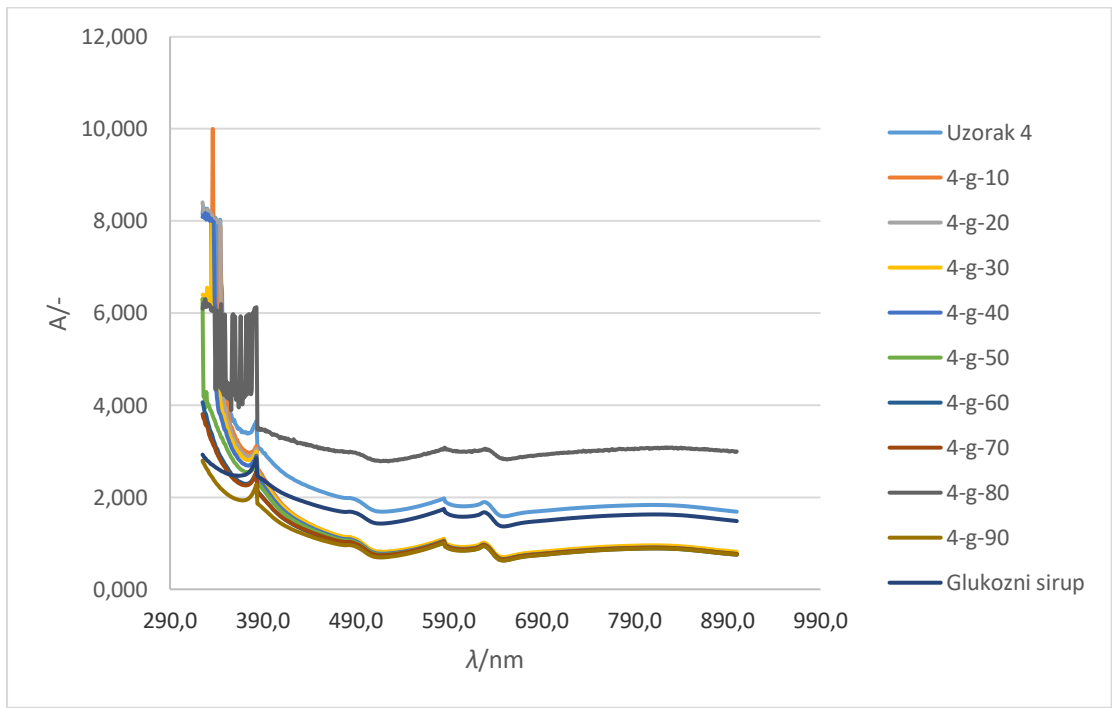
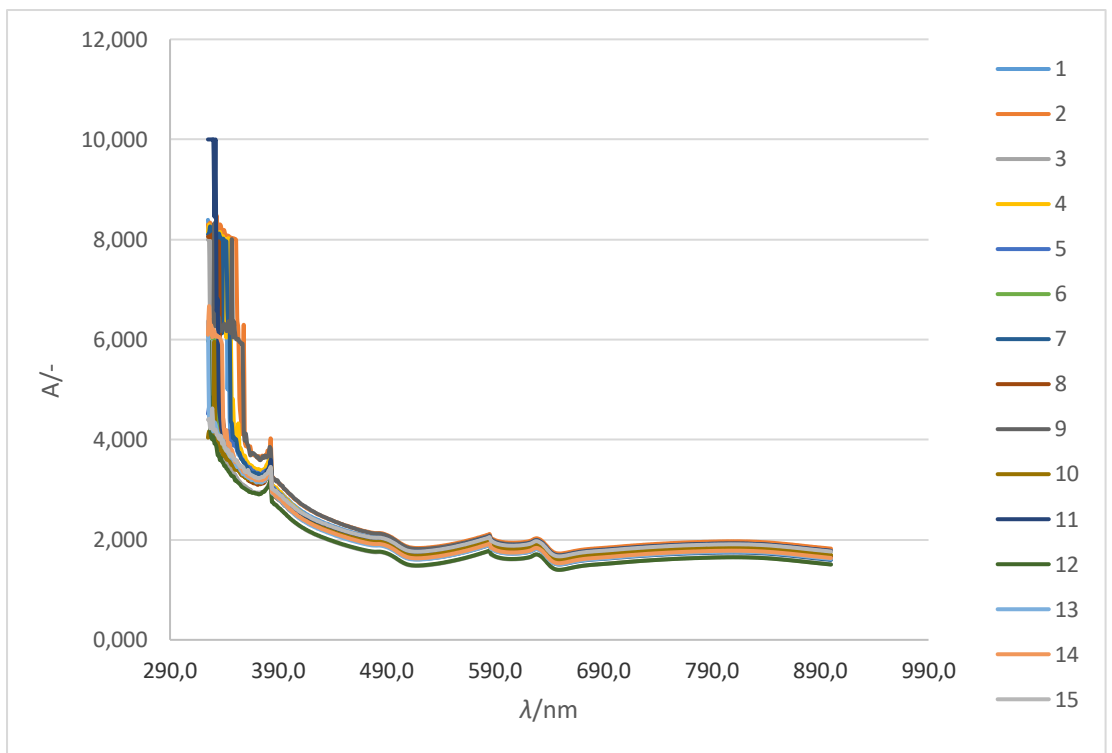
spektara. Svrha korištenja je također razvoj modela koji bi pretpostavljao udio patvorine u uzorku meda. Podaci spektara nisu bili predprocesirani prije analiza. Kvaliteta i reprezentativnost modela procijenjena je na temelju koeficijenta determinacije R^2 za koji je također što bolje da bude bliže vrijednosti 1,0.

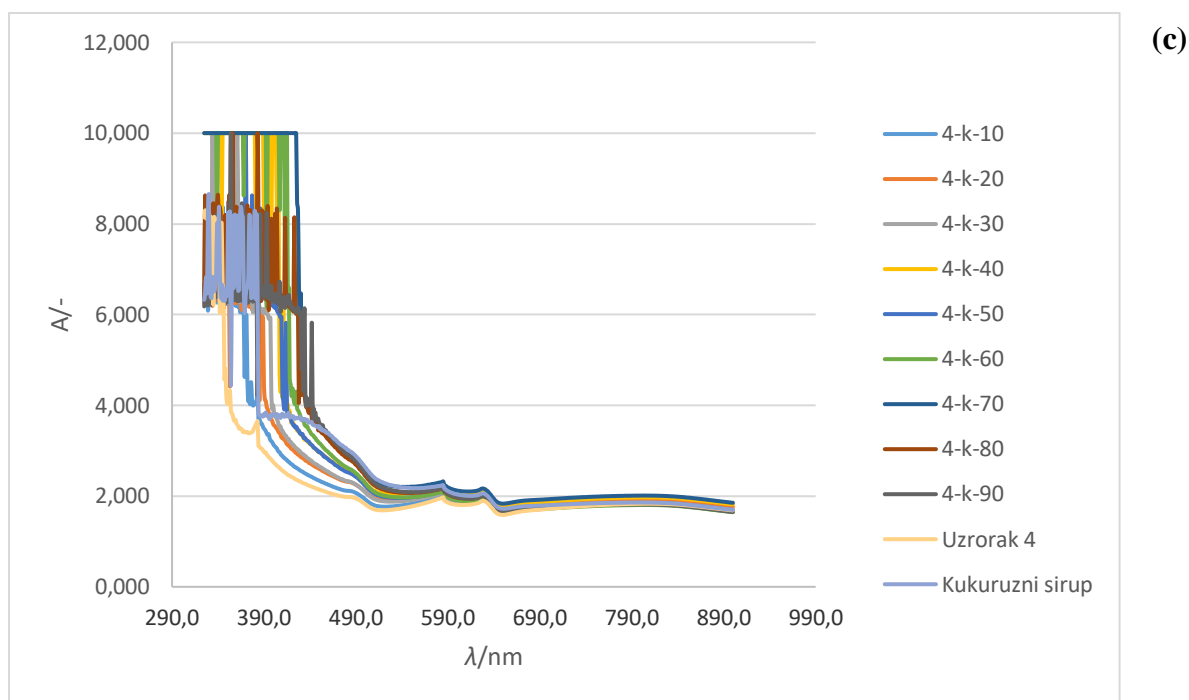
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati eksperimentalnog rada počevši od kemijskih analiza: rezultati za ukupne polifenole koristeći Folin – Ciocalteu metodu, rezultati za antioksidacijsku aktivnost koristeći dvije različite metode, DPPH i FRAP. Nakon toga slijede rezultati analize glavnih komponenata (PCA) čiji grafički prikazi služe za potencijalnu klasifikaciju patvorenih uzoraka, a pet prvih glavnih komponenti korišteno je za ulazni sloj pri modeliranju neuronskih mreža. Najprikladnije neuronske mreže za svaki od uzoraka (smjese izvornih medova i dodanih sirupa) odabrane su na temelju koeficijenata determinacije i broja neurona u skrivenom sloju.

4.1. UV-VIS SPEKTRI IZVORNIH MEDOVA I PRIPREMLJENIH PATVORINA

U ovom poglavlju prikazani su grafički prikazi spektara izvornih medova (Slika 9a), uzoraka meda patvorenih glukoznim (Slika 9b) i kukuruznim sirupom (Slika 9c). Spektri izvornih medova izgledaju poprilično jednako na temelju čega se može zaključiti da su podjednakog kemijskog sastava zbog približnih vrijednosti apsorbancija pri istim valnim duljinama. Mogu se razlikovati dva manja pika na približno $\lambda = 590$ nm i 640 nm, a osim toga visoke vrijednosti apsorbancija pri nižim valnim duljinama (do 390 nm). Spektri uzoraka patvorenih kukuruznim sirupom izgledaju nešto drukčije. Konkretno, spektar uzorka br. 4 i kukuruznog sirupa pokazuje visoke vrijednosti apsorbancija u početnom dijelu spektra, čak do približno 450 nm. Spektar uzorka br. 4 patvorenog glukoznim sirupom u istom, početnom dijelu spektra pokazuje dosta niže vrijednosti. Oba spektra sadrže ista dva pika kao i izvorni medovi pri istim valnim duljinama.





Slika 9. Grafički prikaz spektara (a) izvornih medova (b) uzorka br. 4 patvorenog glukoznim sirupom (c) uzorka br. 4 patvorenog kukuruznim sirupom

Analiza glavnih komponenta rabljena je kao prva metoda za procesiranje podataka dobivenih snimanjem UV-VIS spektara. Podaci ubačeni u program TIBCO™ Statistica 13.0 su transponirani (naredba "Transpose") nakon čega je provedena analiza glavnih komponenti. Rezultati PCA analiza prikazani su odvojeno u dvije skupine, za medove patvorene glukoznim (Slika 10b) odnosno kukuruznim sirupom (Slika 10c) i za izvorne medove (Slika 10a). Za grafičke prikaze rezultata PCA analize korištena su prva dva faktora odnosno glavne komponente od kojih 1. faktor predstavlja x – vrijednosti, a 2. faktor predstavlja y – vrijednosti.

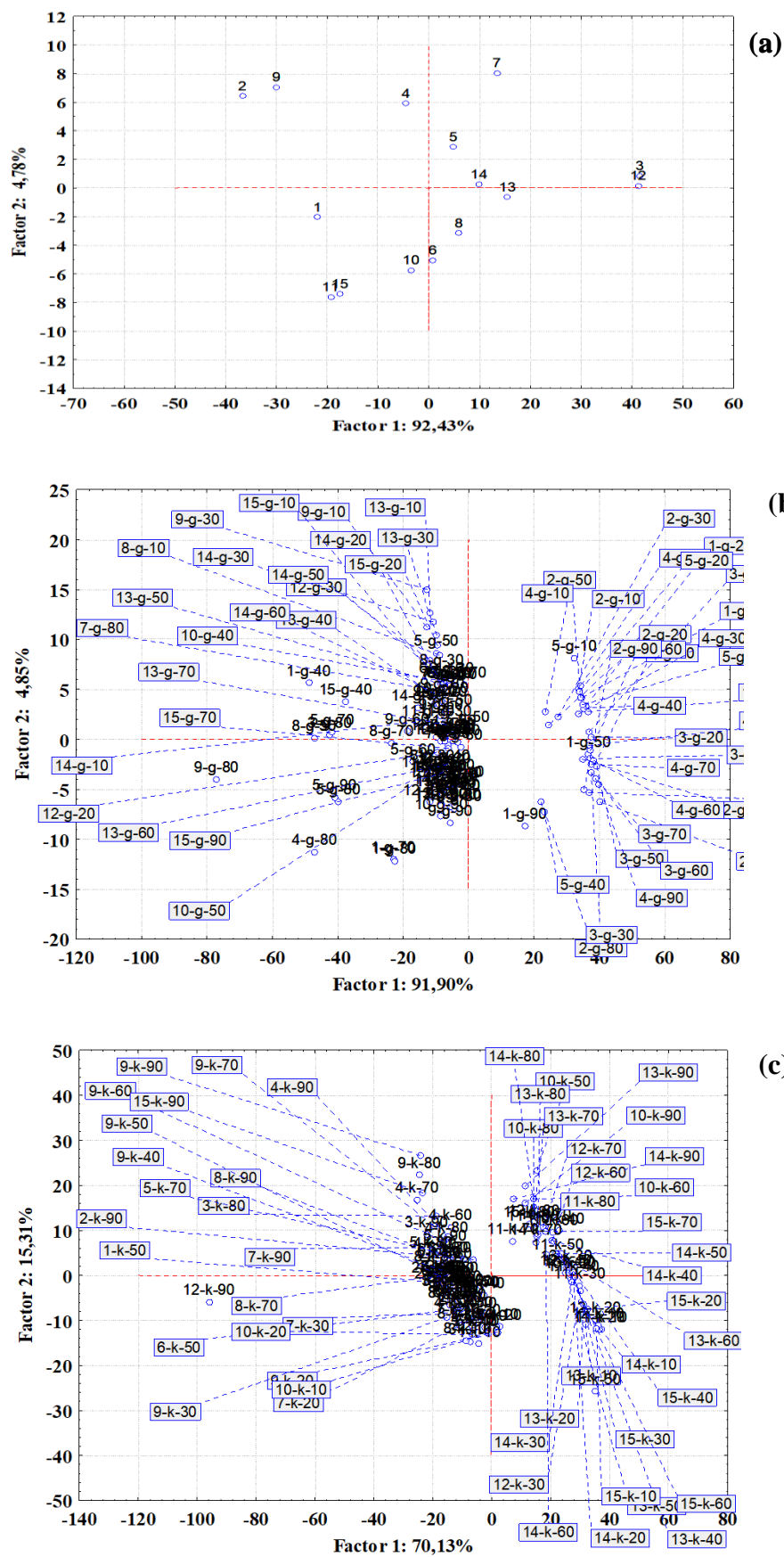
Rezultati PCA analize za izvorne medove daju raspodjelu uzoraka izvornih medova prikazanih na Slici 10a. Na temelju rezultata spektara za uzorke mogu se grupirati u nekoliko skupina kao primjerice uzorak 3 i 12 te 2 i 9. Uzorci u donjem dijelu koordinatnog sustava mogu se svrstati u jednu grupu (11, 5, 1, 10, 6 i 8) kao i uzorci u gornjem dijelu (4, 5, 7, 14 te 13).

Rezultati za uzorke patvorene glukoznim sirupom obuhvaćaju varijancu izvornih podataka od gotovo 97 %, a uzorci su ugrubo grupirani u dvije velike skupine u kojima su podijeljeni uzorci na način da se u lijevoj skupini nalaze patvoreni medovi od uzorka br. 7 pa nadalje dok su u desnoj skupini uzorci ispod 7, uz iznimke (Slika 10b). Osim dvije velike skupine dio rezultata "strši", ali također ne pokazuju određenu pravilnost pri grupiranju uzoraka. Napomena za

označavanje uzoraka: oznake uzoraka sastoje se od 3 oznake od kojih je prva broj uzorka izvornog meda (1 – 15), druga je oznaka patvorine ("g" za glukozni sirup i "k" za kukuruzni) i treća predstavlja udio patvorine u uzorku (10 – 90 %). Analogno tome su označeni uzorci patvoreni kukuruznim sirupom.

Varijanca izvornih podataka od otprilike 85 % obuhvaćena je rezultatima za uzorke patvorene kukuruznim sirupom (Slika 10c). Uzorci su također grupirani u dvije jako velike skupine sličnih vrijednosti faktora 1 i 2 kao kod uzoraka patvorenih glukoznim sirupom (Slika 10b). U lijevoj skupini se nalaze patvoreni uzorci od br. 1 do 10 dok su u desnoj skupini uzorci iznad 10. Rezultati za ove uzorke pokazuju manje pojedinačnih uzoraka izvan tih dvaju skupina, ali je prepoznavanje i klasificiranje pojedinačnih uzoraka još zahtjevnije od prethodnih rezultata.

Sveukupno gledano analiza glavnih komponenti ne prikazuje konkretne i jasno čitljive podatke o klasifikaciji patvorenih uzoraka, bilo kukuruznim ili glukoznim sirupom. Razlog tomu mogu biti veliki udjeli dodanih patvorina u uzorke medova (do 90 %) što je otežalo pripremu uzoraka pa je samim time moguće i otežano spektrofotometrijsko mjerenje.



Slika 10. Rezultati PCA analize UV-VIS spektara za (a) izvorne medove (b) uzorke patvorene glukoznim sirupom (c) uzorke patvorene kukuruznim sirupom

Analiza glavnih komponenti danas je sve češće u upotrebi, prvenstveno za predprocesiranje podataka, ali i za klasifikaciju uzoraka. Primjerice, u radu gdje je istraživana dodatak glukoznog sirupa u medove PCA se pokazala korisnom metodom za razlikovanje izvornih medova i onih patvorenih glukozom u udjelima od 12, 19 i 33 % (Mouazen i Al-Walaan, 2014). Za analizu su korišteni rezultati spektrofotometrijskih mjerenja u vidljivom i infracrvenom dijelu spektra. Pokazalo se i preklapanje uzoraka patvorenih malim udjelima glukoze (5 %).

Analiza glavnih komponenti uspješno je primijenjena i za klasifikaciju medova prema botaničkom podrijetlu uz korištenje rezultata elektronskog jezika (Major i sur., 2011). Iz grafičkog prikaza PCA rezultata uz faktore 1 i 2 (ukupna varijanca mjerenja el. jezika od 79,57 %) razlikuju se tri skupine uzoraka koje odgovaraju medovima bagrema, kestena i dinje. Povezano s time, rezultati umjetnih neuronskih mreža ne pokazuju nikakav gubitak u preciznosti određivanja pojedinih vrsta medova.

4.2. PLS MODELI ZA PREDIKCIJU UDJELA PATVORINE U MEDU NA TEMELJU UV-VIS SPEKTARA

Jedan od kalibracijskih metoda za mjerenja je kemometrijski model parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata. U nekim od istraživanja (Martelo – Vidal i Vazquez, 2014) može se naći teoretska pozadina metode najmanjih kvadrata kao i potrebni odnosno mogući postupci predprocesiranja podataka. Isti znanstvenici u navedenom radu PLS model predstavili su uspješnijim od regresije glavnih komponenti (eng. *Principal component regression*) pri analizi polifenola u crvenom vinu (korištena UV-VIS i NIR spektroskopija).

Rezultati dobiveni mjerenjem UV-VIS spektara (valne duljine $\lambda = 325$ do 900 nm) korišteni su za konstrukciju PLS modela. Podaci prethodno nisu procesirani. Za procjenu kvalitete i reprezentativnosti modela korišteni su sljedeći parametri:

- Koeficijent determinacije, R^2
- Standardna pogreška predikcije, SEP (eng. *Standard Error of Prediction*)
- Omjer standardne pogreške predikcije i standardne devijacije, RPD (eng. *Ratio of Standard Error of Prediction to Standard Deviation*)
- Korijen standardne kvadratne pogreške predikcije, RMSEP (eng. *Root Mean Square Errors of Prediction*).

Prema nekim istraživanjima (Chiang i sur., 20) kvaliteta kalibracijskog modela ocjenjuje se na temelju vrijednosti R^2 i RPD omjera pa se modeli klasificiraju kao izvrsni ($R^2 > 0,8$ i $RPD > 2$), srednje kvalitete ($0,50 < R^2 < 0,80$ i $1,4 < RPD < 2$) i neupotrebljivi ($R^2 < 0,50$ i $RPD < 1,4$).

Rezultati razvijenog PLS modela prikazani su u Tablici 2. Prema prethodno navedenoj klasifikaciji kvalitete modela može se zaključiti da većina PLS modela pripada u 1. skupinu po kvaliteti predikcije vrijednosti. Izuzev RPD vrijednosti za uzorak br. 2 patvoren glukoznim sirupom kod koje je očito došlo do pogreške zbog ogromne vrijednosti ($RPD = 43321,2376$), ostale RPD vrijednosti su jako dobre, a tek nekolicina je ispod 2,4. Najbolji model za predikciju udjela glukoznog sirupa u medu je onaj za uzorak br. 3 koji ima koeficijente korelacije za kalibraciju $R^2 = 0,9839$ i validaciju $R^2 = 0,9386$ uz RPD od 6,5521. Za kukuruzni sirup modeli su generalno nešto bolji, a kao najbolji ocijenjen je model za uzorak br. 2 s koeficijentima korelacije za kalibraciju od $R^2 = 0,9940$ i validaciju $R^2 = 0,9663$ uz malo manju RPD vrijednost koja iznosi 2,2910.

Tablica 2. PLS modeli za opis udjela dodane patvorine glukoznog i kukuruznog sirupa u medu na temelju UV-VIS spektara

Patvorine s glukoznim sirupom							
Uzorak	$R^2_{\text{kalibracija}}$	$R^2_{\text{validacija}}$	RMSE _{kalibracija}	RMSE _{validacija}	SEP	RMSEP	RPD
1	0,9916	0,8657	2,3128	9,4549	9,4756	9,4549	1,6587
2	0,8856	0,8233	9,1755	11,4082	11,6515	11,4083	43321,2376
3	0,9839	0,9386	3,1625	7,4953	7,5643	7,4954	6,5521
4	0,9727	0,9543	4,1266	5,5235	5,6377	5,5236	2,7350
5	0,8910	0,8785	8,6598	10,0963	10,2962	10,0964	11,6350
6	0,8974	0,7482	8,4964	13,5417	13,8728	13,5418	11,8555
7	0,8417	0,6247	10,1916	15,0918	15,3420	15,0919	19,0969
8	0,9606	0,8282	5,0536	10,1708	10,3597	10,1708	4,8526
9	0,9701	0,8909	4,2608	9,7505	9,3118	9,7507	6,7320
10	0,9836	0,9606	2,9411	4,8401	4,9385	4,8402	1,8269
11	0,9981	0,9655	1,0698	5,0764	5,1803	5,0765	0,8036
12	0,9732	0,9480	3,9778	5,8218	5,9344	5,8219	17,2145
13	0,9759	0,9311	3,5517	6,1778	6,3021	6,1780	3,4497
14	0,9951	0,9304	1,5948	7,2780	7,3478	7,2780	1,4698
15	0,9739	0,9325	4,0677	6,5439	6,6693	6,5440	3,8532
Patvorine s kukuruznim sirupom							
Uzorak	$R^2_{\text{kalibracija}}$	$R^2_{\text{validacija}}$	RMSE _{kalibracija}	RMSE _{validacija}	SEP	RMSEP	RPD
1	0,9939	0,9558	2,0017	5,2483	5,2449	5,2484	2,4567
2	0,9940	0,9663	1,9881	4,7515	4,7347	4,7515	2,2910
3	0,9869	0,9051	2,8612	8,0251	8,0798	8,0251	3,8088
4	0,9987	0,8015	0,8700	11,0551	11,0560	11,0659	1,4092
5	0,9871	0,9742	2,9217	4,4688	4,5530	4,4689	4,4216
6	0,9903	0,9455	2,5419	6,4477	6,5495	6,4477	2,7417
7	0,9901	0,9352	2,5642	7,0651	7,1656	7,0652	3,0310
8	0,9906	0,9634	2,4957	5,0735	5,0357	5,0735	3,8100
9	0,9427	0,9185	6,1791	7,5526	7,6964	7,5526	6,7213
10	0,9873	0,9152	2,9054	8,2316	8,3777	8,2317	3,1030
11	0,9766	0,9406	3,9417	6,2768	6,3921	6,2768	2,1479
12	0,9862	0,9519	3,0359	5,8105	5,8418	5,8105	4,6585
13	0,9845	0,9716	3,2124	4,3901	4,4518	4,3901	2,6656
14	0,9961	0,9127	1,5981	7,3334	7,4237	7,3334	1,0054
15	0,9847	0,9128	3,1919	7,6346	7,6347	7,6946	1,0971

Parcijalna regresija u kombinaciji s lineardnom diskriminantnom analizom (PLS – LDA) korištena je u istraživanju (Li i sur., 2012) detekcije patvorina kukuruznog i maltoznog sirupa u medu. Smjese meda i patvorina pripremljene su na nešto drukčiji način nego u ovom istraživanju s obzirom na koncentracije patvorina. Istraživači su dodali navedene patvorine u udjelima od 10 %, 20 % i 40 %. Navedena kombinacija kemometrijskih metoda korištena je za

konstrukciju binarnog klasifikacijskog modela pri čemu su dobiveni sljedeći rezultati: preciznost klasifikacije smjese meda i kukuruznog sirupa od 91,1 %, za smjesu meda i maltoznog sirupa od 97,8 % i za smjesu meda i kombinacije sirupa (kukuruzni i maltozni) od 75,6 %. Za snimanje spektara korištena je Raman spektroskopija i kombinacija s korištenim kemometrijskim modelima pokazala se učinkovitom u detekciji patvorina u medu.

Slično istraživanje provedeno je na smjesama meda i patvorina (osim kukuruznog sirupa korišten je i sirup šećerne repe) koristeći nekoliko multivarijantnih metoda uz IR spektroskopiju (Başar i Özdemir, 2018). PLS model se u ovom istraživanju pokazao kao korisna metoda za detekciju patvorine, ali i za klasifikaciju medova na temelju geografskog i botaničkog podrijetla. Koeficijent determinacije za klasifikaciju medova iznosi $R^2 = 0,9807$ uz standardnu pogrešku predikcije od $SEP = 2,89$. Nešto bolji rezultati ostvareni su za detekciju kukuruznog sirupa u medu gdje je koeficijent determinacije $R^2 = 0,9846$ uz standardnu pogrešku predikcije od $SEP = 2,55$. Za detekciju sirupa šećerne repe ostvarena je još manja standardna pogreška predikcije koja iznosi $SEP = 1,66$, ali je koeficijent determinacije nešto niži, točnije $R^2 = 0,9772$.

Osim spomenutih patvorina, istraživanja su provedena i dodajući necentrifugirani sirup šećerne trske tzv. Jagerry šećer (Kumaravelu i Gopal, 2014). Razvijeni kalibracijski model pomoću PLS-a pokazao se vrlo efikasnim u detekciji patvorine u medu s koeficijentom determinacije od $R^2 = 0,9924$.

4.3. MODELI UMJETNIH NEURONSKIH MREŽA ZA PREDIKCIJU UDJELA PATVORINE U MEDU NA TEMELJU UV/VIS SPEKTARA

Umjetne neuronske mreže pokazale su se kao koristan predikcijski alat za različite procese. Danas se koriste za kontrolne procese, praćenje i modeliranje procesa proizvodnje, predikciju izlaznih parametara i slično. Podaci se prije korištenja za modeliranje neuronskih mreža najčešće predprocesiraju, a u ovom istraživanju analiza glavnih komponenata prethodila je neuronskim mrežama gdje je prvih pet glavnih komponenti korišteno za modeliranje istih. Jedna od uspješnih primjena umjetnih neuronskih mreža navedena je prethodno u Teoretskom dijelu (Meng i sur., 2012), a odnosi se na praćenje procesa skladištenja zelene paprike.

Modeli umjetnih neuronskih mreža za patvorine s kukuruznim sirupom nalaze se u Tablici 3, a za patvorine s glukoznim sirupom u Tablici 4. Općenito, modeli za predikciju kukuruznog

sirupa u medu su nešto bolji i precizniji od modela za glukozni sirup. Svi modeli pokazuju prilično dobro slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti udjela predviđenih modelima. To se može zaključiti na temelju vrijednosti koeficijenta determinacije za učenje, testiranje i validaciju te na temelju pogrešaka za iste procese. Na razini svih rezultata, minimalni koeficijent determinacije za učenje je $R^2 = 0,9524$, koeficijent determinacije za testiranje je $R^2 = 0,8525$ i koeficijent validacije od $R^2 = 0,9350$ (Tablica 4). Kao najbolji model za predikciju patvorine kukuruznog sirupa je model neuronska mreža za uzorak br. 15 (Tablica 3). Koeficijenti determinacije za učenje, testiranje i validaciju su $R^2 = 0,9999$ što je iznimno dobro za predikcijski model. Pogreške za navedene procese su prilično niske, a iznose 0,0648 za učenje, 0,4492 za testiranje i 0,0338 za validaciju. Tip skrivene aktivacijske funkcije je tanh kao i za izlaznu aktivacijsku funkciju. Tip modela procijenjenog kao najefikasniji za predikciju patvorine kukuruznog sirupa u medu je MLP 5-5-1 koji osim 5 ulaznih neurona (glavne komponente korištene iz PCA analize) i jednog izlaznog (udio patvorine) ima 5 neurona u skrivenom sloju.

Za predikciju udjela glukoznog sirupa u medu kao najbolji model pokazala se neuronska mreža za uzorak br. 1. Mreža je tipa MLP 5-4-1 sa skrivenom aktivacijskom funkcijom tanh i funkcijom identiteta kao izlaznom aktivacijskom funkcijom. Preciznosti osnovnih procesa za ovaj model su također prilično visoke: $R^2 = 0,9992$ za učenje, $R^2 = 0,9993$ za testiranje i $R^2 = 0,9974$ za validaciju modela. Pogreške za iste procese su minimalne, a iznose 0,5849 za učenje, 0,5088 za testiranje i nešto veća pogreška za validaciju od 4,2315.

Sveukupno gledano, modeli za predikciju udjela glukoznog sirupa su nešto lošiji, prvenstveno gledajući pogreške za učenje, testiranje i validaciju. Primjerice, za uzorak br. 7 model mreže MLP 5-3-1 pokazuje pogrešku testiranja od 129,9690 što je prilično visoko.

Tablica 3. Odabrane umjetne neuronske mreže za opis udjela dodane patvorine kukuruznog sirupa u medu na temelju UV-VIS spektara

Uzorak	Tip mreže	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
1	MLP 5-5-1	0,9989	0,9981	0,9996	0,7926	1,0049	0,8112	Logistička funkcija	Eksponecijalna funkcija
2	MLP 5-6-1	0,9998	0,9999	0,9999	0,1798	0,1383	0,2968	Tanh	Eksponecijalna funkcija
3	MLP 5-5-1	0,9999	0,9999	0,9997	0,0267	0,1477	0,4410	Eksponecijalna funkcija	Logistička funkcija
4	MLP 5-4-1	0,9998	0,9996	0,9999	0,1310	0,5554	0,0906	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
5	MLP 5-4-1	0,9992	0,9993	0,9987	0,5362	0,4377	0,8031	Logistička funkcija	Funkcija identiteta
6	MLP 5-7-1	0,9997	0,9941	0,9997	0,1957	11,3701	3,2048	Tanh	Eksponecijalna funkcija
7	MLP 5-8-1	0,9999	0,9998	0,9978	0,0218	0,4285	1,5578	Logistička funkcija	Funkcija identiteta
8	MLP 5-6-1	0,9993	0,9999	0,9915	0,4667	0,5605	5,8202	Tanh	Funkcija identiteta
9	MLP 5-5-1	0,9995	0,9996	0,9960	0,4106	0,2584	4,3866	Tanh	Tanh
10	MLP 5-7-1	0,9996	0,9989	0,9999	0,2851	0,8269	0,7922	Logistička funkcija	Funkcija identiteta
11	MLP 5-6-1	0,9998	0,9998	0,9987	0,1543	0,1707	4,1105	Eksponecijalna funkcija	Eksponecijalna funkcija
12	MLP 5-6-1	0,9965	0,9942	0,9989	2,4705	2,6179	1,1322	Tanh	Logistička funkcija
13	MLP 5-8-1	0,9999	0,9999	0,9991	0,0712	0,0192	0,3707	Eksponecijalna funkcija	Eksponecijalna funkcija
14	MLP 5-8-1	0,9981	0,9997	0,9968	1,3305	0,6745	2,8206	Eksponecijalna funkcija	Eksponecijalna funkcija
15	MLP 5-5-1	0,9999	0,9999	0,9999	0,0648	0,4492	0,0338	Tanh	Tanh

Tablica 4. Odabrane umjetne neuronske mreže za opis udjela dodane patvorine glukoznog sirupa u medu na temelju UV-VIS spektara

Uzorak	Tip mreže	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
1	MLP 5-4-1	0,9992	0,9993	0,9974	0,5849	0,5088	4,2315	Tanh	Funkcija identiteta
2	MLP 5-6-1	0,9975	0,9996	0,9991	1,6923	0,2908	0,7343	Eksponecijalna funkcija	Eksponecijalna funkcija
3	MLP 5-5-1	0,9991	0,9992	0,9984	0,6104	0,4894	0,7086	Eksponecijalna funkcija	Tanh
4	MLP 5-3-1	0,9942	0,9920	0,9989	4,3679	3,8871	5,0823	Tanh	Tanh
5	MLP 5-8-1	0,9917	0,9997	0,9940	5,7099	1,1785	2,3402	Eksponecijalna funkcija	Logistička funkcija
6	MLP 5-9-1	0,9640	0,9996	0,9314	24,4554	22,0311	112,8299	Tanh	Logistička funkcija
7	MLP 5-3-1	0,9577	0,9122	0,9315	28,4954	129,9690	97,1790	Tanh	Funkcija identiteta
8	MLP 5-3-1	0,9967	0,8525	0,9828	2,2723	87,9979	7,4087	Logistička funkcija	Funkcija identiteta
9	MLP 5-5-1	0,9978	0,9944	0,9981	1,6281	6,5155	0,7764	Tanh	Tanh
10	MLP 5-8-1	0,9944	0,9780	0,9992	4,3067	28,2496	0,4120	Tanh	Tanh
11	MLP 5-5-1	0,9981	0,9991	0,9995	1,4454	9,6243	3,2715	Eksponecijalna funkcija	Logistička funkcija
12	MLP 5-3-1	0,9970	0,9999	0,9997	2,0884	0,0988	0,3299	Tanh	Funkcija identiteta
13	MLP 5-4-1	0,9984	0,9997	0,9998	1,1875	0,2995	2,4211	Logistička funkcija	Logistička funkcija
14	MLP 5-3-1	0,9972	0,9999	0,9953	2,3850	0,4745	3,6257	Tanh	Tanh
15	MLP 5-5-1	0,9524	0,9932	0,9350	32,2889	15,7275	27,9168	Funkcija identiteta	Logistička funkcija

Umjetne neuronske mreže korištene su kao alat za predikciju patvorina u medu. Primjerice, u jednom od istraživanja gdje su znanstvenici koristili 3D fluorescentnu spektroskopiju u kombinaciji s neuronskim mrežama za detekciju dodanog rižinog sirupa u med (Zhao i sur., 2013). Podaci za konstrukciju i treniranje neuronskih mreža su korišteni nakon linearne diskriminantne analize (eng. *Linear Discriminant Analysis*, LDA), a znanstvenici zaključuju da prepoznavanje patvorina pomoću neuronskih mreža u ovom istraživanju može biti čak i 100 % ako je broj korištenih glavnih komponenti četiri.

Model za detekciju invertnog šećernog sirupa iz šećerne trske također je uspješno konstruiran koristeći neuronske mreže uz FTIR (infracrvena spektroskopija uz Fourierove transformacije) spektroskopiju (Irudayaraj i sur., 2006). Ulazni sloj koristio je direktno rezultate spektroskopskih analiza (800 do 1500 cm, područje koje odgovara apsorpciji glukoze, fruktoze i sukroze) dok se u izlaznom sloju nalaze tri vrijednosti koje predstavljaju tri skupine medova patvorene različitim udjelima patvorina: grupa 1 – od 1 do 8 %, grupa 2 – od 8 do 16 % i grupa 3 – od 16 do 25 %. Za ovo istraživanje 40 neurona u skrivenom sloju pokazivalo je najbolje rezultate klasifikacije medova s patvorinama. Zaključno, modeli umjetnih neuronskih mreža izabranih kao najrelevantniji ostvarili su stupanj klasifikacije od 93,75 %.

U istraživanju Cordella i sur. 2003 provedena je klasifikacija medova (timijan, lavanda, ružmarin i nekoliko drugih) i detekcija patvorenja koristeći šećerne sirupe. Komponente pripremljenih uzoraka razdvojene su pomoću kromatografije s ionskom izmjenom, a za obradu podataka korištena je analiza glavnih komponenti, linearna diskriminantna analiza i konačno umjetne neuronske mreže. Istraživači su pokazali da su modeli mreža kompaktnije strukture (što manji broj neurona u skrivenom sloju) učinkovitiji u klasifikaciji uzoraka medova. Za sve uzorke medova kao najbolji model neuronske mreže pokazala se MLP4, a također i za tamne medove gdje model MLP4 pokazuje odličan klasifikacijski i predikcijski kapacitet mreže. Najbolji model neuronske mreže pokazuje klasifikaciju medova tretiranih odvojeno od 100 %, dok je uspješnost klasifikacije za uzorke tretirane skupa nešto manja i iznosi 90,7 %.

4.4. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST IZVORNIH MEDOVA I PRIPREMLJENIH PATVORINA

Rezultati kemijskih analiza za uzorke izvornih medova i pripremljenih patvorina prikazani su u nastavku rada počevši s rezultatima izvornih medova nakon čega slijede rezultati za patvorine glukoznog i kukuruznog sirupa.

Izvorni medovi pokazuju relativno slične kemijske karakteristike što se tiče ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti što se može očekivati s obzirom da su prikupljeni s relativno malog geografskog područja. Rezultati kemijskih analiza za izvorne medove nalaze se u Tablici 5. Uzorak s najmanjom količinom polifenola je uzorak br. 8 s $UF = 13,80 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ dok uzorak br. 9 sadrži najveću količinu polifenola koja iznosi $UF = 108,40 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$. Standardna devijacija za vrijednost količine fenola iznosi $UF = 24,78 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$, a srednja vrijednost $UF = 41,83 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ (Tablica 6). Osim izvornih medova u Tablici 5 se nalaze vrijednosti ukupnih polifenola za sirupe korištene kao tvari za patvorenje. Odvojene kemijske analize za sirupe korištene kao tvari za patvorenje su prisutne kako bi se pokazao njihov utjecaj na rezultate mjerenja za patvorine. Rezultat Folin – Ciocalteu metode za kukuruzni sirup je izrazito velik i iznosi $UF = 827,94 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ s pretpostavkom da su određene komponente kukuruznog sirupa interferirale pri korištenju navedene metode i spektrofotometrijskom mjerenju. Vrijednost ukupnih polifenola za glukozni sirup je puno manja i iznosi $UF = 14,55 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$.

Kod rezultata inhibicije DPPH radikala za očekivati je da će uzorci s najvećim udjelom polifenola imati veći postotak inhibicije slobodnih radikala jer imaju sposobnosti doniranja vodika radikalu pri čemu ga stabiliziraju. Rezultati se baš ne poklapaju s teoretskim činjenicama pri čemu uzorak br. 9 koji ima najveću količinu polifenola prema Folin – Ciocalteu metodi pokazuje najmanji postotak inhibicije kod DPPH metode. Najveći postotak inhibicije slobodnog radikala pokazuje uzorak br. 11 od 60,07 % koji sadrži $UF = 16,20 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ polifenola. Osim toga, glukozni sirup (63,63 %) pokazuje veći postotak inhibicije od kukuruznog sirupa (28,66 %) što dodatno može potvrditi interferencije prilikom korištenja metode za ukupne polifenole.

Rezultati FRAP metode u većoj mjeri podupiru rezultate analize ukupnih polifenola iz razloga što najveću količinu redukcije Fe^{3+} -TPTZ - a ostvaruje uzorak br. 9 od 49,49 $\mu\text{M Fe(II)}$ u 10 % otopini meda, a koji sadrži najveću količinu polifenola. Ista stvar vrijedi i za najmanju vrijednost redukcije gdje uzorak br. 11 s najmanjom količinom polifenola ima i najniži rezultat FRAP analize od 20,31 $\mu\text{M Fe(II)}$ u 10 % otopini meda. Rezultati za kukuruzni sirup su

ponovno puno veći nego za glukozni, a iznose 485,23 odnosno 7,17 μM Fe(II) u 10 % otopini meda.

Prema korelacijskoj matrici (Tablica 7) metoda za određivanja ukupnih fenola Folin – Ciocalteu i FRAP metoda su u pozitivnoj korelaciji dok je korelacija između Folin – Cioalteu i DPPH metode negativna. Korelacija između FRAP i DPPH metoda također je negativna.

Tablica 5. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost za uzorke čistih medova, glukoznog i kukuruznog sirupa

uzorak	<i>UF</i> / $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{kg}^{-1}$	<i>DPPH</i> / % inhibicije	<i>FRAP</i> / μM Fe(II) u 10 % otopini meda
1	50,60 ± 4,24	47,27 ± 1,17	46,21 ± 4,51
2	57,40 ± 3,11	48,57 ± 2,34	27,67 ± 7,61
3	60,40 ± 0,57	50,35 ± 0,17	30,97 ± 0,98
4	52,20 ± 11,59	43,01 ± 0,69	47,41 ± 5,92
5	50,80 ± 1,13	45,26 ± 2,68	49,29 ± 1,61
6	26,40 ± 0,56	49,53 ± 1,34	37,45 ± 3,94
7	56,80 ± 4,53	47,15 ± 1,01	45,31 ± 9,43
8	13,80 ± 0,28	52,13 ± 0,67	36,35 ± 0,70
9	108,40 ± 3,96	41,71 ± 1,34	49,49 ± 5,77
10	21,40 ± 2,54	49,64 ± 0,16	25,19 ± 1,27
11	16,20 ± 4,24	60,07 ± 13,23	20,31 ± 1,41
12	21,80 ± 1,97	51,06 ± 1,84	27,48 ± 3,09
13	40,40 ± 10,74	53,43 ± 1,84	38,44 ± 0,85
14	30,40 ± 1,13	54,26 ± 0,67	40,83 ± 3,66
15	20,40 ± 5,65	52,61 ± 4,02	37,94 ± 10,28
glukozni sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
kukuruzni sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 6. Osnovna statistička analiza vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti izvornih medova

	<i>UF</i> / $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{kg}^{-1}$	<i>DPPH</i> / % inhibicije	<i>FRAP</i> / μM Fe(II) u 10 % otopini meda
srednja vrijednost	41,83	49,74	37,36
standardna devijacija	24,78	4,64	9,32
minimum	13,800	41,71	20,32
maksimum	108,40	60,07	49,49

Tablica 7. Korelacijska matrica između vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti izvornih medova

	<i>UF</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>
<i>UF</i>	1,000		
<i>DPPH</i>	-0,735	1,000	
<i>FRAP</i>	0,557	-0,698	1,000

U nastavku rada prikazani su rezultati kemijskih analiza za sve pripremljene patvorine (Tablica 8 – Tablica 22). Među rezultatima za ukupne polifenole kod patvorina s glukoznim sirupom postoji određena korelacija. S obzirom na udio polifenola u izvornim medovima, udio polifenola se u patvorenim smjesama s glukoznim sirupom smanjuje kako se dodaju veći udjeli istog (od 10 pa prema 90 %). Primjerice, kod uzorka br. 4 patvorenog glukoznim sirupom (Tablica 11) vidi se opadanje udjela polifenola u pripremljenim smjesama od 52,20 mg_{GAE} kg⁻¹ za čisti med pa do 14,60 mg_{GAE} kg⁻¹ za smjesu s udjelom patvorine od 90 %. Opadajući niz udjela polifenola u smjesama glukoznog sirupa i medova je očekivan jer dodatak glukoznog sirupa teoretski samo razrijedi čisti med bez nekog očekivanog utjecaja na udio polifenola. Pomalo neočekivani rezultati pojavljuju se za smjese s patvorinom glukoznog sirupa niskih udjela (od 10 do 30 %) gdje je udio polifenola veći nego u čistom medu, a nakon toga udjel polifenola opada prema 90 %. Ovakav trend rezultata pojavljuje se kod približno 90 % patvorina glukoznim sirupom.

Sukladno tome za očekivati je da manje polifenola u smjesama patvorina omogućuje manju redukciju slobodnih radikala. Rezultati DPPH metode su na neki način suprotni očekivanjima s obzirom na rezultate udjela polifenola. Za primjer je opet uzorak br. 4 patvoren glukoznim sirupom gdje je postotak inhibicije radikala za čisti med 43,01 % nakon čega su postoci inhibicije pokazuju niže vrijednosti u odnosu na čisti med sve do smjese s glukoznim sirupom u udjelu od 40 %. Za navedenu smjesu patvorine postotak inhibicije je viši nego za čisti med i iznosi 46,24 %. Nakon toga postotak inhibicije se povećava sve do 70,13 % za smjesu s glukoznim sirupom u udjelu od 90 %. Ovakav uzorak rezultata se također ponavlja kod većine uzoraka s glukoznim sirupom. Na taj način rezultati ukupnih fenola i DPPH metode su teoretski kontradiktorni.

Naprotiv tome, rezultati FRAP metode se pokazuju kao mnogo bolji (u odnosu na očekivanja) nego rezultati DPPH metode. Rezultati se ponovno mogu prokomentirati na primjeru uzorka

br. 4 patvorenog glukožnim sirupom. Čisti med pokazuje rezultat FRAP metode izražen kao koncentracija c (Fe^{2+}) = 47,41 μM Fe(II). Nadalje, rezultati za smjese patvorina daju manje vrijednosti koncentracija željezovih iona sve do $c = 4,28 \mu\text{M}$ Fe(II) za smjese s udjelom glukožnog sirupa od 90 %. Trend rezultata se može vidjeti praktički kod svih smjesa patvorina s glukožnim sirupom.

Dodatak kukuruznog sirupa u čiste medove pokazuje rezultate za ukupne polifenole suprotne dodatku glukožnog sirupa. Sve veći dodani udjeli kukuruznog sirupa rezultiraju većim udjelom ukupnih polifenola. Primjerice, udio ukupnih polifenola u uzorku br. 4 (Tablica 11) iznosi $UF = 52,20 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ nakon čega se koncentracija naglo povećava na $UF = 311,80 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ za udio kukuruznog sirupa od 20 %. Koncentracija polifenola se povećava čak do $UF = 704,40 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ za udio kukuruznog sirupa od 90 %. Isto tako trend rezultata je praktički isti za sve uzorke patvorene kukuruznim sirupom. Najveća koncentracija polifenola doseže čak $UF = 1095,20 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ za uzorak br. 13 s dodanim kukuruznim sirupom u udjelu od 80 % (Tablica 20).

Rezultati DPPH i u ovom slučaju izgledaju nesukladni koncentracijama polifenola u patvorinama kukuruznim sirupom. Postotak inhibicije za uzorak br. 4 iznosi 43,01 % nakon čega postotak linearno opada sve do 24,63 % za patvorinu kukuruznog sirupa u udjelu od 90 %. Također i za rezultate DPPH metode trend je nepromjenjiv kod svih patvorenih uzoraka.

Antioksidacijska aktivnost određivana FRAP metodom i kod patvorina kukuruznim sirupom pokazuje bolju korelaciju s određenim koncentracijama ukupnih polifenola u istim smjesama. Rezultat za čisti med odnosno uzorak br. 4 iznosi $c = 47,41 \mu\text{M}$ Fe(II), a vrijednosti se povećavaju s povećanjem udjela kukuruznog sirupa sve do $c = 443,08 \mu\text{M}$ Fe(II) za patvorinu s kukuruznim sirupom u udjelu od 90 %. Također i u ovom slučaju linearnost rezultata se vidi kod svih patvorina kukuruznog sirupa.

Udio polifenola u medu uvelike ovisi o botaničkom podrijetlu meda. Koncentracija u korištenim bagremovim medovima značajno je manja nego u određenim tradicionalnim malezijskim medovima (Kek i sur., 2014). Primjerice, prema navedenom istraživanju "Kelulut" med sadrži $UF = 791,5 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ odnosno $UF = 1058,8 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$. U istom istraživanju određena je koncentracija polifenola u medu ananasa od $UF = 602,4 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$. Za usporedbu, koncentracije polifenola u nekim portugalskim medovima prema istraživanju Ferreira i sur., 2009. godine varira između $UF = 226,2 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ i $UF = 727,8 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$. Koncentracija polifenola u medu bagrema (Marghitas i sur., 2010) značajnije je manja nego u medovima iz

prethodnog istraživanjima. Prema navedenom istraživanju koncentracije polifenola u medovima bagrema kreću se od $UF = 120 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ do $UF = 260,5 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$. Prosječna koncentracija polifenola u medu bagrema u istraživanju Can i sur., 2015. godine iznosi $UF = 160,2 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ i u istom radu med bagrema je "najsiriromašniji" polifenolima. Po višim koncentracijama polifenola ističu se med hrasta ($UF = 1200,04 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$) i med vrijeska ($UF = 1054,6 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$). Prema nekim radovima (Alqarni i sur., 2016) koncentracija polifenola u medovima iznosi $UF = 740, 800$ odnosno $840 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$.

Rezultati FRAP metode za bagremov med u istom istraživanju (Can i sur., 2015) iznose $6,4 \mu\text{M Fe(II)}$ u 10 %-tnoj otopini meda. U literaturi postoje radovi u kojima se istražuju antioksidacijska svojstva pomoću DPPH metode pa se tako u jednom istraživanju (Gül i Pehlivan, 2018) navodi kako je postotak inhibicije za korišteni med bagrema 12,72 % dok je koncentracija ukupnih polifenola $UF = 519,1 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$.

Prema korelacijskoj matrici (Tablica 24) u pozitivnoj korelaciji su metoda za ukupne polifenole i FRAP metoda, dok su DPPH metoda i ukupni polifenoli u negativnoj korelaciji. Korelacijska matrica dodatno potvrđuje komentare o rezultatima kemijskih analiza u ovom poglavlju. Pozitivna korelacija između FRAP metode i metode za određivanje ukupnih fenola (Folin – Ciocalteu) potvrđena je u već navedenom istraživanju (Gül i Pehlivan, 2018) koja iznosi 0,70.

Tablica 8. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 1

Uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
1	50,60 ± 4,24	47,27 ± 1,17	46,21 ± 4,51
1-g-10 %	65,60 ± 29,98	49,39 ± 0,24	33,76 ± 1,55
1-g-20 %	48,00 ± 4,52	29,31 ± 1,37	29,38 ± 6,06
1-g-30 %	41,84 ± 1,35	35,74 ± 1,50	26,69 ± 5,07
1-g-40 %	40,60 ± 1,97	35,65 ± 1,62	15,54 ± 2,82
1-g-50 %	33,20 ± 2,82	36,80 ± 0,00	9,96 ± 0,85
1-g-60 %	28,20 ± 3,67	36,85 ± 0,07	11,35 ± 2,82
1-g-70 %	27,80 ± 3,11	36,94 ± 0,20	8,86 ± 0,14
1-g-80 %	13,00 ± 0,28	60,79 ± 6,35	7,37 ± 0,85
1-g-90 %	14,40 ± 1,13	77,16 ± 11,04	5,68 ± 2,39
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
1	50,60 ± 4,24	47,27 ± 1,17	46,21 ± 4,51
1-k-10 %	226,60 ± 42,14	42,69 ± 3,56	37,15 ± 5,77
1-k-20 %	315,40 ± 13,29	40,21 ± 1,35	41,33 ± 4,08
1-k-30 %	411,20 ± 21,50	39,41 ± 1,53	48,90 ± 0,70
1-k-40 %	437,00 ± 22,91	38,29 ± 5,03	164,72 ± 9,86
1-k-50 %	484,00 ± 7,92	38,90 ± 6,74	256,45 ± 111,69
1-k-60 %	608,00 ± 0,00	27,22 ± 0,60	432,13 ± 14,51
1-k-70 %	639,80 ± 0,28	27,79 ± 2,14	442,88 ± 23,24
1-k-80 %	698,40 ± 10,75	27,55 ± 3,98	490,79 ± 12,39
1-k-90 %	789,20 ± 54,87	24,55 ± 1,64	429,34 ± 2,96
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 9. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 2

Uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
2	57,40 ± 3,11	48,57 ± 2,34	27,67 ± 7,61
2-g-10 %	64,20 ± 25,17	16,00 ± 1,37	19,02 ± 2,68
2-g-20 %	71,80 ± 1,97	11,20 ± 0,91	20,02 ± 0,42
2-g-30 %	57,80 ± 0,84	13,54 ± 0,89	13,74 ± 5,07
2-g-40 %	57,20 ± 18,10	20,35 ± 4,71	13,44 ± 2,96
2-g-50 %	51,80 ± 4,24	25,54 ± 12,06	14,84 ± 1,55
2-g-60 %	45,20 ± 0,56	27,38 ± 14,65	14,04 ± 3,24
2-g-70 %	42,60 ± 0,28	30,63 ± 8,64	10,76 ± 2,25
2-g-80 %	43,40 ± 1,41	42,53 ± 0,00	5,08 ± 0,70
2-g-90 %	43,20 ± 1,69	45,30 ± 4,64	5,28 ± 0,14
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
2	57,40 ± 3,11	48,57 ± 2,34	27,67 ± 7,61
2-k-10 %	243,80 ± 26,87	41,89 ± 2,44	23,30 ± 0,85
2-k-20 %	285,20 ± 2,83	38,74 ± 8,67	47,51 ± 4,65
2-k-30 %	364,60 ± 1,41	37,89 ± 1,46	75,39 ± 6,90
2-k-40 %	506,60 ± 18,95	37,53 ± 3,21	153,27 ± 0,99
2-k-50 %	462,60 ± 12,16	35,70 ± 0,55	253,96 ± 12,68
2-k-60 %	548,00 ± 11,31	28,35 ± 17,01	398,37 ± 4,79
2-k-70 %	688,00 ± 35,64	24,13 ± 7,90	411,91 ± 22,54
2-k-80 %	718,80 ± 15,27	24,77 ± 3,65	460,61 ± 6,34
2-k-90 %	645,40 ± 43,27	23,49 ± 1,46	523,16 ± 19,86
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 10. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 3

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
3	60,40 ± 0,57	50,35 ± 0,17	30,97 ± 0,98
3-g-10 %	60,20 ± 1,41	20,17 ± 0,86	22,31 ± 3,10
3-g-20 %	52,20 ± 1,98	28,80 ± 0,06	13,15 ± 0,85
3-g-30 %	50,00 ± 1,70	29,09 ± 0,24	37,94 ± 4,37
3-g-40 %	46,00 ± 2,26	33,47 ± 1,03	23,40 ± 4,08
3-g-50 %	52,80 ± 5,09	39,55 ± 7,05	17,03 ± 0,42
3-g-60 %	46,20 ± 1,98	52,51 ± 5,26	12,35 ± 2,25
3-g-70 %	37,20 ± 11,88	64,41 ± 9,14	10,96 ± 0,00
3-g-80 %	44,40 ± 2,83	56,52 ± 6,70	4,28 ± 2,39
3-g-90 %	20,00 ± 7,35	70,87 ± 0,00	3,39 ± 0,85
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
3	60,40 ± 0,57	50,35 ± 0,17	30,97 ± 0,98
3-k-10 %	194,00 ± 5,09	50,84 ± 2,16	40,24 ± 1,69
3-k-20 %	298,20 ± 14,42	47,92 ± 1,07	52,48 ± 12,54
3-k-30 %	355,60 ± 18,67	38,40 ± 1,42	86,45 ± 7,04
3-k-40 %	467,00 ± 2,55	38,15 ± 0,10	152,47 ± 1,83
3-k-50 %	486,60 ± 18,95	37,13 ± 3,55	280,35 ± 13,10
3-k-60 %	555,20 ± 14,71	34,05 ± 1,96	269,10 ± 115,77
3-k-70 %	590,20 ± 14,99	35,86 ± 3,60	372,37 ± 3,24
3-k-80 %	605,60 ± 46,95	32,45 ± 1,01	448,26 ± 12,54
3-k-90 %	799,20 ± 16,97	26,51 ± 1,60	512,20 ± 20,99
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 11. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 4

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
4	52,20 ± 11,59	43,01 ± 0,69	47,41 ± 5,92
4-g-10 %	70,60 ± 0,28	21,90 ± 4,27	40,83 ± 0,28
4-g-20 %	51,00 ± 3,11	36,80 ± 0,00	35,16 ± 9,15
4-g-30 %	46,20 ± 3,68	40,57 ± 2,47	26,79 ± 0,14
4-g-40 %	53,60 ± 0,57	46,24 ± 8,81	22,51 ± 1,13
4-g-50 %	21,20 ± 2,26	52,92 ± 0,00	10,86 ± 1,55
4-g-60 %	24,60 ± 3,11	52,92 ± 0,00	10,56 ± 0,28
4-g-70 %	25,60 ± 8,49	60,27 ± 10,39	10,16 ± 1,69
4-g-80 %	12,40 ± 1,70	66,71 ± 14,24	11,45 ± 2,11
4-g-90 %	14,60 ± 4,24	70,13 ± 7,91	4,28 ± 2,11
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
4	52,20 ± 11,59	43,01 ± 0,69	47,41 ± 5,92
4-k-10 %	311,80 ± 26,87	39,49 ± 2,92	53,88 ± 13,10
4-k-20 %	295,20 ± 9,62	37,09 ± 1,21	67,22 ± 0,99
4-k-30 %	395,60 ± 5,09	36,29 ± 4,51	128,07 ± 49,58
4-k-40 %	507,80 ± 30,26	36,71 ± 1,74	227,07 ± 3,94
4-k-50 %	541,20 ± 36,20	35,93 ± 0,43	249,08 ± 6,62
4-k-60 %	570,00 ± 19,80	34,60 ± 1,90	344,19 ± 24,79
4-k-70 %	656,40 ± 40,16	25,24 ± 0,07	404,84 ± 11,97
4-k-80 %	589,20 ± 41,86	26,89 ± 3,97	450,55 ± 12,39
4-k-90 %	704,40 ± 56,00	24,63 ± 1,12	443,08 ± 7,75
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 12. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 5

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
5	50,80 ± 1,13	45,26 ± 2,68	49,29 ± 1,61
5-g-10 %	69,40 ± 1,41	17,81 ± 1,73	38,74 ± 2,68
5-g-20 %	62,00 ± 11,88	35,19 ± 6,75	34,96 ± 0,99
5-g-30 %	60,60 ± 3,68	34,14 ± 3,04	24,90 ± 0,85
5-g-40 %	49,80 ± 4,24	39,67 ± 4,05	22,01 ± 1,83
5-g-50 %	57,20 ± 6,79	44,86 ± 11,40	17,43 ± 0,42
5-g-60 %	54,80 ± 2,83	61,55 ± 4,22	12,15 ± 2,25
5-g-70 %	50,00 ± 0,00	59,74 ± 1,66	13,05 ± 3,80
5-g-80 %	49,80 ± 0,85	64,55 ± 1,74	9,16 ± 0,28
5-g-90 %	41,00 ± 9,33	64,57 ± 3,48	6,97 ± 1,97
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
5	50,80 ± 1,13	45,26 ± 2,68	49,29 ± 1,61
5-k-10 %	246,20 ± 12,73	39,71 ± 1,54	52,48 ± 15,63
5-k-20 %	371,40 ± 16,69	39,22 ± 0,04	167,11 ± 27,61
5-k-30 %	469,00 ± 22,34	38,48 ± 1,77	247,88 ± 60,70
5-k-40 %	537,20 ± 23,19	38,86 ± 2,81	326,16 ± 1,27
5-k-50 %	577,60 ± 45,82	38,03 ± 4,99	376,85 ± 9,01
5-k-60 %	560,60 ± 19,52	35,57 ± 1,29	388,31 ± 17,32
5-k-70 %	576,40 ± 22,06	26,19 ± 2,10	542,28 ± 58,45
5-k-80 %	658,80 ± 54,87	25,06 ± 1,73	565,78 ± 3,52
5-k-90 %	848,60 ± 37,62	26,24 ± 4,05	549,05 ± 0,14
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 13. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 6

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
6	26,40 ± 0,56	49,53 ± 1,34	37,45 ± 3,94
6-g-10 %	30,40 ± 1,70	21,98 ± 7,02	23,20 ± 6,90
6-g-20 %	23,20 ± 16,40	28,82 ± 0,80	22,71 ± 1,97
6-g-30 %	9,20 ± 0,57	39,45 ± 4,73	22,41 ± 0,99
6-g-40 %	9,80 ± 0,85	48,38 ± 0,56	22,11 ± 3,38
6-g-50 %	7,40 ± 0,28	54,98 ± 20,67	19,12 ± 0,28
6-g-60 %	6,40 ± 0,00	61,71 ± 5,74	13,64 ± 2,68
6-g-70 %	5,40 ± 0,28	50,16 ± 12,92	11,05 ± 3,80
6-g-80 %	5,20 ± 0,57	56,96 ± 3,47	11,65 ± 0,42
6-g-90 %	5,80 ± 1,98	57,37 ± 1,82	9,46 ± 0,14
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
6	26,40 ± 0,56	49,53 ± 1,34	37,45 ± 3,94
6-k-10 %	316,00 ± 19,80	41,28 ± 5,95	57,36 ± 2,25
6-k-20 %	406,00 ± 13,01	37,29 ± 1,09	112,84 ± 2,11
6-k-30 %	380,00 ± 1,70	36,92 ± 0,55	218,11 ± 16,90
6-k-40 %	401,00 ± 7,07	37,38 ± 1,95	285,83 ± 5,63
6-k-50 %	480,00 ± 21,50	36,22 ± 0,86	283,44 ± 133,80
6-k-60 %	543,20 ± 22,63	26,70 ± 0,54	424,06 ± 20,28
6-k-70 %	567,60 ± 23,19	24,64 ± 1,15	438,00 ± 37,18
6-k-80 %	598,80 ± 32,81	23,52 ± 1,12	479,24 ± 23,94
6-k-90 %	648,60 ± 19,52	21,28 ± 5,95	468,88 ± 18,31
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 14. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 7

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
7	56,80 ± 4,53	47,15 ± 1,01	45,31 ± 9,43
7-g-10 %	44,40 ± 0,57	15,36 ± 5,21	45,41 ± 4,51
7-g-20 %	42,60 ± 3,11	30,13 ± 1,82	36,35 ± 11,41
7-g-30 %	41,20 ± 1,13	36,80 ± 0,00	31,77 ± 2,11
7-g-40 %	40,80 ± 0,57	37,27 ± 0,66	29,58 ± 8,31
7-g-50 %	41,80 ± 0,85	31,65 ± 2,57	23,40 ± 3,52
7-g-60 %	40,80 ± 1,13	42,40 ± 1,58	20,52 ± 1,69
7-g-70 %	33,40 ± 0,28	50,25 ± 3,77	19,42 ± 3,52
7-g-80 %	16,80 ± 6,22	54,52 ± 0,88	14,74 ± 1,41
7-g-90 %	7,00 ± 0,28	62,11 ± 1,70	5,08 ± 0,14
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
7	56,80 ± 4,53	47,15 ± 1,01	45,31 ± 9,43
7-k-10 %	337,40 ± 44,41	38,58 ± 6,43	55,67 ± 0,70
7-k-20 %	423,80 ± 18,38	37,60 ± 2,03	101,48 ± 4,37
7-k-30 %	484,40 ± 13,01	37,22 ± 0,57	225,08 ± 5,35
7-k-40 %	564,60 ± 12,16	36,90 ± 2,45	327,66 ± 64,79
7-k-50 %	602,40 ± 11,88	35,50 ± 1,26	323,37 ± 3,24
7-k-60 %	811,60 ± 13,58	36,49 ± 3,75	364,31 ± 5,35
7-k-70 %	839,60 ± 28,85	26,20 ± 2,63	420,08 ± 26,76
7-k-80 %	846,80 ± 9,05	24,15 ± 0,84	457,32 ± 6,20
7-k-90 %	890,00 ± 19,80	24,81 ± 0,10	463,10 ± 1,97
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 15. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 8

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
8	13,80 ± 0,28	52,13 ± 0,67	36,35 ± 0,70
8-g-10 %	17,80 ± 7,64	12,03 ± 0,26	31,77 ± 0,14
8-g-20 %	11,00 ± 4,81	16,77 ± 1,72	29,88 ± 0,28
8-g-30 %	7,40 ± 0,28	23,35 ± 0,43	29,58 ± 0,14
8-g-40 %	4,60 ± 0,28	32,20 ± 13,55	20,91 ± 5,07
8-g-50 %	7,00 ± 0,85	31,48 ± 7,52	13,84 ± 4,93
8-g-60 %	4,20 ± 0,28	34,63 ± 2,91	15,44 ± 2,68
8-g-70 %	5,60 ± 2,83	36,80 ± 0,00	11,05 ± 0,99
8-g-80 %	3,00 ± 1,41	44,32 ± 10,64	8,66 ± 0,14
8-g-90 %	1,00 ± 0,28	49,76 ± 6,70	4,78 ± 0,56
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
8	13,80 ± 0,28	52,13 ± 0,67	36,35 ± 0,70
8-k-10 %	283,20 ± 35,07	51,44 ± 2,53	60,05 ± 3,52
8-k-20 %	379,00 ± 28,00	47,41 ± 3,77	144,31 ± 25,49
8-k-30 %	408,80 ± 2,83	45,82 ± 3,12	207,45 ± 7,75
8-k-40 %	530,00 ± 35,64	37,82 ± 4,69	248,58 ± 0,28
8-k-50 %	612,60 ± 17,82	36,81 ± 0,96	301,17 ± 5,35
8-k-60 %	740,80 ± 22,06	36,19 ± 0,29	344,89 ± 26,34
8-k-70 %	779,40 ± 16,12	35,37 ± 0,23	409,22 ± 13,10
8-k-80 %	804,40 ± 22,06	24,45 ± 0,67	434,82 ± 15,77
8-k-90 %	924,00 ± 45,25	25,42 ± 1,72	443,18 ± 1,69
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 16. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 9

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
9	108,40 ± 3,96	41,71 ± 1,34	49,49 ± 5,77
9-g-10 %	96,60 ± 5,94	18,33 ± 2,77	43,62 ± 0,85
9-g-20 %	86,80 ± 11,88	33,06 ± 10,32	39,74 ± 0,42
9-g-30 %	95,80 ± 5,37	36,80 ± 0,00	37,15 ± 5,77
9-g-40 %	80,40 ± 1,70	44,47 ± 4,92	21,21 ± 4,37
9-g-50 %	69,40 ± 8,20	59,74 ± 9,91	18,52 ± 9,58
9-g-60 %	70,40 ± 23,76	65,05 ± 0,95	16,13 ± 0,56
9-g-70 %	46,80 ± 1,13	62,10 ± 0,12	13,15 ± 1,13
9-g-80 %	36,00 ± 0,57	62,71 ± 0,85	10,46 ± 1,55
9-g-90 %	36,80 ± 2,26	65,16 ± 0,87	8,96 ± 1,41
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
9	108,40 ± 3,96	41,71 ± 1,34	49,49 ± 5,77
9-k-10 %	415,00 ± 13,86	40,81 ± 5,53	52,88 ± 4,37
9-k-20 %	616,40 ± 40,16	40,78 ± 1,51	175,78 ± 10,00
9-k-30 %	435,60 ± 0,57	38,29 ± 3,02	232,94 ± 21,27
9-k-40 %	605,60 ± 5,09	37,94 ± 2,01	315,51 ± 21,97
9-k-50 %	691,00 ± 32,53	38,13 ± 1,71	335,03 ± 0,28
9-k-60 %	650,20 ± 14,42	36,28 ± 0,00	407,63 ± 21,83
9-k-70 %	784,80 ± 21,50	26,50 ± 1,43	451,45 ± 4,93
9-k-80 %	862,60 ± 1,98	24,98 ± 2,35	473,36 ± 13,10
9-k-90 %	849,40 ± 41,01	25,76 ± 1,90	468,28 ± 22,54
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 17. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 10

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
10	21,40 ± 2,54	49,64 ± 0,16	25,19 ± 1,27
10-g-10 %	24,60 ± 3,11	17,24 ± 0,31	24,30 ± 1,41
10-g-20 %	18,80 ± 1,13	24,63 ± 0,12	22,81 ± 0,14
10-g-30 %	12,80 ± 3,39	28,85 ± 3,63	15,64 ± 1,27
10-g-40 %	14,40 ± 8,49	32,81 ± 18,08	10,36 ± 0,56
10-g-50 %	13,60 ± 5,09	42,33 ± 16,50	9,76 ± 0,85
10-g-60 %	10,80 ± 5,09	44,06 ± 10,26	8,07 ± 0,70
10-g-70 %	8,00 ± 2,26	53,61 ± 8,46	7,07 ± 0,42
10-g-80 %	6,80 ± 0,00	62,71 ± 0,85	6,47 ± 0,14
10-g-90 %	7,00 ± 0,85	64,54 ± 0,00	7,87 ± 3,52
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
10	21,40 ± 2,54	49,64 ± 0,16	25,19 ± 1,27
10-k-10 %	178,20 ± 11,60	42,44 ± 4,19	37,35 ± 0,70
10-k-20 %	224,60 ± 4,81	39,78 ± 3,43	138,83 ± 9,30
10-k-30 %	223,20 ± 37,90	38,31 ± 3,67	197,09 ± 1,27
10-k-40 %	268,00 ± 17,54	36,94 ± 3,12	262,92 ± 8,17
10-k-50 %	387,00 ± 0,00	38,47 ± 1,76	335,13 ± 15,07
10-k-60 %	921,80 ± 41,86	36,13 ± 1,96	364,21 ± 11,41
10-k-70 %	930,80 ± 35,92	37,41 ± 1,59	396,47 ± 9,15
10-k-80 %	442,40 ± 21,21	35,61 ± 0,43	433,32 ± 21,55
10-k-90 %	402,60 ± 17,54	25,44 ± 4,19	481,23 ± 26,76
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 18. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 11

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
11	16,20 ± 4,24	60,07 ± 13,23	20,31 ± 1,41
11-g-10 %	13,40 ± 0,85	16,04 ± 5,49	22,51 ± 0,85
11-g-20 %	12,60 ± 3,68	18,09 ± 9,70	19,42 ± 8,03
11-g-30 %	10,60 ± 0,85	20,87 ± 14,02	19,62 ± 2,96
11-g-40 %	7,20 ± 0,57	25,14 ± 0,08	20,91 ± 0,85
11-g-50 %	6,20 ± 0,28	37,24 ± 7,14	13,94 ± 0,28
11-g-60 %	9,20 ± 0,57	31,64 ± 0,11	10,36 ± 0,85
11-g-70 %	4,80 ± 0,57	33,24 ± 5,04	9,16 ± 0,28
11-g-80 %	5,40 ± 3,11	53,99 ± 17,48	7,47 ± 1,55
11-g-90 %	2,00 ± 0,57	68,90 ± 0,26	9,06 ± 0,42
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
11	16,20 ± 4,24	60,07 ± 13,23	20,31 ± 1,41
11-k-10 %	325,60 ± 12,73	52,44 ± 4,19	51,49 ± 9,72
11-k-20 %	366,80 ± 9,33	49,78 ± 3,43	101,88 ± 17,32
11-k-30 %	462,20 ± 27,15	48,31 ± 3,67	147,30 ± 43,80
11-k-40 %	643,00 ± 13,01	46,94 ± 3,12	239,72 ± 0,42
11-k-50 %	664,00 ± 42,71	38,47 ± 1,76	308,44 ± 51,41
11-k-60 %	726,40 ± 3,11	36,13 ± 1,96	359,23 ± 7,46
11-k-70 %	713,20 ± 29,13	37,41 ± 1,59	395,58 ± 21,13
11-k-80 %	802,20 ± 65,05	35,61 ± 0,43	345,38 ± 66,48
11-k-90 %	806,00 ± 17,82	35,68 ± 1,89	441,49 ± 1,55
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 19. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 12

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
12	21,80 ± 1,97	51,06 ± 1,84	27,48 ± 3,09
12-g-10 %	18,60 ± 1,41	19,01 ± 10,56	26,09 ± 1,41
12-g-20 %	13,80 ± 0,85	22,84 ± 11,20	18,82 ± 3,24
12-g-30 %	10,60 ± 0,28	26,25 ± 6,37	20,02 ± 1,27
12-g-40 %	11,00 ± 0,85	35,33 ± 15,84	13,84 ± 7,75
12-g-50 %	9,20 ± 1,13	41,24 ± 8,89	12,05 ± 1,55
12-g-60 %	6,80 ± 0,00	36,80 ± 0,00	14,34 ± 3,10
12-g-70 %	6,60 ± 0,28	35,11 ± 10,49	11,75 ± 1,41
12-g-80 %	5,20 ± 1,13	50,22 ± 12,37	14,84 ± 0,42
12-g-90 %	5,00 ± 0,85	53,47 ± 0,78	10,46 ± 2,96
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
12	21,80 ± 1,97	51,06 ± 1,84	27,48 ± 3,09
12-k-10 %	340,40 ± 32,53	48,03 ± 8,17	56,67 ± 0,42
12-k-20 %	431,60 ± 9,33	47,86 ± 2,30	172,29 ± 12,96
12-k-30 %	507,20 ± 15,56	37,20 ± 3,48	211,43 ± 14,51
12-k-40 %	644,80 ± 19,52	38,79 ± 1,20	267,90 ± 7,61
12-k-50 %	611,00 ± 13,01	36,34 ± 1,06	340,80 ± 0,56
12-k-60 %	755,60 ± 50,06	34,98 ± 0,34	351,96 ± 15,21
12-k-70 %	821,00 ± 49,78	36,81 ± 0,59	426,25 ± 1,41
12-k-80 %	811,40 ± 6,22	34,59 ± 1,72	459,62 ± 13,10
12-k-90 %	928,80 ± 42,71	34,38 ± 0,50	452,35 ± 11,27
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 20. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 13

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
13	40,40 ± 10,74	53,43 ± 1,84	38,44 ± 0,85
13-g-10 %	43,00 ± 3,68	13,70 ± 0,47	35,16 ± 0,99
13-g-20 %	41,60 ± 1,13	22,26 ± 20,56	34,56 ± 0,99
13-g-30 %	40,80 ± 0,57	22,11 ± 3,21	26,49 ± 3,94
13-g-40 %	41,80 ± 0,28	30,84 ± 3,86	25,10 ± 3,66
13-g-50 %	35,60 ± 2,83	43,86 ± 3,02	19,12 ± 9,58
13-g-60 %	26,40 ± 5,66	51,00 ± 4,49	24,80 ± 1,27
13-g-70 %	14,20 ± 4,24	50,32 ± 18,70	9,36 ± 1,13
13-g-80 %	10,00 ± 0,00	58,45 ± 6,70	7,27 ± 8,87
13-g-90 %	6,00 ± 2,26	65,16 ± 0,87	9,46 ± 2,68
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
13	40,40 ± 10,74	53,43 ± 1,84	38,44 ± 0,85
13-k-10 %	422,80 ± 19,52	52,09 ± 0,89	48,90 ± 2,96
13-k-20 %	443,00 ± 18,10	51,10 ± 1,16	199,08 ± 9,15
13-k-30 %	514,00 ± 14,42	48,77 ± 0,34	219,00 ± 0,42
13-k-40 %	569,00 ± 15,84	48,07 ± 1,32	277,46 ± 10,70
13-k-50 %	652,20 ± 14,14	45,98 ± 1,76	287,32 ± 30,28
13-k-60 %	705,60 ± 50,06	45,24 ± 3,06	356,94 ± 16,06
13-k-70 %	807,20 ± 32,53	35,81 ± 1,51	403,45 ± 0,70
13-k-80 %	1095,20 ± 52,33	34,85 ± 1,83	436,51 ± 5,77
13-k-90 %	979,40 ± 18,10	33,89 ± 1,81	505,93 ± 7,61
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 21. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 14

uzorak	UF / mg _{GAE} kg ⁻¹	DPPH / % inhibicije	FRAP / μM Fe(II)
14	30,40 ± 1,13	54,26 ± 0,67	40,83 ± 3,66
14-g-10 %	32,00 ± 2,26	13,67 ± 2,60	26,99 ± 4,08
14-g-20 %	26,80 ± 7,92	17,57 ± 4,48	12,05 ± 6,90
14-g-30 %	17,20 ± 0,57	17,57 ± 0,60	27,49 ± 1,69
14-g-40 %	13,60 ± 2,83	19,18 ± 14,86	42,43 ± 9,01
14-g-50 %	11,60 ± 0,00	25,74 ± 2,89	25,69 ± 7,04
14-g-60 %	9,80 ± 0,85	42,36 ± 11,93	33,36 ± 10,84
14-g-70 %	7,60 ± 1,13	49,92 ± 5,14	33,66 ± 3,38
14-g-80 %	7,40 ± 0,28	66,03 ± 1,49	25,10 ± 3,94
14-g-90 %	5,60 ± 1,13	63,49 ± 8,60	26,99 ± 4,08
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
14	30,40 ± 1,13	54,26 ± 0,67	40,83 ± 3,66
14-k-10 %	364,20 ± 21,50	51,56 ± 0,44	76,19 ± 7,46
14-k-20 %	455,60 ± 8,77	49,80 ± 5,82	156,56 ± 6,48
14-k-30 %	536,00 ± 7,07	49,09 ± 2,68	246,39 ± 16,90
14-k-40 %	660,20 ± 15,27	38,50 ± 0,57	278,56 ± 11,13
14-k-50 %	691,00 ± 38,47	36,10 ± 5,44	327,86 ± 3,10
14-k-60 %	792,60 ± 23,76	35,50 ± 3,93	352,26 ± 23,24
14-k-70 %	730,80 ± 9,33	34,83 ± 0,61	417,79 ± 0,99
14-k-80 %	999,80 ± 17,54	34,14 ± 0,84	407,03 ± 17,04
14-k-90 %	1071,00 ± 45,82	34,64 ± 2,04	496,56 ± 25,92
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 22. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost pripremljenih patvorina s glukoznim i kukuruznim sirupom uzorka 15

uzorak	<i>UF</i> / mg _{GAE} kg ⁻¹	<i>DPPH</i> / % inhibicije	<i>FRAP</i> / μM Fe(II)
15	20,40 ± 5,65	52,61 ± 4,02	37,94 ± 10,28
15-g-10 %	31,40 ± 0,28	15,44 ± 5,94	10,46 ± 0,14
15-g-20 %	20,80 ± 3,96	30,33 ± 8,55	15,54 ± 9,58
15-g-30 %	16,80 ± 3,39	31,23 ± 3,19	10,06 ± 0,42
15-g-40 %	10,60 ± 0,28	28,44 ± 15,68	13,84 ± 4,93
15-g-50 %	7,40 ± 0,28	35,85 ± 3,14	12,25 ± 3,52
15-g-60 %	5,20 ± 0,57	32,98 ± 73,24	12,45 ± 0,99
15-g-70 %	5,60 ± 0,00	44,30 ± 3,26	10,96 ± 0,85
15-g-80 %	7,20 ± 0,57	47,36 ± 24,59	10,66 ± 0,42
15-g-90 %	4,60 ± 0,28	57,42 ± 1,62	9,56 ± 0,56
Gluk.sirup	14,55 ± 7,82	63,63 ± 3,51	7,17 ± 4,66
15	20,40 ± 5,65	52,61 ± 4,02	37,94 ± 10,28
15-k-10 %	444,20 ± 1,70	52,68 ± 0,38	74,49 ± 5,07
15-k-20 %	444,20 ± 14,14	49,25 ± 3,59	202,67 ± 20,70
15-k-30 %	414,60 ± 3,96	40,11 ± 2,96	245,89 ± 15,63
15-k-40 %	679,60 ± 36,49	36,07 ± 2,32	335,23 ± 22,25
15-k-50 %	737,20 ± 7,07	37,01 ± 0,36	370,98 ± 15,92
15-k-60 %	808,20 ± 3,96	37,23 ± 0,87	420,08 ± 27,04
15-k-70 %	846,80 ± 27,44	35,53 ± 3,97	475,55 ± 9,15
15-k-80 %	784,80 ± 21,78	35,34 ± 4,01	434,22 ± 11,55
15-k-90 %	884,20 ± 0,00	35,78 ± 2,72	455,13 ± 9,86
Kukur.sirup	827,94 ± 5,60	28,66 ± 8,00	485,23 ± 5,00

Tablica 23. Osnovna statistička analiza vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti pripremljenih patvorina

	<i>UF</i> / mg _{GAE} kg ⁻¹	<i>DPPH</i> / % inhibicije	<i>FRAP</i> / μM Fe(II) u 10 % otopini meda
glukozni sirup			
srednja vrijednost	28,748	39,991	18,023
standardna devijacija	22,635	16,314	9,954
minimum	1,000	11,202	3,386
maksimum	96,600	77,161	45,414
kukuruzni sirup			
srednja vrijednost	579,477	36,705	294,708
standardna devijacija	204,352	7,469	150,107
minimum	178,200	21,519	23,304
maksimum	1095,200	52,954	565,780

Tablica 24. Korelacijska matrica između vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti pripremljenih patvorina s glukoznim odnosno kukuruznim sirupom

	<i>UF</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>
<i>UF</i>	1,000		
<i>DPPH</i>	-0,210 (-0,525)	1,000	
<i>FRAP</i>	0,451 (0,810)	-0,557 (-0,751)	1,000

4.5. MODELI NEURONSKIH MREŽA ZA OPIS UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST PRIPREMLJENIH PATVORINA MEDA

Umjetne neuronske mreže osim za predikciju udjela patvorine, gdje su pokazale jako dobre rezultate, koristile su se i za predikciju udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti pripremljenih patvorina. Za konstrukciju modela neuronske mreže također su korišteni rezultati snimljenih UV-VIS spektara za pripremljene patvorine. Generalno gledano, modeli za predikciju udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti znatno su lošiji nego modeli neuronskih mreža za predikciju udjela patvorina u medu. U tablici 25 označeni su modeli koji su korišteni za predikciju karakteristika za obe patvorine. Model neuronske mreže korišten za patvorine glukoznog sirupa je tipa MLP 5-3-3 sa skrivenom aktivacijskom funkcijom tanh i izlaznom aktivacijskom funkcijom tipa funkcija identiteta. Preciznosti učenja, testiranja i validacije za ovaj model iznose $R^2 = 0,6948$, $0,6730$ odnosno $0,7274$. Unatoč nešto lošijim vrijednostima preciznosti modela za navedene procese, greške istih procesa su minimalne. Model za predikciju kemijskih karakteristika u patvorinama podosta je bolji od prethodno opisanog modela (MLP 5-3-3 model za patvorine glukoznog sirupa). Karakterizira ga 7 neurona u skrivenom sloju (tip MLP 5-7-3) s vrlo dobrim preciznostima za učenje, testiranje i validaciju od $R^2 = 0,9021$, $0,8892$ te $0,9242$. Kao i za prethodni model pogreške su također minimalne. Skrivena aktivacijska funkcija ovog modela je tanh funkcija, a logistička funkcija je izlazna aktivacijska funkcija.

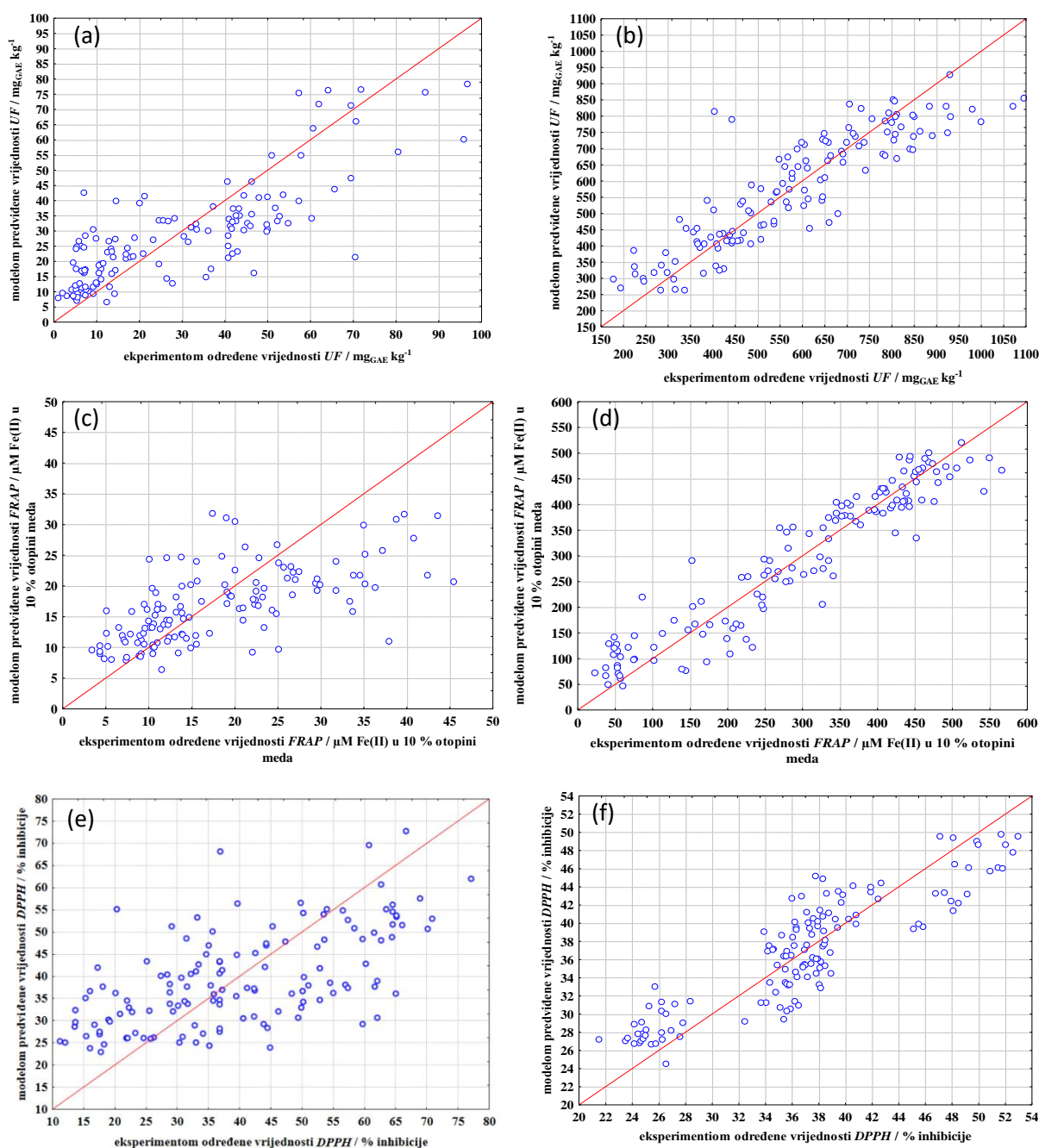
Koeficijenti za predikciju kemijskih karakteristika patvorina meda prikazani su u tablici 26. Kako se može vidjeti, koeficijenti korelacije su najlošiji za predikciju rezultata DPPH metode s koeficijentima korelacije $R^2 = 0,6089$, $0,6416$ i $0,6172$, ali i sveukupno gledano koeficijenti korelacije su lošiji za patvorine glukoznog sirupa nego kukuruznog. Model neuronske mreže za predikciju udjela polifenola i antioksidacijske aktivnosti ima najbolje karakteristike za određivanje rezultata FRAP metode s koeficijentima korelacije za učenje, testiranje i validaciju od $R^2 = 0,9531$, $0,8943$ odnosno $0,9579$. Grafički prikazi eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti za udjele ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti prikazani su na Slici 11.

Tablica 25. Neuronske mreže odabrane za predikciju udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti patvorina meda s glukoznim i kukuruznim sirupom na temelju UV-VIS spektara (mreža odabrana za predikciju označena sivom bojom u tablici)

Tip mreže		Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
Glukozni sirup	MLP 5-6-3	0,7061	0,6784	0,7252	0,0415	0,0531	0,0561	Tanh	Logistička funkcija
	MLP 5-6-3	0,7386	0,6593	0,7201	0,0372	0,0372	0,0529	Logistička funkcija	Tanh
	MLP 5-3-3	0,7247	0,6588	0,7102	0,0393	0,0515	0,0545	Tanh	Tanh
	MLP 5-3-3	0,6948	0,6730	0,7274	0,0423	0,0508	0,0530	Tanh	Funkcija identiteta
	MLP 5-3-3	0,6935	0,6778	0,6999	0,0429	0,055	0,0589	Tanh	Funkcija identiteta
Kukuruzni sirup	MLP 5-9-3	0,8805	0,8843	0,9206	0,0181	0,0197	0,0184	Tanh	Funkcija identiteta
	MLP 5-4-3	0,8912	0,8734	0,9242	0,0165	0,0210	0,0181	Logistička funkcija	Tanh
	MLP 5-7-3	0,9021	0,8892	0,9242	0,0151	0,0182	0,0159	Tanh	Logistička funkcija
	MLP 5-11-3	0,8949	0,8908	0,9216	0,0161	0,0183	0,0179	Logistička funkcija	Tanh
	MLP 5-6-3	0,8704	0,8890	0,9257	0,0194	0,0192	0,0196	Eksponecijalna funkcija	Tanh

Tablica 26. Koeficijenti korelacije za predikciju udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti patvorina meda s glukoznim i kukuruznim sirupom na temelju UV-VIS spektara

		R^2		
		učenje	testiranje	validacija
Glukozni sirup	<i>UF</i>	0,8018	0,9323	0,8089
	<i>DPPH</i>	0,6089	0,6416	0,6172
	<i>FRAP</i>	0,7074	0,6413	0,7495
Kukuruzni sirup	<i>UF</i>	0,8805	0,8667	0,8728
	<i>DPPH</i>	0,8727	0,8757	0,9478
	<i>FRAP</i>	0,9531	0,8943	0,9579



Slika 11. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti i modelom neuronske mreže predviđenih vrijednosti udjela ukupnih polifenola u patvorinama s (a) glukoznim sirupom, (b) kukuruznim sirupom, antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u patvorinama s (c) glukoznim sirupom, (d) kukuruznim sirupom i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u patvorinama s (e) glukoznim sirupom i (f) kukuruznim sirupom na temelju UV-VIS spektara

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti:

- (1) Analiza glavnih komponenata UV-VIS spektra daje zadovoljavajuće razdvajanje patvorenih uzoraka meda na dvije velike skupine.
- (2) PLS modeli i modeli neuronskih mreža pokazuju izvrsne rezultate za predikciju udjela patvorina kukuruznog i glukoznog sirupa u medu na temelju UV-VIS spektara s minimalnim pogreškama ($R^2 > 0,90$)
- (3) U analiziranim uzorcima meda su koncentracije ukupnih polifenola u rasponu od $UF = 13,80 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$ do $UF = 108,40 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ kg}^{-1}$
- (4) Najveću količinu redukcije Fe^{3+} -TPTZ - a ostvaruje uzorak br. 9 od $49,49 \mu\text{M}$ $\text{Fe}(\text{II})$ u 10 % otopini meda, a koji sadrži najveću količinu polifenola. Ista stvar vrijedi i za najmanju količinu redukcije Fe^{3+} -TPTZ – a od $20,32 \mu\text{M}$ $\text{Fe}(\text{II})$ u 10 % otopini meda koju ostvaruje uzorak br. 11
- (5) Dodatak kukuruznog sirupa u čiste medove uzrokuje porast udjela polifenola, smanjenje postotka inhibicije radikala određivane DPPH metodom i povećanje antioksidacijske aktivnosti određivane FRAP metodom dok dodatak glukoznog sirupa ima za posljedicu smanjenja udjela ukupnih polifenola, djelomično smanjenje postotka inhibicije radikala određivane DPPH metodom i smanjenje antioksidacijske aktivnosti određivane FRAP metodom u pripremljenim patvorinama meda.

6. LITERATURA

Anonymous 1, <<https://www.pijanitvor.com/threads/med-zdrav-ili-ne.27095/page-5#lg=attachment14389&slide=0>>, pristupljeno 26.05.2019.

Anonymous 2, <<https://bionewscentral.com/cancer-cells-co-opt-pain-sensing-wasabi-receptor-to-survive-oxidative-stress/>>, pristupljeno 01.06.2019.

Anonymous 3, <<https://courses.lumenlearning.com/physics/chapter/24-3-the-electromagnetic-spectrum/>>, pristupljeno 01.06.2019.

Alvarez – Suarez, J. M., Tulipani, S. R., Battino, M. (2010) Contribution of honey in nutrition and human health: review. *Med. J. Nutrition Metab.* **3**, 15 – 23.

Alvarez – Suarez, J. M., Giampieri, F., Gonzalez – Paramas, A. M., Damiani, E., Astolfi, P., Martinez – Sanchez, G. (2012) Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1508 – 1516.

Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A. (2012) Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *J. Saudi Chem. Soc.* **5**, 618 – 625.

Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A. (2016) Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. *Arab. J. Chem.* **9**, 114 – 120.

Andersen, Ø. M., Markham, K. R. (2006) Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications, Taylor & Francis, New York.

Başar, B., Özdemir, D. (2018) Determination of honey adulteration with beet sugar and corn syrup using infrared spectroscopy and genetic-algorithm-based multivariate calibration. *J. Sci. Food Agr.* **98**, 5616-5624.

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

Beratta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **533**, 185 – 191.

Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007) Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* **105**, 822 – 828.

Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E. A., Silici, S., Kolayli, S. (2015) An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem.* **180**, 133 – 141.

Cienciosi, D., Forbes – Hernandez, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo – Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Lamas, L. B., Martinez Florez, S., Toyos, P. A., Quiles, J. L., Giampieri, F., Battion, M. (2018) Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules* **23**, 2322.

Cordella, C. B. Y., Militão, J. S. L. T., Clément, M. C., Cabrol-Bass, D. (2003) Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC – PAD profiles. 1. Honey floral species characterization. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3234 – 3242.

- da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., Fett, R. (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* **196**, 309 – 323.
- Di Anibal, C., Rodriguez, M. S., Albertengo, L. (2014) UV-Visible spectroscopy and multivariate classification as a screening tool to identify adulteration of culinary spices with Sudan 1 and blends of Sudan 1 + 4 dyes. *Food Anal. Method.* **7**, 1090 – 1096.
- dos Santos, W. N. L., Sauthier, M. C. S., dos Santos, A. M. P., Santana, D. A., Azevedo, R. S. A., Caldas, J. C. (2017) Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds inguava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and neural network analysis (NNA). *Microchem. J.* **133**, 583 – 592.
- El Darra, N., Rajha, H. N., Saleh, F., Al-Oweini, R., Maroun, R. G., Louka, N. (2017) Food fraud detection in commercial pomegranate molasses syrups by UV-VIS spectroscopy, ATR-FTIR and HPLC methods. *Food Control* **78**, 132 – 137.
- Escuredo, O., Miguez, M., Fernandez – Gonzalez, M. Seijo, M. C. (2013) Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chem.* **138**, 851 – 856.
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., Estevinho, L. M. (2009) Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* **114**, 1438 – 1443.
- Funes, E., Allouche, Y., Beltran, G., Jimenez, A. (2015) A review: Artificial neural networks as tool for control food industry process. *J. Sensor Tech.* **5**, 28 – 43.
- Gad, H. A., El-Ahmady, S. H., Abou-Shoer, M. I., Al-Azizi, M. M. (2012) Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. *Phytochem. Analysis* **24**, 1 – 24.
- Gagné, F. (2014) *Biochemical Ecotoxicology*, Elsevier Inc., London, str. 103 – 115.
- Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L., Maggio, R. M. (2017) Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends Food Sci. Tech.* **72**, 83 – 90.
- Granato, D., Putnik, P., Bursac Kovačević, D., Santos, J. S., Calado, V., Rocha, R. S., Cruz, A. G., Jarvis, B., Rodionova, O. Y., Pomerantsev, A. (2018) Trends in chemometrics: Food authentication, microbiology and effects of processing. *Compr. Rev. Food. Sci. F.* **17**, 663 – 677.
- Gül, A., Pehlivan, T. (2018) Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 1056 – 1065.
- Irudayaraj, J., Xu, R., Tewari, J. (2006) Rapid determination of invert cane sugar adulteration in honey using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *J. Food Sci.* **68**, 2040 – 2045.
- Jiménez, A., Aguilera, M. P., Uceda, M., Beltrán, G. (2009) Neural network as tool for virgin olive oil elaboration process optimization. *J. Food Eng.* **95**, 135 – 141.

- Kek, S. P., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Tan, S. W., Chua, L. S. (2014) Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis* spp. and *Trigona* spp. bees. *Agric. Agric. Sci. Proc.* **2**, 150 – 155.
- Kumaravelu, C., Gopal, A. (2014) Detection and quantification of adulteration in honey through Near Infrared Spectroscopy. *Int. J. Food Prop.* **18**, 1930 – 1935.
- Lamrini, B., Della Valle, G., Trelea Perrot, I. C., Trystram, G. (2012) A new method for dynamic modeling of bread dough kneading based on artificial neural network. *Food Control* **26**, 512 – 524.
- Li, S., Shan, Y., Zhu, X., Zhang, X., Lin, G. (2012) Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. *J. Food Compos. Anal.* **28**, 69 – 74.
- Lorber, A., Wangen, L. E., Kowalski, B. R. (1987) A theoretical foundation for the PLS algorithm. *J. Chemometr.* **1**, 19 – 31.
- Major, N., Marković, K., Krpan, M., Šarić, G., Hruškar, M., Vahčić, N. (2011) Rapid honey characterization and botanical classification by an electronic tongue. *Talanta* **85**, 569 – 574.
- Manzanares, A. B., Garcia, H., Galdon, B. R., Rodriguez, E. R., Romero, C. D. (2014) Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *Food Sci. Tech.* **55**, 572 – 578.
- Marghitas, L. A., Dezmirean, D. S., Pocol, C. B., Ilea, M., Bobis, O., Gergen, I. (2010) The development of a biochemical profile of acacia honey by identifying biochemical determinants of its quality. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* **38**, 84 – 90.
- Martelo-Vidal, M. J., Vázquez, M. (2014) Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chem.* **158**, 28 – 34.
- Meng, X., Zhang, M., Adhikari, B. (2012) Prediction of storage quality of fresh-cut green peppers using artificial neural network. *Int. J. Food Sci. Tech.* **47**, 1586 – 1592.
- Moreira, R. F. A., Maria, C. A. B., Pietroluongo, M., Trugo, L. C. (2010) Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem.* **121**, 697 – 704.
- Mouazen, A. M., Al-Walaan, N. (2014) Glucose adulteration in Saudi honey with visible and near infrared spectroscopy. *Int. J. Food Prop.* **17**, 2263 – 2274.
- Naila, A., Flint, S. H., Sulaiman, A., Ajit, A., Weeds, Z. (2018) Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. *Food Control* **90**, 152 – 165.
- Nawrocka, A., Lamorska, J. (2013) Determination of food quality by using spectroscopic methods. U: *Advances in agrophysical research*, (Grundas, S., Stępniewski, A., ured.), IntechOpen, London, str. 347 – 367.
- Pravilnik o medu (2015) *Narodne novine* **53**, Zagreb.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 790 – 795.

Ruiz – Navajas, Y., Viuda – Martos, M., Fernandez – Lopez, J., Zaldivar – Cruz, J.M., Kuri, V., Perez – Alvarez, J.A. (2011) Antioxidant activity of artisanal honey from Tabasco, Mexico. *Int. J. Food Prop.* **14**, 459 – 470.

Satarupa, R., Subha, G. (2014) Physical, chemical and antioxidant properties of honey: A review. *Asian J. Chem. Pharm. Res.* **2**, 96 – 99.

Souto, U. T. C. P., Barbosa, M. F., Dantas, H. V., Pontes, A. S., Lyra, W. S., Diniz, P. H. G. D., Araujo, M. C. U., Silva, E. C. (2015) Identification of adulteration in ground roasted coffees using UV/Vis spectroscopy and SPA – LDA. *LWT Food Sci. Technol.* **63**, 1037 – 1041.

Üçüncüoğlu, D., İlaslan, K., Boyacı, I. H., Özyay, D. S. (2013) Rapid detection of fat adulteration in bakery products using Raman and near-infrared spectroscopies. *Eur. Food Res. Technol.* **237**, 703 – 710.

Zábrodská, B., Vorlová, L. (2014) Adulteration of honey and available methods for detection – a review. *Acta Vet. Brno* **83**, 85 – 102.

Zhao, J. W., Han, X. Y., Chen, Q. S., Ouyang, Q. (2013) Identification of adulterated honey based on three dimensional fluorescence spectra technology. *Spectr. Spectral Anal.* **33**, 1626 – 1030.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta