

# Primjena kemometrije u karakterizaciji in vitro procesa probave te fizikalnih i kemijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani

---

**Kukina, Luka**

**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:159:617501>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-20**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Luka Kukina

1058/N

**PRIMJENA KEMOMETRIJE U  
KARAKTERIZACIJI *IN VITRO*  
PROCESA PROBAVE TE  
FIZIKALNIH I KEMIJSKIH  
SVOJSTAVA  
MULTIVITAMINSKIH  
DODATAKA PREHRANI**

Ovaj rad izrađen je Kabinetu za Osnove inženjerstva Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Benković, uz pomoć doc.dr.sc. Davora Valingera iz Laboratorija za mjerenja, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

---

Ovim se putem želim zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Benković te doc. dr. sc. Davoru Valingeru kao i čitavom Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na velikoj pomoći, stručnim savjetima i prijateljskom pristupu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezgraničnoj podršci tijekom svih godina studiranja.

---

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

**Primjena kemometrije u karakterizaciji *in vitro* procesa probave te fizikalnih i kemijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani**

*Luka Kukina, 1058/N*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je objasniti i povezati bioraspoloživost (*in vitro* simulacija procesa probave), fizikalna (raspodjela veličine čestica, sadržaj vlage, nasipna gustoća, svojstva tečenja, ukupne otopljene tvari i vodljivost) i kemijska svojstva (antioksidacijski kapacitet, sadržaj šećera) multivitaminskih prahova te bombona okusa naranče koji su dostupni na hrvatskom tržištu. Isto tako, ispitana je i mogućnost primjene kemometrijskih metoda (PCA analiza i umjetne neuronske mreže) u karakterizaciji bioraspoloživosti te fizikalnih i kemijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani u obliku bombona i prahova. Dobiveni rezultati pokazali su da korišteni praškasti uzorci imaju niske vrijednosti indeksa kohezije i da slobodno teku, ali su isto tako skloni lomu granula pri većim brzinama tečenja. Analizirana fizikalna i kemijska svojstva otopina prahova i bombona ovisna su o sastavu uzorka i o prisustvu ostalih dodataka izuzev vitamina (kalcij, sladila, dekstroza i slični). Provedbom simulacije probavnog procesa *in vitro* utvrđen je veliki gubitak antioksidacijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani. Navedena fizikalna i kemijska svojstva tijekom *in vitro* probavnog procesa uspješno se mogu pratiti i predvidjeti snimanjem UV-VIS i NIR spektara uzoraka te naknadnom kemometrijskom analizom podataka primjenom analize glavnih komponenata i predikcije umjetnim neuronskim mrežama.

**Ključne riječi:** multivitamin, dodatak prehrani, antioksidacijski kapacitet, umjetne neuronske mreže, *in vitro* probava

**Rad sadrži:** 56 stranica, 12 slika, 13 tablica, 49 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Maja Benković*

**Pomoć pri izradi:** *doc.dr.sc. Davor Valinger*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. *Prof. dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić*
2. *Doc.dr.sc. Davor Valinger*
3. *Doc.dr.sc. Maja Benković*
4. *Prof.dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)*

**Datum obrane:** 25. rujan, 2019.

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Nutrition

### **Application of chemometrics for characterisation of the *in vitro* digestion process and physical and chemical properties of multivitamin dietary supplements**

*Luka Kukina, 1058/N*

**Abstract:** The aim of this work was to explain and connect bioavailability (*in vitro* simulation of digestion), physical (particle size distribution, moisture content, bulk density, flow properties, total dissolved substances and conductivity) and chemical properties (antioxidant capacity, sugar content) of orange flavoured multivitamin powders and candies available on the Croatian market. The possibility of applying chemometric methods (PCA analysis and artificial neural networks) in characterization of the bioavailability, physical and chemical properties of multivitamin supplements in the form of candies and powders was also examined. The obtained results showed that the used powder samples have low values of cohesion index and that they flow freely, but they were also prone to fracture of granules at higher flow speed. The analyzed physical and chemical properties of the powder and candy solutions depend on the composition of the sample and the presence of other additives except vitamins (calcium, sweeteners, dextrose and other). Conducting an *in vitro* simulation of the digestive process revealed a great loss of the antioxidant properties of multivitamin supplements. The listed physical and chemical properties during *in vitro* digestive process can be successfully monitored and predicted by recording UV-VIS and NIR spectra of samples and subsequent chemometric data analysis using principal component analysis and artificial neural network prediction.

**Keywords:** multivitamin, dietary supplement, antioxidant capacity, artificial neural networks, *in vitro* digestion

**Thesis contains:** 56 pages, 12 figures, 13 tables, 49 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Maja Benković, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *dr.sc. Davor Valinger, Assistant professor*

**Reviewers:**

1. *PhD Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full professor*
2. *PhD Davor Valinger, Assistant professor*
3. *PhD Maja Benković, Assistant professor*
4. *PhD Ines Panjkota Krbavčić, Full professor (substitution)*

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

---

# Sadržaj

---

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. VITAMINI TOPLJIVI U VODI.....	3
2.1.1. Vitamini B skupine.....	3
2.1.2. Vitamin C .....	3
2.2. METODE ANALIZE KEMIJSKIH I FIZIKALNIH SVOJSTAVA MULTIVITAMINSKIH PRIPRAVAKA .....	4
2.2.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta.....	4
2.2.2. Metode određivanja udjela šećera u hrani .....	5
2.2.3. Metode određivanja fizikalnih svojstava.....	5
2.2.4. Spektrofotometrijske i kemometrijske metode.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. MATERIJALI .....	11
3.2. METODE .....	14
3.2.1. Fizikalna svojstva odabranih multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče.....	16
3.2.2. Svojstva tečenja multivitaminskih prahova okusa naranče .....	18
3.2.3. Kemijska svojstva odabranih multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče.....	20
3.2.4. <i>In vitro</i> model simulacije probave.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	26
4.1. Fizikalna svojstva početnih uzoraka i otopina multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče .....	26
4.2. Svojstva tečenja multivitaminskih prahova okusa naranče .....	32
4.3. Kemijska svojstva početnih otopina multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče. ...	35
4.4. Kemijska svojstva multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče tijekom i nakon <i>in vitro</i> modela ljudske probave.....	39
4.5. Kemometrijska obrada podataka .....	43
5. ZAKLJUČCI.....	50
6. LITERATURA .....	51

---



## 1. UVOD

---

U današnje doba sve se češće spominje pojam užurbanog načina života pomoću kojeg ljudi opisuju nedostatak vremena za obavljanje svakodnevnih poslova. Takav način života kao posljedicu donosi povećanje razina stresa i rizika od kroničnih bolesti, a ujedno i smanjenje količine vremena u kojem su ljudi posvećeni sebi i svojem zdravlju u vidu tjelesne aktivnosti i prehrane. Štoviše, Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će do 2020. godine upravo takav način života biti uzrok čak dvije trećine bolesti u svijetu, a nepravilnoj prehrani se pripisuju zasluge za najčešći uzrok smrti u SAD-u [1]. Ljudi koji žive u razvijenim zemljama uglavnom se hrane tzv. zapadnjačkim načinom prehrane koji obiluje zasićenim masnim kiselinama, jednostavnim šećerima i soli te se isto tako često ne pridržavaju tri ključna pravila prehrane, a to su: raznolikost, ravnoteža i umjerenost. Drugim riječima, ljudi većinom jedu hranu visoke energetske gustoće i niske nutritivne gustoće čime najčešće ne uspijevaju zadovoljiti dnevne preporuke za unos čitave palete mikronutrijenata te vlakana pa se procjenjuje kako više od dvije milijarde ljudi svjetske populacije ima nedostatan unos jednog ili više vitamina, odnosno minerala [2]. No, kako se danas ljudi često okreću brzim rješenjima za svoje probleme, ne smanjuje se unos hrane visoke energetske gustoće i povećava unos voća i povrća već se problem prebacuje na prehrambenu industriju te se od nje traži brzo i funkcionalno rješenje. Kao odgovor na to, prehrambena i industrija dodataka prehrani počinje proizvoditi vrlo popularne multivitaminske/multimineralne dodatke prehrani raznih oblika: od prahova i sokova, do tableta i kapsula. Takvo rješenje je vrlo dobro prihvaćeno širom svijeta, a u prilog tom zaključku ide i činjenica da su upravo multivitaminski/multimineralni dodaci prehrani najprodavanija vrsta dodataka prehrani u SAD-u [3].

Popularnost multivitaminskih pripravaka te njihova iznimna važnost u zamjeni vitamina porijeklom iz hrane razlog su izrade ovog diplomskog rada čiji je cilj objasniti i povezati bioraspodjivost (*in vitro* simulacija procesa probave), fizikalna (raspodjela

---

veliĉine ĉestica, sadržaj vlage, nasipna gustoća, svojstva teĉenja, ukupne otopljene tvari i vodljivost) i kemijska svojstva (antioksidacijski kapacitet, sadržaj šećera) multivitaminskih prahova te bombona okusa naranĉe koji su dostupni na hrvatskom tržištu. Isto tako, ispitana je i mogućnost primjene kemometrijskih metoda (PCA analiza i umjetne neuronske mreže) u karakterizaciji bioraspoloživosti te fizikalnih i kemijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani u obliku bombona i prahova.

## 2. TEORIJSKI DIO

---

### 2.1. VITAMINI TOPLJIVI U VODI

U grupu vitamina topljivih u vodi spadaju vitamin C te vitamini B skupine. Njihova se apsorpcija odvija jednostavnom difuzijom ili pomoću prenosioca, a nalaze se u vodenim dijelovima stanice: citoplazmi i matriksu mitohondrija. Vitamini topljivi u vodi esencijalni su kofaktori i kosupstrati enzima uključenih u mnogobrojne metaboličke reakcije [4]. Vitamini topljivi u vodi se za razliku od vitamina topljivih u mastima ne mogu nakupljati u tijelu, izuzev vitamina B<sub>12</sub>. Isto tako, podložniji su razaranju u lužnatom i pri višim temperaturama. Preporučeni izvori vitamina su: žitarice, povrće, voće, meso i riba, piletina, jaja, mahunarke, orašasto voće te mlijeko i mliječni proizvodi [5].

#### 2.1.1. Vitamini B skupine

Predstavnici vitamina B skupine jesu: tiamin, riboflavin, niacin, biotin, pantotenska kiselina, vitamin B<sub>6</sub>, folat te vitamin B<sub>12</sub>. Makronutrijenti su izvor energije organizmu, a vitamini B skupine omogućavaju iskorištenje te energije budući da nekoliko vitamina B skupine izgrađuje koenzime metabolizma energije. Ostali vitamini B skupine imaju neke druge nezamjenjive uloge u organizmu kao što su: sudjelovanje u metabolizmu aminokiselina, umnožavanje stanica eritrocita i stanica epitela probavnog sustava [5].

#### 2.1.2. Vitamin C

Askorbinska kiselina je reducirani oblik vitamina C te u organizmu djeluje kao antioksidans. Zbog toga ga mnogi proizvođači hrane dodaju kao konzervans. Vitamin C pomaže u prevenciji oštećenja tkiva, štiti željezo od oksidacije te regenerira oksidirani vitamin E [6]. Također, vitamin C pomaže u stvaranju kolagena koji predstavlja matriks za

stvaranje kostiju i zuba, a gotovo najpoznatija uloga vitamina C je uloga u prevenciji i liječenju prehlade [5].

## **2.2. METODE ANALIZE KEMIJSKIH I FIZIKALNIH SVOJSTAVA MULTIVITAMINSKIH PRIPRAVAKA**

### 2.2.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijski kapacitet definira se kao parametar koji govori koliko su razni sastojci hrane i/ili biljaka učinkoviti u pronalaženju te neutraliziranju slobodnih radikala koji u ljudskom organizmu, u prekomjernim količinama, uzrokuju štetne posljedice. Postoji nekoliko metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta među kojima su ORAC, ABTS, CUPRAC, Briggs-Rauscher metode te DPPH i FRAP metode koje će biti detaljnije objašnjene budući da su korištene u izradi ovog rada.

#### *2.2.1.1. DPPH metoda*

DPPH metodu su 1994. godine razvili Brand-Williams i suradnici [7]. DPPH jedna je od najčešće korištenih metoda za procjenu antioksidacijskog kapaciteta biljaka i/ili hrane, a temelji se na redukciji alkoholne otopine DPPH u prisutnosti antioksidansa. DPPH radikal ( $\alpha$ -difetil- $\beta$ -pikrilhidrazil,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) stabilan je dušikov radikal ljubičaste boje, a nespareni elektron iz dušikovog atoma reducira se primanjem vodikovog atoma iz antioksidansa pri čemu dolazi do gubitka ljubičaste boje. Smanjenje ljubičastog obojenja mjeri se promjenom apsorbancije pri valnim duljinama od 515-528 nm. DPPH je topljiv jedino u organskim otapalima [8]. Također, reakcija se provodi u mraku budući da je dokazano kako je apsorbancija smanjena za 20-30 % ukoliko se metoda provodi na svjetlu pri 25°C tijekom 2 sata [9]. DPPH metoda pogodna je za ispitivanje uzoraka u tekućem i čvrstom stanju, ali je osjetljiva na veličinu molekule antioksidansa, pri čemu veće molekule teže dolaze do reaktivnog mjesta DPPH [8].

### 2.2.1.2. FRAP metoda

FRAP metoda razvijena je 1996. godine [10]. Temelji se na reakciji redukcije žuto obojanog željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ-a) do reduciranog, plavo obojanog  $\text{Fe}^{2+}$  oblika. Antioksidansi provode redukciju TPTZ-a doniranjem elektrona u kiselom mediju ( $\text{pH} = 3,6$ ). Potencijal ove redoks reakcije iznosi 0,77 V te će posljedično svi spojevi s nižim iznosom redoks potencijala reducirati TPTZ čime će se povećati rezultat izmjerene antioksidacijske aktivnosti promatranog uzorka. Rezultat dobiven FRAP metodom mjeri se promjenom apsorbancije pri valnoj duljini od 593 nm [11].

### 2.2.2. Metode određivanja udjela šećera u hrani

Udio šećera u hrani može se odrediti kemijskim, enzimskim i refraktometrijskim metodama. Kemijske metode određivanja šećera temelje se uglavnom na reducirajućim svojstvima šećera, odnosno na njihovoj sposobnosti redukcije iona metala iz alkalnih otopina soli metala [12]. Refraktometrijskim se metodama uz pomoć mjernog instrumenta određuje kut pod kojim se svjetlosna zraka lomi prelaskom iz otopine u staklenu prizmu poznatog indeksa loma. Budući da je indeks loma otopina proporcionalan njihovoj koncentraciji, refraktometrija se kao analitička metoda često koristi za određivanje koncentracije šećera u prehrambenoj industriji [13]. Enzimskim metodama može se određivati koncentracija ukupnih šećera ili specifičnih šećera. Enzimi provode različite kemijske reakcije modifikacije šećera koji se potom takvi modificirani mogu detektirati spektrofotometrijskim mjerenjima [14].

### 2.2.3. Metode određivanja fizikalnih svojstava

#### 2.2.3.1. Ukupne otopljene tvari (TDS) i električna vodljivost

Električna vodljivost sposobnost je otopine da provodi električnu energiju. Sposobnost provođenja električne energije proporcionalno je koncentraciji iona prisutnih u otopini. Isto tako, vodljivost se mijenja i promjenom temperature otopine. Sposobnost tvari da provodi

električnu energiju recipročna je električnom otporu pa je i mjerna jedinica za električnu vodljivost (Mho) doslovno suprotna mjernoj jedinici za otpor (Ohm). No, učestalije korištena te prema SI sustavu priznata mjerna jedinica električne vodljivosti je Simens po centimetru ( $S\text{ cm}^{-1}$ ) [15].

TDS (eng. Total Dissolved Solids) predstavlja ukupne otopljene tvari u otopini te ova vrsta mjerenja pripada gravimetriji, a koristi se za određivanje krute tvari u otopini. Budući da su krutine u otopinama uglavnom prisutne u obliku iona, mogu se približno mjeriti električnom vodljivošću. Metoda mjerenja je ista, a mjerači vodljivosti automatski preračunavaju i izražavaju rezultate mjerenja u mjernim jedinicama TDS-a. TDS skala koristi mjerenja od  $2\ \mu S\text{ cm}^{-1} = 1\text{ ppm}$  (part per million) te se prikazuje kao  $1\text{ mg L}^{-1}$  [15].

#### 2.2.3.2. *Sadržaj vlage*

Metode za određivanje sadržaja vlage mogu se podijeliti na kemijske (Karl-Fischer titracija) i gravimetrijske metode. Gravimetrijske metode temelje se na sušenju uzoraka do konstantne mase te vaganja uzorka prije i poslije procesa sušenja. Temperatura sušenja ne smije biti viša od temperature ishlapljivanja ili izgaranja sastojaka uzorka osim vode [16]. Karl Fischer titracija najčešći je način određivanja vode u uzorcima u farmaceutskoj industriji. Temelji se na modificiranoj Bunsenovoj reakciji u kojoj voda reagira s jodom u prikladnom otapalu u prisutnosti organske lužine. Prilikom provođenja reakcije nastaju kiseli produkti koje lužina mora neutralizirati, a titracija traje sve dok sva voda u uzorku ne nestane [17].

#### 2.2.3.3. *Fizikalna svojstva i svojstva tečenja prahova*

Jedna od najvažnijih karakteristika prahova na koji je potrebno obratiti izrazitu pozornost u industrijskim pogonima, jest njihovo protjecanje koje je definirano kao lakoću pomicanja čestica ili nakupine čestica te njihovo ponašanje tijekom cijelog procesa tečenja. Općenito, protok je normalno ponašanje svojstveno heterogenoj populaciji čestica u prahu. Protjecanje je svojstvo praha koje uključuje više vrijednosti, kombinaciju fizičkih osobina

materijala koje utječu na protjecanje i karakteristike opreme u kojoj se prah obrađuje [18]. Faktori koji utječu na svojstva tečenja mogu se podijeliti u tri skupine:

- Fizikalna svojstva čestica praha, kao što su veličina, raspon veličina, oblik, tvrdoća, elastičnost, porozitet, masa, interakcije među česticama, tekstura i uglatost.
- Faktori okoliša koji utječu na svojstva sipkih materijala, kao što je zrak i sadržaj vlage, vanjski pritisak, vibracije itd. Ovi faktori mijenjaju fizičku raspodjelu i poredak čestica u masi praha.
- Promjene pojedinih čestica uzrokovane faktorima, kao što su trenje, aglomeriranje, elektrostatski naboj i kemijske promjene.

Svojstva sipkih materijala ovisiti će o kombiniranim učincima gore navedenih faktora [19][20]. U karakterizaciji prahova najčešće se određuju sljedeći parametri: raspodjela veličine čestica, nasipna gustoća, svojstva tečenja (kohezivnost, sklonost stvaranju čvrstog kolača) te mikroskopske karakteristike prahova [21].

#### 2.2.4. Spektrofotometrijske i kemometrijske metode

##### 2.2.4.1. UV-VIS spektroskopija

Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (VIS) spektrofotometrija postala je najčešće upotrebljavana metoda pri identificiranju i kvantificiranju organskih i anorganskih tvari u uzorcima.

Spektroskopske instrumentalne metode služe za proučavanje atomske i molekulske strukture spojeva. UV-VIS spektrofotometri najčešće djeluju unutar područja valnih duljina od 200-800 nm što obuhvaća ultraljubičasti (200-380 nm) i vidljivi (380-770 nm) dio spektra. Baziraju se pretežno na interakciji elektromagnetskog zračenja sa uzorkom, pri čemu mjerena tvar emitira ili apsorbira točno određenu količinu zračenja koja se potom mjeri i interpretira.

Najjednostavniji oblik spektrofotometra sadrži izvor svjetla, monokromator, dio za postavljanje uzoraka te detektor. UV svjetlo u većini slučajeva proizvodi deuterijeva lampa,

dok VIS svjetlo nastaje radom volframove lampe. Monokromatorom se omogućuje odabir željenih valnih duljina. Budući da većinu uzoraka čine tekući uzorci, UV-VIS spektrofotometri imaju prilagođeno postolje za kvarcne kivete te kao takvo osigurava precizna i ponovljiva mjerenja. Detektori su spojeni sa sistemom za mjerenje i ispis rezultata.

Kako bi se znalo protumačiti rezultate mjerenja treba znati koji su mogući uzroci pogrešaka pri mjerenju. Tako se napominje kako uzroci pogreške mogu biti unutarnji, pogreške samog uređaja, ili vanjski, pogreške koje ne nastaju zbog uređaja već zbog uzoraka. Vanjski uzroci pogrešaka su puno češći te mogu nastati zbog raznih čimbenika kao što su fizikalna svojstva uzoraka, temperatura, koncentracija ili mogućnost postojanja tvari (onečišćenja) koje dodatno apsorbiraju svjetlo na promatranoj valnoj duljini čime se povećava dobiven rezultat apsorbancije [22].

#### 2.2.4.2. NIR spektroskopija

Blisko infracrvena spektroskopija (eng. Near Infrared Spectroscopy, NIR) vrsta je elektronske, ali i vibracijske spektroskopije te djeluje u području valnih duljina od 800-2500 nm. Koristi se za brzu kvantitativnu i kvalitativnu analizu spojeva u uzorcima te za kontrolu fizikalnih i kemijskih procesa [23]. NIR spektroskopija je brza, nedestruktivna, neinvazivna metoda koja zahtjeva malu količinu uzorka te njegovu minimalnu pripremu te se zbog tih karakteristika često koristi u agronomiji, prehrambenoj industriji, biomedicini, farmaciji itd. [24].

Uobičajeno provedene spektralne analize najčešće nisu dovoljne da se razumije komplicirani spektar dobiven NIR spektroskopijom. Stoga se pribjegava korištenju kemometrijskih metoda koje karakterizira mogućnost multivarijatne obrade podataka koja je prijeko potrebna dobivanje kvalitativnih i kvantitativnih podataka na temelju NIR spektroskopije koja nudi ogromnu količinu podataka svakim snimanjem uzoraka. Osim multivarijatne analize podataka, koriste se i modeli poput PCA (eng. Principal Component Analysis) i/ili PLS (eng. Partial Least Squares) [25][26].



#### 2.2.4.3. PCA analiza

Analiza glavnih komponentata (engl. Principal Component Analysis, PCA) uočava razlike u snimljenim spektrima uzoraka, te ih obrađuje tako da se dobiju najvažnije karakteristike iz kojih se dobivaju nove ortogonalne varijable ili tzv. „principal components“. Iz njih se računaju „faktori“ za svaki uzorak, koji su linearne kombinacije intenziteta određene karakteristike uzorka koji je od relativne važnosti za model [27]. Faktori se pozicioniraju u kvadrante na grafu. Zbog toga što je faktor ovisan i izračunat na temelju spektralnih karakteristika, uzorci koji su prema određenim komponentama slični, biti će prikazani blizu jedan drugoga na grafu, a što se više razlikuju, bit će udaljeniji [27]. Abdi i Williams navode kako PCA daje uvid u sličnostima i različitostima između podataka, tako da ih smješta na određenu poziciju na grafu [28].

#### 2.2.4.4. Umjetne neuronske mreže ANN (eng. Artificial Neural Networks)

Umjetne neuronske mreže u širem smislu riječi predstavljaju umjetnu repliku ljudskog mozga čiji je cilj samoprilagođavanje, samoorganiziranje i simuliranje procesa učenja u stvarnom vremenu. ANN je skup međusobno povezanih jedinica ili čvorova čija se funkcionalnost temelji na biološkom neuronu [29].

Veze između neurona određuje mrežnu funkciju. Podgrupe neurona obrade nazivaju se slojevima u neuronskoj mreži te se prvi sloj naziva input, dok se zadnji sloj naziva output. Slojevi koji se nalaze između inputa i outputa nazivaju se skriveni slojevi. Obradbeni moć neuronske mreže sadržana je u snazi (težini) veza između neurona te se obradbeni moć neuronske mreže može povećati učenjem iz podataka namijenjenih za učenje. Prema načinu učenja, umjetne neuronske mreže dijele se u dvije grupe: 1) učenje s učiteljem ili 2) učenje bez učitelja. U prvu skupinu spadaju mreže koje uče tako da dobivaju inpute i outpute te si tijekom ovakvog načina učenja neuronska mreža može modificirati težinu veza tako da se njen output ne razlikuje od stvarnog outputa dok se ne postigne željeni rezultat. U drugu skupinu spadaju mreže koje dobivaju samo inpute, odnosno nemaju poznate outpute te dolazi do samoorganizacije neuronske mreže grupiranjem dobivenih inputa i pronalaženjem obilježja svojstvenih problema [30].

ANN se najčešće koriste prilikom rješavanja problema klasifikacije i predviđanja, odnosno problema gdje postoje odnosi između ulaznih i izlaznih varijabli. Danas se njihova primjena može vidjeti u medicini, bankarstvu, strojarstvu i geologiji i to najčešće za zadatke: raspoznavanja uzoraka, obrada slika i govora, optimizacije, nelinearno upravljanje te obrade nepreciznih i nekompletnih podataka [29].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

---

#### 3.1. MATERIJALI

Kao materijali u ovom radu korišteni su:

- Multivitaminska zrnca okusa naranče, dodatak prehrani
- Multivitaminska zrnca sa sladilima okusa naranče, dodatak prehrani
- Multivitaminska zrnca s kalcijem okusa naranče, dodatak prehrani
- Multivitaminski komprimirani bomboni s kalcijem okusa naranče
- Multivitaminski komprimirani bomboni okusa naranče

Otapala i reagensi:

- Destilirana voda
- Dinatrijev hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- Natrijev acetat-trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ), (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox,  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ), (SigmaAldrich Co., Moskva, Rusija)
- Fosfatni pufer,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$
- Klorovodična kiselina (HCl),  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Pariz, Francuska)
- Koncentrirana octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- $\alpha$  amilaza (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Natrijev klorid (NaCl) (SigmaAldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)

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

#### Aparatura:

- Uljna kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Dongguan City, Kina)
- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Zagreb, Hrvatska)
- Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Plus, Riga, Latvija)
- Centrifuga (Hettich EBA 8, Tuttlingen, Njemačka)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S11., Cambridge, Engleska)
- Aparatura za vakuum filtraciju (Rocker 300 – LF 30, New Taipei City, Taiwan)
- Konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska)
- Refraktometar ABBE, 2WAJ (Bluewave Industry Co.,Ltd., Shanghai, Kina)
- NIR spektrometar (Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu\text{m}$ , South Bend, SAD)
- Analizator veličine čestica (Mastersizer 2000, Malvern, Velika Britanije)
- Analizator tečenja prahova (Powder Flow Analyser, Stable Micro Systems, Cardiff, Velika Britanija)
- Magnetska mješalica (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- pH metar (Jenco 601A, Schaumburg, SAD)
- Vibracioni volumetar (laboratorijska izrada)

## Pribor:

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

### 3.2. METODE

Uzorci korišteni u izradi rada donirani su od strane proizvođača te je popis uzoraka sa pripadajućim oznakama prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz oznaka uzoraka te njihovo značenje

Oznaka uzorka	Značenje
1	Multivitaminska zrnca okusa naranče (u obliku praha)
S1	Multivitaminska zrnca okusa naranče (početna otopina)
U1	Multivitaminska zrnca okusa naranče (nakon probave u ustima)
Z1	Multivitaminska zrnca okusa naranče (nakon probave u želucu)
C1	Multivitaminska zrnca okusa naranče (nakon probave u tankom crijevu)
2	Multivitaminska zrnca sa šećerom i sladilima okusa naranče (u obliku praha)
S2	Multivitaminska zrnca sa šećerom i sladilima okusa naranče (početna otopina)
U2	Multivitaminska zrnca sa šećerom i sladilima okusa naranče (nakon probave u ustima)
Z2	Multivitaminska zrnca sa šećerom i sladilima okusa naranče (nakon probave u želucu)
C2	Multivitaminska zrnca sa sladilima šećerom i okusa naranče (nakon probave u tankom crijevu)
3	Multivitaminska zrnca s kalcijem okusa naranče (u obliku praha)
S3	Multivitaminska zrnca s kalcijem okusa naranče (početna otopina)
U3	Multivitaminska zrnca s kalcijem okusa naranče (nakon probave u ustima)
Z3	Multivitaminska zrnca s kalcijem okusa naranče (nakon probave u želucu)

C3	Multivitaminska zrnca s kalcijem okusa naranče (nakon probave u tankom crijevu)
4	Multivitaminska zrnca sa sladilima okusa naranče (u obliku praha)
S4	Multivitaminska zrnca sa sladilima okusa naranče (početna otopina)
U4	Multivitaminska zrnca sa sladilima okusa naranče (nakon probave u ustima)
Z4	Multivitaminska zrnca sa sladilima okusa naranče (nakon probave u želucu)
C4	Multivitaminska zrnca sa sladilima okusa naranče (nakon probave u tankom crijevu)
5	Multivitaminski bomboni s kalcijem okusa naranče (u obliku bombona)
S5	Multivitaminski bomboni s kalcijem okusa naranče (početna otopina)
U5	Multivitaminski bomboni s kalcijem okusa naranče (nakon probave u ustima)
Z5	Multivitaminski bomboni s kalcijem okusa naranče (nakon probave u želucu)
C5	Multivitaminski bomboni s kalcijem okusa naranče (nakon probave u tankom crijevu)
6	Multivitaminski bomboni okusa naranče (u obliku bombona)
S6	Multivitaminski bomboni okusa naranče (početna otopina)
U6	Multivitaminski bomboni okusa naranče (nakon probave u ustima)
Z6	Multivitaminski bomboni okusa naranče (nakon probave u želucu)
C6	Multivitaminski bomboni okusa naranče (nakon probave u tankom crijevu)

Napitci multivitaminskih prahova pripremljeni su prema napisanim uputama na deklaracijama ispitivanih proizvoda, na način da je pripremljeni volumen iznosio 5 mL za uzorke 1, 3, 4, 5 i 6 te 10 mL za uzorak 2. Masa multivitaminskog praha za uzorak 1 iznosila je 0,38 g, za uzorak 2: 0,055 g, za uzorak 3: 0,375 g, a za uzorak 4: 0,2 g. Ovakvom odvagom uzoraka zadovoljila se preporučena koncentracija napitka navedena na deklaracijama

proizvoda. Prilikom pripreme uzoraka 5 i 6 (multivitaminskih bombona) otopljeni su po jedan bombon mase 1,0038 g za uzorak 5 te 1,3525 g za uzorak 6 u 5 mL vode.

### 3.2.1. Fizikalna svojstva odabranih multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče

#### 3.2.1.1. *Nasipna gustoća*

Uzorak se slobodno nasipa u menzuru do ukupnog volumena 100 mL te se izvaže. Nakon očitavanja početne mase i volumena menzura se pričvršćuje na postolje vibracionog volumetra laboratorijske izrade. Volumetar radi na principu sabijanja praha vibracijama duž vertikalne osi koje uzrokuju istiskivanje zraka iz šupljina među česticama što kao posljedicu ima smanjenje volumena praha u menzuri, a time ujedno i povećanje vrijednosti nasipne gustoće. U prvom se ciklusu provodi 10 vibracija menzure s uzorkom (4s) i zabilježi se volumen praha. U drugom se ciklusu provodi 100 vibracija (20s) i zabilježi se volumen praha. Provode se dva paralelna mjerenja.

#### 3.2.1.2. *Udio suhe tvari*

U suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem odvažuje se određena količina uzorka (približno 3 g) ukoliko se radi o multivitaminskom prahu ili dva komada bombona ako se radi o multivitaminskim bombonima ( $\approx 2,0076$  g i  $\approx 2,705$  g). Sušenje uzorka traje tri sata pri  $105^{\circ}\text{C}$  u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kad je postupak sušenja završen, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode. Vrše se dva paralelna mjerenja, a izračun suhe tvari provodi se prema jednadžbama tri i četiri:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbama:

$$\% \text{ vode} = (a - b) \cdot \frac{100}{m} \quad (1)$$



$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad (2)$$

Gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

#### *3.2.1.3. Ukupne otopljene tvari (TDS)*

Nakon hlađenja uzoraka na sobnu temperaturu, uranjanjem elektrode konduktometra (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska) u uzorke izmjerena je i očitana vrijednost ukupne otopljene tvari prikazana na zaslonu uređaja. Provode se dva paralelna mjerenja.

#### *3.2.1.4. Vodljivost*

Nakon hlađenja uzoraka na sobnu temperaturu, uranjanjem elektrode konduktometra (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska) u uzorke izmjerena je i očitana vrijednost vodljivosti prikazana na zaslonu uređaja. Provode se dva paralelna mjerenja.

#### *3.2.1.5. Raspodjela veličine čestica*

Mjerenja su provedena uz pomoć laserskog analizatora veličine čestica (Mastersizer 2000) i jedinice za suhu disperziju (Scirocco 2000). Uzorak se usipa u kadu jedinice za suhu disperziju koja je opremljena sitom za razbijanje aglomerata i ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Prije mjerenja provodi se mjerenje pozadinskog šuma koji nastaje kao rezultat struje zraka kroz mjernu ćeliju. Zasićenje laserske zrake podešava se na 2 – 6 %, a za svaki se uzorak provode 3 paralelna mjerenja, svako u trajanju od 7 sekundi.

### 3.2.2. Svojstva tečenja multivitaminskih prahova okusa naranče

#### 3.2.2.1. Indeks kohezije

Svojstva kohezije praha određuju se pomoću reometra za analizu svojstva tečenja prahova TA.HDPlus Powder Flow Analyser (StableMicro Systems, Godalming, Velika Britanija). Uzorak volumena 160 mL izvaže se i stavlja u staklenu posudu. Staklena posuda fiksira se na predviđeno mjesto na instrumentu te se na računalu pokrene postupak mjerenja. Prije nego se obavi mjerenje uzorka, instrument provodi dva pripremna ciklusa mjerenja. Svojstva zbijanja ispitivana su i mjerena kad se rotirajuća oštrica instrumenta kretala prema dolje, a svojstva kohezije mjerena su u trenutku kada se rotirajuća oštrica kretala prema gore pri najvećoj brzini od  $50 \text{ mm s}^{-1}$ . Tijekom kretanja oštrice prema dolje mjeren je koeficijent kohezije kao površina ispod negativnog dijela krivulje. Indeks kohezije je tada računat dijeljenjem koeficijenta s masom uzorka. Indeks kohezije koristi se za kategorizaciju prahova kao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Kategorizacija prahova temeljem indeksa kohezije [31][32][33]

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

#### 3.2.2.2. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača

Test sposobnosti stvaranja čvrstog kolača također se provodi TA.HDPlus Powder Flow Analyser-om (StableMicro Systems, Godalming, Velika Britanija). Uzorak volumena 160 mL izvaže se i stavlja u staklenu posudu. Staklena posuda fiksira se na predviđeno mjesto na instrumentu te se na računalu pokrene postupak mjerenja. Proces započinje provođenjem

dva ciklusa kondicioniranja. Oštrica uređaja izravnavava vrh kolone praha i mjeri visinu same kolone. Nakon toga oštrica se kreće kroz kolonu prema dolje s brzinom od  $20 \text{ mm s}^{-1}$  i zbija prah unaprijed određenom silom od 750 g. Kad oštrica dosegne zadanu silu, kreće se kroz prah brzinom od  $10 \text{ mm s}^{-1}$ , a postupak se ponavlja četiri puta. Na početku svakog ciklusa oštrica je izmjerila visinu kolone te je također zabilježena visina praha kada je postignuta zadana sila. Kada je peti puta dosegnuta zadana sila, oštrica mijenja smjer i reže kolač koji se formirao u posudi. Uređaj bilježi promjene u visini stupca prilikom sabijanja mješavine [34], a rezultati su prikazani kao čvrstoća kolača (gmm) i prosječna čvrstoća kolača (g).

### 3.2.2.3. *PFSD test*

PFSD test provodi se TA.HDPlus Powder Flow Analyser-om (StableMicro Systems, Godalming, United Kingdom). Uzorak volumena 160 mL izvaže se i stavlja u staklenu posudu. Staklena posuda fiksira se na predviđeno mjesto na instrumentu te se na računaru pokrene postupak mjerenja. Powder Flow Analyser mjeri potreban rad da multivitaminski prah teče pri različitim brzinama. Kontrola protoka djelovanjem rotirajuće oštrice sastoji se od dva ciklusa od kojih svaki sadrži pet serija. Brzina rotirajuće oštrice u prvoj seriji iznosi  $10 \text{ mm s}^{-1}$ , dok u drugoj, trećoj i četvrtoj raste na  $20 \text{ mm s}^{-1}$ ,  $50 \text{ mm s}^{-1}$ , odnosno  $100 \text{ mm s}^{-1}$ , a u zadnjoj seriji brzina oštrice opada te iznosi opet  $10 \text{ mm s}^{-1}$ . Svakim se ciklusom, pomoću oštrice, prah sabija prema dolje i podiže prema gore, a kretanje oštrice prema dolje se bilježi kao pozitivna sila, dok se kretanje oštrice prema gore bilježi kao negativna sila. Stabilnost prahova se procjenjuje na osnovi promjene svojstva prahova tijekom testiranja te se uspoređuje rad koji je potreban za tečenje prahova u prva dva kruga pri brzini od  $10 \text{ mm s}^{-1}$  s radom koji je potreban za tečenje prahova u zadnja dva kruga, također pri brzini od  $10 \text{ mm s}^{-1}$ . Dobivene vrijednosti indeksa stabilnosti tumači se prema tablici 3 [35].

Tablica 3. Promjene svojstva tečenja prahova ovisno o indeksu stabilnosti

Indeks stabilnosti	Svojstvo tečenja praha
1	Nema promjena svojstava praha prilikom testiranja
>1	Teže tečenje praha porastom brzine tečenja
<1	Lakše tečenje praha porastom brzine tečenja

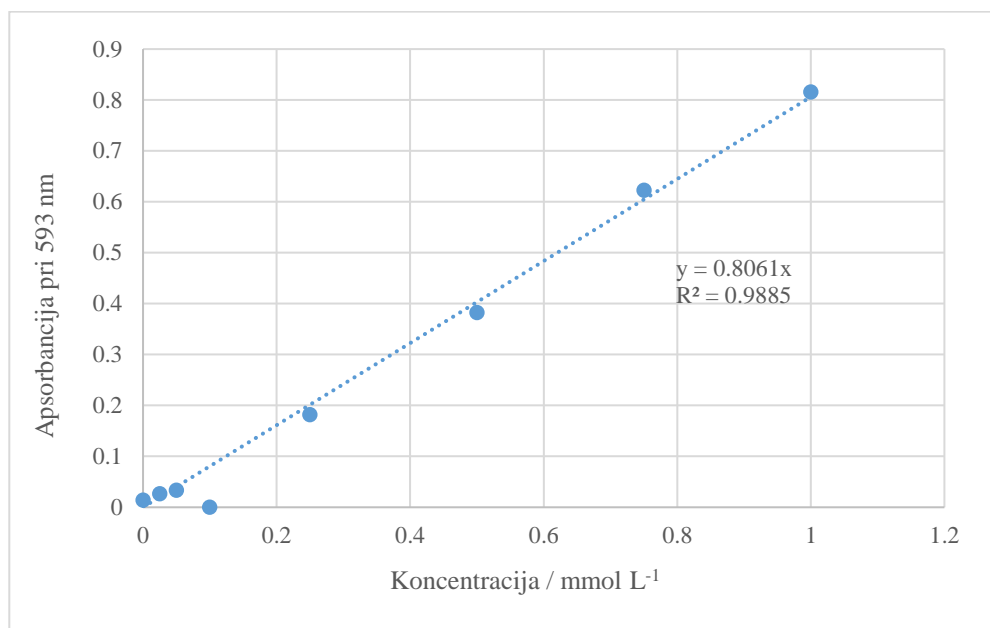
### 3.2.3. Kemijska svojstva odabranih multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče

#### 3.2.3.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

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

Za postupak mjerenja, u kivetu se pomiješa  $V = 50 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka i  $V = 950 \text{ }\mu\text{L}$  FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija na  $\lambda = 593 \text{ nm}$  u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka  $V = 50 \text{ }\mu\text{L}$  vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa ( $V = 950 \text{ }\mu\text{L}$ ).

Rezultati se izražavaju kao molarni ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) ili maseni udio ( $\mu\text{g g}^{-1}$  uzorka) ekvivalenta  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , temeljem baždarnog pravca (Slika 1.) izrađenog pomoću otopina  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ .



Slika 1. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti (FRAP)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,8061x \quad (3)$$

gdje je:

$y$  = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 593 nm

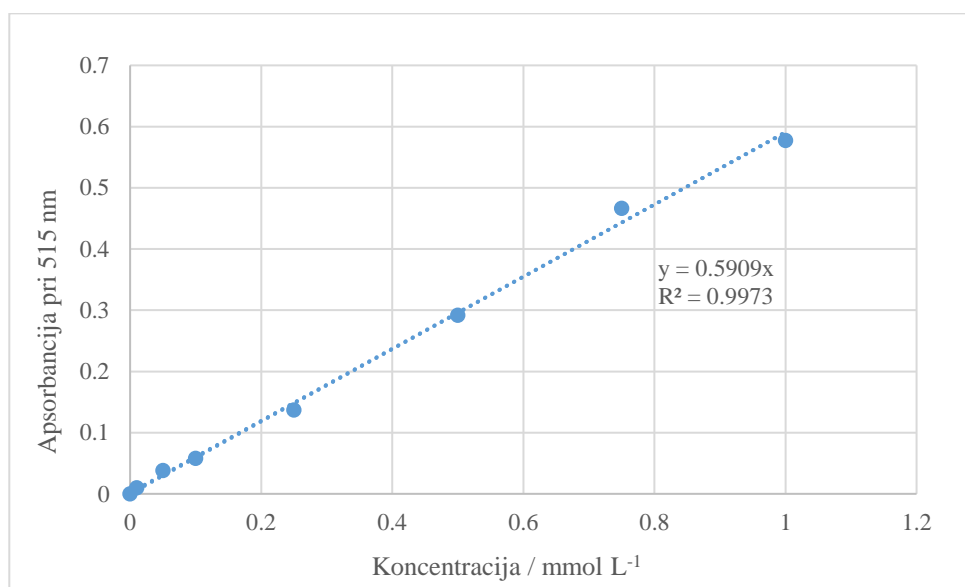
$x$  = ekvivalent  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{mM L}^{-1}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

### 3.2.3.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetira se 100  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te se takva smjesa dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 min u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Na osnovu izmjerenih vrijednosti

apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a kao standarda konstruirana se pravac ovisnosti apsorbancije  $\Delta A$  o koncentraciji  $\text{mM L}^{-1}$ , odnosno baždarni pravac. Promjena apsorbancije DPPH radikala ( $\Delta A$ ), nakon reakcije s uzorkom, računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe. Rezultati  $\Delta A$  preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca (Slika 2.) u koncentracije ( $\text{mmol L}^{-1}$  Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) ili maseni udio ( $\mu\text{g g}^{-1}$  uzorka) ekvivalenta Trolox-a.



Slika 2. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti (DPPH)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,5909x \quad (4)$$

gdje je:

$y$  = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 515 nm

$x$  = ekvivalent Troloxa (TAE) ( $\text{mM L}^{-1}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

### 3.2.3.3. *Udio šećera*

Udio šećera mjeri se refraktometrom ABBE, 2WAJ (Bluewave Industry Co., Ltd., Kina) Dvije do tri kapi uzorka pomoću kapaljke se nakapaju na stakalce refraktometra kroz koje prolaze svjetlosne zrake iz izvora svjetla. Dobivena se vrijednost očita sa refraktometra u obliku refrakcijskog indeksa i % Brix-a. Provode se dva paralelna mjerenja, a nakon svakog mjerenja se stakalce refraktometra očisti pomoću acetona i krpice.

### 3.2.4. *In vitro* model simulacije probave

*In vitro* simulacija probavnog procesa započinje korakom koji simulira uvjete u ustima. Odvaži se 40 mg  $\alpha$ -amilaze i otopi u 40 mL fosfatnog pufera zajedno s 0,04 % NaCl-a i 0,004 %  $\text{CaCl}_2$ . Tako pripremljena otopina stavi se u uljnu kupelj i zagrije na temperaturu od 37 °C. Kada se dostigne potrebna temperatura, doda se 4 grama uzorka i pokrene štoperica. Inkubacija traje 5 minuta. Nakon inkubacije izuzme se 2 mL uzorka za daljnje analize koji se odmah ohladi u smjesi leda i vode. Nakon hlađenja uzorak se profiltrira pomoću šprice kroz mikrofilter.

Nakon toga, pH reakcijske mješavine se namjesti na pH = 2 pomoću koncentrirane klorovodične kiseline (HCl), čime se simuliraju uvjeti probave u želucu. Nakon što je pH namješten, dodaje se suspenzija pepsina (60 mg pepsina otopljenog u 4 ml 0,01 mol L<sup>-1</sup> HCl) te se reakcijska mješavina inkubira na 2 sata pri 37 °C. Nakon završetka inkubacije, pH se podesi na pH = 6,5 dodatkom  $\text{NaHCO}_3$ , što odgovara uvjetima u tankom crijevu te se izuzme 2 mL uzorka za daljnje analize koji se odmah ohladi u smjesi leda i vode. Nakon hlađenja uzorak se profiltrira pomoću šprice kroz mikrofilter.

Nakon što je pH namješten na 6,5 dodaje se suspenzija pankreatina (0,08 grama pankreatina otopljenog u 10 mL fosfatnog pufera) i žučnih soli (0,5 g žučnih soli u 10 mL fosfatnog pufera). Mješavina se inkubira na 2 sata pri 37 °C. Nakon završene inkubacije izuzeti 2 mL uzorka koji se odmah mora ohladiti u smjesi vode i leda i profiltrirati pomoću šprice kroz mikrofilter.

Uzorcima dobivenim nakon inkubacija svih koraka *in vitro* modela probave određuje se: antioksidacijski kapacitet DPPH i FRAP metodom, TDS i vodljivost, udio šećera refraktometrom te im se snimaju kontinuirani UV-VIS i NIR spektri.

### 3.2.5. Spektrofotometrijske metode

#### 3.2.5.1. UV-VIS spektroskopija

Za snimanje UV-VIS spektra korišten je UV-spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska) sa instaliranim programom Acquire LITE. Prije samog početka snimanja spektra uzoraka multivitaminskih napitaka okusa naranče potrebno je kalibrirati uređaj. Potom je potrebno uzorak uliti u kvarcnu kivetu koja se postavlja u posebno dizajniran prostor spektrofotometra te se klikom na Wavescan pokreće snimanje spektra. UV-VIS spektar svakog uzorka snima se dva puta, a dobiveni podaci spremaju se kao „.xls“ datoteke u programu Microsoft Office Excel.

#### 3.2.5.2. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR)

NIR metoda temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u bliskom infracrvenom području spektra ( $\lambda = 780 - 2500$  nm), a analiza snimljenih uzoraka može se provoditi pomoću kombinacije raznih kemometrijskih metoda, dok se u ovom radu koristila PCA analiza podataka. Pomoću NIR spektrometra Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu$ m snimi se NIR spektar uzoraka multivitaminskih napitaka u početnom obliku te nakon svake faze probave. Sustav za snimanje NIR spektra sastoji se od računala sa instaliranim Control Development softverom Spec32, NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu$ m spektrometra, polikromatskog izvora svjetlosti, optičkih kablova i postolja s poklopcem u koji se stavlja kiveta s uzorkom.

Postupak snimanja provodi se tako da se uzorak ulije u kivetu te se stavi u postolje s poklopcem koje omogućuje snimanje spektra bez prisustva okolne svjetlosti iz prostorije.



Za svaki uzorak provode se tri paralelna mjerenja, a dobiveni podaci spremaju se kao .xls datoteke u programu Microsoft Office Excel.

### 3.2.6. Kemometrijska obrada podataka

Eksperimentalno dobiveni podaci korišteni su za provođenje PCA i ANN analiza upotrebom softverskog paketa StatSoft Statistica (StatSoft, Tulsa, SAD). Za izradu PCA analize korišteni su podaci dobiveni UV-VIS i NIR spektroskopijom početnih otopina te otopina nakon svake faze simulacije ljudske probave za sve uzorke. Za izradu ANN analize upotrijebljeno je: deset faktora dobivenih PCA analizom te eksperimentalno dobiveni podaci o: TDS-u, vodljivosti, udjelu šećera prikazan u % Brix-a i refrakcijskim indeksom te antioksidativnoj aktivnosti prema FRAP i DPPH metodi u početnim otopinama te nakon svake faze simulacije ljudske probave za sve uzorke. Prikladnost modela procijenjena je pomoću vrijednosti koeficijenta determinacije prema Chaddock-ovoj ljestvici (Tablica 4.).

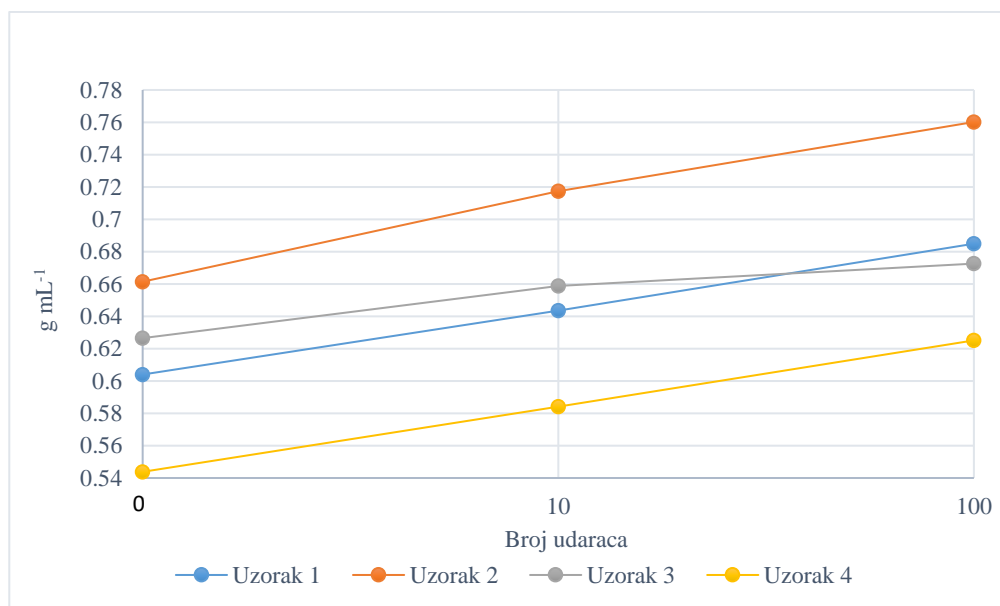
Tablica 4. Chaddock-ova ljestvica

$R^2$	Interpretacija
0	Odsutnost veze
0,01 – 0,25	Slaba veza
0,25 – 0,64	Veza srednje jakosti
0,64 – 1	Čvrsta veza
1	Potpuna veza

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Fizikalna svojstva početnih uzoraka i otopina multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče

#### 4.1.1. Nasipna gustoća

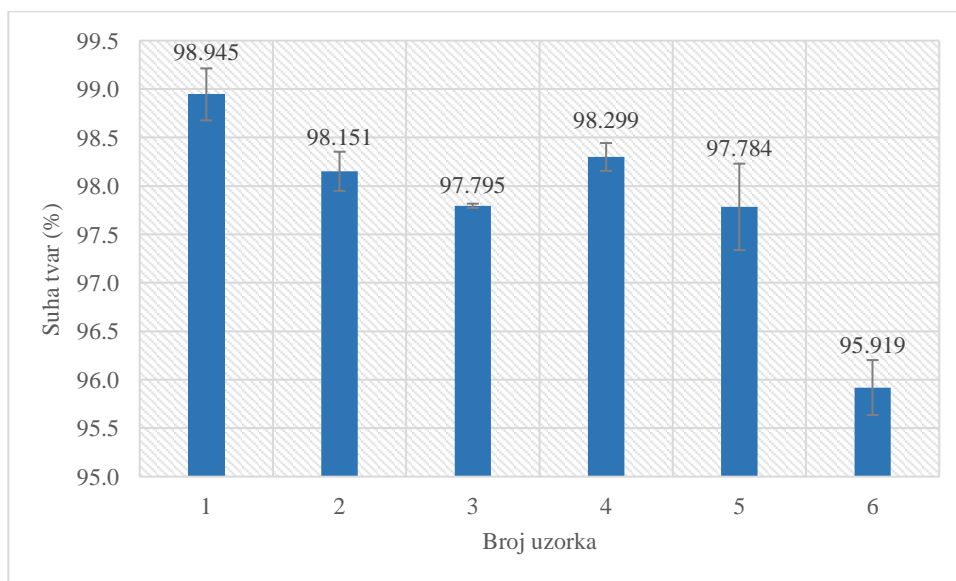


Slika 3. Nasipna gustoća multivitaminskih prahova okusa naranče pri 0, 10 i 100 udaraca

Nasipna je gustoća kod svih uzoraka porasla s povećanjem broja udaraca zbog smanjenja udjela zraka između čestica praha [36]. Slika 3 grafički prikazuje dobivene rezultate nasipne gustoće nakon 0, 10 i 100 udaraca. Rezultati nasipne gustoće multivitaminskih prahova u početnom obliku (0 udaraca) kreću se od 0,5438 g mL<sup>-1</sup> do 0,6614 g mL<sup>-1</sup>. Nasipna gustoća nakon 10 udaraca iznosi između 0,5841 g mL<sup>-1</sup> i 0,7173 g mL<sup>-1</sup>, a nakon 100 udaraca od 0,6251 g mL<sup>-1</sup> do 0,7602 g mL<sup>-1</sup>. Najmanju je promjenu vrijednosti nasipne gustoće pokazao uzorak 3 i iznosi 0,0461 g mL<sup>-1</sup>, dok najveću promjenu pokazuje uzorak 2 i iznosi 0,0988 g mL<sup>-1</sup>. Mala promjena nasipne gustoće i niska

kompresibilnost sugeriraju kako ispitivani prah ima poželjne osobine pri procesima skladištenja, transporta, pakiranju itd. Može se zaključiti da između ispitivanih prahova, uzorak 3 posjeduje najpoželjnije osobine kod navedenih procesa, dok uzorak 2 pokazuje najmanje poželjne osobine. Uzevši u obzir da su multivitaminski pripravci korišteni u ovom radu u granuliranom obliku, poželjne osobine tečenja dobivene analizom nasipne gustoće očekivane su, s obzirom da se u literaturnim podacima često navodi da prahovi u granuliranom ili aglomeriranom obliku imaju izvrsna svojstva tečenja. Naime, prilikom procesa proizvodnje ovakvih prahova omogućena je stroga kontrola uvjeta proizvodnje, a time i rezultirajuće veličine čestica, nasipne gustoće i svojstva tečenja takvih prahova [37].

#### 4.1.2. Udio suhe tvari

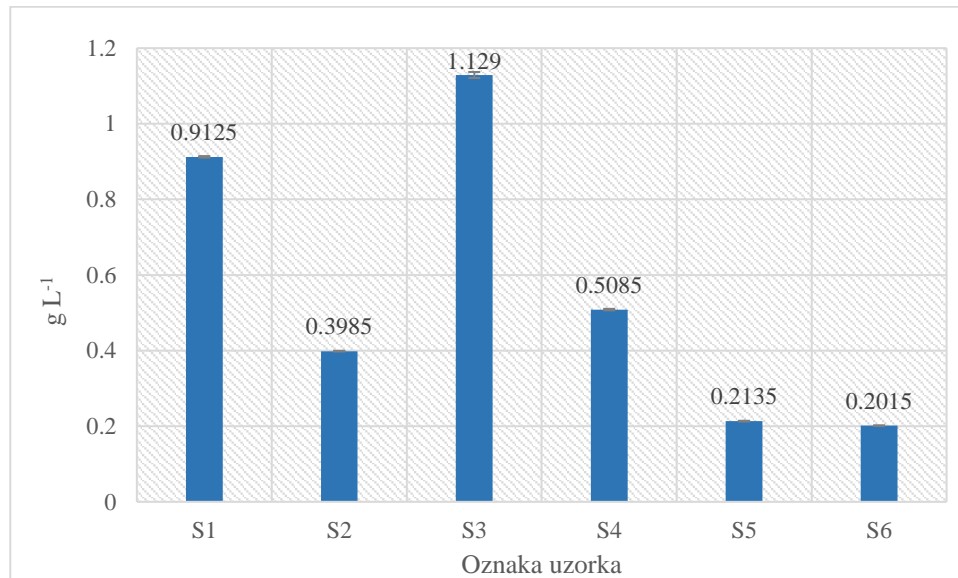


Slika 4. Grafički prikaz udjela suhe tvari ispitivanih multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče

Prema rezultatima prikazanim na slici 4, udio suhe tvari u ispitivanim multivitaminskim prahovima kreće se od 97,795 % do 98,945 %. Udio suhe tvari ispitivanih multivitaminskih bombona kreće se od 95,919 % do 97,784 %. Najveći udio suhe tvari ima uzorak 1, dok uzorak 6 ima najmanji postotak suhe tvari. Dobiveni rezultati u skladu su s

literaturnim podacima, prema kojima praškasti uzorci ili bomboni proizvedeni komprimiranjem praškastih materijala imaju nizak udio vlage (ispod 10 %) [21].

#### 4.1.3. Ukupne otopljene tvari (TDS)



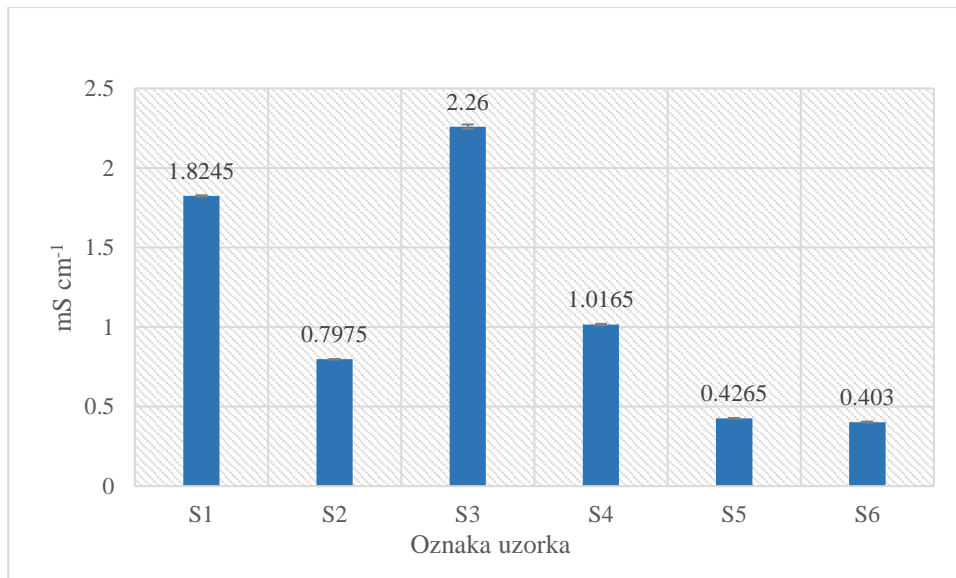
Slika 5. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti TDS-a početnih otopina ispitivanih multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče

Ukupne otopljene tvari određivane su u svježe pripremljenim vodenim otopinama uzoraka. Iz slike broj 5 vidljivo je kako uzorak S3 ima najveću vrijednost ukupne otopljene tvari među multivitaminskih prahovima te iznosi 1,129 g L<sup>-1</sup>. Uzorak 3 je multivitaminski prah s dodatkom kalcija te je otopina S3 dobivena tako što je 0,375 g praha dodano u 5 mL vode. Uzorak S1 pokazuje nešto nižu vrijednost TDS-a od S3, u iznosu od 0,9125 g L<sup>-1</sup>. Otopina je dobivena dodavanjem 0,38 g praha na 5 mL vode što ju čini koncentriranijom od S3, no razlikuje se od uzorka S3 po tome što uzorak 1 ne sadrži dodatnu količinu kalcija. Uzorak S2 i S4 su otopine multivitaminskih prahova koji sadrže sladila umjesto šećera te pokazuju znatno niže vrijednosti TDS-a u usporedbi s uzorcima S1 i S3. Uzorak S1 dobiven je dodatkom 0,055 g praha u 10 mL vode, dok je uzorak S4 dobiven dodatkom 0,2 g praha

u 5 mL vode te je tako uzorak S2 najmanje koncentriran što je i razlog najniže vrijednosti TDS-a među svim ispitivanim multivitaminskim prahovima.

S druge strane, uzorci S5 i S6 (multivitaminski bomboni) međusobno pokazuju slične rezultate, no znatno niže u usporedbi s ispitivanim uzorcima multivitaminskih prahova. Razlozi nastalih razlika između bombona i prahova mogu biti dvojaki. Kao prvi razlog navodi se razlika u količini vitamina koju prema proizvođačkoj specifikaciji sadrže bomboni, dok je drugi razlog povezan sa sastavom bombona koji se podešava tijekom proizvodnog procesa. Naime, s obzirom da proces proizvodnje komprimata (bombona) podrazumijeva sabijanje prahova u kalupima (prešama) u oblik koji moraju zadržati i nakon što prestane sabijanje, u početne smjese prahova često se dodaju punila ili veziva, najčešće u obliku ugljikohidrata, primjerice maltodekstrina ili dekstroze. U slučaju uzoraka bombona korištenih u ovom radu, kao punilo je korištena dekstroza. Prema literaturnim podacima, vodene otopine šećera ne sadrže dovoljno velik broj iona koji bi doveo do povećanja vrijednosti TDS-a ili vodljivosti. Navedeno je pokazano u istraživanjima Ronga i suradnika (2009) na maltodekstrinu [38] i Juanash i Julanti (2016) na vodenim otopinama glukoze [39].

## 4.1.4. Vodljivost



Slika 6. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti vodljivosti početnih otopina ispitivanih multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče

Iz slike 6 vidljivo je kako srednje vrijednosti vodljivosti pokazuju iznimno veliku korelaciju s rezultatima TDS-a. Stoga se može zaključiti kako su razlozi dobivanja ovakvih rezultata vodljivosti upravo oni opisani u poglavlju (4.1.3.).

4.1.5. Raspodjela veličine čestica

Tablica 5. Raspodjela veličine čestica multivitaminskih prahova okusa naranče prikazana kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n = 3)

Uzorak	d (0,5) ( $\mu\text{m}$ )	D [3, 2] ( $\mu\text{m}$ )	Raspon ( $\mu\text{m}$ )
1	268,170 $\pm$ 49,549	144,474 $\pm$ 24,981	2,252 $\pm$ 0,345
2	286,870 $\pm$ 6,942	102,104 $\pm$ 2,944	1,920 $\pm$ 0,017
3	239,539 $\pm$ 8,828	119,782 $\pm$ 1,340	2,037 $\pm$ 0,050
4	252,739 $\pm$ 9,717	154,340 $\pm$ 8,527	1,669 $\pm$ 0,026

Raspodjela veličine čestica prikazana je pomoću d(0,5), D[3, 2] te raspona kojim je definirana širina raspodjele a rezultati dobiveni mjerenjem prikazani su u tablici 5. Iz vrijednosti d(0,5) može se zaključiti kako uzorak 2 ima najveći srednji promjer u iznosu od 286,87  $\mu\text{m}$ , dok vrijednosti d(0,5) za uzorak 3 pokazuju kako on ima najmanji srednji promjer u iznosu od 239,539  $\mu\text{m}$ . Promatrajući parametar D [3, 2] zaključujemo kako uzorak 4 ima najveći Sauterov promjer, odnosno površinski srednji promjer i iznosi 154,34  $\mu\text{m}$ , dok najmanju vrijednost pokazuje uzorak 2 u iznosu od 102,104  $\mu\text{m}$ . Prema literaturnim podacima, prahovi sa veličinama čestica oko 200  $\mu\text{m}$  pokazuju najbolja svojstva tečenja [21], te je vrlo vjerojatno to razlog zašto su se pri proizvodnji granula multivitaminskih napitaka nastojale proizvesti čestice upravo tog promjera. Najveću vrijednost parametra raspodjele pokazuje uzorak 1 te iznosi 2,252  $\mu\text{m}$ , a najmanju vrijednost pokazuje uzorak 4 u iznosu od 1,669  $\mu\text{m}$ . Vrijednosti parametra raspodjele veće su u usporedbi sa nekim često korištenim prehrambenim prahovima (primjerice kakao, šećer, brašno i slični), ponajprije zbog toga što tijekom procesa aglomeracije mogu nastati aglomerati različitih dimenzija koji uključuju čestice velikih i malih promjera, što je vidljivo kod analize raspona ukoliko uzorak nakon aglomeracije nije prosijan [21][40].

**4.2. Svojstva tečenja multivitaminskih prahova okusa naranče**

4.2.1. Indeks kohezije

Tablica 6. Indeks kohezije te svojstvo tečenja multivitaminskih prahova okusa naranče prikazan kao srednja vrijednost (n = 3)

Uzorak	Indeks kohezije (mm)	Svojstvo tečenja praha
1	6,6231 ± 0,1634	Slobodno teče
2	9,2405 ± 0,1226	Slobodno teče
3	10,7478 ± 0,2685	Slobodno teče
4	10,5573 ± 0,3749	Slobodno teče

Vidljivo iz tablice 6, vrijednosti indeksa kohezije za ispitivane multivitaminske prahove okusa naranče kreću se u rasponu od 6,6231 mm do 10,7478 mm. Ovakvim rezultatima ispitivani uzorci mogu se okarakterizirati slabo kohezivni, odnosno glede svojstva tečenja prahova spadaju u grupu prahova koji slobodno teku. Može se zaključiti kako će se ispitivani uzorci dobro ponašati tijekom transporta, što je i inače slučaj sa granuliranim prahovima. Naime, budući da su svi uzorci korišteni u ovom radu u aglomeriranom obliku, a proces aglomeracije koristi se kako bi se prahovima poboljšala svojstva tečenja, vidljivo je da je temeljni cilj aglomeracije postignut.



4.2.2. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača

Tablica 7. Procjena sposobnosti stvaranja čvrstog kolača multivitaminskih prahova okusa naranče prikazana kao srednja vrijednost čvrstoće kolača i prosječne čvrstoće kolača (n = 3)

Uzorak	Čvrstoća kolača (gmm)	Prosječna čvrstoća kolača (g)
1	1579,890	64,213
2	2460,559	48,542
3	9285,814	140,140
4	3732,463	76,461

Rezultati testa procjene sposobnosti stvaranja kolača prikazani u tablici 7 kreću se u rasponu od 1579,89 gmm do 9285,814 gmm za čvrstoću kolača te od 48,542 g do 140,140 g za prosječnu čvrstoću kolača. Vrijednosti čvrstoće kolača i prosječne čvrstoće kolača ukazuju na nisku čvrstoću i stabilnost kolača koji nastaje sabijanjem ispitivanih multivitaminskih prahova što ih čini dobrim materijalom za rukovanje, miješanje i transport u proizvodnom pogonu. Uzorak 1 pokazuje najnižu vrijednost čvrstoće kolača u iznosu od 1579,89 gmm, dok uzorak 2 pokazuje najnižu vrijednosti prilikom ispitivanja prosječne gustoće kolača u iznosu od 48,542 g. Razlike u čvrstoći i prosječnoj čvrstoći kolača mogu se objasniti sa dva fenomena: sastavom uzoraka i samom strukturom aglomerata. Naime, prema navedenom na proizvođačkoj specifikaciji, uzorci se razlikuju u količini dodanog šećera, prisustvu sladila te dodatka minerala. Tako je uzorak 3, sa dodatkom kalcija, pokazao najveću tendenciju stvaranju čvrstog kolača, dok je uzorak 2, sa dodatkom sladila umjesto šećera, pokazao najmanju. Nadalje, budući da je analiza rađena na aglomeriranim proizvodima, lom aglomerata pri primjeni vanjske sile čest je kod ovakve vrste uzoraka. Ukoliko dođe do loma aglomerata tijekom testiranja, vidljive su i razlike u vrijednostima čvrstoće kolača, što je bio slučaj i u ovom radu.

4.2.3. PFSD test

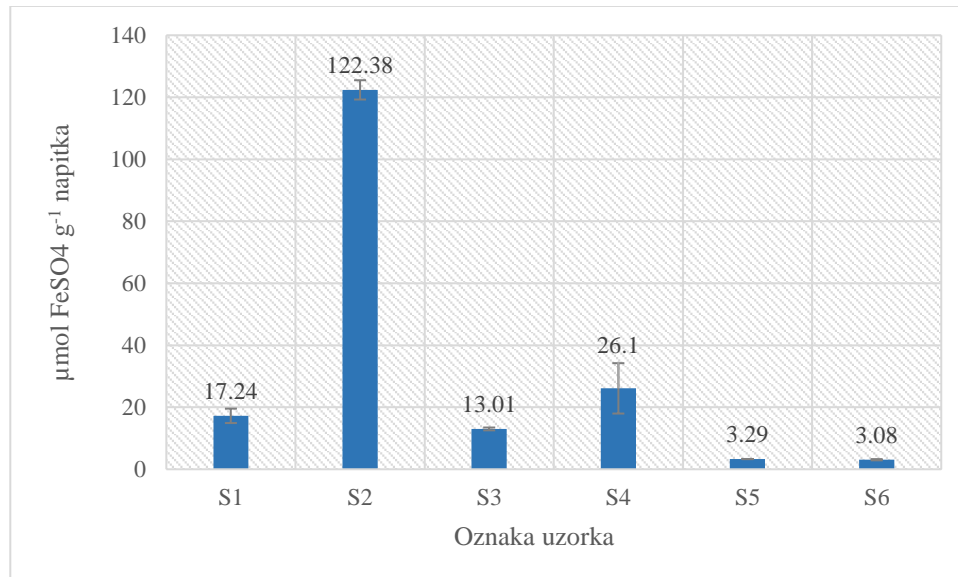
Tablica 8. Rezultati PFSD testa ispitivanih multivitaminskih prahova okusa naranče prikazani kao indeks stabilnosti (n = 3)

Uzorak	Indeks stabilnosti
1	0,29
2	0,89
3	0,61
4	1,94

U tablici 8 prikazani su dobiveni rezultati indeksa stabilnosti nakon provedenog PFSD testa te se vrijednosti kreću u rasponu od 0,29 do 1,94. Svi uzorci pokazali su se ovisnim o brzini tečenja, budući da su vrijednosti indeksa stabilnosti toka različite od 1. Indeks stabilnosti toka računa se računa dijeljenjem koeficijenta sabijanja prva dva kruga testiranja pri  $10 \text{ mm s}^{-1}$  sa koeficijentom sabijanja zadnja dva kruga pri  $10 \text{ mm s}^{-1}$ , a ukoliko je jednak 1, nema promjena na prahu tijekom testiranja. Vrijednosti veće ili manje od 1 ukazuju na promjene, primjerice u obliku čestica ili kristalnoj strukturi, može doći do razbijanja aglomerata i čestica praha [31]. Indeksi stabilnosti toka za sve uzorke različiti su od 1, pri čemu je uzorak 2 pokazao najveće odstupanje od „idealne“ vrijednosti. Budući da se u svim analiziranim slučajevima radi o aglomeriranim prahovima, dobivene vrijednosti indeksa stabilnosti toka ukazuju na lom aglomerata i promjene u strukturi praha sa promjenom brzine tečenja.

### 4.3. Kemijska svojstva početnih otopina multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče

#### 4.3.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta početnih otopina FRAP metodom

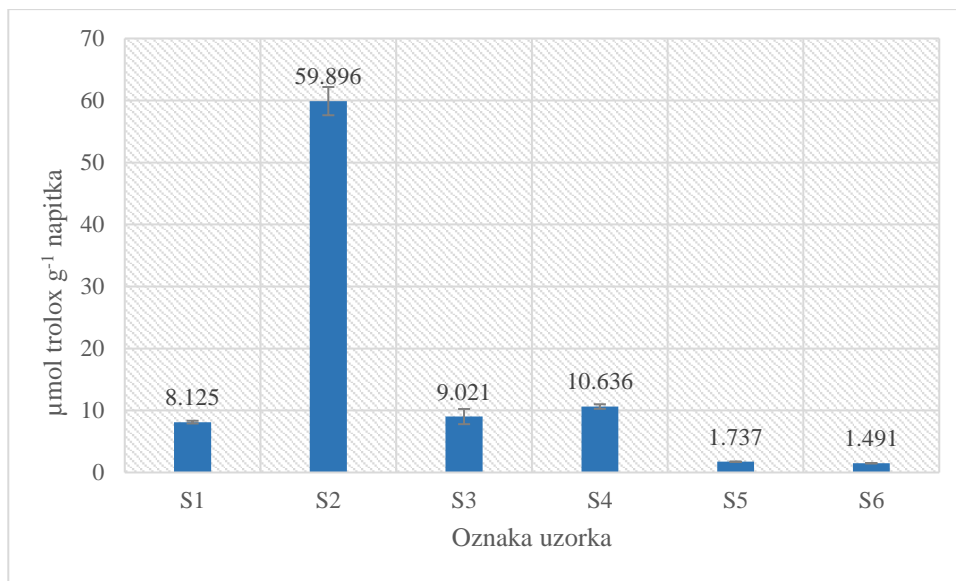


Slika 7. Grafički prikaz antioksidacijskog kapaciteta početnih otopina ispitivanih multivitaminskih prahova i bombona FRAP metodom

Vrijednosti antioksidativnog kapaciteta multivitaminskih prahova okusa naranče variraju u rasponu od 13,01 – 122,38 μmol ekvivalenata FeSO<sub>4</sub> po gramu napitka, dok su vrijednosti antioksidativnog kapaciteta multivitaminskih bombona znatno niže te iznose 3,29 μmol ekvivalenata FeSO<sub>4</sub> po gramu napitka, odnosno 3,08 μmol ekvivalenata FeSO<sub>4</sub> po gramu napitka što je vidljivo na slici 7. Uzorak 2 ima najveći antioksidacijski kapacitet na jednaku količinu napitka, iste koncentracije. Razlog najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta uzorka 2 leži u samom sastavu napitka navedenom na proizvođačkoj specifikaciji. Naime, navedeni uzorak 2 sadrži veće količine dodanih vitamina u usporedbi sa ostalim uzorcima (primjerice 1200 mg dodanog vitamina C na 100 g uzorka u uzorku 2 u usporedbi sa 160 mg dodanog vitamina C na 100 g uzorka u uzorku 3). Nadalje, iz rezultata je vidljivo kako su vrijednosti antioksidativnog kapaciteta početnih

otopina multivitaminskih prahova u pravilu veće od vrijednosti antioksidativnog kapaciteta početnih otopina multivitaminskih bombona, što se ponovno može objasniti činjenicom da prema proizvođačkoj specifikaciji bomboni sadrže manje dodanih vitamina u usporedbi sa praškastim uzorcima.

#### 4.3.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta početnih otopina DPPH metodom

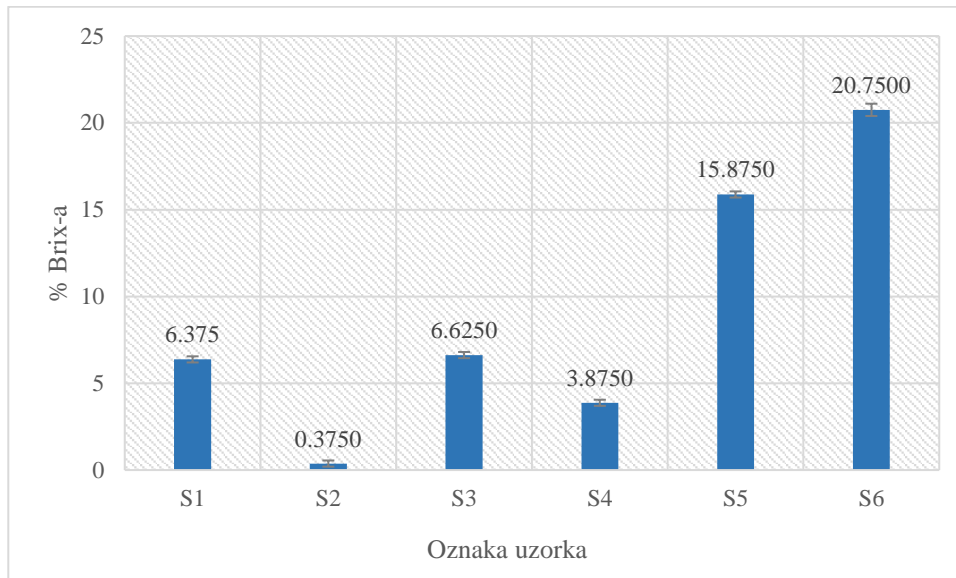


Slika 8. Grafički prikaz antioksidacijskog kapaciteta početnih otopina ispitivanih multivitaminskih prahova i bombona DPPH metodom

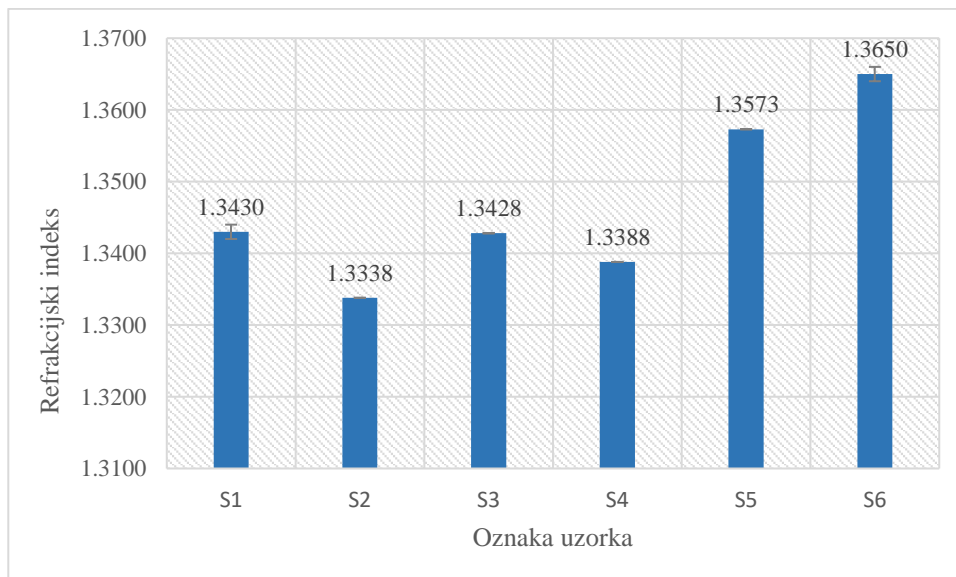
Slika 8 grafički prikazuje dobivene rezultate nakon provođenja DPPH metode na početnim otopinama multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče, a te se vrijednosti za multivitaminske prahove kreću u rasponu od 8,125 – 59,896 μmol Troloxa po gramu napitka, dok vrijednosti za multivitaminske bombone iznose 1,737 i 1,491 μmol Troloxa po gramu napitka. Rezultati DPPH metode koreliraju s rezultatima FRAP metode (Slika 7) pa se tako uzorak 2 ističe kao multivitaminski prah koji pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost. Multivitaminski bomboni i ovom metodom pokazuju nižu razinu antioksidativne aktivnosti u odnosu na multivitaminske prahove, a najnižu vrijednost ima uzorak 6. Rezultati dobiveni FRAP metodom u skladu su sa rezultatima dobivenih DPPH metodom, budući da

se sa obje metode pokazalo da uzorak 2 pokazuje najviši antioksidacijski kapacitet, a uzorci 5 i 6 najniži.

#### 4.3.3. Udio šećera u početnim otopinama



Slika 9. Grafički prikaz udjela šećera u početnim otopinama iskazan u % Brix-a



Slika 10. Grafički prikaz udjela šećera u početnim otopinama iskazan refrakcijskim indeksom

Slike 9 i 10 grafički prikazuju razinu prisutnosti šećera u početnim otopinama istraživanih multivitaminskih prahova i bombona pomoću % Brix-a te refrakcijskog indeksa. Rezultati pokazuju kako uzorak 2 ima najmanje razine šećera. S druge strane, najveću razinu šećera među multivitaminskim prahovima pokazuje uzorak 1, dok uzorak 3 pokazuje nešto niže vrijednosti. Što se tiče multivitaminskih bombona, uzorak 4 sadrži veću razinu šećera u usporedbi s uzorkom 5. Refraktometrijska se analiza pokazala izuzetno preciznom kod uzoraka 1, 2 i 3 kad se dobivene vrijednosti usporede s vrijednostima istaknutim na nutritivnim deklaracijama ispitivanih proizvoda. Naime, prema nutritivnim deklaracijama, uzorak 1 bi na 100 mL napitka trebao sadržavati 6,4 g šećera, a izmjerena je vrijednost od 6,375 g na 100 mL napitka; uzorak 2 bi na 100 mL napitka trebao sadržavati 0,03 g šećera, a izmjerena je vrijednost od 0,375 g na 100 mL napitka; uzorak 3 bi na 100 mL napitka trebao sadržavati 6,15 g šećera, a izmjerena je vrijednost od 6,625 g na 100 mL napitka. Prilikom usporedbe rezultata dobivenih refraktometrijskom analizom i nutritivne deklaracije kod uzorka 4 možemo zaključiti kako se značajno razlikuju budući da prema nutritivnoj deklaraciji uzorka 4, uzorak 4 bi na 100 mL napitka trebao imati 0 g šećera, a dobivena vrijednost iznosi 3,875 g na 100 mL napitka.

Refraktometrijskom analizom multivitaminskih bombona dobiveni su rezultati kako uzorak 5 na 100 g bombona sadrži 79,075 g šećera, dok uzorak 6 sadrži 76,71 g šećera na 100 g bombona. Nutritivne deklaracije ovih uzoraka kazuju kako bi uzorak 5 trebao sadržavati 94 g šećera na 100 g bombona, dok bi uzorak 6 trebao sadržavati 95 g šećera na 100 g bombona.

#### 4.4. Kemijska svojstva multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče tijekom i nakon *in vitro* modela ljudske probave

##### 4.4.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta prije i nakon simulacije probave

Tablica 9. Prikaz vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta prije i nakon simulacije probave

Uzorak	Početni antioksidacijski kapacitet DPPH metodom ( $\mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ otopine)	Antioksidacijski kapacitet nakon simulacije probave DPPH metodom ( $\mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ otopine)	Početni antioksidacijski kapacitet FRAP metodom ( $\text{mmol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ otopine)	Antioksidacijski kapacitet nakon simulacije probave FRAP metodom ( $\text{mmol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ otopine)
1	$617,49 \pm 16,71$	$44,02 \pm 4,18$	$1,31 \pm 0,18$	$0,92 \pm 0$
2	$329,43 \pm 12,53$	$26,89 \pm 5,01$	$0,67 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,02$
3	$676,58 \pm 91,92$	$13,30 \pm 6,69$	$0,98 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0$
4	$425,45 \pm 14,62$	$46,68 \pm 2,92$	$1,04 \pm 0,32$	$0,75 \pm 0,03$
5	$348,63 \pm 6,27$	$29,55 \pm 6,27$	$0,80 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,02$
6	$403,29 \pm 8,36$	$0 \pm 0$	$0,83 \pm 0,05$	$0,79 \pm 0,02$

Tablica 9 prikazuje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta uzoraka nakon što su provedeni kroz *in vitro* simulaciju probavnog sustava. Antioksidacijski kapacitet izmjeren DPPH metodom nakon *in vitro* simulacije probave iznosi između  $13,30 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$  otopine i  $46,68 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$  otopine što je između 91 % i 98 % manje u odnosu na antioksidacijski kapacitet izmjeren prije *in vitro* simulacije probave za multivitaminske prahove. Kod multivitaminskih bombona antioksidacijska aktivnost nakon *in vitro* simulacije probave iznosi  $29,55 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$  otopine za uzorak 5, odnosno  $0 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$  otopine za uzorak 6 što je jednako smanjenju antioksidacijske aktivnosti nakon

*in vitro* simulacije probave u odnosu na onu izmjerenu prije *in vitro* simulacije probave u iznosu od 92 % do 100 %.

Provođenjem FRAP metode, dobiveni su znatno drugačiji rezultati. Iznos antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probave kreće se u rasponu od 0,66 do 0,92 mmol  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$  otopine za multivitaminske prahove. Ovakvi rezultati sugeriraju kako smanjenje antioksidativne aktivnosti prije i nakon *in vitro* simulacije probave multivitaminskih prahova iznosi između 0 % i 30 %. Kod multivitaminskih bombona, nakon *in vitro* simulacije probave, antioksidacijska aktivnost iznosi 0,66 mmol  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$  otopine za uzorak 5 te 0,79 mmol  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$  otopine što ukazuje na ukupno smanjenje antioksidacijske aktivnosti nakon *in vitro* simulacije probave u iznosu od 17,5 % za uzorak 5, odnosno 5 % za uzorak 6.

Prema dobivenim rezultatima, velik dio antioksidansa razgrađuje se prilikom prolaska kroz probavni sustav, ponajprije zbog promjena pH vrijednosti određenog dijela probavnog sustava te efekta razrjeđenja do kojeg dolazi kako materijal prolazi kroz probavni sustav. Primjerice, prema protokolu provođenja simulacije probavnog procesa *in vitro*, početni uzorci razrjeđuju se već u ustima, dok je taj efekt najizraženiji u želucu te dalje u crijevima, čemu se može pripisati pad u koncentraciji antioksidansa na izlasku iz probavnog sustava. Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju Marić (2017) u kojem je utvrđeno da do najvećeg pada antioksidacijskog kapaciteta i sadržaja ukupnih polifenola dolazi nakon koraka probave koji se odvija u želucu, te je najniža koncentracija bioaktivnih spojeva detektirana nakon posljednjeg koraka probave (crijevo) [41]. Međutim, postoje i istraživanja provedena na specifičnim bioaktivnim spojevima (polifenolima i spojevima koji ulaze u sastav polifenola) u kojima je utvrđeno da zbog prirode spojeva i njihovog ponašanja u kiselim/lužnatim medijima i njihove disocijacije dolazi i do povišenja koncentracija određenih spojeva nakon prolaska kroz crijeva (ukupni flavonoid aglikoni i ukupni flavonoid glikozidi) [42]. Nadalje, studije provedene na vitaminima pokazale su da se više od 95 % vitamina C razgrađuje nakon duodenalnog koraka probave [43], dok je u slučaju karotenoida zabilježeno preživljavanje 7 – 30 % nakon duodenalnog koraka, uz zaključak da postotak preživljenja značajno ovisi o prehranbenoj matrici u kojoj se vitamin ili provitamin nalazi [44].



Razlike u rezultatima dobivene DPPH i FRAP metodom mogu se objasniti prisustvom ostalih tvari u uzorcima, ponajprije šećera. Csepregi i suradnici (2016) utvrdili su da prisutnost šećera i proteina u uzorcima dovodi do povišenja vrijednosti antioksidativnog kapaciteta mjenenog TEAC i FRAP metodom, ali nema utjecaja na DPPH metodu [45]. Također, uzorcima kojima je pH podešen na 6,5 nakon crijevnog koraka probave zahtijevaju puno veću promjenu pH vrijednosti za FRAP metodu (pH = 3,6) u usporedbi s DPPH metodom koja se odvija pri puno bližim pH vrijednostima (pH = 7,0 – 7,4) onima koje su podešene uzorcima pri crijevnom koraku probave [46].

#### 4.4.2. Određivanje TDS-a i vodljivosti prije i nakon simulacije probave

Tablica 10. Prikaz vrijednosti TDS-a i vodljivosti prije i nakon simulacije probave

Uzorak	Početni TDS (g L <sup>-1</sup> )	TDS nakon simulacije probave (g L <sup>-1</sup> )	Početna vodljivost (mS cm <sup>-1</sup> )	Vodljivost nakon simulacije probave (mS cm <sup>-1</sup> )
1	0,913 ± 0,002	7,635 ± 0,035	1,825 ± 0,004	15,270 ± 0,071
2	0,399 ± 0,001	7,735 ± 0,007	0,798 ± 0,002	15,465 ± 0,021
3	1,129 ± 0,008	6,975 ± 0,021	2,260 ± 0,014	13,950 ± 0,042
4	0,509 ± 0,002	7,550 ± 0,014	1,017 ± 0,004	15,105 ± 0,035
5	0,214 ± 0,001	7,465 ± 0,064	0,427 ± 0,001	14,930 ± 0,127
6	0,202 ± 0,001	8,915 ± 0,035	0,403 ± 0,003	17,835 ± 0,078

Tablica 10 prikazuje promjene ukupnih otopljenih tvari te vodljivosti do kojih je došlo nakon prolaska ispitivanih uzoraka kroz *in vitro* simulaciju probavnog sustava. Promjena do koje je došlo gotovo je identična za TDS i vodljivost. Iz tablice se može iščitati veliko povećanje vrijednosti oba promatrana parametra u rasponu od 6,17 puta do 44,26 puta. Najmanje promjene vrijednosti zabilježene su kod uzorka 3, dok su najveće promjene zabilježene kod uzorka 2 kod multivitaminskih prahova. Kod multivitaminskih bombona

veća se promjena u ova dva parametra dogodila kod uzorka 5 u usporedbi s uzorkom 6. Objašnjenje povećanja vodljivosti i TDS-a događa se zbog promjena pH vrijednosti tijekom simulacije probavnog procesa, ponajprije tijekom simulacije uvjeta u želucu tijekom koje se pH vrijednost podešava na  $\text{pH} = 2$  pri kojoj dolazi do razgradnje ili disocijacije šećera i vitamina prisutnih u uzorku, što dovodi do povećanja koncentracije iona u otopini te posljedično tome i povećanja TDS-a i vodljivosti.

#### 4.4.3. Određivanje udjela šećera prije i nakon simulacije probave

Tablica 11. Prikaz vrijednosti udjela šećera prije i nakon simulacije probave

Uzorak	Početni udio šećera (% Brix-a)	Udio šećera nakon simulacije probave (% Brix-a)	Početni udio šećera (refrakcijski indeks)	Udio šećera nakon simulacije probave (refrakcijski indeks)
1	$6,375 \pm 0,177$	$2,500 \pm 0$	$1,3430 \pm 0,001$	$1,3365 \pm 0$
2	$0,375 \pm 0,177$	$2,125 \pm 0,177$	$1,3338 \pm 0$	$1,3363 \pm 0$
3	$6,625 \pm 0,177$	$2,375 \pm 0,177$	$1,3428 \pm 0$	$1,3365 \pm 0$
4	$3,875 \pm 0,177$	$2,625 \pm 0,177$	$1,3388 \pm 0$	$1,3368 \pm 0$
5	$15,875 \pm 0,177$	$3,875 \pm 0,177$	$1,3573 \pm 0$	$1,3388 \pm 0$
6	$20,750 \pm 0,354$	$4,375 \pm 0,177$	$1,3650 \pm 0,001$	$1,3395 \pm 0$

Tablica 11 prikazuje promjenu količine šećera u vodenim otopinama ispitivanih uzoraka. Kod multivitaminskih prahova se vidi kako se količina šećera nakon simulacije probave uglavnom smanjuje u iznosu od 1,25 g do 3,85 g šećera na 100 ml napitka, osim uzorka 2 kojem se količina šećera povećala za 1,75 g na 100 ml napitka u usporedbi s početnom otopinom, a razlog tomu je prisutnost maltodekstrina u uzorku koji se cijepa na glukozne jedinice koje se apsorbiraju u crijevu [47]. Kod multivitaminskih bombona također dolazi do smanjenja udjela šećera nakon njihove probave i to za otprilike 60 g šećera na 100 g multivitaminskih bombona. Tijekom probavnog procesa saharoze, koja se najčešće koristi

u proizvodnji multivitaminskih napitaka, dolazi do kidanja glikozidne veze između monosaharidnih jedinica te apsorpcije nastalih monosaharidnih jedinica (glukoze i fruktoze) kroz stjenku crijeva [48].

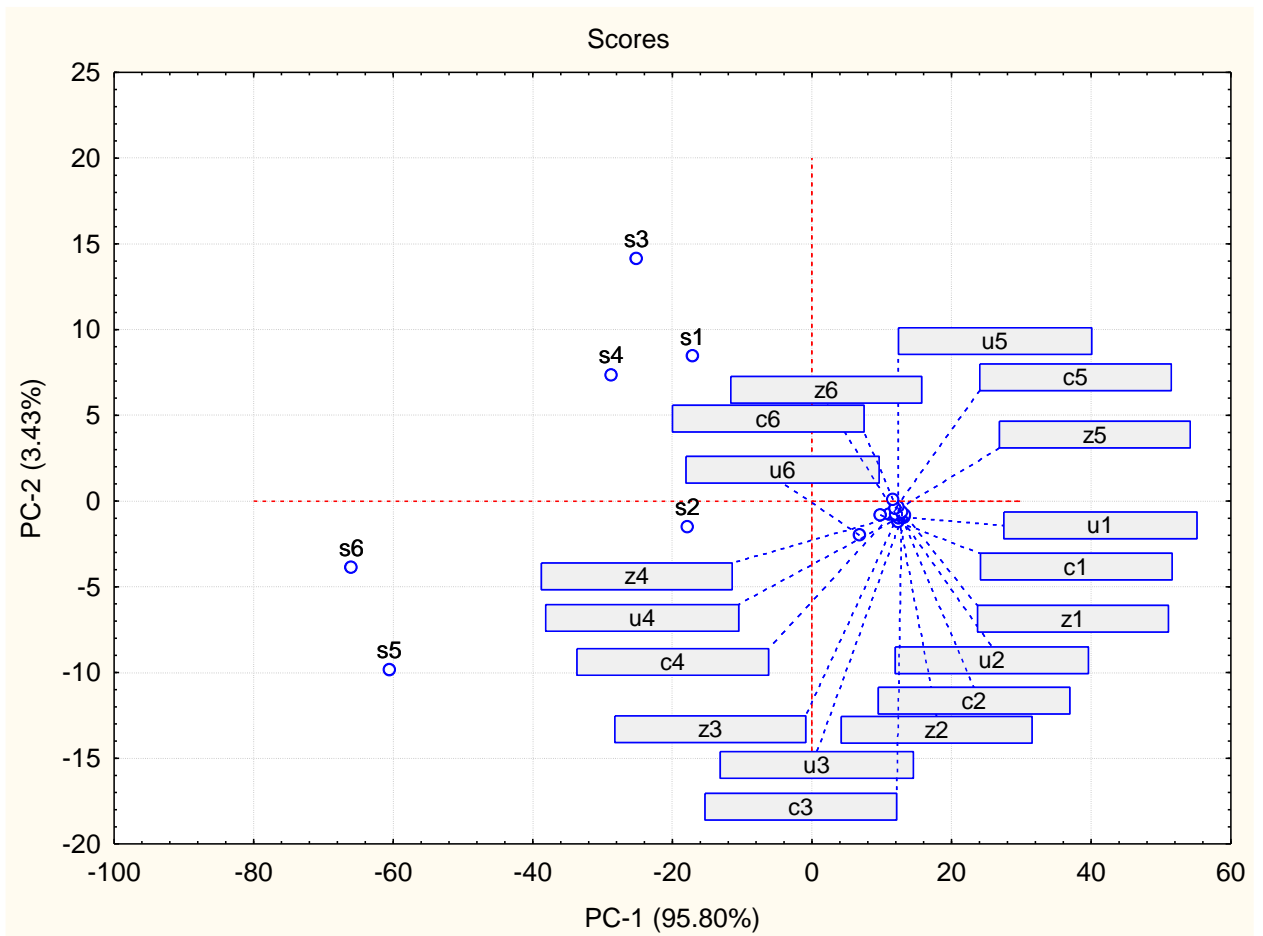
#### **4.5. Kemometrijska obrada podataka**

##### 4.5.1. PCA analiza

U razradi PCA analize uzorci su šifrirani uz pomoć slova i brojeva. Upotrijebljena slova su S, U, Z i C pri čemu slovo S označava uzorak u početnom obliku, prije ulaska u *in vitro* simulaciju probave, slovo U označava probavu u ustima, slovo Z probavu u želudcu te slovo C probavu u tankom crijevu. Korišteni brojevi su od 1 do 6 i jednaki su broju ispitivanog uzorka.

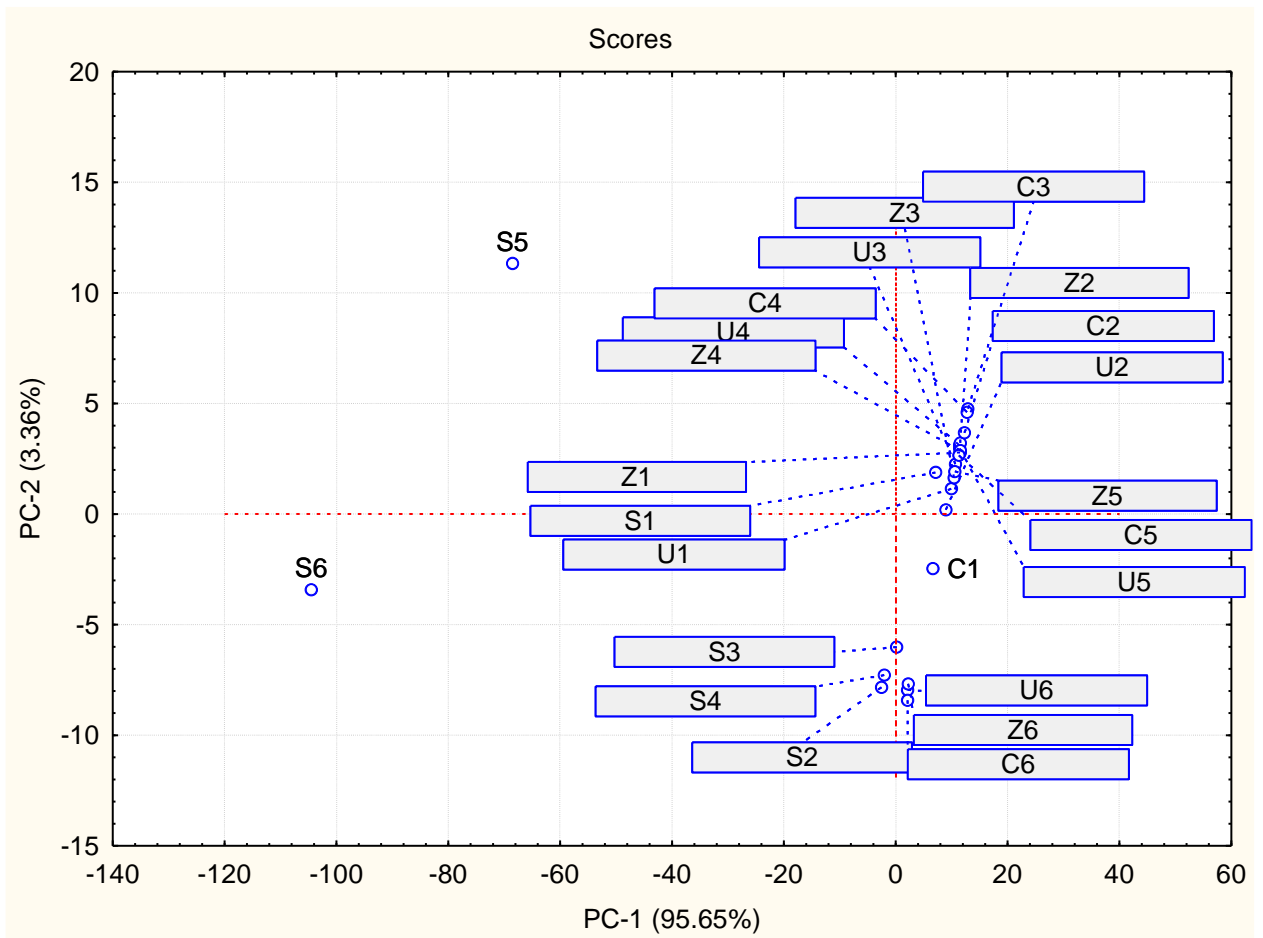
Početni uzorci i uzorci nakon svake faze probave bili su snimani UV-VIS i NIR instrumentima kako bi se, između ostalog, provela i PCA analiza čime bi se provjerila mogućnost svrstavanja ispitivanih uzoraka u manje grupe pomoću određenih sličnosti.

Provedbom PCA analize pomoću podataka dobivenih UV-VIS spektrometrijom, iz slike 11, vidi se da postoji jasna razlika između uzoraka u početnim oblicima (S1 – S6) te da su smješteni u drugom i trećem kvadrantu. Svi ostali uzorci, tijekom i nakon procesa probave, smješteni su oko iste točke u četvrtom kvadrantu pri čemu možemo zaključiti kako je nakon početka probave UV-VIS instrumentu teško raspoznati uzorke prema njihovim karakteristikama, odnosno da nakon početka procesa probave ispitivani uzorci poprimaju slične osobine.



Slika 11. PCA analiza UV-VIS spektara ispitivanih uzoraka multivitaminških prahova i bombona okusa naranče u početnom obliku te nakon svake faze *in vitro* simulirane probave

Provedbom PCA analize sa podacima dobivenih NIR spektrometrijom, iz slike 12, vidi se kako je većina uzoraka grupirana u prvom kvadrantu. Međutim, izdvaja se manja grupa uzoraka (U6, Z6 i C6) u četvrtom kvadrantu čime se sugerira postojanje velike sličnosti između navedenih uzoraka. NIR uređaj uspješno je prepoznao uzorak 6 (multivitaminški bombon okusa naranče) tijekom i nakon *in vitro* simulacije probave. Također, uzorci 2, 3 i 4 u početnom stanju su svrstani jedno blizu drugoga u trećem kvadrantu što sugerira njihovu prepoznatu sličnost u početnim oblicima. Uzorak 1 nakon prolaska kroz tanko crijevo se nalazi u četvrtom kvadrantu, izoliran od drugih uzoraka. Također je vidljivo izdvajanje startnih uzoraka od svih ostalih u procesu probave.



Slika 12. PCA analiza NIR spektara ispitivanih uzoraka multivitaminских prahova i bombona okusa naranče u početnom obliku te nakon svake faze *in vitro* simulirane probave

#### 4.5.2. Umjetne neuronske mreže

Početni uzorci, kao i uzorci nakon svake faze probave, koji su se koristili za određivanje TDS-a, električne vodljivosti, udjela šećera te antioksidacijske aktivnosti, bili su snimani i s UV-VIS i NIR uređajima. Na temelju prvih deset faktora PCA analize ispitivane su umjetne neuronske mreže kako bi se ispitalo može li se UV-VIS i NIR uređajima uspješno predvidjeti vrijednosti promatranih parametara u usporedbi s onima koji su direktno izmjereni. Odabrano je pet neuronskih mreža koje su imale najviše koeficijente

determinacije za učenje, testiranje i validaciju s najmanjim pogreškama za ispitivane uzorke prije, tijekom i nakon *in vitro* simulacije probave (Tablica 12.).

Tablica 12. Karakteristike modela odabranih umjetnih neuronskih mreža (ANN) razvijenih za predviđanje TDS-a, električne vodljivosti, udjela šećera u obliku refrakcijskog indeksa i % Brix-a te antioksidativne aktivnosti dobivene FRAP odnosno DPPH metodom (NIR i UV-VIS)

Struktura mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivac. funkcija	Izlazna aktivac. funkcija
<b>NIR</b>								
10-10-6	0,996	0,002	0,993	0,004	0,977	0,013	Exponential	Logistic
10-11-6	0,995	0,002	0,995	0,004	0,985	0,012	Exponential	Logistic
10-13-6	0,994	0,003	0,99	0,005	0,989	0,008	Tanh	Logistic
10-10-6	0,995	0,002	0,992	0,004	0,99	0,007	Tanh	Logistic
10-7-6	0,994	0,003	0,993	0,004	0,983	0,012	Tanh	Logistic
<b>UV-VIS</b>								
10-10-6	0,892	0,056	0,734	0,111	0,701	0,151	Identity	Logistic
10-13-6	0,892	0,056	0,711	0,114	0,618	0,149	Identity	Logistic
10-12-6	0,88	0,062	0,72	0,147	0,533	0,193	Identity	Logistic
10-11-6	0,881	0,067	0,858	0,11	0,856	0,158	Exponential	Logistic
10-5-6	0,891	0,056	0,779	0,128	0,626	0,153	Identity	Logistic

Podaci su bili raspodijeljeni na učenje, testiranje i validaciju prema omjeru 70:10:20 za NIR te 70:20:10 za UV-VIS koji su se pokazali kao najbolji modeli između četiri isprobana omjera (60:20:20, 70:20:10, 70:15:15 i 70:10:20). Broj neurona u skrivenom sloju bio je postavljen na raspon od 4 do 13 neurona. Uporabom NIR uređaja  $R^2$  vrijednosti za učenje, testiranje i validaciju iznose između 0,977 i 0,996 (čvrsta veza) što ove modele

svrstava u precizne modele. Pogreške su u svim slučajevima bile prilično male, a njihov je raspon iznosio od 0,002 do 0,013. Najbolja se neuronska mreža izabrala na osnovu  $R^2$  vrijednosti i najmanje pogreške, a to se za NIR instrument pokazala mreža 10-10-6 s deset neurona u skrivenom sloju. S druge strane, uporabom UV-VIS uređaja  $R^2$  vrijednosti za učenje, testiranje i validaciju su znatno niže u odnosu na NIR uređaj, a kreću se od 0,533 do 0,892 (Uveze srednje jakosti do čvrste veze). Raspon pogreške iznosi od 0,056 do 0,193. Najbolja se neuronska mreža izabrala na osnovu  $R^2$  vrijednosti i najmanje pogreške, a to se za UV-VIS instrument pokazala mreža 10-11-6 s jedanaest neurona u skrivenom sloju iako nema najveći  $R^2$  za učenje, ima najveće vrijednosti  $R^2$  i za testiranje i za validaciju. Ove dvije neuronske mreže korištene su za daljnje analize predviđanja TDS-a, električne vodljivosti, udjela šećera te antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče.

Tablica 13. Rezultati predviđanja TDS-a, električne vodljivosti, udjela šećera u obliku refrakcijskog indeksa i % Brix-a te antioksidativne aktivnosti dobivene FRAP odnosno DPPH metodom (NIR i UV-VIS)

Varijabla	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
<b>NIR</b>			
TDS	0,995	0,985	0,989
Električna vodljivost	0,996	0,982	0,988
Udio šećera (refrakcijski indeks)	0,996	0,998	0,988
Udio šećera (% Brix-a)	0,996	0,998	0,994
AO aktivnost (FRAP)	0,99	0,992	0,984
AO aktivnost (DPPH)	0,999	0,999	0,999
<b>UV-VIS</b>			
TDS	0,872	0,93	0,838
Električna vodljivost	0,869	0,928	0,835
Udio šećera (refrakcijski indeks)	0,908	0,706	0,826
Udio šećera (% Brix-a)	0,958	0,727	0,719
AO aktivnost (FRAP)	0,737	0,878	0,921
AO aktivnost (DPPH)	0,938	0,979	0,996

Iz tablice 13 može se iščitati kako se predviđanje vrijednosti odabranih karakteristika ispitivanih uzoraka može preciznije provesti NIR uređajem u usporedbi s UV-VIS uređajem. Koeficijenti determinacije se korištenjem NIR uređaja kreću od 0,982 do 0,999 (čvrsta veza), dok se koeficijenti determinacije korištenjem UV-VIS uređaja kreću od 0,706 do 0,996 (čvrsta veza). Korištenjem NIR instrumenta, koeficijenti determinacije najveću su u slučajevima izmjerene antioksidativne aktivnosti DPPH metodom. Oni su iznosili 0,999 za



učenje, testiranje i validaciju. Koeficijenti determinacije korištenjem UV-VIS uređaja su također najveći u slučaju izmjerene antioksidativne aktivnosti DPPH metodom te iznose 0,938 za učenje, 0,979 za testiranje i 0,996 za validaciju. Dok i kod drugih odabranih karakteristika NIR spektroskopija pokazuje visok stupanj mogućnosti predviđanja rezultata kroz umjetne neuronske mreže, UV-VIS spektroskopija ima manje koeficijente determinacije i pokazuje se kao relativno manje prikladan uređaj za predviđanje rezultata željenih karakteristika kroz umjetne neuronske mreže. Dobivene rezultate potvrđuju i drugi znanstvenici koji su kroz svoja istraživanja koristili NIR spektroskopiju i ANN za predviđanje funkcionalnih, fizikalnih i kemijskih svojstava različitih prehrambenih proizvoda [49].

---

## 5. ZAKLJUČCI

---

1. Multivitaminski dodaci prehrani u granuliranom obliku okusa naranče analizirani u ovom radu imaju izrazito povoljna svojstva tečenja: niske vrijednosti indeksa kohezije svrstavaju ih u kategoriju prahova koji lako teku
2. Temeljem PFSD testa utvrđeno je da korišteni granulirani multivitaminski dodaci prehrani okusa naranče pokazuju izrazitu ovisnost o brzini tečenja – pri višim brzinama tečenja prisutan je lom granulata
3. S obzirom na visok sadržaj vitamina, otopine pripremljene s uzorcima multivitaminskih prahova i bombona okusa naranče pokazuju visoke vrijednosti TDS-a i vodljivosti
4. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ovise o sastavu uzorka i o prisustvu ostalih dodataka izuzev vitamina (kalcij, sladila, dekstroza i slični)
5. Utvrđen je veliki gubitak antioksidacijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani okusa naranče nakon prolaska kroz probavni sustav *in vitro*
6. PCA analiza provedena temeljem snimljenih UV-VIS i NIR spektara pokazala se uspješnom u razdvajanju uzoraka prema fazama probavnog procesa *in vitro* (prije probave, nakon usta, želuca i crijeva)
7. Umjetne neuronske mreže razvijene temeljem UV-VIS i NIR spektara mogu se sa visokom preciznošću i pouzdanošću koristiti u predviđanju fizikalnih (TDS, vodljivost) i kemijskih karakteristika (antioksidacijski kapacitet, sadržaj šećera) multivitaminskih dodataka prehrani okusa naranče tijekom prolaska kroz probavni sustav *in vitro*

---

## 6. LITERATURA

---

- [1] M. Chopra, S. Galbraith, and I. Darnton-Hill, "A global response to a global problem: The epidemic of overnutrition," *Bull. World Health Organ.*, vol. 80, no. 12, pp. 952–958, 2002.
- [2] L. Allen, B. de Benoist, O. Dary, and R. Hurrell, *Guidelines on food fortification with micronutrients*. Geneva: World Health Organisation, 2006.
- [3] U.S. Department of Agriculture., *2015–2020 Dietary Guidelines for Americans.*, 8th ed. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, 2015.
- [4] G. F. Combs, *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*, 2nd ed. Orlando: Academic Press, 1998.
- [5] Z. Šatalić, "Vitamini," Zagreb, 2015.
- [6] H. E. Sauberlich, "Pharmacology of vitamin C," *Ann Rev Nutr*, vol. 14, p. 371, 1994.
- [7] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.
- [8] K. Pyrzynska and A. Pełal, "Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples," *Anal. Methods*, vol. 5, no. 17, pp. 4288–4295, 2013.
- [9] J. Deng, W. Cheng, and G. Yang, "A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay," *Food Chem.*, vol. 125, no. 4, pp. 1430–1435, 2011.
- [10] I. Benzie and J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant," *Anal. Biochem.*, vol. 239, no. 0292, pp. 70–76, 1996.
- [11] N. S. Rajurkar and S. M. Hande, "Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants.," *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no. 2, pp. 146–51, 2011.
- [12] N. Vahčić, M. Hruškar, and K. Marković, "Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane (interna skripta)," Zagreb, 2008.

- 
- [13] H. I. D.o.o., “Koliko li je slatko?” [Online]. Available: <http://hannainst.hr/refraktometrija/>.
- [14] M. Steegmans, S. Ilaens, and H. Hoebregs, “Enzymatic, Spectrophotometric Determination of Glucose, Fructose, Sucrose, and Inulin/Oligofructose in Foods,” *J. AOAC Int.*, vol. 87, no. 5, pp. 1200–1207, 2004.
- [15] “Električna vodljivost.” [Online]. Available: <http://hannainst.hr/elektricna-vodljivost/>.
- [16] S. Pervan, M. Klarić, and M. Slivar, “Normirane metode određivanja i procjenjivanja sadržaja vode u drvu u Republici Hrvatskoj,” *Drv. Ind.*, vol. 64, no. 2, pp. 149–157, 2013.
- [17] B. S. J. Stojanović, A. M. Vemić, T. M. Rakić, N. M. Kostić, and A. M. Malenović, “Razvoj metode titracije po Karl Fischeru primjenom tzv. Quality by Design koncepta,” *Hem. Ind.*, vol. 66, p. 659, 2012.
- [18] J. K. Prescott and R. A. Barnum, “On Powder Flowability,” *Pharm Technol*, vol. 24, no. October, pp. 60-84., 2000.
- [19] I. Bobinac, “Određivanje karakteristika protoka mlijeka u prahu,” Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2009.
- [20] Freeman and Technology, “Measuring Flow Properties of Powders,” 2007. [Online]. Available: <http://www.freemantech.co.uk>.
- [21] G. Barbosa-Canovas, E. Ortega-Rivas, P. Juliano, and H. Yan, *Food powders*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.
- [22] L. Evans, *UV-VIS Spectrophotometry A Brief Background to Spectrophotometry*, no. 1. 2018.
- [23] C. Pasquini, “Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 14, no. 2, pp. 198–219, 2003.
- [24] P. Williams and K. Norris, *Near-Infrared Technology*, 2nd ed. St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemistry, Inc., 2001.
- [25] Y. Ozaki, T. Genkawa, and Y. Futami, *Near-Infrared Spectroscopy*, 3rd ed. Elsevier Ltd., 2016.
- [26] Y. Okazaki, “Near-Infrared Spectroscopy—Its Versatility in Analytical,” *Anal. Chem*, vol. 28, no. June, pp. 545–562, 2012.
-

- 
- [27] D. Valinger *et al.*, “Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis for particle size control of dried medicinal plants,” *J. Process. Energy Agric.*, vol. 21, no. 1, pp. 17–22, 2017.
- [28] H. Abdi and L. J. Williams, “Principal component analysis,” *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, vol. 2, pp. 433–459, 2010.
- [29] B. Dabelo Bašić, M. Čupić, and J. Šnajder, “Umjetne neuronske mreže,” Fakultet elektronike i računarstva, Zagreb, 2008.
- [30] F. Amato, A. López, E. M. Peña-méndez, P. Vaňhara, and A. Hampl, “Artificial neural networks in medical diagnosis,” *J. Appl. Biomed.*, vol. 11, no. 2, pp. 47–58, 2013.
- [31] R. B. Shah, M. A. Tawakkul, and M. A. Khan, “Comparative Evaluation of Flow for Pharmaceutical Powders and Granules,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 1, pp. 250–258, 2008.
- [32] D. Janjatović, “Ispitivanje značajki tečenja sipkih koncentrata juha,” Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb, 2011.
- [33] M. Benković, S. Srećec, I. Špoljarić, G. Mršić, and I. Bauman, “Flow properties of commonly used powders and their mixtures,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 9, pp. 2525–2537, 2013.
- [34] M. Abu-hardan and S. E. Hill, “Handling properties of cereal materials in the presence of moisture and oil,” *Powder Technol.*, vol. 198, no. 1, pp. 16–24, 2010.
- [35] M. Benković and I. Bauman, “Flow characteristics of powdered infant formula,” *J. Process. Energy Agric.*, vol. 13, no. 1, pp. 67–70, 2009.
- [36] K. Traina, R. Cloots, S. Bontempi, G. Lumay, N. Vandewalle, and F. Boschini, “Flow abilities of powders and granular materials evidenced from dynamical tap density measurement,” *Powder Technol.*, vol. 235, pp. 842–852, 2013.
- [37] M. Benković *et al.*, “Artificial neural network modelling of changes in physical and chemical properties of cocoa powder mixtures during agglomeration,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 64, no. 1, pp. 140–148, 2015.
- [38] Y. Rong, M. Sillick, and C. Gregson, “Introduction Determination of Dextrose Equivalent Value and Number Average Molecular Weight of Maltodextrin by Osmometry,” *J. Food Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 33–40, 2009.
-

- 
- [39] J. Juansah and W. Yulianti, "Studies on Electrical behavior of Glucose using Impedance Spectroscopy Studies on Electrical behavior of Glucose using Impedance Spectroscopy," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 31, p. br.012039, 2016.
- [40] M. Benković, A. Belščak-Cvitanović, I. Bauman, and D. Komes, "Physical Properties of Non-Agglomerated Cocoa Drink Powder Mixtures Containing Various Types of Sugars and Sweeteners," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 4, pp. 1044–1058, 2013.
- [41] L. Marić, "Stabilnost vodenih ekstrakata samoniklog bilja tijekom simulacije probavnog sustava in vitro," Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2017.
- [42] N. Ortega, A. Macià, M. Romero, J. Reguant, and M. Motilva, "Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model," *Food Chem.*, vol. 124, no. 1, pp. 65–71, 2011.
- [43] A. Perez-Vicente, A. Gil-Izquierdo, and C. Garcia-Viguera, "In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds , Anthocyanins , and Vitamin C," *Food Chem.*, vol. 50, no. 8, pp. 2308–2312, 2002.
- [44] J. Courraud, J. Berger, J. Cristol, and S. Avallone, "Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion," *Food Chem.*, vol. 136, no. 2, pp. 871–877, 2013.
- [45] K. Csepregi, S. Neugart, M. Schreiner, and É. Hideg, "Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols," *Molecules*, vol. 21, no. 2, p. 208, 2016.
- [46] D. Gupta, "Methods for Determination of Antioxidant Capacity: A Review," *Int J Pharm Sci Res*, vol. 6, no. 2, pp. 546–566, 2015.
- [47] D. Hofman, V. Van Buul, and F. Brouns, "Nutrition Nutrition , Health , and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins," *Crit Rev Food Sci Nutr.*, vol. 56, no. 12, pp. 2091–2100, 2016.
- [48] S. Mishra, A. Hardacre, and J. Monro, "Food Structure and Carbohydrate Digestibility," in *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, C. Chuan-Fa, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2012, pp. 289–316.
- [49] Y. Huang, L. J. Kangas, and B. A. Rasco, "Applications of Artificial Neural Networks (ANNs) in food science," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 47, no. 2, pp. 113–126, 2007.
-

---

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

\_\_\_\_\_  
Ime i prezime studenta

---