

Analiza utjecaja temperature na fizikalna svojstva vodenih ekstrakata planinskog vrijeska (Satureja montana L.) pomoću UV-VIS i NIR spektroskopije

Jović, Lucija

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:159:836374>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2019.

Lucija Jović

989/N

**ANALIZA UTJECAJA
TEMPERATURE
NA FIZIKALNA SVOJSTVA
VODENIH EKSTRAKATA
PLANINSKOG VRIJESKA
(*Satureja montana* L.)
POMOĆU UV-VIS I NIR
SPEKTROSKOPIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Davora Valingera.

Zahvala

Zahvaljujem se svom mentoru doc.dr.sc. Davoru Valingeru na ukazanoj pomoći i na iznimnom mentorstvu.

Zahvaljujem se svim članovima Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za pomoć pri izradi diplomskog rada i na uvijek predivnoj i veseloj atmosferi.

Zahvaljujem se svojoj krvnoj famiji na enormnoj podršci.

Zahvaljujem se famiji kroz sve dane studiranja Luciji, Tei, Ivani i Angelu.

Zahvaljujem se životnoj famiji, prijateljima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

ANALIZA UTJECAJA TEMPERATURE NA FIZIKALNA SVOJSTVA VODENIH EKSTRAKATA PLANINSKOG VRIJESKA (*Satureja montana* L.) POMOĆU UV-VIS I NIR SPEKTROSKOPIJE

Lucija Jović, 989/N

Sažetak: *Planinski vrijesak (*Satureja montana* L.) je biljka karakteristična za podneblje Mediterana. Biljka je vrlo jednostavna za uzgoj i kroz povijest se često koristila kao ublaživač bolova u mišićima i prilikom liječenja grčeva i mučnina. U posljednje se vrijeme sve više koriste eterična ulja planinskog vrijeska koja su pokazala antibakterijska i antivirusna svojstva. U ovom radu provedena je analiza kinetike vodene ekstrakcije tri različita tipa vrijeska (svježeg, sušenog i kupovnog planinskog vrijeska (*Satureja montana* L.)) pri trima različitim temperaturama ($T = 40, 60$ i 80 °C) i ukupnom vremenu ekstrakcije od $t = 90$ min. Vodenim ekstraktima su određena fizikalna svojstva (električna vodljivost, ukupne otopljene tvari (TDS), pH), kemijska svojstva (ukupni polifenoli) te su snimani UV-VIS i NIR kontinuirani spektri. Uočeno je da porast temperature ekstrakcije ima za posljedicu porast električne vodljivosti, ukupnih otopljenih tvari i ukupnih polifenola u svim vodenim ekstraktima. Kako bi se pomoću umjetnih neuronskih mreža (ANN) uspjelo povezati UV-VIS i NIR spektre s fizikalnim svojstvima, napravljena je analiza glavnih komponenata (PCA), najprije UV-VIS spektara, a zatim NIR spektara. U slučaju predikcije ANN fizikalnih svojstava vodenih ekstrakata dobiveni su bolji rezultati, u smislu viših koeficijenata determinacije, za UV-VIS spektre gdje su za sva fizikalna svojstva bili u rasponu od $R^2 = 0,89$ do $R^2 = 0,98$.*

Ključne riječi: *planinski vrijesak (*Satureja montana* L.), ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektroskopija, blisko infracrvena spektroskopija (NIR), umjetne neuronske mreže*

Rad sadrži: 42 stranice, 19 slika, 3 tablice, 44 literaturna navoda

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

Jezik izvornika: hrvatski

Mentor: *Doc.dr.sc. Davor Valinger*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Maja Benković*
2. Doc.dr.sc. *Davor Valinger*
3. Doc.dr.sc. *Tamara Jurina*
4. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać-Kovačević* (zamjena)

Datum obrane: 12. 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: Nutrition

ANALYSIS OF TEMPERATURE INFLUENCE ON PHYSICAL PROPERTIES OF AQUEOUS EXTRACTS OF WINTER SAVORY (*Satureja montana* L.) WITH UV-VIS AND NIR SPECTROSCOPY

Lucija Jović, 989/N

Abstract: *Winter savory (*Satureja montana* L.) is traditional plant in the Mediterranean region. Through history the plant has often been used as a muscles pain reliever and in the treatment of cramps and nausea. Lately, essential oils of winter savory, which have shown antibacterial and antiviral properties, have been increasingly used. In this paper, the analysis of kinetics of aqueous extraction of three different types of savory (fresh, dried and purchasing winter savory (*Satureja montana* L.)) was performed at three different temperatures ($T = 40, 60$ and $80\text{ }^{\circ}\text{C}$) during time of $t = 90\text{ min}$. For aqueous extracts physical properties (electrical conductivity, total dissolved solids (TDS), pH) and chemical properties (total polyphenols) were determined and for all the extracts UV-VIS and near infrared (NIR) spectra were recorded. It was observed that the increase in extraction temperature results in an increase in electrical conductivity, TDS and total polyphenols in all aqueous extracts. In order to predict the physical and chemical properties by UV-VIS and NIR spectroscopy with the use of artificial neural networks (ANN), principal component analysis was performed on UV-VIS spectra followed by NIR spectra. In the case of the prediction of the physical and chemical properties of the aqueous extracts, the results obtained with ANN models showed higher coefficients of determination for UV-VIS spectra, where for all physical properties they were in the range from $R^2 = 0,89$ to $R^2 = 0,98$.*

Keywords: *winter savory (*Satureja montana* L.), ultraviolet–visible (UV-VIS) spectroscopy, near infrared spectroscopy (NIR), artificial neural networks*

Thesis contains: 42 pages, 19 figures, 3 tables, 44 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Davor Valinger, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
2. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
3. PhD. *Tamara Jurina*, Assistant professor
4. PhD. *Danijela Bursać-Kovačević*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 12 July, 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KARAKTERISTIKE <i>Satureja</i> VRSTA	3
2.2. FITOKEMIJA	4
2.2.1. Hlapljive tvari (terpeni)	4
2.2.2. Fenolne kiseline.....	5
2.2.3. Flavonoidi i slični spojevi	5
2.2.4. Ostale fitokemikalije	5
2.2.5. Anorganski spojevi	6
2.3. METODE ODREĐIVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA BILJNIH ESKTRAKATA	6
2.3.1. Metode određivanja fizikalnih svojstava	6
2.3.1.1. <i>Ukupne otopljene tvari (TDS) i električna vodljivost</i>	6
2.3.1.2. <i>pH</i>	7
2.3.2. Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola	7
2.3.3. Spektrofotometrijske metode	7
2.3.3.1. <i>UV-VIS spektroskopija</i>	7
2.3.3.2. <i>NIR spektroskopija i kemometrija</i>	8
2.3.3.3. <i>Umjetne neuronske mreže (ANN)</i>	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Otapala i reagensi.....	11
3.1.2. Aparatura i pribor.....	12
3.2. METODE	13
3.2.1. Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva	13
3.2.2. Ukupne otopljene tvari (TDS) i električna vodljivost	13
3.2.3. pH vrijednost ekstrakta	13
3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola	14
3.2.5. UV- VIS spektroskopija.....	15
3.2.6. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR)	15
3.2.7. Analiza glavnih komponenata.....	15

3.2.8. Umjetne neuronske mreže	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA (ELEKTRIČNA VODLJIVOST, TDS, pH) I UKUPNI POLIFENOLI	17
4.1.1. Električna vodljivost	17
4.1.2. TDS (ukupne otopljene tvari)	19
4.1.3. pH	21
4.1.4. Ukupni polifenoli.....	23
4.2. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI	26
4.3. UMJETNE NEURONSKE MREŽE	31
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Upotreba samoniklog bilja predstavlja jedan od najstarijih načina liječenja. Zbog povećane dostupnosti sintetičkih lijekova, zapostavlja se prirodan način liječenja odnosno liječenja pomoću biljaka. Flora mediteranskog bilja uključuje veliki broj samoniklog bilja koje se stoljećima koristi u mediteranskoj prehrani. Planinski vrijesak (*Satureja montana* L.) je aromatična biljka koja je kao začim korištena od davnina i naravno, kao ljekovito bilje u Dalmaciji. Vrijesak sadrži timol i karvakrol u sastavu eteričnih ulja, zbog čega mu se pripisuje visok antioksidacijski kapacitet (Radonić i Miloš, 2003).

Statističke procjene provedene u Australiji i SAD-u ukazuju na to da je čak 48,5 % i 34 % osoba koristilo barem jednu nekonvencionalnu metodu liječenja (Kim i sur., 2007; Momtaz i Abdollahi, 2010). U zemljama u razvoju, oko 65-80 % svjetske populacije primarno koristi biljke za liječenje zbog nedostatka adekvatne zdravstvene skrbi (Calixto, 2005; Momtaz i Abdollahi, 2010).

U zadnje vrijeme vrši se mnogo istraživanja s ljekovitim biljem koje pokazuju pozitivan učinak na mnoge bolesti. Vodeći se statističkim rezultatima, u lijekovima koji se trenutno koriste, oko 25 % aktivnih komponenti je prvo identificirano u biljkama. Nadalje, 20 000 aktivnih komponenti korišteno je u medicinske svrhe dok su neke od njih, čak oko 4 000, korištene u svakodnevnoj uporabi. Od svih njih, samo se 10 % trenutno koristi u komercijalne svrhe (Kim i sur., 2007; Momtaz i Abdollahi, 2010).

U ovom radu provedeno je istraživanje na vodenim ekstraktima svježe ubranog vrijeska, osušenog vrijeska i kupljenog osušenog vrijeska. Cilj rada bio je utvrditi može li se UV-VIS spektroskopija ili blisko infracrvena spektroskopija (NIR) koristiti za određivanje fizikalnih svojstava (električna vodljivost, ukupno otopljene tvari (TDS) i pH) i kemijskih svojstava (ukupni polifenoli) vodenih ekstrakata. Također je ispitana kinetika vodenih ekstrakata svih triju biljaka pri različitim temperaturama (40, 60 i 80 °C), kako bi se pratila promjena fizikalnih i kemijskih svojstava tijekom vremenskog intervala od 90 minuta.

Ispitano je može li se UV-VIS spektroskopija koja je jedna od standardnih metoda za određivanje ukupnih polifenola također koristiti i za određivanje fizikalnih svojstava biljnih ekstrakata te isto tako može li se NIR spektroskopija, koja je neinvazivna i brza metoda i za koju nije potrebno pripremati uzorke prije snimanja, koristiti za određivanje navedenih svojstava. Primjenom UV-

VIS spektroskopije i NIR spektroskopije, zbog velikog broja uzoraka koji su snimljeni i velikog broja valnih duljina, korištena je kemometrijska analiza prilikom obrade podataka. Korištenjem analize glavnih komponentata (PCA) smanjen je broj varijabli, snimljenih UV-VIS i NIR spektara, koje su kasnije korištene za umjetne neuronske mreže (ANN) kako bi se vidjelo na temelju učenja, testiranja i validacije ANN modela mogućnost predviđanja fizikalnih i kemijskih svojstava ispitivanih ekstrakata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KARAKTERISTIKE *Satureja* VRSTA

Grmovi vriješka su karakteristično maleni i niski te uvijek rastu u sličnim uvjetima gdje ima dosta zraka, sunca i na stjenovitim područjima. *Satureja* je dobro poznata medicinska i aromatična biljka s velikim brojem endemičnih vrsta koje rastu u divljini Mediterana. Pokazala se kao biljka najbolja za proizvodnju meda zbog bogatog sastava eteričnih ulja. Međutim, među svim ovim vrstama dolazi do varijacija u sastavu eteričnih ulja. Eterična ulja pomažu biljci u fiziološkim procesima, ali imaju i ekološku funkciju, tako da pomažu biljci da komunicira s okolišom (Vidić i sur., 2009).

U radu od Vidić i sur. (2009) prikazuje se usporedba sastava eteričnih ulja između vrsta *Satureja montana* L. i *Satureja visianii* Šilić. Oba uzorka biljaka uzeta su na Pelješcu u sličnim ekološkim uvjetima. *Satureja visianii* Šilić stenoendemična je vrsta karakteristična za područje poluotoka Pelješca u južnom dijelu Jadrana. Razlikuje se od ostalih *Satureja* vrsta jer posjeduje drugačije cvjetove koji su pomalo žućkasti s ljubičastim točkicama i crtama. Područje Pelješca posjeduje tipičnu mediteransku klimu s dugim, suhim i toplim ljetima. Uzorak biljke *S. visianii* uzet je nakon perioda cvatnje, dok je uzorak *S. montana* uzet na početku cvatnje. U navedenom radu prikazan je sastav eteričnih ulja putem plinske kromatografije, a u rezultatima su prikazani značajnije veći udjeli eteričnih ulja u vrsti *S. visianii* naspram *S. montana*. Identificirano je više od 120 spojeva u obje vrste. U eteričnom ulju vrste *S. visianii* pronađeno je 88 spojeva, koji su sačinjavali 90,4% od ukupnog ulja. Za *Satureja* vrste karakterističan je najveći udio timola i karvakrola. Kod *S. visianii* je, nakon timola i karvakrola u ukupnom sastavu ulja, primijećen velik udio viridiflorola (seskviterpenski alkohol) u ukupnom udjelu od 17,9%.

Satureja vrste pokazuju mnoge terapijske učinke: sadrže mnoštvo antioksidansa, sudjeluju u kontroli lipida u krvi, sudjeluju u kontroli šećera u krvi, inhibiraju lipidnu peroksidaciju, djeluju protuupalno, analgetski, anitpoliforirajuće, antifugalno, vazorelaksirajuće, antiviralno i posjeduju antikoagulacijski efekt. U radu od Babajafari i sur. (2015) prikazuje se utjecaj *Satureja* vrsta na metabolički sindrom. Metabolički sindrom je stanje u organizmu gdje dolazi do neosjetljivosti stanica na inzulin, čime se višak glukoze u krvi ne može pospremiti u stanice. Takvim djelovanjem dolazi do povišenja koncentracije glukoze u krvi. U prijašnjim istraživanjima se sve više navodi odmak od modernih načina liječenja i terapija te sve veća upotreba biljnih i prirodnih

načina pomoći organizmu. Također su se takva djelovanja pokazala djelotvornijima na organizam naspram sintetički dobivenih spojeva. Naravno, uvijek treba obratiti pozornost na sastav spojeva i na moguće interakcije s nužnim terapijama (Babajafari i sur., 2015).

Satureja montana je biljka koja je pokazala povoljno djelovanje na uranjene probleme s erektilnom disfunkcijom. Eretilna disfunkcija je problem koji pogađa čak 23 % muškaraca. U radu od Paco i sur. (2016) navodi se kako sekundarni metaboliti iz *Satureja montana* djeluju na neurotransmitere poput serotonina i na prokrvljenost krvnih žila. U radu od Sansalone i sur., (2016) provedena je studija s muškarcima koji su imali problema s erektilnom disfunkcijom, a koji su u periodu od tri mjeseca dobivali terapiju. U terapiji su bili uključeni ekstrakti biljaka *Satureja montana*, *Tribulus terrestris*, *Phyllanthus emblica*. Nakon provedene studije, zabilježeni su znatno poboljšani učinci na erektilnu disfunkciju u muškaraca koji su dobivali terapiju naspram onih koji su dobivali placebo.

2.2. FITOKEMIJA

2.2.1. Hlapljive tvari (terpeni)

Satureja vrste iznimno su bogate oksigeniranim terpenima, dok su timol i karvakrol ipak najzastupljeniji u sastavu eteričnih ulja. Obe hlapljive tvari pronađene su u vrstama poput *S. cuneifolia*, *S. hortensis*, *S. montana*, *S. spicigera*, *S. thymbra*, i *S. bachtiarica*. Timol i karvakrol zatim prate p-cimeni i γ -terpeni. Kamfor je pronađen kao komponenta kod *S. visanii* Šilić (Bezić i sur., 2009; Dunkić i Bezić, 2008.; Vidić i sur., 2009).

Timol i karvakrol su komponente koje nalazimo u svim vrstama, međutim, terpeni koje je također bitno naglasiti su: piperiton, piperitenon i piperitenon oksid (*S. parvifolia*), kamfor (*S. visanii*), timokinon, geraniol, karvakrol i metil eter (*S. montana*), linalo, borneol, beta-kariofilen, alfa-pinen, limonen, alfa-terpenin, terpinen-4-ol, spatulenol i mircen (Vidić i sur., 2009).

2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline nalazimo u velikom broju *Satureja* vrsta, dok najveći udio u fenolnim kiselinama čini ružmarinska kiselina. Kafeinska kiselina druga je fitokemikalija nađena u *Satureja* vrstama i karakteristična je fenolna kiselina vrsta *S. hortensis*, *S. icerica* i *S. montana*. Ostale fenolne kiseline pronađene u ovim vrstama su p-kumarinska, ferulinska, galna, klorogenična, prokatehinska, vanilinska i karnoična kiselina (Tepe i Cilkiz, 2015).

2.2.3. Flavonoidi i slični spojevi

Flavonoidi su skupina spojeva koja obuhvaća mnoštvo podskupina, a koje također pronalazimo u *Satureja* vrstama. Podskupine flavonoida su: flavoni, flavanoli, flavanoni, flavan-3-oli i flavanonoli. Glukozidi se svrstavaju u flavanoide kao flavonoidni glukozidi, flavanonski glukozidi, flavonski glukozidi i flavonolski glukozidi. Flavoni koje najčešće nalazimo u *Satureja* vrstama su luteolin, apigenin i timonin (Gohari i sur., 2009; Moradi i sur., 2008).

Flavanoli koje najčešće nalazimo u *Satureja* vrstama su kvercetin, epikatehin-3-*O*-galat, epigalokatehin-3-*O*-galat, kampferol i mircetin. Kvercetin nalazimo u najvećem broju vrsta poput *S. cilicica*, *S. corulea* L., *S. hortensis*, *S. icerica*, *S. montana* i *S. sahendica* (Alizahed, 2011; Četojević-Simin i sur., 2012; Exarchou i sur., 2002; Kayedi i sur., 2014).

Četojević-Simin i sur. (2012) također su identificirali flavanonske glukozide (narangin, naringenin glukozid i hesperidin), flavonske glukozide (vitexin, apigenin-7-glukozid, luteolin glukozid, apigenin glukozid) i rutin (flavonolski glukozidi) kod *S. cilicica*, *S. corulea* i *S. icerica*.

2.2.4. Ostale fitokemikalije

U radu Kitić i sur. (1999) navedene su linolenska, linolna, palmitinska i oleinska kiselina kod vrsta *S. adamovicii* Šilić i *S. fukarekii* Šilić. Kod *S. hortensis* zabilježeni su enzimi flavocitokrom b(2), citokrom b(2) (NAD-neovisna laktat dehidrogenaza), peroksidazni izoenzimi, *o*-dianizid peroksidaza, lignin peroksidaza, askorbat peroksidaza, i superoksid dismutaza (Arzi i sur., 2008, 2010; Keyhani i Keyhani, 2006; Keyhani i sur., 2009; Paknia i sur., 2006).

2.2.5. Anorganski spojevi

Anorganski spojevi također se nalaze u *Satureja* vrstama. U znanstvenom radu Dunkić i sur. (2012) kod *S. montana* i *S. subspicata* (Bartl. ex Vis) prikazani su prisutni Ca, Mg, K, Na, i Hg. Prema ovom istraživanju, pronađene su visoke razine Ca i Mg, nešto niže koncentracije K i Na te niske koncentracije Hg u ovim vrstama.

Grzeszczuk i Jadczyk (2009) u svom su radu naveli pronađene razine dušika, ukupnih proteina, ukupnih šećera, reducirajućih šećera, saharoze, klorofila a, klorofila b, vitamina c, nitrata i nitrita kod vrste *S. hortensis*.

2.3. METODE ODREĐIVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA BILJNIH EKSTRAKATA

2.3.1. Metode određivanja fizikalnih svojstava

2.3.1.1. Ukupne otopljene tvari (TDS) i električna vodljivost

Električna vodljivost sposobnost je otopine da provodi električnu struju. Sposobnost otopine da posjeduje električnu vodljivost ovisi o čimbenicima poput: prisutnosti iona, koncentraciji iona, pokretljivosti i valenciji iona i temperaturi mjerenja. Organski spojevi ili imaju slabu električnu vodljivost ili je nemaju, dok su anorganski spojevi u obliku otopina većinski dobri vodiči. Mjerna jedinica električne vodljivosti je mikrosimens po centimetru ($\mu\text{S cm}^{-1}$), a to je recipročna vrijednost jedinici otpora, mikroohmu po centimetru odnosno: $1 \mu\text{S cm}^{-1} = 1/1 \mu\text{ohm cm}^{-1}$ (Dadić, 2001). Mjerenje vodljivosti kompliciranije je i manje točno kod niske koncentracije iona pa se zbog veće pouzdanosti koristi skala otpora. Recipročna vrijednost $0,10 \mu\text{S cm}^{-1}$ ili $1/(0,10 \cdot 10^{-6} \text{ S cm}^{-1})$ je tada $10 \cdot 10^6 \text{ ohms} \cdot \text{cm}$ ($10 \text{ MO} \cdot \text{cm}$). Konduktivnost je mjera koncentracije iona prisutnih u uzorku. Ukupne otopljene tvari (TDS) gravimetrijska su mjera, ali samim time što su krute tvari u otopini uglavnom u formi iona, one se mogu izmjeriti preko električne

vodljivosti. TDS skala koristi $2 \mu\text{S cm}^{-1} = 1 \text{ ppm}$ (part per milion), prikazan kao mg L^{-1} TDS. U praksi se pokazalo da su električna vodljivost i TDS često usko povezani pa se koncentracija otopljenih tvari, a to su uglavnom ioni, može odrediti mjerenjem vodljivosti, čija se vrijednost zatim pomnoži s određenim faktorom u rasponu od 0,5 do 0,75 (Walton, 1989).

2.3.1.2. pH

pH je mjera kiselosti ili lužnatosti medija. Kiselo označava vodeni medij kojemu je pH pri sobnoj temperaturi manji od 7, a lužnato označava medij kojemu je pH pri sobnoj temperaturi veći od 7. Neutralna točka pH na sobnoj temperaturi je 7, što znači da je koncentracija OH^- iona jednaka koncentraciji H_3O^+ iona u vodi. pH vrijednost biljnih ekstrakata oscilira najčešće u rasponu od 4 do 6,5, a uglavnom ovisi o spojevima koji su ekstrahirani u određenim fazama ekstrakcije te o otapalu koje se koristi u metodi i o procesu ekstrakcije.

2.3.2. Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola

Folin-Ciocalteu metoda se temelji na oksidaciji fenolnih skupina iz biljnih ekstrakata dodatkom Folin-Ciocalteuova reagensa. Dodatkom reagensa nastaje plavo obojenje čija se apsorbancija prati na spektrofotometru pri valnim duljinama 750-765 nm. Folin-Ciocalteuova reagens je smjesa fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline. Dodatkom reagensa fenolni spojevi oksidiraju se u kinone, a fosfovolframska i fosfomolibdenska kiselina reduciraju se u okside volframa i molibdena koji su plavo obojeni (Marković i Talić, 2013).

2.3.3. Spektrofotometrijske metode

2.3.3.1. UV-VIS spektroskopija

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu najčešće se koriste apsorpcijske spektroskopijske metode: ultraljubičasta (UV) i vidljiva (VIS). Prema definiciji, spektrofotometrija je kvantitativno mjerenje refleksijskih ili transmisijskih svojstava nekog materijala s obzirom na valne duljine.

Spektrofotometrija pokriva valne duljine, odnosno može se koristiti za mjerenje u vidljivoj svjetlosti, ultraljubičastom polju ili infracrvenom području elektromagnetskog spektra (Cvetković, 2017). Spektroskopske instrumentalne metode koriste se prilikom definiranja molekulske i atomske strukture spojeva. Molekule uzorka imaju kapacitet da apsorbiraju elektromagnetsko ultraljubičasto zračenje (100-380 nm) i/ili vidljivo zračenje (380-800 nm). Djeluje tako da zračenje u molekuli izaziva prijelaz elektrona u više nepopunjene energetske orbitale, čime se mijenja elektronska gustoća unutar ispitivanog uzorka. Kromofor je naziv za dio molekule koja apsorbira zračenje.

Uređaj kojim se izvode mjerenja zove se spektrofotometar te se njime mjeri intenzitet svjetlosnih zraka koje prolaze kroz uzorak pri različitim valnim duljinama, a mora sadržavati izvor zračenja (volframova ili deuterijeva lampa), monokromator koji omogućuje izbor valnih duljina i detektor koji mjeri intenzitet zraka.

Zrake koje prolaze kroz uzorak djelomično se apsorbiraju, a djelomično prolaze. Spektrofotometar djeluje po principu da skenira UV-VIS spektar i na detektoru registrira valne duljine (nm) pri kojima dolazi do apsorpcije zračenja. Dobiveni podaci se na kraju uspoređuju s referencama kako bi se otkrilo koji su sve spojevi prisutni u uzorku.

2.3.3.2. NIR spektroskopija i kemometrija

Blisko infracrvena spektroskopija (engl. *Near Infrared Spectroscopy*) jedna je od metoda koja se koristi za kontrolu fizikalnih, ali i kemijskih procesa pa tako i brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva u procesu. Odnosi se na valne duljine u području od 750 nm do 2500 nm gdje se pojavljuju preklapanja i kombinacije vrpce (Jednačak i Novak, 2013). Proces *in situ* NIR-sondom, koji se prati transmisijskom in-line spektroskopijom, provodi se tako da je sonda optičkim kablom povezana sa spektrometrom. Zrake svjetlosti koje ulaze provode se preko optičkog kabla do leća koje ga usmjeruju u uzorak i tada dolazi do djelomične apsorpcije. Ono zračenje koje se propustilo preko optičkog kabla prenosi se do detektora. Pošto je sonda preosjetljiva na vanjske utjecaje, nužno je da je zaštićena s inertnim metalom (Jednačak i Novak, 2013). Nedostatak ove metode jest da vrpce u NIR-spektrima daju manje informacija, čime može doći do preklapanja pa se uvijek preporučuje napraviti više oblika analize. NIR-spektroskopija in-line se koristi u:

polimernom inženjerstvu kako bi se uspješno pratile ekstruzije polimera i kako bi se dobile informacije o sastavu polimera, udjelu vlage i viskoznosti smjese; praćenju biokemijskih procesa kao što je kultivacija monoklonih antitijela; u mesnoj industriji za kontrolu kvalitete mesnih prerađevina tijekom njihove obrade i u farmaceutskoj industriji za praćenje procesa razvoja lijeka, kao i u određivanju sastava farmaceutskih pastila tijekom procesa proizvodnje te klasifikaciji uzorka prema količini djelatne tvari (Jednačak i Novak, 2013). Najveća prednost NIR spektroskopije je što se uzorci ne moraju posebno pripremati odnosno nema potrebe za (pred)pripremanjem uzorka, dok je sama analiza jednostavna i brza te traje između 15 do 90 sekundi (ne uništava se uzorak). Također, ovom se metodom može analizirati više sastojaka uzorka (Nicolai i sur., 2007; Jakelić, 2016). U prehrambenoj industriji koristi se za funkcionalne i senzorske analize sastojaka hrane, procesne međuprodukte i gotove proizvode (Hernández Gómez i sur., 2006). NIR spektar obuhvaća veliku količinu podataka, pa kako bi se utvrdilo između kojih uzoraka ima razlika, nužno je kombinirati podatke NIR spektra s drugim kemometrijskim metodama. PCA metoda (engl. *Principal Component Analysis*) jedna je od kemometrijskih metoda pomoću koje se analiziraju glavne komponente te se koristi za obradu velikog broja podataka koji su dobiveni NIR metodom. Ovom metodom se definiraju razlike u snimljenim spektrima uzoraka te se dalje analiziraju i obrađuju kako bi se dobile najvažnije karakteristike. Pomoću tih karakteristika dobivaju se nove ortogonalne varijable koje nazivamo “principal components” iz kojih se izračunavaju “faktori” za svaki uzorak, a koji je linearna kombinacija intenziteta određene karakteristike uzorka koje je od relativne važnosti za model (Valinger i sur., 2017). Uzorci koji su prema određenim komponentama slični, bit će pozicionirani na grafu jedan blizu drugog, dok će oni uzorci koji se razlikuju biti udaljeniji (Valinger i sur., 2017). Bitno je naglasiti da su faktori ovisni i izračunati na temelju spektralnih karakteristika te predstavljaju razlike u karakteristikama uzorka (kemijski sastav), ali ne mogu pokazati o kojem se točno spoju radi. PCA daje uvid u sličnosti i različitosti između podataka pa ih samim time smješta na poziciju na grafu (Abdi i Williams, 2010).

2.3.3.3. Umjetne neuronske mreže (ANN)

Umjetna neuronska mreža (engl. *Artificial Neural Network*, ANN) model je pomoću kojeg se stvara umjetna inteligencija koja imitira rad mozga čovjeka. Istraživanja u neurofiziologiji i kognitivnoj znanosti upućuju na to da se mozak sastoji od velikog broja neurona koji rade paralelno. Tako se u neuro-računarstvu stvara najbližiji model računalnog sustava u kojemu se brojni procesni elementi podataka obrađuju paralelno. Grana računarstva u čiju skupinu spada neuro-računarstvo naziva se „meko računarstvo“ (engl. *soft computing*).

Neuronska mreža po definiciji je skup međusobno povezanih jednostavnih procesnih elemenata (jedinica, čvorova) čije se funkcioniranje temelji na biološkom neuronu, a upravo te neuronske mreže služe distribuiranoj paralelnoj obradi podataka. Umjetne neuronske mreže primjenjuju se kod rješavanja problema klasifikacije i predviđanja velikog broja podataka kod kojih postoji nelinearna veza ulaza i izlaza. (Bašić, 2008)

Uporaba ANN za interpretaciju podataka iz spektara (NIR spektroskopija, masena spektroskopija i ultrazvučna spektroskopija) uključuje kako kvantitativnu analizu, tako i kvalitativnu analizu (Long i sur., 1990; Yang i Griffiths, 1999). Pritom se kao ulazna informacija koriste izmjereni podaci cijelog spektra ili sažeti spektralni podaci, a kao izlazna informacija primjerice koncentracija analita ili traženo fizikalno ili kemijsko svojstvo. Zahvaljujući fleksibilnosti i sposobnosti ANN da kombinira kompleksne skupove podataka i da riješi mnoge probleme na koje možemo naići tijekom provedbe eksperimenata, ova tehnika se može iskoristiti za povezivanje mnogo naoko vrlo različitih karakteristika (Basheer i Hajmeer, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao materijal u ovom radu korištene su biljke:

- Svježe ubrani vrijesak (*Satureja montana* L.) iz Dubrovačko-neretvanske županije, berba 2018.
- Osušeni vrijesak (*Satureja montana* L.) iz Dubrovačko-neretvanske županije, berba 2017.
- Kupljeni osušeni vrijesak (*Satureja montana* L.), Višnjevac, Hrvatska, berba 2018.

3.1.1. Otapala i reagensi

Sljedeća otapala i reagensi korišteni su u eksperimentalnom radu:

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3), p.a. (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Taufkirchen, Njemačka)
- Etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana-Črnuče, Slovenija)
- Galna kiselina, 98 % (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (SigmaAldrich, Taufkirchen, Njemačka)

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Vodena kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Plus, Latvija)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
- Potencijometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- Konduktometar (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska)
- NIR spektrometar 128-1.7-USB/6.25/50 μ m (Control Development inc., SAD)

Pribor:

- Filter papir od celuloze (veličina pora 20 μ m)
- Stakleni ljevak
- Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 500 mL
- Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL
- Menzura volumena 100 mL
- Metalna špatulica
- Aluminijske posudice s poklopcem
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete volumena 10 mL
- Pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Mikropipete volumena 100 μ L i 500 μ L
- Kiveta od kvarcnog stakla

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva

Pripremani su ekstrakti tri različita tipa vrijeska (svježi, sušeni i kupovni vrijesak). U laboratorijsku čašu volumena 100 mL odvagano je 30 g biljnog uzorka na analitičkoj vagi (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka). Ista je priprema bila za sva tri tipa vrijeska. Odvagani uzorak usipan je u laboratorijsku čašu od 2000 mL u kojoj je bila destilirana voda volumena 1500 mL prethodno termostatorana pomoću uljne kupelji s integriranom magnetskom miješalicom (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka) koja je održavala određenu temperaturu od 40 °C, 60 °C i 80 °C, pri kojima su bile provedene ekstrakcije pri brzini miješanja od 500 rpm. Svaki proces ekstrakcije trajao je 90 min (tri različite temperature za sva tri tipa vrijeska). U periodu od 90 min uzimani su uzorci ekstrakata pri točno određenim vremenskim intervalima ($t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80$ i 90 min). Za svaki vremenski interval uzimano je 10 mL ekstrakta koji je filtriran kroz filter papir od celuloze (veličina pora 20 μm) i lijevak u falkon epruvete od 15 mL. Kako bi se smanjila temperatura uzoraka nakon filtracije, falkon epruvete s ekstraktima stavljene su u posudu s ledom da se smanji temperatura uzorka na sobnu temperaturu. Time je zaustavljeno daljnje odvijanje kemijskog procesa na toj temperaturi kao i hlapljenje biološki aktivnih komponenti.

3.2.2. Ukupne otopljene tvari (TDS) i električna vodljivost

Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakti su analizirani pomoću konduktometra (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska). Svakom je uzorku dva puta izmjerena i očitana vrijednost ukupnih otopljenih tvari i električne vodljivosti.

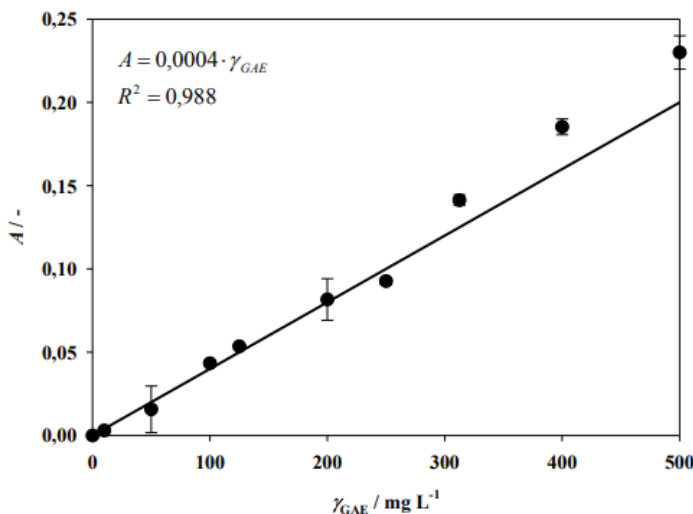
3.2.3. pH vrijednost ekstrakta

Za određivanje pH vrijednosti uzoraka korištena je staklena elektroda spojena na pH metar (Jenco 601A, SAD), koji je prethodno kalibriran koristeći standarde s vrijednostima pH=4 i pH=7.

3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola

Spektrofotometrijskom metodom, korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, određuje se količina ukupnih polifenola u uzorku tako da navedeni reagiraju s fenolima u kolorimetrijskoj reakciji. Fenoksid ion iz uzorka reagira s Folin-Ciocalteu reagensom (sastoji se od fosfovolframove i fosfomolibden kiseline). Reakcija teče tako da se fenoksid ion, u reakciji s navedenim reagensom, oksidira dok se reagens reducira do pojave plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. U epruvetu je otpipetirano 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka i 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Reakcija je pokrenuta dodatkom 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata nakon čega su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi u mraku da stoje dva sata. Slijepa proba rađena je tako da je količina uzorka zamijenjena istom količinom destilirane vode, odnosno, umjesto 100 μL uzorka stavljeno je 100 μL destilirane vode.

Nakon dva sata mjereno je intenzitet plavog obojenja pri 765 nm na spektrofotometru. Intenzitet plavog obojenja pri 765 nm proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku. Za svaki uzorak pripremane su dvije paralelne probe, a kao rezultat uzimana je srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (slika 1.), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) ($0 - 100 \text{ mg L}^{-1}$) po litri ili gramu uzorka.



Slika 1. Baždarni pravac za određivanje ukupnih polifenola.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0004x$$

gdje je:

x = koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

y = apsorbancija pri 765 nm

R^2 - koeficijent determinacije

3.2.5. UV-VIS spektroskopija

UV-VIS spektri ekstrakata snimljeni su pomoću UV-spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Engleska) s programom Acquire LITE (Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Prvo je napravljena kalibracija uređaja kako bi mjerenje bilo što preciznije. Uzorci (duplikati za svaki pripremljeni uzorak) su prethodno homogenizirani te potom snimani u kvarčnoj kiveti od 3 mL. Za svaki uzorak snimljeni su kontinuirani spektri u rasponu od 350 do 900 nm.

3.2.6. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR)

Za snimanje uzoraka u rasponu valnih duljina od 904 do 1699 nm korišten je NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm skenirajući monokromator (Control Development, SAD) s instaliranim pripadajućim softwareom Spec32 (Control Development, SAD). Uzorci (duplikati za svaki pripremljeni uzorak) su prethodno homogenizirani, potom snimani u kvarčnoj kiveti od 3 mL na postolju s poklopcem, kako bi se spriječio utjecaj vanjskog izvora svjetlosti.

3.2.7. Analiza glavnih komponenata

Kako bi se NIR spektri mogli koristiti za umjetne neuronske mreže, prethodno je napravljena analiza glavnih komponenata (PCA). Analiza glavnih komponenti koristi se kako bi se izdvojile

specifične informacije iz velike baze podataka i radi lakšeg uočavanja sličnosti i razlika među podacima na temelju njihovog međusobnog razdvajanja i grupiranja. Najznačajnije informacije, koje proizlaze iz vrijednosti apsorbancija (u raspona valnih duljina 904-1699 nm) pri zadanim volumnim udjelima, pretvorene su u skup novih ortogonalnih varijabli koje zovemo glavne komponente ili faktori (Abdi i Williams, 2010). Tako je smanjen broj varijabli koji se koristi kao ulaz u neuronske mreže. Za analizu podataka NIR spektara PCA metodom korišten je program Statistica 10.0 (StatSoft, SAD).

3.2.8. Umjetne neuronske mreže

Umjetne neuronske mreže korištene su kako bi se na temelju podataka iz UV-VIS i NIR spektara predvidjele vrijednosti fizikalnih parametara (električne vodljivosti, TDS-a i pH), kemijskih parametara (ukupni polifenoli) i vremena ekstrakcije. Koristeći program Statistica v.10.0 (StatSoft, USA) razvijene su mreže s 3-12 neurona u skrivenom sloju. Kao ulazne varijable korišteno je prvih 10 faktora dobivenih analizom glavnih komponenti koji su bili odgovorni za 99,9% varijabilnosti u podacima. Kao izlazne varijable postavljene su pH vrijednost, električna vodljivost, koncentracija ukupnih polifenola, ukupne otopljene tvari (TDS) i vrijeme ekstrakcije. Kako bi se dobili što precizniji modeli u smislu što većih koeficijenata determinacije umjetnih neuronskih mreža provedena je podjela podataka u skupove za učenje, test i validaciju u različitim omjerima (60:20:20, 70:20:10, 70:15:15 i 50:30:20).

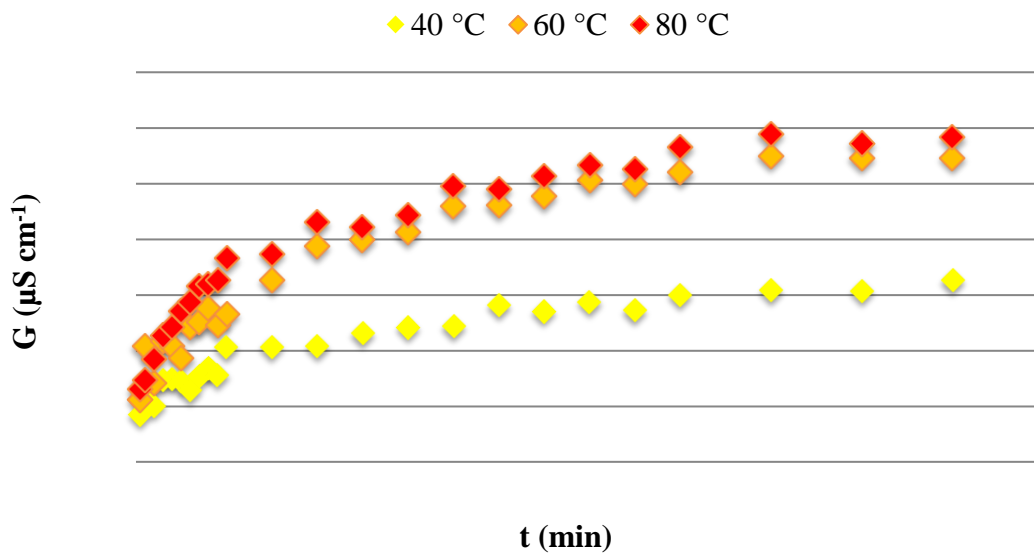
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA (ELEKTRIČNA VODLJIVOST, TDS, pH) I UKUPNI POLIFENOLI

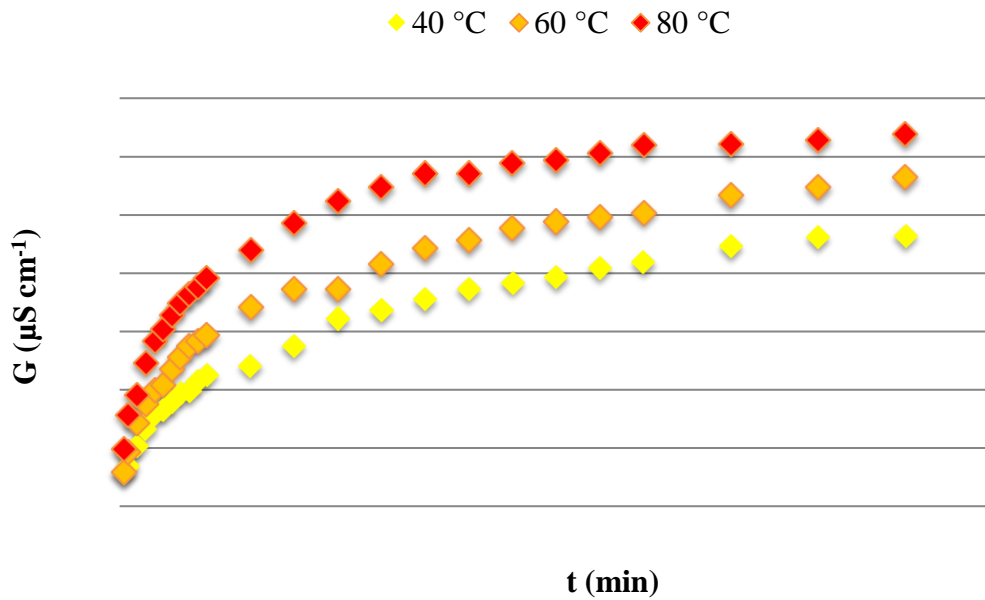
U radu Tušek i sur., 2018. pokazalo se kako temperatura najviše utječe na proces ekstrakcije i zbog toga je također u ovom radu ispitivan utjecaj temperature pri određenim vremenskim intervalima za kinetičke pokuse ekstrakcije. Na slikama 2-10 prikazani su rezultati dobiveni za fizikalna svojstva vodenih ekstrakata tri proučavane biljke (svježi vrijesak, sušeni vrijesak i kupovni sušeni vrijesak) pri tri različite temperature ($T = 40, 60$ i 80 °C). Mjerenja su provedena tako da su ispitivani uzorci uzimani u određenim vremenskim intervalima ($t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80$ i 90 min).

4.1.1. Električna vodljivost

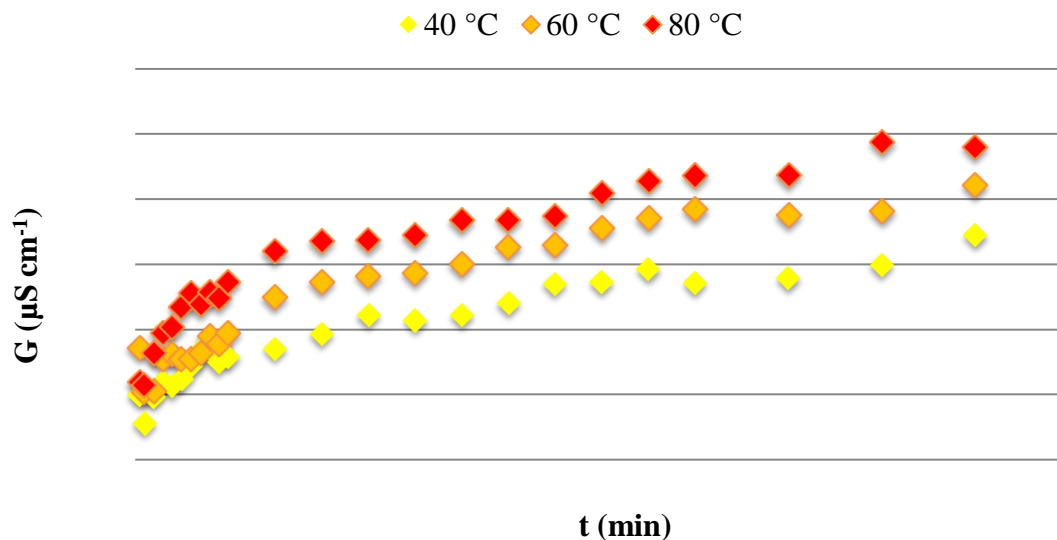
Na sljedećim slikama (2-4) prikazani su rezultati ovisnosti električne vodljivosti o vremenu ekstrakcije vodenih ekstrakata tri vrste vrijeska. Na slici 2. prikazana je električna vodljivost vodenog ekstrakta svježe ubranog vrijeska, dok su na slikama 3. i 4. prikazane električne vodljivosti sušenog (slika 3.) i kupovnog sušenog vrijeska (slika 4.). Usporedbom svih triju slika jasno je vidljivo da povišenje temperature utječe na proces ekstrakcije u smislu povećanja električne vodljivosti za sva tri vodena ekstrakta. Najbolji trend prati sušeni vrijesak (slika 3.) za sve tri temperature ($40, 60$ i 80 °C) i vidljivo je kako se u ovisnosti o temperaturi i vremenu podjednako otpuštaju komponente koje sudjeluju u električnoj vodljivosti.



Slika 2. Grafički prikaz ovisnosti električne vodljivosti (G) o vremenu ekstrakcije za svježi vrijesak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.



Slika 3. Grafički prikaz ovisnosti električne vodljivosti (G) o vremenu ekstrakcije za sušeni vrijesak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.



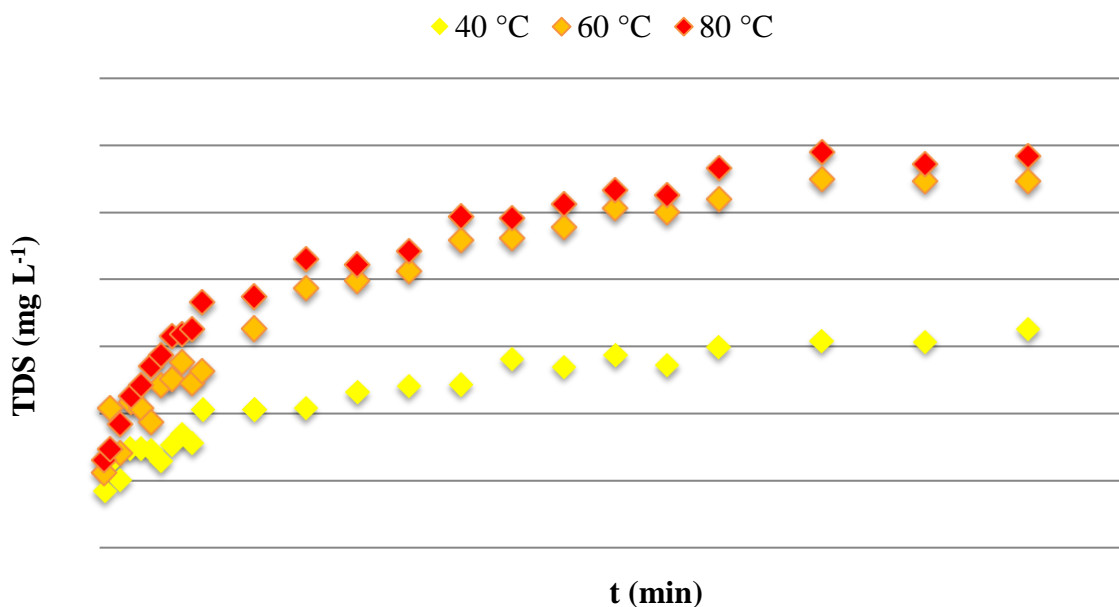
Slika 4. Grafički prikaz ovisnosti električne vodljivosti (G) o vremenu ekstrakcije za kupovni sušeni vriješak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.

Ako se pogledaju vrijednosti vodenog ekstrakta sušenog vriješka, najviša vrijednost od $1300 \mu\text{S cm}^{-1}$ je dobivena pri 80 °C (slika 3.), dok su vrijednosti vodenih ekstrakata za svježi i kupovni puno niže i iznose 600 i $800 \mu\text{S cm}^{-1}$, što s druge strane odgovara vrijednostima vodenog ekstrakta sušenog vriješka pri 40 °C. Prema dobivenim podacima, čini se kako se u vodenom ekstraktu sušenog vriješka nalazi veća količina ukupnih otopljenih tvari, odnosno ima manje tvari koje isparavaju pod određenim uvjetima, što bi značilo da svježi i kupovni vriješak u svom sastavu imaju veći sadržaj vode i ulja nego vodeni ekstrakt sušenog vriješka.

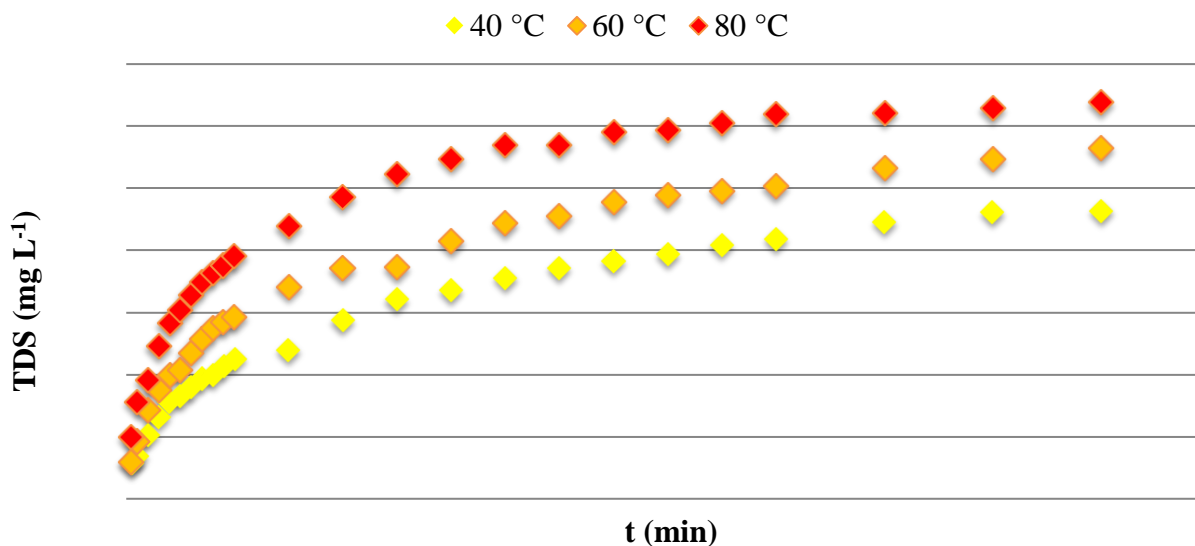
4.1.2. TDS (ukupne otopljene tvari)

Slični rezultati kao i kod električne vodljivosti dobiveni su pri određivanju koncentracije ukupnih otopljenih tvari jer su inače u vodenim otopinama ukupne otopljene tvari (TDS) većinom prisutne kao ioni te se i one mogu mjeriti preko električne vodljivosti. Zanimljivo je primijetiti da kod svježeg vriješka razlike između 80 i 60 °C (slika 5.) nisu toliko velike, jer najviše zabilježene vrijednosti iznose 291 i 273 mg L^{-1} , dok je pri 40 °C zabilježena najviša vrijednost od 162 mg L^{-1} . Za sušeni i kupovni vriješak (slike 6. i 7.) vidljiva je puno veća razlika između svih triju

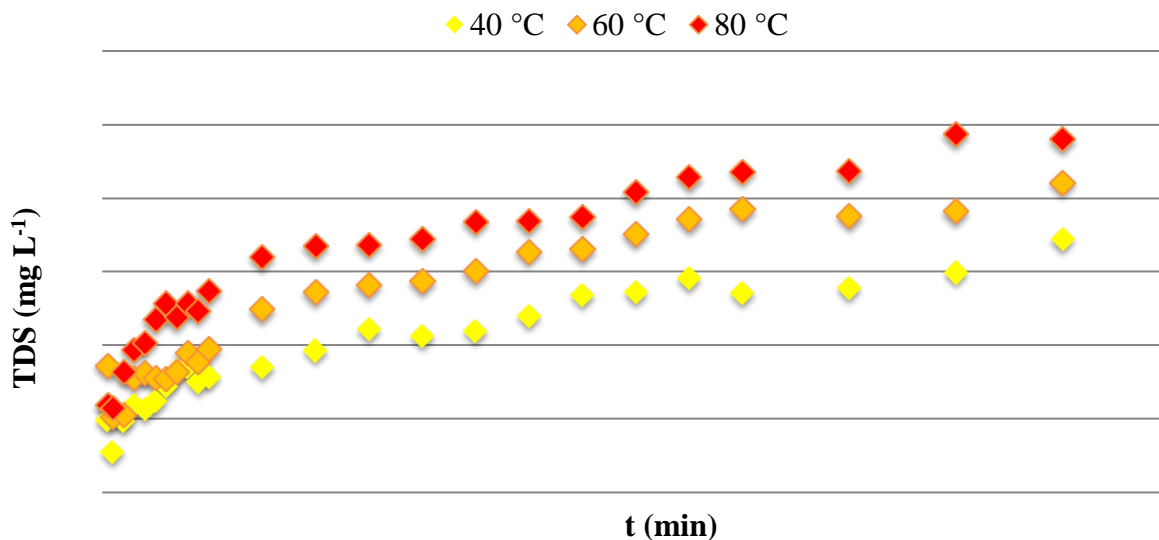
temperatura i kako se pokazalo i pri mjerenju električne vodljivosti, najviše vrijednosti dobivene su za svaki vodeni ekstrakt pri najdužem vremenu zadržavanja i najvišoj temperaturi.



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti TDS-a o vremenu ekstrakcije za svježi vrijesak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti TDS-a o vremenu ekstrakcije za sušeni vrijesak pri 40°C, 60 °C i 80 °C.

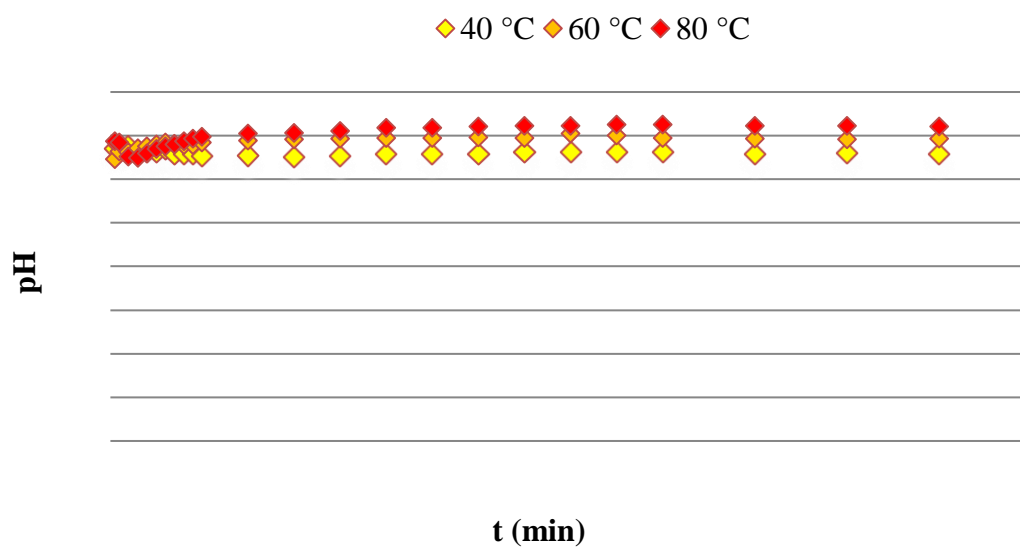


Slika 7. Grafički prikaz ovisnosti TDS-a o vremenu ekstrakcije za kupovni sušeni vrijesak pri 40°C, 60 °C i 80 °C.

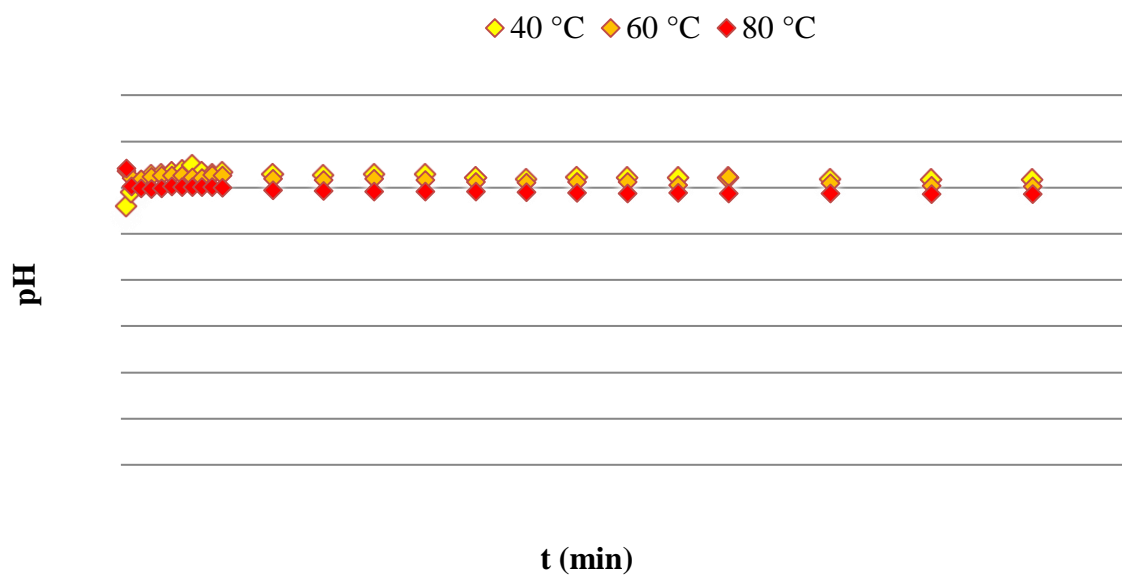
Najviša vrijednost TDS-a izmjerena je za sušeni vrijesak pri 80 °C (slika 6.) i iznosila je 638 mg L⁻¹, dok su vrijednosti TDS-a za svježi (slika 5.) i kupovni (slika 7.), kao i u prethodnom slučaju, puno niže i iznose 291 i 247 mg L⁻¹. Također, najviše koncentracije dobivene pri 40 °C, 60°C i 80 °C za svježi i kupovni vrijesak odgovaraju vrijednostima TDS-a vodenog ekstrakta sušenog vrijeska pri 40 °C.

4.1.3. pH

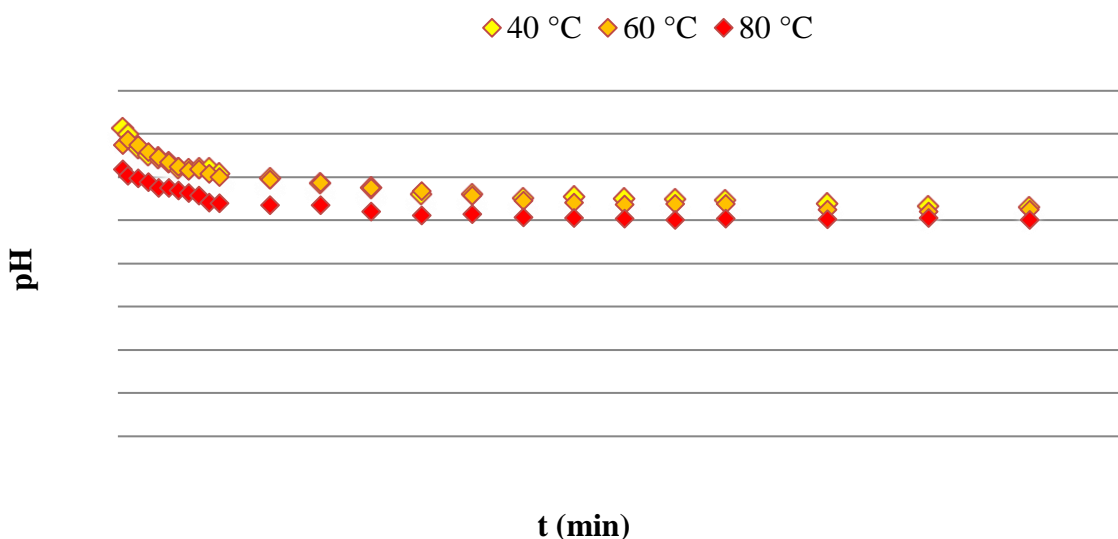
Kao što je vidljivo iz rezultata koji su prikazani na slikama 8-10., pH kod ovih uzoraka nije pokazao mnogo odstupanja pri različitim temperaturama. Čak su za sušeni vrijesak (slika 9.) pri tri različite temperature pH vrijednosti vrlo slične dok su za svježi (slika 8.) i kupovni (slika 10.) rezultati vidljivo odvojeni. Rezultati iz navedenih grafova pokazali su kako sušeni vrijesak pokazuje vrlo slične rezultate za pH, iz čega možemo zaključiti da je pri ove tri različite temperature pH vodenog biljnog ekstrakta sušenog vrijeska neovisan o temperaturi. Jedino se može reći za kupovni vrijesak da kod svih temperatura ima tendenciju pada pH vrijednosti u ovisnosti o vremenu.



Slika 8. Grafički prikaz ovisnosti pH o vremenu ekstrakcije za svježi vrijesak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti pH o vremenu ekstrakcije za sušeni vrijesak pri 40°C, 60 °C i 80 °C.

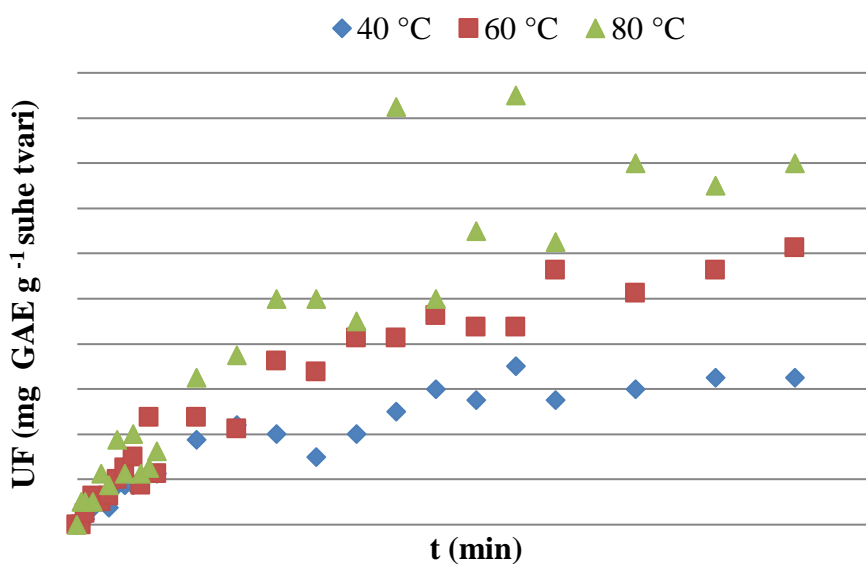


Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti pH o vremenu za kupovni sušeni vriješak pri 40°C, 60 °C i 80 °C.

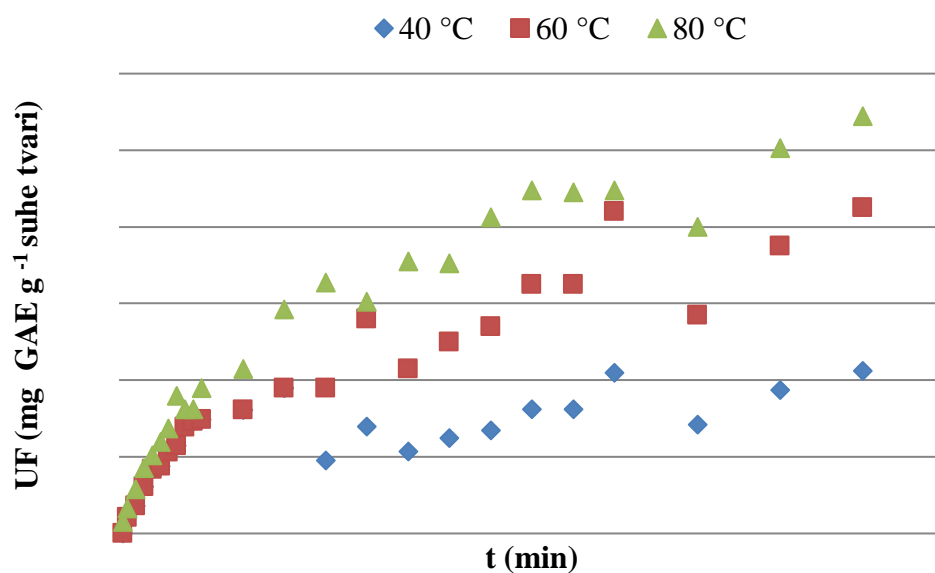
4.1.4. Ukupni polifenoli

Za određivanje ukupnih polifenola u vodenim biljnim ekstraktima uzoraka (svježi, sušeni i kupovni vriješak) korištena je Folin-Ciocalteu metoda. U radu od Serrano i sur. (2011) prikazani su rezultati prethodno navedene metode za vodene ekstrakte vrste *Satureja montana* L., gdje je prikazano i mjerenje ukupnih polifenola vodenih ekstrakata pri različitim temperaturama. Kod analize rezultata uočeno je da najveći udio polifenola imaju vodene otopine ekstrakata dobivenih pri višim temperaturama. Zaključeno je da je udio polifenola u ekstrakcijskoj smjesi razmjernan temperaturi, odnosno da se pri višim temperaturama ekstrakcije u ekstrakcijsku smjesu otpuštaju veće količine polifenola. Na slikama 11-13. prikazani su rezultati ovisnosti ukupnih polifenola o vremenu ekstrakcije za svježi (slika 11.), sušeni (slika 12.) i kupovni vriješak (slika 13.) pri 40°C, 60 °C i 80 °C. Na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata, vidljivo je da vodeni ekstrakti sušenog vriješka sadrže značajno veći udio ukupnih polifenola (slika 12.) u odnosu na vodene ekstrakte svježeg i kupovnog vriješka (slika 11. i 13.). Wu i sur. (2004) pokazali su da sadržaj ulja u biljkama značajno utječe na koncentraciju ukupnih polifenola pa je moguće da svježi

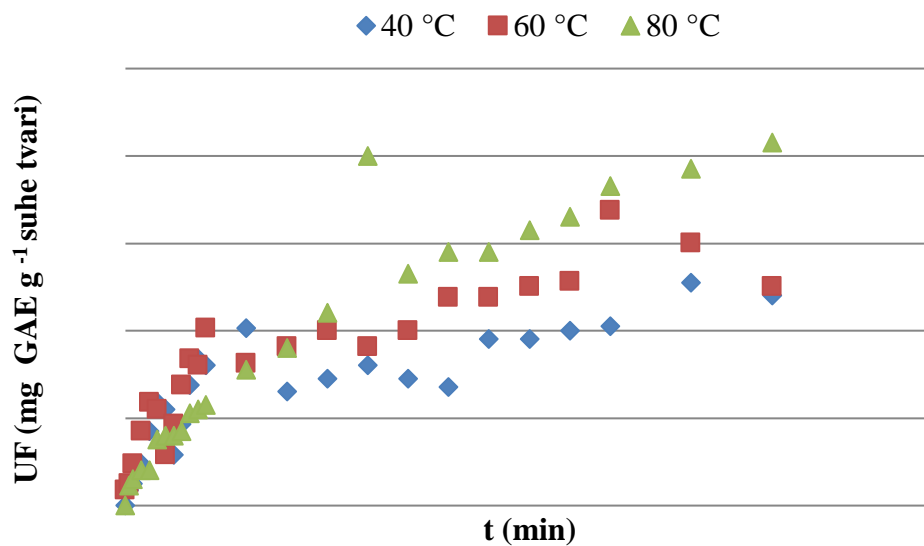
vrijesak zbog većeg sadržaja ulja brže i lakše ispari, stoga sušeni i kupovni vrijesak imaju veći udio ukupnih polifenola. Također je vidljivo da u sva tri slučaja porastom temperature raste udio ukupnih polifenola u vodenim biljnim ekstraktima. Najveći udio ukupnih polifenola (27,3 mg GAE g⁻¹ suhe tvari) zabilježen je za sušeni vrijesak pri temperaturi 80 °C i vremenu od 90 minuta (slika 12.), dok je najmanji udio iznosio 3,3 mg GAE g⁻¹ suhe tvari za ekstrakt svježeg vrijeska pri 40 °C (slika 11.). Vrijeme trajanja ekstrakcije iznimno je bitan čimbenik, što je isto vidljivo na sve tri slike. Za sve tri temperature dobivene su najviše vrijednosti pri najduljem vremenu od 90 minuta ekstrakcije. Izuzetak su dva mjerenja (40 i 55 minuta) za ekstrakt svježeg vrijeska (slika 11.), što se može pripisati pogrešci prilikom mjerenja. Rezultati dobiveni u radu Jurinjak Tušek i sur. (2016) također su pokazali kako porastom temperature raste udio ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima, s tim da se u njihovim eksperimentima koji su rađeni na biljkama iz porodice *Asteraceae* veći udio ukupnih polifenola i bioaktivnih komponenata oslobađao iz biljnog materijala u otapalo tijekom prvih 10 minuta procesa ekstrakcije.



Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti ukupnih polifenola (UF) o vremenu ekstrakcije za svježii vrijesak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.



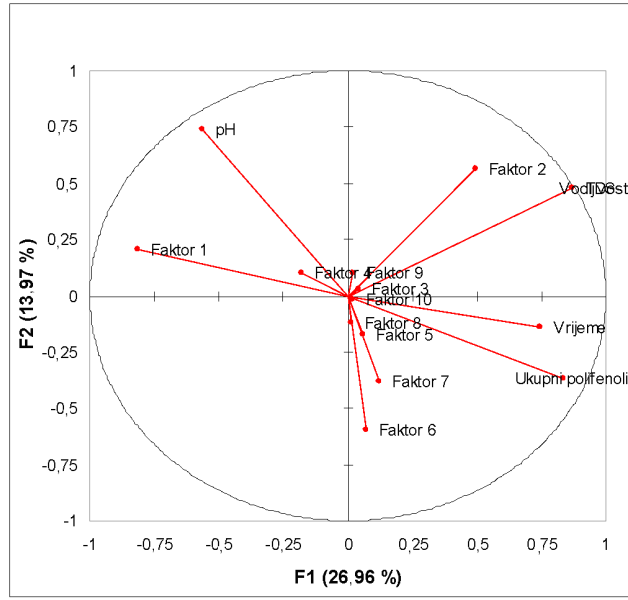
Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti ukupnih polifenola (UF) o vremenu ekstrakcije za sušeni vrijesak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.



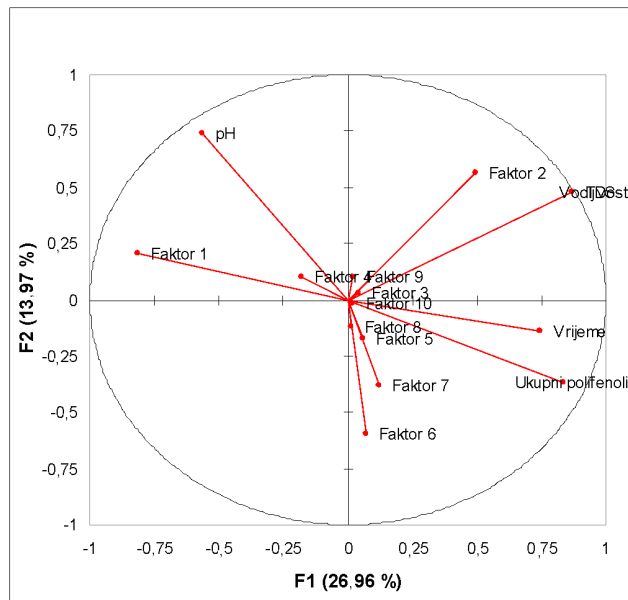
Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti ukupnih polifenola o vremenu ekstrakcije za kupovni sušeni vrijesak pri 40 °C, 60 °C i 80 °C.

4.2. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI

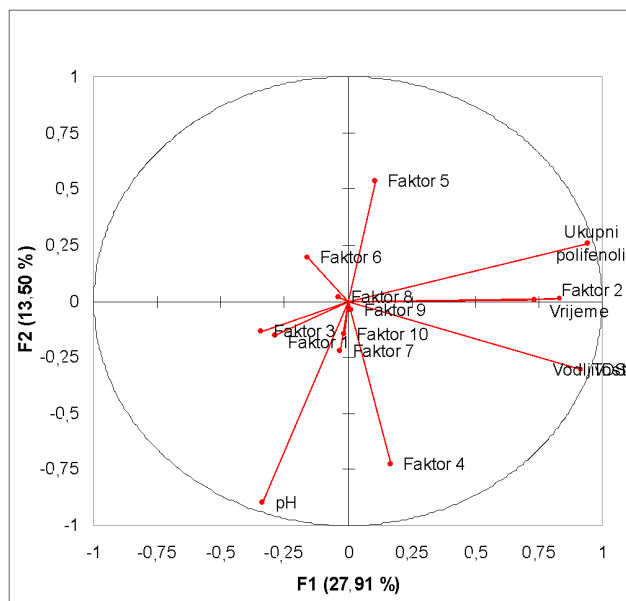
Kako bi bilo moguće testirati mogućnost primjene umjetnih neuronskih mreža prilikom predikcije fizikalnih parametara (električna vodljivost, TDS i pH) te ukupnih polifenola na temelju UV-VIS i blisko infracrvene spektroskopije (NIR), potrebno je prethodno napraviti analizu glavnih komponenata. Svi uzorci vodenih ekstrakata snimljeni su spektrofotometrom (kontinuirani spektar od $\lambda = 350$ do $\lambda = 900$ nm) i NIR instrumentom (kontinuirani spektar od $\lambda = 904$ do $\lambda = 1699$ nm). Svaki uzorak snimljen je u triplikatu kako bi bilo moguće raditi sa što većim skupom podataka. Snimljeni spektri nisu bili procesirani tj. nije napravljena nikakva prethodna obrada prije analize glavnih komponenata poput zaglađivanja krivulja, prve i druge derivacije itd.. Kako je u slučaju UV-VIS spektara bilo snimljeno 550 vrijednosti za svaki uzorak, a u slučaju NIR spektroskopije 795 vrijednosti za svaki uzorak, prvo je napravljena analiza glavnih komponenata (PCA). PCA ne samo da se koristi kako bi se odvojili uzorci prema sličnostima i prema razlikama, nego je njezina prvobitna primjena smanjiti broj varijabli s kojima se kasnije računa. Tako se dobiju koordinate faktora u prostornoj ravnini koje se kasnije mogu koristiti za daljnju obradu. Grafički prikaz korelacija između PCA faktora u kombinaciji s tri fizikalna parametra, ukupnim polifenolima i vremenom u kojem su uzimani uzorci prikazani su na slikama 14-16. za UV-VIS spektar i 17-19. za NIR spektar.



Slika 14. PCA analiza fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost i pH), ukupnih polifenola te vremena ekstrakcije i prvih 10 faktora UV-VIS spektara, pri temperaturi od 40 °C.



Slika 15. PCA analiza fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost i pH), ukupnih polifenola te vremena ekstrakcije i prvih 10 faktora UV-VIS spektara, pri temperaturi od 60 °C.



Slika 16. PCA analiza fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost i pH), ukupnih polifenola te vremena ekstrakcije i prvih 10 faktora UV-VIS spektara, pri temperaturi od 80 °C.

Kako bi se odredilo treba li uzeti u daljnji obzir za korištenje umjetnih neuronskih mreža svih 10 faktora tj. koordinata koje su dobivene PCA analizom i koje su u ovom slučaju bile odgovorne za 99,9 % varijance, svi uzorci iste temperature (vodeni ekstrakti svježeg vrijeska, sušenog vrijeska i kupovnog sušenog vrijeska) zajedno su analizirani kao da se radi o jednom tipu vodenog ekstrakta.

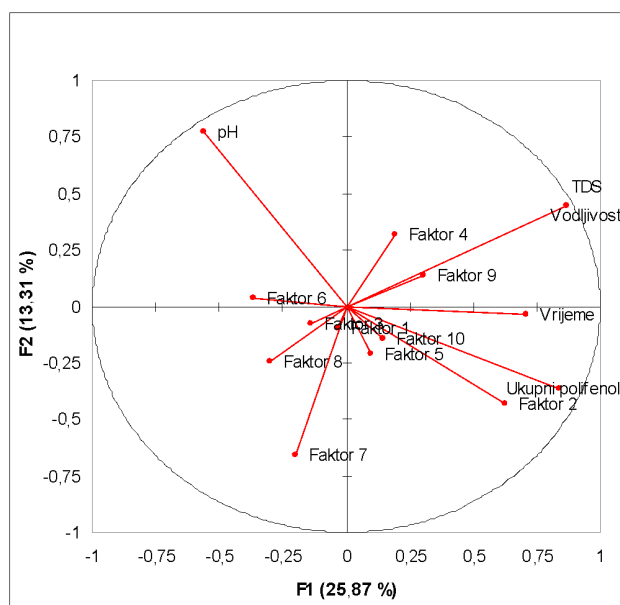
Za UV spektre pri temperaturi 40 °C (slika 14.), u prvom kvadrantu zastupljeni su TDS i vodljivost i najbliži prema njima bili su faktor 2, 9 i 3. U drugom kvadrantu zastupljena je pH i tu su bila značajna dva faktora – faktor 1 i faktor 4. Vrijeme i ukupni polifenoli bili su zastupljeni u četvrtom kvadrantu u kojem su bili prisutni faktori 3, 10, 8, 5, 7 i 6. Ako se gleda podjela lijevo-desno tj. prvi/četvrti kvadrant i drugi/treći, vidljivo je da vrijeme ne utječe na pH, što se slaže s eksperimentalnim podacima u ovom slučaju.

Kao i za 40 °C, u slučaju 60 °C (slika 15.) ukupni polifenoli bili su najviše ovisni o vremenu ekstrakcije, a isto tako između vodljivosti i TDS-a skoro pa i nema razlika. U prvom kvadrantu u ovom slučaju bili su ukupni polifenoli i vrijeme te faktori 2, 3, 4, 6, 8, 10. Zanimljivo je primijetiti da prvi faktor koji ima uvijek najviši postotak varijance u ovom slučaju nije povezan

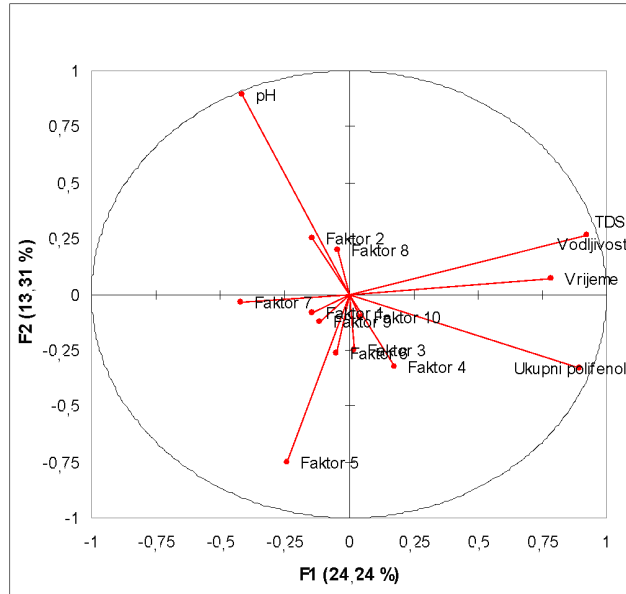
ni s jednim fizikalnim svojstvom te da faktor 4 nije povezan s fizikalnim svojstvima. Uz pH bio je jedva primjetno vezan faktor 9, dok su uz vodljivost i TDS bili povezani ostali faktori.

Za 80 °C (slika 16.) ukupni polifenoli zastupljeni su u prvom kvadrantu zajedno s faktorima 5 i 2, dok je pH zastupljen u trećem kvadrantu, ovaj put s puno više faktora 3, 1, 7 i 10. Uz vodljivost i TDS bili su vezani faktori 4 i 9, dok je vrijeme bilo na granici između prvog i četvrtog kvadranta s faktorom 2 koji je bio uz njega.

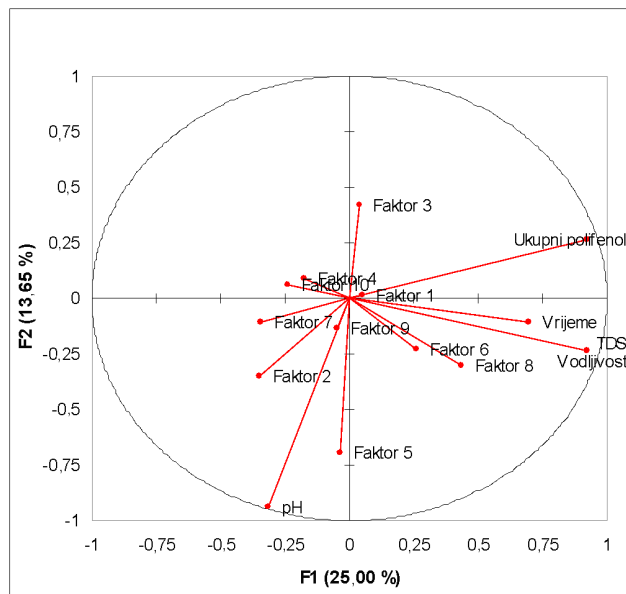
Na temelju ovih rezultata nije bilo moguće razdvojiti zasebno koji faktor bi bio vezan uz koje svojstvo pa se za umjetne neuronske mreže koje bi mogle odrediti povezanost UV spektara i fizikalnih svojstava moralo nastaviti sa svih 10 faktora.



Slika 17. PCA analiza fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost i pH), ukupnih polifenola te vremena ekstrakcije i prvih 10 faktora NIR spektara, pri temperaturi od 40 °C.



Slika 18. PCA analiza fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost i pH), ukupnih polifenola te vremena ekstrakcije i prvih 10 faktora NIR spektara, pri temperaturi od 60 °C.



Slika 19. PCA analiza fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost i pH), ukupnih polifenola te vremena ekstrakcije i prvih 10 faktora NIR spektara, pri temperaturi od 80 °C.

Slično kao i kod UV-VIS spektara za sve temperature primijećena je potpuna izdvojenost pH od ostalih parametara i kod NIR spektara. Pri 40 °C (slika 17.) u prvom kvadrantu bili su zastupljeni TDS i vodljivost zajedno s faktorima 4 i 9. Uz pH bio je vezan jedino faktor 6, a uz vrijeme i ukupne polifenole faktor 1, 10 i 5. U ovom slučaju tri faktora bila su u zasebnom kvadrantu (faktor 2, 8 i 7) i nisu bili pridruženi niti jednom svojstvu.

Kada se gleda slika 18. pri 60 °C, zanimljivo je primijetiti da se u prvom kvadrantu nalaze TDS, vodljivost i vrijeme, ali niti jedan od faktora. Ukupni polifenoli prikazani su u četvrtom kvadrantu i uz njih faktori 10, 3, 4 i 6, dok je pH u drugom kvadrantu uz faktore 2 i 8. Faktori 7, 5, 9 i 1 nalaze se zasebno u trećem kvadrantu.

Pri 80 °C (slika 19.), ukupni polifenoli nalaze se u prvom kvadrantu zajedno s faktorima 1 i 3, dok su u drugom kvadrantu faktori 4 i 10 koji ne pokazuju vezu s ostalim svojstvima. pH i faktori 7, 2, 5 i 9 nalaze se u trećem kvadrantu, a u četvrtom su vrijeme, TDS i vodljivost uz faktore 8 i 6.

Na temelju rezultata faktorske analize teško je izdvojiti određeni faktor koji bi bio vezan za određeno svojstvo kako u slučaju UV-VIS spektara, tako i u slučaju NIR spektara.

4.3. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Kako je već objašnjeno u poglavlju 4.2., za umjetne neuronske mreže nisu korišteni cijeli spektri UV-VIS i NIR spektra, već je napravljena PCA analiza kako bi se smanjio broj varijabli. Analiza predikcije umjetnih neuronskih mreži rađena je sa svih 10 faktora dobivenih PCA analizom kako za UV-VIS tako i za NIR spektre. Ulazne varijable neuronskih mreža bili su prvih 10 faktora PCA analize, dok su izlazni parametri bili fizikalna svojstva (električna vodljivost, TDS i pH), ukupni polifenoli i vrijeme ekstrakcije. Cilj je bio saznati može li se ANN model uspješno koristiti za predviđanje vrijednosti promatranih parametara u odnosu na eksperimentalne rezultate prikazane na slikama 2-13. Svaka neuronska mreža dijeli podatke prema učenju, testiranju i validaciji pa su prema tome za svaku temperaturu pri kojoj je vođena ekstrakcija napravljeni preliminarni rezultati s različitim omjerima podataka koji su korišteni. Ispitane vrijednosti za učenje, test i validaciju uključivale su omjere podataka u odnosima 60:20:20, 70:20:10, 70:15:15

i 50:30:20. Cilj je bio naći omjere koji bi se mogli koristiti i za UV-VIS i za NIR spektar. Najboljim se pokazao omjer 60:20:20 što se tiče učenja, testiranja i validacije. Rezultati umjetnih neuronskih mreža u obliku koeficijenta determinacije (u tablici navedeno preciznosti) i pogreški za UV-VIS i NIR spektre prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike modela odabranih umjetnih neuronskih mreža (ANN) razvijenih za predviđanje TDS vrijednosti, električne vodljivosti, pH, vremena i ukupnih fenola u uzorcima vodenih ekstrakata.

Uzorak	Struktura mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
NIR									
40 °C	10-12-5	0,8359	0,0637	0,8263	0,0542	0,8043	0,0702	Tanh	Logistic
60 °C	10-11-5	0,9426	0,0216	0,8898	0,0317	0,5724	0,1299	Logistic	Logistic
80 °C	10-7-5	0,7329	0,1089	0,7830	0,1050	0,5513	0,1545	Exponential	Logistic
UV-VIS									
40 °C	10-4-5	0,9714	0,0120	0,9108	0,0360	0,9347	0,0252	Exponential	Logistic
60 °C	10-5-5	0,9809	0,0080	0,9759	0,0125	0,9553	0,0179	Tanh	Tanh
80 °C	10-8-5	0,9716	0,0129	0,9522	0,0173	0,9647	0,0147	Logistic	Identity

Iz podataka prikazanih u tablici 1. vidljivo je kako su vrijednosti R^2 za učenje, test i validaciju kod razvijenih ANN modela vrlo visoke u slučaju UV-VIS spektara, dok su znatno niže za NIR spektre. Zanimljivo je primijetiti kako je kod svih ANN vezanih za UV-VIS spektre broj neurona u skrivenom sloju bio relativno nizak (4-8), dok je kod ANN vezanih uz NIR spektre taj broj bio u rasponu od 7-12. Najbolje slaganje podataka i predikcije ANN vidljivo je u slučaju UV-VIS spektara za 60 °C i 80 °C gdje su koeficijenti determinacije za učenje bili 0,9809 i 0,9716, za testiranje 0,9759 i 0,9522 te za validaciju 0,9553 i 0,9647. Moglo bi se reći da je samo jedna ANN dala dosta loše rezultate u smislu niskog koeficijenta determinacije za učenje, testiranje i validaciju i to ANN 10-7-5 koja je bila za korištena za predikciju rezultata fizikalnih svojstava na

temelju NIR spektara pri 80 °C, gdje je koeficijent determinacije za učenje bio 0,7329, za testiranje 0,7830 te za validaciju 0,5513.

Kako bi se dobio što bolji uvid u korelacije između spektara i fizikalnih svojstava, ukupnih polifenola te vremena za svaku pojedinačnu ANN iz tablice 1., prikazani su rezultati predviđanja TDS vrijednosti, električne vodljivosti, pH, vremena i ukupnih fenola u tablici 2. za NIR spektre i tablici 3. za UV-VIS spektre.

Tablica 2. Rezultati predviđanja TDS vrijednosti, električne vodljivosti, pH, vremena i ukupnih polifenola na temelju odabranih ANN modela iz tablice 1. za NIR spektre.

Uzorak	Varijabla	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
40 °C	TDS	0,9051	0,9064	0,9095
	El. vodljivost	0,9073	0,9114	0,9061
	pH	0,9131	0,7932	0,8179
	Vrijeme ekstrakcije	0,6087	0,6652	0,4830
	Ukupni polifenoli	0,8453	0,8554	0,9053
60 °C	TDS	0,9334	0,8818	0,8049
	El. vodljivost	0,9369	0,8998	0,5295
	pH	0,9499	0,9017	0,8608
	Vrijeme ekstrakcije	0,9461	0,9424	0,2445
	Ukupni polifenoli	0,9467	0,8235	0,7220
80 °C	TDS	0,7807	0,8000	0,5682
	El. vodljivost	0,8237	0,8191	0,5499
	pH	0,9256	0,9012	0,8875
	Vrijeme ekstrakcije	0,4157	0,7860	0,2211
	Ukupni polifenoli	0,7187	0,6086	0,5296

Na temelju rezultata iz tablice 1. i tablice 2., vidljivo je da su najbolje korelacije NIR spektara i fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost, i pH), ukupnih polifenola i vremena ekstrakcije postignute za temperaturu od 40 °C, dok su najslabije korelacije bile za 80 °C. Najviše slaganje između

eksperimentalnih podataka i predikcije ANN, vidljivo je u slučaju električne vodljivosti pri 40 °C, gdje je preciznost učenja iznosila 0,9073, preciznost testiranja 0,9114 te preciznost validacije 0,9061. Također, visoke korelacije dobivene su pri istoj temperaturi za TDS i ukupne fenole, dok je vrijeme imalo najslabije korelacije s NIR spektrima. Najlošije slaganje u smislu najnižih koeficijenata determinacije zabilježene su za vrijeme, pri svim trima temperaturama, a posebno za temperaturu pri 80°C, gdje je R^2 iznosio 0,4157 za učenje, 0,7860 za testiranje i 0,2211 za validaciju.

Tablica 3. Rezultati predviđanja TDS vrijednosti, električne vodljivosti, pH, vremena i ukupnih polifenola na temelju odabranih ANN modela iz tablice 1. za UV-VIS spektre.

Uzorak	Varijabla	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
40 °C	TDS	0,9868	0,9745	0,9801
	El. vodljivost	0,9857	0,9698	0,9739
	pH	0,9682	0,8670	0,8900
	Vrijeme ekstrakcije	0,9720	0,8954	0,9039
	Ukupni polifenoli	0,9445	0,8475	0,9258
60 °C	TDS	0,9924	0,9909	0,9773
	El. vodljivost	0,9924	0,9914	0,9782
	pH	0,9678	0,9632	0,9346
	Vrijeme ekstrakcije	0,9750	0,9816	0,9480
	Ukupni polifenoli	0,9769	0,9525	0,9384
80 °C	TDS	0,9826	0,9818	0,9846
	El. vodljivost	0,9823	0,9821	0,9836
	pH	0,9815	0,9816	0,9715
	Vrijeme ekstrakcije	0,9411	0,8370	0,9238
	Ukupni polifenoli	0,9705	0,9785	0,9601

Puno bolji rezultati dobiveni su korištenjem ANN za sve mjerene temperature prilikom korelacije UV-VIS spektara s fizikalnim parametrima, ukupnim polifenolima i vremenom ekstrakcije

(tablica 3.). Ako izuzmemo preciznosti testiranja pri 40 °C za vrijeme te pH i vrijeme pri 80 °C, svi su koeficijenti determinacija za učenje, testiranje i validaciju viši od 0,9. Zanimljiv je slučaj da pri višim temperaturama, gdje predikcija ANN fizikalnih svojstava i vremena na temelju NIR spektara nije dala dobre rezultate, predikcija ANN je za UV-VIS spektre pokazala najbolje rezultate. U svim modelima, uvijek se pokušava dobiti R^2 vrijednost što bliže 1. Međutim, modeli čija je vrijednost R^2 između 0,7 i 0,9 su modeli za koje možemo reći da su donekle precizni, a modeli čija je vrijednost R^2 ispod 0,7 indiciraju da taj model može biti upotrebljiv samo za kvalifikaciju bez mogućnosti da bude korišten za kvantifikacijske predikcije (Mustafa i sur., 2011; Petigny i sur., 2013).

Kako bi se dobio zaključak koja bi metoda (UV-VIS ili NIR) u kombinaciji s umjetnim neuronskim mrežama mogla naći primjenu prilikom praćenja vodenih ekstrakcija, potrebno je još napraviti „fingerprint“ metodu i ispitati umjetne neuronske mreže na određenim dijelovima spektra kako bi se dobio bolji uvid te povezati i s kemijskim svojstvima vodenih ekstrakata što bi mogao biti cilj sljedećih istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju eksperimentalnih podataka pokazano je kako fizikalne karakteristike svježih vodenih ekstrakata svježeg, sušenog i kupovnog sušenog vrijeska ovise o temperaturi ekstrakcije.
2. Najviši rezultati za električnu vodljivost, TDS i ukupne fenole zabilježeni su pri 80°C za sva tri vodena ekstrakta.
3. Umjetne neuronske mreže pokazale su bolju moć predviđanja fizikalnih svojstava i vremena ekstrakcije za sva tri različita tipa vrijeska pri sve tri mjerene temperature ($T = 40, 60, 80$ °C), na temelju snimljenih UV-VIS spektara u rasponu valnih duljina $\lambda = 350-900$ nm.

6. LITERATURA

Abdi, H., Williams, L.J. (2010) Principal Components Analysis. John Wiley & Sons, Inc. *WIREs Comp Stat.* **2**, 433-459.

Alizahed, O. (2011) The Effect of Harvesting Time on Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Five Plants of the Family Labiatae. *Planta Med.* **77**, PE1.

Arzi, L., Keyhani, E., Keyhani, J. (2008) Unusual Temperature Dependence Properties of Cytochrome b2 (NAD-independent lactate dehydrogenase) (EC.1.1.1.27) from *Satureja hortensis*. *Febs. J.* **275**, 212.

Babajafari, S., Nikaein, F., Mazloomi, S. M., Zibaenejad, M. J., Zargaran, A. (2015) A Review of the Benefits of *Satureja* Species on Metabolic Syndrome and Their Possible Mechanisms of Action. *Journal of Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **20**, 212-223.

Basheer, I. A. i Hajmeer, M. (2000) Artificial Neural Networks: Fundamentals, Computing, Design, and Application. *J. Microbiol. Meth.* **43**, 3-31.

Bašić, B. D., Čupić, M., Šnajder, J. (2008) Umjetne neuronske mreže. *Fakultet elektrotehnike i računarstva*.

Tepe, B. i Cilkiz, M. (2016) A Pharmacological and Phytochemical Overview on *Satureja*. *Pharm. Biol.* **54**, 375-412.

Bezić, N., Šamanić, I., Dunkić, V., Besendorfer, V., Puizina, J. (2009) Essential Oil Composition and Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence Variability of Four South-Croatian *Satureja* Species (Lamiaceae). *Molecules.* **14**, 925–938.

Calixto, J.B. (2005) Twenty-five Years of Research on Medicinal Plants in Latin America: A personal view. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 131–134.

Cantino PD, Harley RM, Wagstaff SJ. (1992). Genera of Labiatae Status and Classification. In: Harley RM, Reynolds T, eds. *Advances in Labiatae Science*. Kew, UK: Royal Botanic Gardens Press, 511–522.

Četojević-Simin, DD, Velićanski, A.S., Cvetković, DD, Markov, S.L., Mrđamović, Ž, Bogdanović VV, Šolajić S. (2012). Bioactivity of Lemon Balm Kombucha. *Food Bioprocess. Tech.* **5**, 1756–1765.

Cvetković, A. (2017) Modeliranje i optimiranje fizikalno-kemijskih karakteristika i UV spektara vodenih ekstrakata lavande i melise. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Dunki, V., Bezić, N., Vuko, E., Cukrov, D. (2010) Antiphytoviral Activity of *Satureja montana* L. ssp *variegata* (Host) P. W. Ball Essential Oil and Phenol Compounds on CMV and TMV. *Molecules.* **15**, 6713–6721.

Dunkic V, Bezic N. (2008). Comparison of Essential Oils of Endemic *Satureja visianii* Silic with Other *Satureja* Species of Croatia. *Planta Med.* **74**, 1193–1194.

Espaillet, J. R., French, E. C., Colvin, D. L., West, S. H., Meister, C. W. (1993) Phytotoxicity Screening of 4 Postemergence Applied Herbicides on 7 Herbs. *Soil Crop Sci. Soc. Florida Proc.* **5**, 33–39.

Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I. P., Troganis, A., Boskou, D. (2002) Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5294–9.

Ghazanfari, G., Minaie, B., Yasa, N., Nakhai, L. A., Mohammadirad, A., Nikfar, S., Salehnia, A. (2006) Biochemical and Histopathological Evidences for Beneficial Effects of *Satureja khuzestanica* Jamzad Essential Oil on The Mouse Model of Inflammatory Bowel Diseases. *Toxicol. Mech. Method.* **16**, 365–372.

Gohari, A. R., Saeidnia, S., Gohari, M. R., Moradi-Afrapoli, F., Malmir, M., Hadjiakhoondi, A. (2009) Bioactive Flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. *Nat. Prod. Res.* **23**, 1609–1614.

Grzeszczuk, M., Jadcak, D. (2009) The Estimation of Biological Value of Some Species of Spice Herbs. *IV Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes*, **830**, 81–86.

Hernández Gómez, A., He, Y., García Pereira, A. (2006) Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* **77**, 313–319.

Jakelić, M. (2016) Jednostavni i parcijalno-linearni regresijski modeli primjenjeni na različitim svojstvima vodenih biljnih ekstrakata. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

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

Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Belščak Cvitanović, A., Valinger D., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J. (2016) Kinetics and Thermodynamics of The Solid-liquid Extraction Process of Total Polyphenols, Antioxidants and Extraction Yield from *Asteraceae* plants. *Ind. Crops Prod.* **91**, 205-214.

Keyhani, J., Paknia, E., Keyhani, E., Ghaffari, S. M. (2009) Identification of Peroxidase Isoenzymes in *Satureja hortensis* L. leaves. *I International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs*. Antalya, Turkey. **826**, 337–344.

Kim, J. D., Kang, S. M., Park, M. Y., Jung, T. Y., Choi, H. Y., Ku, S. K. (2007) Ameliorative Anti-diabetic Activity of Dangnyosoko, a Chinese Herbal Medicine, in Diabetic Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1527– 1534.

Kitić, D., Palić, R., Ristić, N., Stojanović, G. (1999) The Fatty Acids and Alkanes of *Satureja adamovicii* Šilić and *Satureja fukarekii* Šilić. *J. Serb. Chem. Soc.* **64**, 389–392.

Long, J. R., Gregoriou, V. G., & Gemperline, P. J. (1990). Spectroscopic calibration and quantitation using artificial neural networks. *Analytical Chemistry*, **62(17)**, 1791-1797.

Marković, M., Talić, S. (2013) Antioksidacijska aktivnost odabranih hercegovaèkih vina. *Kem. Ind.* **62**, 7-12.

Momtaz S, Abdollahi M. (2010). An Update on Pharmacology of *Satureja* Species; from Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetes and Anti-hyperlipidemic to Reproductive Stimulation. *Int. J. Pharmacol.* **6**, 346–53.

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized Liquid Extraction as a Green Approach in Food and Herbal Plants Extraction: A Re-view. *Anal. Chim. Acta.* **703(1)**, 8-18.

Nicolai, B. M, Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs A., Saeys, W., Theron, K. I., Lammertyn, J. (2007) Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol. Tec.* **46**, 99-118.

Paknia, E., Keyhani, E., Keyhani, J., Ghaffari, S.M. (2006) Catalytic Properties of o-dianisidine Peroxidases in *Satureja hortensis* L. Leaf Extract. *Febs. J.* **273**, 316.

Paco, J. S. i Pereira, B. J. (2016). New Therapeutic Perspectives in Premature Ejaculation. *Urology.* **88**, 87-92.

Petigny, L., Périno-Issartier, S., Wajsman, J., Chemat, F. (2013) Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* mol.). *Int. J. Mol. Sci.* **14**(3), 5750-5764.

Radonić, A., Miloš, M. (2003) Free Radical Research: Chemical Composition and *In Vitro* Evaluation of Antioxidant Effect of Free Volatile Compounds From *Satureja montana* L. *Taylor and Francis health science.* **37** (6), 673–679

Sansalone, S., Russo, G. I., Mondaini, N., Cantiello, F., Antonini, G., Cai, T. (2016). A Combination of Tryptophan, *Satureja montana*, *Tribulus terrestris*, *Phyllanthus emblica* Extracts is Able to Improve Sexual Quality of Life in Patient with Premature Ejaculation. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, **88**, 171-176.

Serrano, C., Matos, O., Teixeira B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M. L., Marques, A. (2011) Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Satureja montana* L. Extracts. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 1554-1560.

Suarez, A., Echandi, M.M., Ulate, G., Ciccio, J.F. (2003). Pharmacological Activity of the Essential Oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Rev. Biol. Trop.* **51**, 247–52.

Valinger, D., Benković, M., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Belščak-Cvitanović, A., Gajdoš Kljusurić, J., Bauman, I. (2017) Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis in divarication of different particle sizes of dried medicinal plants. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* **21**, 17-22.

Vidić, D., Maksimović, M., Čavar, S., Šolić, M.E. (2009). Comparison of Essential Oil Profiles of *Satureja montana* L. and Endemic *Satureja visianii* Šilić. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **12**, 273–81.

Walton, N. R. G. (1989). Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids—What is Their Precise Relationship? *Desalination.* **72**(3), 275-292.

Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2004) Lipophilic and hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *J. Agri. Food Chem.* **52**, 4026–4037.

Yang, H., & Griffiths, P. R. (1999). Application of multilayer feed-forward neural networks to automated compound identification in low-resolution open-path FT-IR spectrometry. *Analytical chemistry*, **71**(3), 751-761.

Zavatti, M., Zanolini, P., Benelli, A., Rivasi, M., Baraldi, C., Baraldi, M. (2011). Experimental Study on *Satureja montana* as a Treatment for Premature Ejaculation. *J. Ethnopharmacol.* **133**, 629–33.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta