

Primjena blisko infracrvene spektroskopije u detekciji pesticida prisutnih u jabuci

Klapan Kurtov, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:916408>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

**PRIMJENA BLISKO INFRACR VENE
SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI
PESTICIDA PRISUTNIH U JABUCI**

Zagreb, srpanj, 2022.

Andrea Klapan

**PRIMJENA BLISKO
INFRACRVENE
SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI
PESTICIDA PRISUTNIH U JABUCI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Tamare Jurina.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Tamari Jurina na pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji.

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

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

PRIMJENA BLISKO INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI PESTICIDA PRISUTNIH U JABUCI

Andrea Klapan,, univ. bacc. nutr., 0058200810

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti može li se primjenom NIR spektroskopije (engl. *Near Infrared Spectroscopy, NIR*) kvalitativno odrediti/detektirati prisutnost fungicida (Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG) na površini jabuka. Za svaki fungicid je pripremljeno osam jabuka od kojih su dvije činile kontrolu, a ostale su prskane originalnim suspenzijama/otopinama istraživanih fungicida i njihovim razrjeđenjima od sto i tisuću puta. Jabuke su snimane pomoću NIR instrumenta tijekom tri tjedna. Kvalitativno detektiranje fungicida interpretacijom izvornih NIR spektara pokazalo se slabo informativnim u pronalaženju razlika među njima. Kombinacijom snimljenih NIR spektara i primjenom PCA (engl. *Principal Component Analysis, PCA*) analize uspješno su razdvojeni originalni uzorci suspenzija/otopina fungicida od njihovih odgovarajućih razrjeđenja te uzorci jabuka na temelju razlike u koncentraciji fungicida kojima su prskane. Kako bi se ustanovila povezanost između NIR spektara i fizikalnih karakteristika (ukupne otopljene tvari, vodljivost, boja) odgovarajućih suspenzija/otopina fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja, razvijeni su PLS (engl. *Partial Least Squares, PLS*) modeli koji su pokazali da postoji linearna povezanost između NIR spektara te fizikalnih karakteristika (ukupne otopljene tvari, vodljivost) istraživanih fungicida ($R^2 \geq 0,9$).

Ključne riječi: *NIR spektroskopija, kemometrija, ostaci pesticida, jabuka, PLS modeli*

Rad sadrži: 63 stranica, 40 slika, 8 tablica, 70 literaturnih navoda, 5 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Tamara Jurina

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Tamara Jurina (mentor)
3. doc. dr. sc. Maja Benković (član)
4. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjenski član)

Datum obrane: 27. srpnja 2022.

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

Graduate university study programme: Nutrition

APPLICATION OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY IN DETECTION OF PESTICIDES PRESENT IN APPLES

Andrea Klapan, univ. bacc. nutr., 0058200810

Abstract: *The aim of this work was to investigate whether the presence of fungicides (Chromosul 80 and Cuprablau Z 35 WG) on the apple surface can be qualitatively determined/detected using NIR (Near Infrared) spectroscopy. Eight apples were prepared for each fungicide, two of them presented control, and the rest were sprayed with the original suspensions/solutions of the investigated fungicides and their dilutions of 100 and 1000 times. Apples were recorded using the NIR instrument during a period of three weeks. Qualitative detection of the fungicides by interpretation of their original NIR spectra was poorly informative in finding differences between them. The combination of the NIR spectra and the application of PCA (Principal Component Analysis) successfully separated the original samples of suspensions/solutions of the fungicides from their corresponding dilutions and sprayed apple samples based on the difference in the concentration of the fungicides. In order to establish the relationship between the NIR spectra and the physical characteristics (total dissolved solids, conductivity, color) of the fungicide suspensions/solutions, PLS (Partial Least Squares) models were developed and showed linear relationship between the NIR spectra and the physical characteristics (total dissolved solids, conductivity) of the investigated fungicides ($R^2 \geq 0.9$).*

Keywords: *NIR spectroscopy, chemometrics, pesticide residues, apples, PLS models*

Thesis contains: 63 pages, 40 figures, 8 tables, 70 references, 5 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Tamara Jurina, Assistant professor

Reviewers:

1. Jasenka Gajdoš Kljusurić, PhD, Full professor (president)
2. Tamara Jurina, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Maja Benković, PhD, Assistant professor (member)
4. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 27th, 2022.

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. Jabuka (<i>Malus domestica</i>) | 2 |
| 2.1.1. Osnovne karakteristike biljke | 2 |
| 2.1.2. Nutritivna vrijednost jabuke..... | 2 |
| 2.1.3. Biološki aktivne komponente u jabuci | 3 |
| 2.1.3.1. Fitokemikalije..... | 4 |
| 2.1.3.2. Vitamin C | 4 |
| 2.1.3.3. Vlakna | 4 |
| 2.1.3.4. Pektin..... | 4 |
| 2.2. Pesticidi | 5 |
| 2.2.1. Ostaci pesticida na jabukama | 5 |
| 2.3. Blisko infracrvena spektroskopija | 6 |
| 2.3.1. Osnove blisko infracrvene spektroskopije | 6 |
| 2.3.2. NIR instrumenti | 8 |
| 2.3.3. Kemometrija | 10 |
| 2.3.3.1. Analiza glavnih komponenata | 11 |
| 2.3.3.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata | 11 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 12 |
| 3.1 Materijali | 12 |
| 3.1.1. Uzorci jabuka | 12 |
| 3.1.2. Kemikalije..... | 12 |
| 3.1.3. Aparatura..... | 12 |
| 3.1.4. Pribor..... | 12 |
| 3.2. Metode | 13 |
| 3.2.1. Priprema uzoraka | 13 |
| 3.2.1.1. Priprema otopina/suspencija istraživanih fungicida..... | 13 |
| 3.2.1.2. Prskanje (kontaminacija) jabuka istraživanim fungicidima | 14 |
| 3.2.2. Ukupne otopljene tvari i vodljivost..... | 17 |
| 3.2.3. Određivanje boje uzoraka istraživanih fungicida..... | 17 |
| 3.2.4. NIR spektroskopija | 18 |
| 3.2.5. Obrada dobivenih podataka | 19 |
| 3.2.6. Analiza glavnih komponenata..... | 19 |
| 3.2.7. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 4.1. Fizikalna svojstva pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja..... | 22 |
| 4.1.1. Ukupne otopljene tvari, vodljivost i boja istraživanih fungicida | 22 |
| 4.2. Primjena parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata u promatranju odnosa NIR spektara i fizikalnih karakteristika istraživanih fungicida | 27 |
| 4.2.1. NIR spektri pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja | 27 |
| 4.2.2. Analiza glavnih komponenata izvornih NIR spektara pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja | 29 |
| 4.2.3. PLS regresijski modeli za fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost, boja) suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG | 31 |
| 4.3. NIR spektri tretiranih (prskanih) te netretiranih (kontrolnih) uzoraka jabuka tijekom trodnevnog vremenskog perioda | 35 |
| 4.4. Analiza glavnih komponenata | 53 |
| 5. ZAKLJUČCI | 57 |
| 6. LITERATURA | 58 |
| 7. PRILOZI | |

1. UVOD

Pesticidi su selektivne, biološki aktivne tvari koje se primjenjuju u poljoprivrednoj proizvodnji s ciljem zaštite usjeva od nametnika (Bogdanović i sur., 2017). Procjenjuje se da bi bez primjene pesticida svjetska proizvodnja hrane pala za 30 %. Kronična izloženost niskim dozama pesticida rezultira nepovoljnim toksičnim učincima na ljudsko zdravlje od kojih su najizraženiji neurotoksični, imunotoksični i genotoksični učinci te toksično djelovanje na reproduktivni sustav (Murati i sur., 2014).

Problem koji se pojavljuje je taj što se pesticidi u gotovoj hrani pojavljuju u obliku ostataka (rezidua) koji predstavljaju visoki rizik za zdravlje ljudi. Ostacima pesticida smatraju se aktivne tvari, njihovi metaboliti i/ili produkti razgradnje ili reakcije s drugim tvarima (Palfi i sur., 2018). Iako je Europska komisija odredila najviše dopuštene količine ostataka pesticida u hrani, oni su u 5,1 % od 88 000 uzoraka hrane analiziranih diljem Europske unije detektirani u količini većoj od najviše dopuštene (EFSA, 2022).

Ostaci pesticida su uglavnom prisutni u voću, povrću i žitaricama. Otkrivanje ostataka pesticida u hrani zahtjeva skupe laboratorijske analize kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) i masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry, MS*). Te metode nisu dostupne u lancu distribucije dok blisko infracrvena spektroskopija (engl. *Near Infrared Spectroscopy, NIR*) ne zahtjeva skupu laboratorijsku opremu za postizanje potrebne točnosti detekcije (Song i sur., 2017).

Jabuke su izrazito popularno voće u Republici Hrvatskoj te je godišnji prosjek potrošnje jabuke, po članu kućanstva u 2017. godini iznosio 11,5 kg (Državni zavod za statistiku, 2020). Stoga je osnovni cilj ovog rada bio istražiti može li se primjenom NIR spektroskopije kao nedestruktivne i brze metode kvalitativno odrediti/detektirati prisutnost fungicida (Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG) na površini jabuka. Za istraživanje su odabrane jabuke kupljene u trgovačkom lancu Lidl koje su prskane (tretirane) s različitim koncentracijama ispitivanih fungicida. Jabuke su snimane pomoću NIR instrumenta tijekom trotjednog vremenskog perioda. Dobiveni NIR spektri obrađeni su metodom glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*) kako bi se utvrdilo je li moguće primjenom NIR spektroskopije utvrditi postoje li razlike među prskanim (tretiranim) odnosno netretiranim uzorcima jabuka. Korištena je parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square, PLS*) kako bi se istražilo je li moguće predvidjeti fizikalne karakteristike istraživanih fungicida (ukupne otopljene tvari, vodljivost, boja) na temelju snimljenih NIR spektara pripremljenih otopina fungicida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JABUKA (*Malus domestica*)

2.1.1. Osnovne karakteristike biljke

Jabuka je jedno od gospodarskih i kulturno najznačajnijih vrsta voća u svijetu. Jabuka raste na listopadnom stablu iz porodice ruža, *Rosaceae*. Stablo može narasti i do 12 metara. Krošnja stabla je gusta i razgranata. Listovi su ovalnog oblika i ušiljeni prema naprijed. Cvjetovi su dvospolni, a ocvijeće dvostruko (sastavljeno od čaške i vjenčića). Prašnici su mnogobrojni, a tučak je jedan. Plod je okruglasti i može biti različite boje, a dozrijeva ljeti ili u ranu jesen (Umeljić, 2004).

2.1.2. Nutritivna vrijednost jabuke

Jabuke spadaju među najčešće konzumirana voća na svijetu. Konzumiraju se svježe ili u prerađenim oblicima (sokovi, kompoti, suhe jabuke) (Ferretti i sur., 2014). Svježe jabuke su umjerene energetske vrijednosti, visoke nutritivne vrijednosti i sadrže brojne bioaktivne komponente (Vallée Marcotte i sur., 2022). Većina energije iz jabuke dobiva se iz jednostavnih ugljikohidrata (šećera) od koji je dominirajući šećer fruktoza. Osim jednostavnih ugljikohidrata jabuka je dobar izvor topljivih vlakana (složenih ugljikohidrata) koji imaju ključnu ulogu u raznim fiziološkim procesima u ljudskom tijelu. Jabuka je također bogata mikronutrijentima i fitokemikalijama (tablica 1). Mikronutrijenti prisutni u jabukama su vitamin C i E, lutein, folna kiselina, te minerali kalij, magnezij, fosfor i kalcij (Ferretti i sur., 2014).

Tablica 1. Prosječni sadržaj hranjivih tvari u 100 g svježije jabuke (prema Jensen i sur., 2009)

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|-----------------------------------|----------|
| VODA (g) | 85,3 |
| ENERGIJA (kcal kJ ⁻¹) | 54/227 |
| PROTEINI (g) | 0,3 |
| MASTI (g) | 0,6 |
| UGLKOHIDRATI (g) | 12,9 |
| Fruktoza (g) | 5,7 |
| Glukoza (g) | 0,6 |
| Saharoza (g) | 0,57 |
| Vlakna (g) | 2,7 |
| Pektin (g) | 2 |
| KALIJ (mg) | 144 |
| KALCIJ (mg) | 7,0 |
| MAGNEZIJ (mg) | 6,0 |
| FOSFOR (mg) | 12,0 |
| TIAMIN (mg) | 0,016 |
| RIBOFLAVIN (mg) | 0,011 |
| VITAMIN B6 (mg) | 0,051 |
| FOLAT (mg) | 9 |
| VITAMIN C (mg) | 12 |
| UKUPNI POLIFENOLI (mg) | 111,45 |
| Flavanoli (mg) | 93,33 |
| Flavonoli (mg) | 5,66 |
| Antocijanidini (mg) | 1,62 |

2.1.3. Biološki aktivne komponente u jabuci

Sve veći broj istraživanja ukazuje na povezanost između konzumacije voća i povrća i poboljšanog zdravlja. Istraživanja pokazuju da biološki aktivne komponente u biljnoj hrani, posebno fitokemikalije imaju vrlo veliki utjecaj na smanjenje rizika od razvoja brojnih bolesti.

Jabuke su izrazito bogate fitokemikalijama i zbog toga su uključena u brojna istraživanja koja proučavaju utjecaj jabuka na ljudsko zdravlje (Hyson, 2011).

2.1.3.1. Fitokemikalije

Fitokemikalije su sekundarni metaboliti biljaka koji zbog antioksidacijskog djelovanja imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Fitokemikalije se ne mogu sintetizirati u ljudskom tijelu, iz tog razloga potrebno ih je unositi u organizam preko hrane. U fitokemikalije spadaju karotenoidi, flavonoidi, oligosumporni spojevi, fenolne kiseline, fitoestrogeni, resveratrol, fitosteroli i fitostanoli. Fitokemikalije zbog svog antioksidacijskog djelovanja smanjuju rizik od razvoja raka, dijabetesa tipa II, hipertenzije, astme, infekcija i kardiovaskularnih bolesti. Fitokemikalije koje su prisutne u jabukama su polifenoli. U jabukama je prisutno pet skupina polifenola, a to su flavanoli (katehin, epikatehin, procijanidin), flavonoli (kvercetin, glikozidi), fenolne kiseline (klorogena, galna i kumarinska kiselina), dihidrohalkoni (florethin glikozidi) i antocijanidini (Vallée Marcotte i sur., 2022).

2.1.3.2. Vitamin C

Vitamin C je snažan antioksidans koji je prisutan u svakom voću i povrću. Antioksidansi su molekule koje doniraju elektron ili proton slobodnom radikalima i na taj način ih "onesposobljavaju" da oštete stanice. Jedna jabuka mase 150 g sadrži 18 mg vitamina C što čini 24 % od preporučenog dnevnog unosa vitamina C za žene i 20 % od preporučenog dnevnog unosa za muškarce (Jensen i sur., 2009). Vitamin C osim svoje antioksidacijske aktivnosti djeluje i kao kofaktor za enzime koji kataliziraju reakcije biosinteze mišićnog karnitina, noradrenalin itd. Nedostatak vitamina C uzrokuje sporo zacjeljivanje rana i povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti. Osoba koja kroz duži vremenski period ne konzumira vitamin C razvija skorbut (Jensen i sur., 2009).

2.1.3.3. Vlakna

Vlakna su polisaharidi koji se ne probavljaju prolaskom kroz gornji dio gastrointestinalnog sustava. Vlakna se u debelom crijevu podvrgavaju mikrobnj fermentaciji pri čemu nastaju spojevi koji su biološki aktivni. Brojna istraživanja pokazuju da vlakana smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, pretilosti, gastrointestinalnih poremećaja i raka (Hervik i Svihus, 2019).

2.1.3.4. Pektin

Pektin je polisaharid koji se nalazi u kori voća. Bitno svojstvo pektina je njegova visoka topljivost u vodi. Zbog svoje viskoznosti, pektin se može vezati na teške metale (arsen, kadmij,

olovo i živa) i olakšati njihovo izlučivanje iz organizma. Pektin ima antikancerogena svojstva i preventivnu ulogu u širokom spektru karcinoma (prostate, gušterače, dojke i debelog crijeva). Bakterije debelog crijeva fermentiraju pektin pri čemu se povećava kiselost u debelom crijevu i eliminiraju nepoželjne bakterije (Lara-Espinoza i sur., 2018).

2.2. PESTICIDI

Pesticidi (lat. *pestis*-kuga i *occidere*-ubiti) su tvari ili mješavina tvari koje se koriste za odbijanje, kontroliranje ili uništavanje bilo kojeg štetnog organizma (Singh, 2012) .

Pesticidi se s obzirom na svoju namjenu dijele na:

- Insekticide (suzbijaju kukce)
- Akaricide (suzbijaju grinje)
- Nematocide (suzbijaju fitoparazite nematode)
- Limacide (suzbijaju puževe)
- Korvifuge (odbijaju napad ptica)
- Rodenticide (suzbijaju glodavce)
- Fungicide (suzbijaju fitopatogene gljive)
- Herbicide (suzbijaju korove)
- Regulateore rasta (utječu na životne procese bilja drukčije od hranjiva) (Singh, 2012).

2.2.1. Ostaci pesticida na jabukama

Jabuke se u velikim količinama konzumiraju u mnogim zemljama i smatraju se vrijednom hranom jer sadrže komponente koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (Slavin i Lloyd, 2012). Izvješća Svjetske zdravstvene organizacije i Organizacije za hranu i poljoprivredu preporučuju da bi odrasle osobe trebale dnevno konzumirati najmanje pet serviranja voća i povrća (Pem i sur., 2015). S druge strane, da bi se stabla i plodovi jabuka zaštitili od brojnih patogenih gljiva i štetnika koji mogu uzrokovati smanjenje prinosa, koriste se brojna sredstva za zaštitu (Damos i sur. 2015). Ostaci pesticida u plodovima koji su tretirani sa brojnim zaštitnim sredstvima mogu predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje (Khan i sur. 2020). Iako Europska unija svojim propisima određuje maksimalnu dozvoljenu koncentraciju ostataka pesticida koja može biti prisutna na hrani (Commision Regulation (EC) 396/2005, 2006) nepravilna upotreba pesticida može dovesti do kontaminacije hrane, a posljedično i do

narušavanja zdravlja potrošača. Jedno od istraživanja je provedeno na libanonskim jabukama koje su nabavljene kod domaćih proizvođača. Analiziralo se 212 uzoraka jabuka, rezultati su pokazali da 16 % analiziranih uzoraka nije imalo ostatke pesticida na površini ploda, 23 % je sadržavalo ostatke pesticida u granicama maksimalne dozvoljene razine ostataka pesticida što je propisala Europska unija, a 61 % analiziranih uzorka je sadržavalo ostatke pesticida u količini većoj od maksimalne dozvoljene razine (El Hawari i sur., 2019).

2.3. BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

2.3.1. Osnove blisko infracrvene spektroskopije

Svjetlost u bliskom infracrvenom području (engl. Near Infrared, NIR) je 1800. godine otkrio njemački znanstvenik Friedrich Wilhelm Herschel tako što je promatrao prolazak Merkura preko sunca. Herschel je primijetio da se prilikom tog događaja u njegovom teleskopu generirala velika količina topline (Davies, 2000). Tada je Herschel došao do zaključka da postoji i druga vrsta nevidljivog zračenja koja je izvan područja crvene vidljive svjetlosti i to zračenje je nazvao "zraka topline". Kasnije je potvrđeno postojanje "zrake topline" te je otkriveno da to zračenje ima veću valnu duljinu od vidljive svjetlosti i nazvano je infracrveno zračenje (Ozaki i Huck, 2021).

Iako je Herschel otkrio svjetlost u blisko infracrvenom području još 1800. godine, najranija primjena NIR spektroskopije je zabilježena tek 1950. godine jer se do tad smatralo da se tom metodom ne može ništa analitički detektirati. Razvoj i poboljšanje električnih, optičkih komponenti i pojava računala koja je omogućila učinkovitu obradu informacija upravo je pokazala suprotno (Davies, 2000).

Za razliku od UV (engl. *Ultraviolet*) spektroskopije koja je elektronska spektroskopija i IR (engl. *Infrared*) spektroskopije koja je vibracijska spektroskopija, NIR spektroskopija je elektronska i vibracijska spektroskopija pa možemo reći da je zbog te činjenice NIR spektroskopija nešto posebno jer se nalazi između područja elektronske spektroskopije i područja vibracijske spektroskopije. Na NIR spektru se zbog toga mogu promatrati vrpce koje nastaju zbog elektronskih i vibracijskih prijelaza (Ozaki i Huck, 2021).

NIR područje obuhvaća raspon valnih duljina od 780 nm do 2500 nm. U tom području molekula apsorbira zračenje određenih valnih duljina te se pobuđuju vibracijski prijelazi. Ti vibracijski prijelazi vide se kao vrpce u opažanom spektru. Molekula može vibrirati na dva osnovna načina: istežanje veza (kraće valne duljine) i deformacija kutova (dulje valne duljine). Istežanje može biti asimetrično i simetrično, a savijanje u ravnini i izvan ravnine. Vibracije molekula mogu se opisati pomoću modela harmonijskog oscilatora kod kojeg se energije različitih i jednako razmaknutih razina mogu opisati pomoću formule:

$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

U ovoj jednadžbi v označava vibracijski broj, h je Planckova konstanta i iznosi $6,62606896 \cdot 10^{-34}$ J s, k konstanta sile i μ smanjene mase vezanih atoma. Kod modela harmonijskog oscilatora mogući su prijelazi samo između uzastopnih energetske razina i zato ovaj model ne može objasniti ponašanje stvarnih molekula (ne uzima u obzir odbijanje između atoma i disocijaciju veze) (Ozaki i Huck, 2021).

Ponašanje molekula bolje opisuje model anharmonijskog oscilatora. U anharmonijskom modelu energije nisu jednako raspoređene jer kad se atomi međusobno približe inducira se odbijanje što kao posljedicu ima povišenje energije tj. kad su atomi međusobno udaljeni prvo se inducira privlačenje što kao posljedicu ima povišenje energije, ali daljnjim udaljavanjem događa se disocijacija atoma i smanjenje energije. U modelu anharmonijskog oscilatora za razliku od modela harmonijskog oscilatora može doći do prijelaza između ne susjednih vibracijskih stanja te nastaju vrpce poznate kao overtoni (engl. *overtone*). Zapravo NIR spektar čini kombinacija osnovnih vibracija i overtona. Osnovne vibracije nastaju kada molekula apsorbira jedan kvant energije, a overtone nastaje kada se apsorbira više od jednog kvanta energije što je opisano modelom anharmonijskog oscilatora. Kao što smo prethodno rekli u stvarnosti su vibracije anharmonijske i prvi overtone ima frekvenciju koja je skoro pa dvostruko veća od osnovne vibracije. Za pobuđivanje većih overtona je potrebno sve manje i manje energije što na kraju završava disocijacijom molekule (Ozaki i Huck, 2021).

Vrpce se pojavljuju između 780 nm i 2500 nm, ovisno o redu overtonova te prirodi i snazi veze. U poliatomnim molekulama može doći do istovremene apsorpcije zračenja tijekom dviju vibracija te nastaju kombinacijske vrpce. One se pojavljuju na valnim duljinama od 1900 nm do 2500 nm (Blanco i Villarroya, 2002).

Nedostaci NIR spektroskopije su ti što su NIR mjerenja slabo selektivna, pa se mora koristiti kemometrija kako bi se iz analitičkih podataka dobilo što više relevantnih informacija, ne postoje modeli koji uzimaju u obzir interakciju između NIR svjetlosti i materije te je kalibracija često čisto empirijska, nije jako osjetljiva metoda i obično se može primijeniti samo na glavne komponente (Blanco i Villarroya, 2002).

Prednosti NIR spektroskopije su te što je to brza, neinvazivna tehnika koja zahtjeva minimalnu ili nikakvu pripremu uzorka. NIR spektar sadrži informacije o elektronegativnosti, fizikalnim svojstvima materijala (gustoća, viskoznost, veličina čestica...itd.), jačini veze i prisutnoj vodikovoj vezi (ako je prisutna vodikova veza mijenja se energetska stanje vibracija i vrpca se na spektru pomiče prema višim valnim duljinama) (Blanco i Villarroya, 2002).

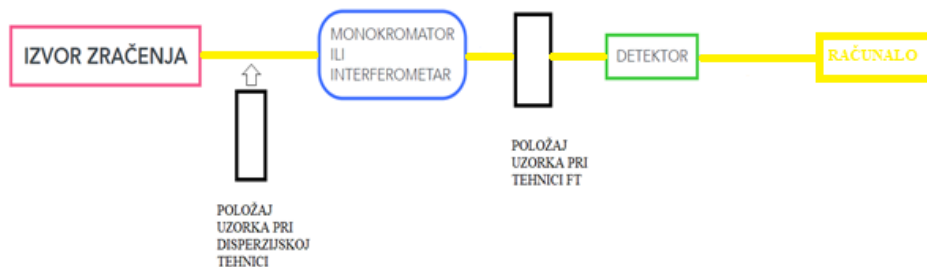
Zbog gore navedenih prednosti NIR spektroskopija se počela koristiti u brojnim industrijskim granama za rutinske kontrolne analize. U poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji NIR spektroskopija se koristi za određivanje proteina u pšenici i za izravno analiziranje voća i povrća tijekom raste i nakon berbe (Guthrie i sur. 1998), u petrokemijskoj industriji za analizu ugljikovodika, goriva, frakcija nafte, polimera i drugih naftnih derivata (Monteiro i sur., 2017), a u farmaceutskoj industriji za kontrolu farmaceutskih proizvoda u različitim fizičkim oblicima kao što su granule ili tablete (Eustaquio i sur. 1999).

2.3.2. NIR instrumenti

Blisko infracrvena spektroskopija sa stajališta instrumentacije je optička apsorpcijska spektroskopija. Iz tog razloga NIR spektrometri imaju istu opću shemu dizajna kao što imaju spektrometri u vidljivoj (VIS) i infracrvenoj (IR) spektroskopiji. Zbog toga instrumenti koji su namijenjeni za rad u VIS (400-800 nm) i IR (700-1000 nm) područjima mogu izmjeriti dio NIR spektra (780-2500 nm) (Ozaki i Huck, 2021).

Osnovni dijelovi NIR spektrometra su izvor zračenja, selektor valne duljine (monokromator ili interferometar) i detektor (slika 1). Postoje dvije opće klase spektrometra: konvencionalni uređaji u kojima se dispergira valna duljina i Fourierova transformacija (Huck, 2021). Kod disperzivne valne duljine monokromator propušta samo određene valne duljine koje mogu u određenom vremenu stići do detektora. Današnji spektrometri gotovo u potpunosti koriste princip Fourierovih transformacija. U takvim spektrometrima valne duljine se razdvajaju pomoću interferometra koji omogućuje upad svih valnih duljina na detektor (Hanely, 2012). Fourierov transformacijski spektrometar specijaliziran za NIR područje dostupan je na tržištu

pod nazivom FT-NIR (engl. *Fourier Transform-Near Infrared Spectroscopy*). FT spektrometar mjeri interferenciju svjetlosnih zraka koje su podijeljene na dvije zrake pomoću Michelsenova interferometra. FT spektrometar se sastoji od izvora svjetlosti, jednog polupropusnog zrcala koje djelomično reflektira, a djelomično propušta svjetlost, ravnih zrcala od kojih se jedno može kretati duž optičke osi, a drugo ne i detektora. Svjetlost se emitira iz izvora prema polupropusnom zrcalu. Zatim se jedan dio svjetlosti odbija od polupropusnog zrcala i reflektira se na nepokretno zrcalo. Dio svjetlosti koji je propušten kroz polupropusno zrcalo ide prema pomičnom zrcalu. Reflektirana i propuštena zraka svjetlosti odbijaju se na ravnom nepomičnom zrcalu i ravnom pomičnom zrcalu i ponovno se sastaju na detektoru gdje se vidi interferentna slika (Ikehata i sur., 2008)



Slika 1. Shematski prikaz spektrometra (prema Huck, 2021)

Većina komercijalno dostupnih spektrometara kao izvor svjetlosti koristi žarulje od volframa. Drugi spektrometri umjesto volframovih žarulja imaju diode koje emitiraju LED svjetlost. Detektor svjetlosti može biti silicijev sulfid, olovni sulfid, deuterirani triglicin sulfid i indij galij arsenid (Crocombe, 2018).

Prije mjerenja uzorak se stavlja u kivetu. Zatim se ta kiveta pozicionira između izvora svjetlosti i monokromatora ili između interferometra i detektora. Prije nego što se uzorak snimi mora se snimiti referentni spektar (zrak, otapalo, prazna kiveta...itd.). Rezultate mjerenja je moguće izraziti kao apsorbancu $\log_{10}(1/T)$ ili transmitancu (T). Transmitanca je udio upadnog zračenja kojeg je uzorak propustio. Uzorak može biti u tekućem ili krutom agregatnom stanju. Za snimanje tekućih uzoraka se koriste kivete, a za snimanje uzoraka u krutom agregatnom stanju sonde. Na završni izgled NIR spektra mogu utjecati i vanjski čimbenici kao što su vlaga zraka, temperatura i razne vibracije (Smetiško, 2018).

2.3.3. Kemometrija

Analitičke informacije o uzorku su sadržane u širokim i preklopljenim vrpcama na NIR spektru. Osim toga dva različita uzorka mogu na NIR spektru imati dvije male razlike koje je teško razlikovati golim okom. Iz tih razloga NIR spektroskopija zahtijeva kemometriju kako bi se iz analitičkih podataka dobilo što više relevantnih informacija (Massart i sur.,1988; Matijević i Blažić, 2008). Kemometrija je kemijska disciplina koja koristeći matematičke i statističke metode predviđa i optimira rezultate eksperimenta (Mathias, 2007). Područja primjene kemometrije mogu se podijeliti u četiri grupe metoda. Prvu grupu čine metode koje omogućuju prikupljanje valjanih podataka, drugu grupu čine metode koje omogućuju odabir vrijednih informacija iz valjanih podataka, treću grupu čine metode kojima se analiziraju spektroskopski podaci, a četvrtu grupu čine metode umjetne inteligencije (Wold i Sjöström, 1998).

Kemometrija koristi ove multivarijatne metode:

- Analiza glavnih komponentata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*)
- Kanonička korelacijska analiza (engl. *Canonical Correlation Analysis, CCA*)
- Analiza zajedničkih komponentata i određene težine (engl. *Common Components and Specific Weight Analysis, CCSWA*)
- Faktorska diskriminativna analiza (engl. *Factorial Discriminant Analysis, FDA*)
- Regresija glavnih komponentata (engl. *Principal Component Regression, PCR*)
- Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares; PLS*)
- Klaster analiza (engl. *Cluster Analysis, CA*)
- Višestruka linearna regresija (engl. *Multiple Linear Regression, MLR*)
- Linearna diskriminantna analiza (engl. *Linear Discriminant Analysis, LDA*)
- Umjetne neuronske mreže (engl. *Artificial Neural Network, ANN*) (Heberger, 2008).

Najčešće korištene kemometrijske metode u obradi NIR spektara su analiza glavnih komponentata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*) i parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares, PLS*).

2.3.3.1. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*) je matematički postupak koji se koristi za razrješavanje skupova podataka u nezavisne varijable tzv. "glavne komponente" čije linearne kombinacije aproksimiraju izvorne podatke do bilo kojeg stupnja točnosti (Jolliffe i Cadima, 2016). Glavni cilj analize glavnih komponenata je smanjiti dimenzionalnost skupa podataka koji se sastoji od prevelikog broja međusobno povezanih varijabli tako da se pronađe novi skup varijabli koji je manji od izvornog skupa, ali koji unatoč tome zadržava većinu informacija sadržanih u izvornom skupu. Nove varijable, zvane glavne komponente nisu korelirane i poredane su tako da prvih nekoliko zadrži većinu varijacija prisutnih u svim izvornim varijablama. Smanjivanjem dimenzionalnosti prostora uvođenjem glavnih komponenata pojednostavljuje se interpretacija podataka (Jolliffe, 2006). Vizualizacija podataka se izvodi pomoću tzv. faktorskih bodova (engl. *score plots*). Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava njihovo grupiranje (Jednačak i Novak, 2013).

2.3.3.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares, PLS*) je multivarijantna projekcijska metoda koja istovremeno modelira nezavisne varijable (X) i zavisne varijable (Y) kako bi pronašla latentne varijable u X koje će predvidjeti latentne varijable u Y (Berrueta i sur., 2007). Prvenstveno se koristi u kemijskoj industriji, farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji i industriji plastike. Uobičajena primjena parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata je modeliranje odnosa između spektralnih mjerenja (NIR, IR, UV), koja uključuju mnoge varijable koje su često međusobno povezane, bilo kemijskog sastava ili drugih fizikalno-kemijskih svojstava (Abdi, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1. Uzorci jabuka

Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog rada korištene su jabuke kupljene u prodavaonici Lidl. Naziv jabuke je " Jabuka zelena", a sorta jabuke je zlatni delišes. Proizvođač je Hortivia d.o.o., Valpovo, Hrvatska.

3.1.2. Kemikalije

- Chromosul 80 – fungicid na bazi sumpora (BASF Croatia d.o.o., Zagreb, Hrvatska).
- Cuprablau Z 35 WG - Dibakrov klorid trihidroksid ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) (CHROMOS AGRO d.d., Zagreb, Hrvatska).
- Destilirana voda

3.1.3. Aparatura

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Plus, Riga, Latvija)
- Konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska)
- NIR spektrometar (Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , South Bend, SAD)
- Magnetska miješalica (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- PCE-CSM 3 kolorimetar (PCE Instruments, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- Laboratorijske čaše volumena 50 mL, 100 mL, 250 mL i 500 mL
- Menzura volumena 100 mL
- Metalna špatulica
- Boce štrcaljke
- Pipeta volumena 100 do 1000 μL
- Mikropipeta volumena 10 do 100 μL
- Falcon kivete volumena 50 mL

- NIR kivete volumena 15 mL

3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzoraka

3.2.1.1. Priprema otopina/suspenzija istraživanih fungicida

Za istraživanje koje je provedeno u ovom radu odabrana su dva komercijalna fungicida, Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG. Ovi fungicidi su stavljeni na tržište u obliku praha, a karenca (najkraći vremenski period koji mora proteći od zadnje primjene pesticida do prve berbe, žetve, otkosa ili puštanja stoke na ispašu) im je četrnaest dana (Dragović, 2017). Doze koje proizvođač preporučuje za korištenje u programu zaštite plodova jabuke od bolesti iznose 0,3 % (300 g u 100 L vode) za Chromosul 80 i 0,05 % (50 g u 100 L vode) za Cuprablau Z 35 WG i po tim preporukama su napravljene originalne doze (0,3 Ch i 0,3 Cu). U tablici 2 prikazane su oznake uzoraka te njihovo značenje.

Tablica 2. Prikaz oznaka uzoraka te njihovo značenje za suspenzije/otopine fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG

| OZNAKA UZORKA | ZNAČENJE |
|---------------|---|
| 0,3 Ch | 0,3 % - tna suspenzija fungicida Chromosul 80 (originalna suspenzija) |
| 0,05 Cu | 0,05 % - tna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG (originalna otopina) |
| 10x | Suspenzija/otopina fungicida koja je deset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 20x | Suspenzija/otopina fungicida koja je dvadeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 30x | Suspenzija/otopina fungicida koja je trideset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 50x | Suspenzija/otopina fungicida koja je pedeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 70x | Suspenzija/otopina fungicida koja je šezdeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 90x | Suspenzija/otopina fungicida koja je devedeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |

(**Tablica 2.** Prikaz oznaka uzoraka te njihovo značenje za suspenzije/otopine fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG – *nastavak*)

| | |
|-------|--|
| 100x | Suspenzija/otopina fungicida koja je sto puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 150x | Suspenzija/otopina fungicida koja je sto pedeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 200x | Suspenzija/otopina fungicida koja je dvjesto puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 350x | Suspenzija/otopina fungicida koja je tristo pedeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 500x | Suspenzija/otopina fungicida koja je petsto puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 700x | Suspenzija/otopina fungicida koja je sedamsto puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 900x | Suspenzija/otopina fungicida koja je devetsto puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |
| 1000x | Suspenzija/otopina fungicida koja je tisuću puta razrijeđena u odnosu na originalnu. |

Prvo se napravio izračun za originalne uzorke i uzorke svih razrjeđenja za oba fungicida. Nakon deset do petnaest minuta iz originalnih uzoraka (koji su cijelo vrijeme miješani na magnetskoj miješalici brzinom od 250 rpm) pomoću pipete i mikropipete izuzimao se odgovarajući volumen suspenzije/otopine kako bi se napravila različita razrjeđenja (tablica 2). Uzorci odgovarajućih razrjeđenja su se pripremali u plastičnim epruvetama s čepom volumena 50 mL.

3.2.1.2. Prskanje (kontaminacija) jabuka istraživanim fungicidima

Za prskanje jabuka su napravljene nove originalne suspenzije/otopine istraživanih fungicida te je svaki fungicid razrijeđen sto i tisuću puta. Za kontaminaciju originalnom suspenzijom/otopinom te odgovarajućim razrjeđenjima, kao i za kontrolni eksperiment (netretirane/neprskane jabuke), odabrane su po dvije jabuke koje su bile slične po masi, dužini i širini.

Tablica 3. Prikaz oznaka uzoraka te njihovo značenje za jabuke koje su prskane (kontaminirane) fungicidima Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG

| OZNAKA UZORKA | ZNAČENJE |
|---------------|---|
| 0 | Netretirana (kontrolna) jabuka |
| 1 Ch | Jabuka prskana originalnom suspenzijom fungicida Chromosul 80 |
| 2 Ch | Jabuka prskana suspenzijom sto puta razrijeđenom u odnosu na originalnu suspenziju fungicida Chromosul 80 |
| 3 Ch | Jabuka prskana suspenzijom tisuću puta razrijeđena u odnosu na originalnu suspenziju fungicida Chromosul 80 |
| 1 Cu | Jabuka prskana originalnom otopinom fungicida Cuprablau Z 35 WG |
| 2 Cu | Jabuka prskana otopinom sto puta razrijeđenom u odnosu na originalnu otopinu fungicida Cuprablau Z 35 WG |
| 3 Cu | Jabuka prskana otopinom tisuću puta razrijeđenom u odnosu na originalnu otopinu fungicida Cuprablau Z 35 WG |

Nakon toga su se jabuke isprale pod mlazom vode i osušile ubrus papirom i označile vodootpornim markerom (slika 2). Značenje oznaka je prikazano u tablici 3.



Slika 2. Označene (netretirane i tretirane) jabuke koje su se snimale NIR spektrometrom (vlastita fotografija)

Suspenzija/otopina istraživanog fungicida je homogenizirana na magnetskoj miješalici (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka) deset do petnaest minuta (250 rpm) te su napravljena odgovarajuća razrjeđenja istraživanih fungicida izuzimanjem odgovarajućeg volumena suspenzije/otopine. Kontaminacija se vršila tako da je svaka jabuka zasebno stavljena na aluminijsku foliju te je prskana s 50 mL suspenzije/ otopine fungicida odnosno s 50 mL pripremljenih odgovarajućih razrjeđenja. Jabuke su nakon toga ostavljene cca dva sata i trideset minuta da se suše na sobnoj temperaturi.

3.2.2. Ukupne otopljene tvari i vodljivost

Pomoću konduktometra (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska) mjerene su vrijednosti ukupnih otopljenih tvari (engl. *Total Dissolved Solids, TDS*) i vodljivosti. Mjerenje se provodilo uranjanjem sonde konduktometra u suspenziju/otopinu istraživanih fungicida odnosno njihovih odgovarajućih razrjeđenja te su se očitale vrijednosti vodljivosti odnosno TDS-a. Svaki uzorak mjeran je tri puta, a kao rezultat se uzimala srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

3.2.3. Određivanje boje uzoraka istraživanih fungicida

Boja svih uzoraka određena je primjenom kolorimetra PCE-CSM3 (PCE Instruments, Njemačka) na način da se svaki uzorak ulio u kivetu i stavio u kućište na instrumentu. Kolorimetrija primjenjuje CIELab sustav (trodimenzionalni prostor boja u kojemu se svaka boja može jednoznačno prikazati točkom). Kolorimetrom su se mjerili Hunterovi parametri: L^* , a^* i b^* za svaki uzorak. L^* je svjetlina uzorka ($L^* = 0$ – potpuno crno, $L^* = +100$ – potpuno bijelo), a^* označava boju uzorka u rasponu od - 100 do + 100, ($a^* = - 100$ čista zelena boja, $a^* = + 100$ čisto crvena boja), b^* označava također boju ($b^* = - 100$ čisto plava boja, $b^* = + 100$ čisto žuta boja). CIELab sustav se sastoji od dvije kromatske osi (a^* i b^*) i jedne akromatske osi (L^*) koja je okomita na kromatske osi (Levaj, B., 2018). Svaki uzorak mjeran je tri puta, a kao rezultat se uzimala srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Za izračun promjene boje suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja u odnosu na boju originalne suspenzije (0,3 Ch) i otopine (0,05 Cu), koristi se vrijednost ΔE^* . Vrijednosti ΔE^* su izračunate po formuli (Mokrzycki i Tatol, 2011):

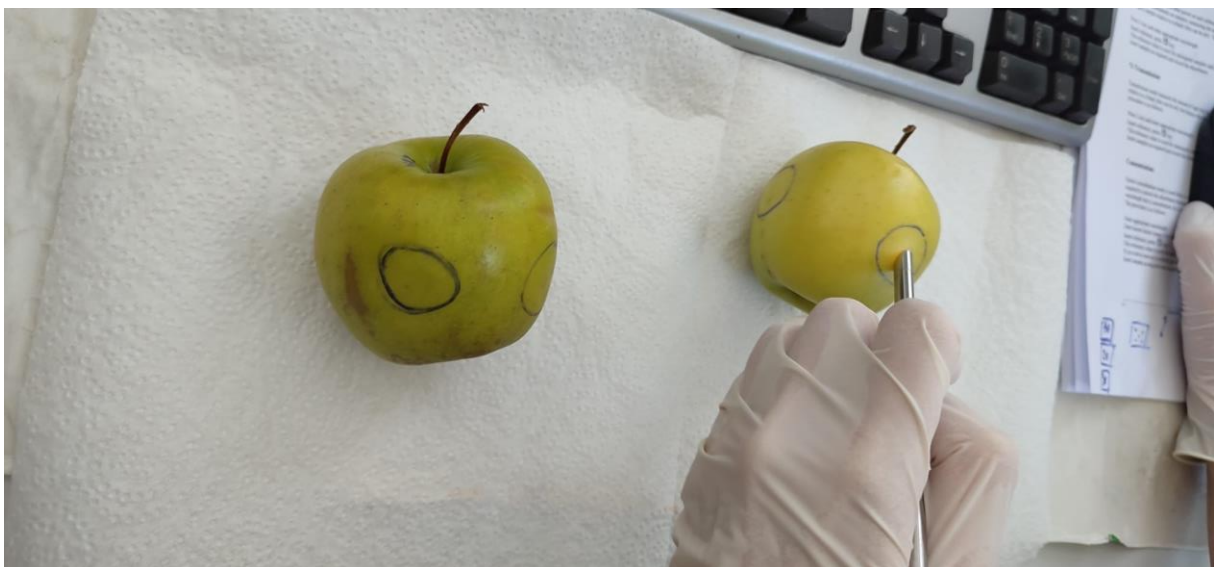
$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{\text{ref}})^2 + (a^* - a^*_{\text{ref}})^2 + (b^* - b^*_{\text{ref}})^2}$$

L^* označava svjetlinu boje ispitivanog uzorka u CIELab prostoru boja, a^* i b^* označavaju parametre boje odgovarajućih razrjeđenja suspenzija/otopina istraživanih fungicida. L^*_{ref} označava svjetlinu boje referentne, originalne suspenzije/otopine istraživanih fungicida dok a^* i b^* označavaju parametre boje originalne referentne, suspenzije/otopine istraživanih fungicida.

3.2.4. NIR spektroskopija

Kontinuirani NIR spektri pripremljenih suspenzija/otopina fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja snimani su na NIR spektrometru Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm s instaliranim Control Development softverom SPEC 32. NIR spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm. Uzorci istraživanih fungicida snimani su u kivetama koje su se pozicionirale u postolje za snimanje tekućih uzoraka. Za svaki uzorak su snimljena tri spektra iz kojih je izračunata srednja vrijednost, koja je korištena u daljnjim analizama.

Jabuke koje su prskane različitim koncentracijama istraživanih fungicida te dvije kontrolne netretirane jabuke su označene kružićima na četiri, tzv. ekvatorijalne pozicije (Jamshidi i sur., 2015). Jabuke su svaki dan, nakon što su izvađene iz frižidera, ostavljene 2 h na sobnoj temperaturi. Snimanje NIR spektara se vršilo pomoću NIR instrumenta na način da se sonda prislonila na površinu jabuke unutar označene pozicije (slika 3). Snimanje unutar svake označene pozicije se vršilo tri puta. Nakon prskanja odnosno kontaminacije, NIR spektri jabuka su snimani tijekom vremenskog perioda u trajanju od tri tjedna. Prva dva tjedna spektri su snimani svaki dan (izuzev vikenda), dok su treći tjedan snimljeni samo jedanput. Za svaku jabuku snimljeno je dvanaest spektara a budući da su po dvije jabuke prskane odgovarajućim koncentracijama fungicida, za svaki uzorak (prskane i neprskane, odnosno kontrolne jabuke) kao rezultat se uzimala srednja vrijednost od 24 spektara.



Slika 3. Prikaz snimanja netretiranih i tretiranih jabuka NIR sondom (*vlastita fotografija*)

3.2.5. Obrada dobivenih podataka

Za analizu dobivenih podataka korišten je MS Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i softverski paketi Statistica 14.0 (TIBCO® Statistica, SAD) i The Unscrambler® X 10.4 (CAMO software, Oslo, Norveška). U MS Excelu 2013 su uneseni svi izmjereni podaci i koristio se za izračunavanje srednjih vrijednosti i standardne devijacije dobivenih eksperimentalnih podataka. Program Statistica 14.0 je korišten za provedbu analize glavnih komponenata kojom se smanjila dimenzionalnost skupa. Program The Unscrambler® X 10.4 je korišten za provedbu parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata.

3.2.6. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*) metoda je multivarijatne analize podataka koju definiramo kao alat za pronalaženje sličnosti i razlika između dobivenih podataka. Cilj PCA analize je reducirati broj izvornih varijabli na mali broj indeksa koji su linearna kombinacija izvornih varijabli i koji se zovu glavne komponente. Glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najkoncizniji način, pokazujući neke skrivene povezanosti odnosno međudnose podataka (Jolliffe i Cadima, 2016) (Mauser i Hartigan, 1977).

PCA analiza primijenjena je za interpretaciju snimljenih NIR spektara suspenzija/otopina istraživanih fungicida i njihovih pripremljenih razrijeđenja te za interpretaciju NIR spektara tretiranih (kontaminiranih) i netretiranih (kontrolni eksperiment) jabuka.

3.2.7. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares, PLS*) je metoda koja se koristi za analizu skupa zavisnih varijabli iz skupa nezavisnih varijabli, tj. koristi se za predviđanje rezultata. Na temelju izračunatih vrijednosti koeficijenata determinacije za kalibraciju, validaciju i predikciju te pripadajuće vrijednosti korijena srednjeg kvadratnog odstupanja (engl. *Root Mean Squared Error, RMSE*) ocjenjuje se prikladnost primijenjenih PLS modela. Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) kreću se u rasponu od 0 do 1. Što je

vrijednost R^2 bliža 1, to je bolje slaganje nezavisne i zavisne varijable odnosno model uspješno opisuje eksperimentalne podatke (Gajdoš Kljusurić i sur., 2017). U ovom radu korištena je parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata kako bi se, na temelju snimljenih NIR spektara pripremljenih suspenzija/otopina ispitivanih fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja (10x, 20x, 30x, 50x, 70x, 90x, 100x, 150x, 200x, 350x, 500x, 700x, 900x, 1000x), predvidjele fizikalne karakteristike istraživanih fungicida (ukupne otopljene tvari, vodljivost, boja pripremljenih suspenzija/otopina i njihovih odgovarajućih razrjeđenja).

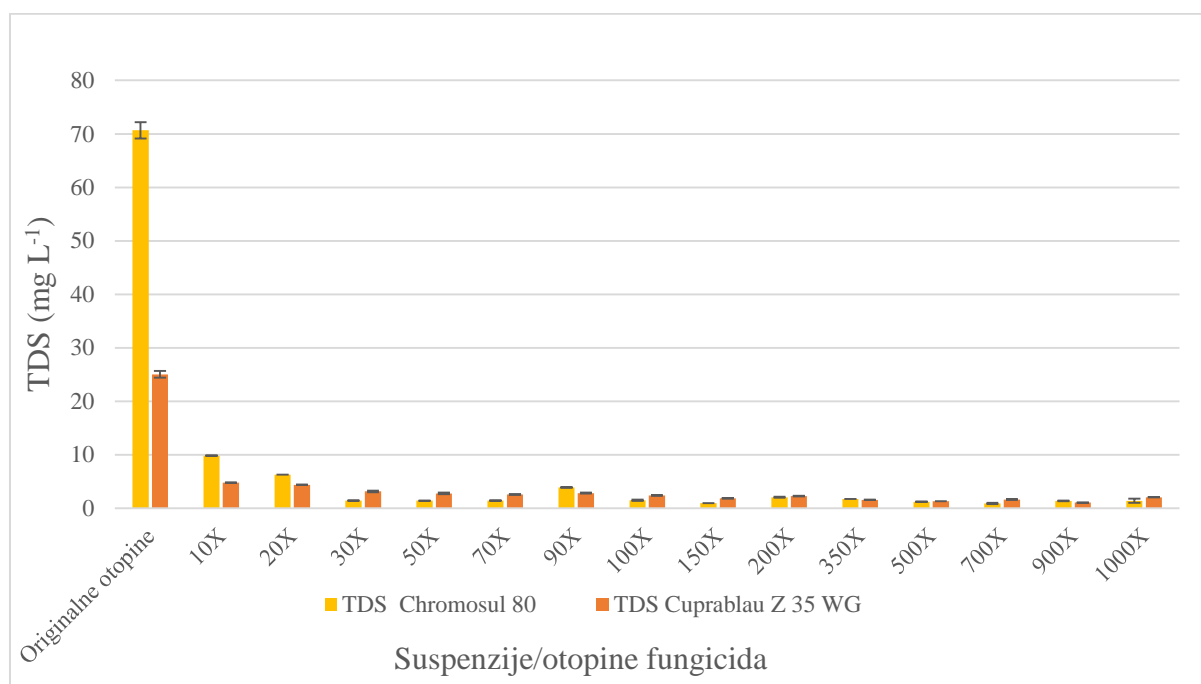
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivana je sposobnost NIR spektroskopije kao nedestruktivne, brze i jednostavne metode da detektira prisutnost različitih koncentracija fungicida (Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG) na površini jabuka. Tijekom istraživanja izmjerena su fizikalna svojstva (TDS, vodljivost i boja) pripremljenih suspenzija/otopina ispitivanih fungicida i odgovarajućih razrjeđenja te su snimani njihovi NIR spektri kao i NIR spektri jabuka koje su prskane (tretirane) s originalnim suspenzijama/otopinama fungicida i njihovim razrjeđenjima od sto i tisuću puta. Rezultati su prikazani pomoću tablica i grafički. Prvo su prikazani rezultati dobiveni mjerenjem ukupnih otopljenih tvari, vodljivosti i boje za originalne suspenzije/otopine i odgovarajuća razrjeđenja (10x, 20x, 30x, 50x, 70x, 90x, 100x, 150x, 200x, 350x, 500x, 700x, 900x, 1000x) ispitivanih fungicida. Rezultati su prikazani grafički na slikama 4 i 5 te u tablicama 4, 5 i 6. Nakon toga su prikazani izvorni NIR spektri za suspenzije/otopine istraživanih fungicida te za odgovarajuća razrjeđenja istraživanih fungicida (slike 6 i 7) i PCA analiza originalnih suspenzija/otopina istraživanih fungicida i njihovih razrjeđenja (slike 8 i 9). Rezultati primjene PLS-a u predikciji vrijednosti ukupnih otopljenih tvari, vodljivosti i boje za originalne uzorke te pripremljena razrjeđenja istraživanih fungicida prikazani su tablicama 7 i 8 te slikama 10 i 11. Izvorni NIR spektri netretiranih jabuka i tretiranih jabuka s istraživanim fungicidima za nulti dan su prikazani slikama 12 i 26 dok su NIR spektri tretiranih jabuka nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za period od tri tjedna, prikazani slikama 13 - 25 i slikama 27 - 39. Svi rezultati dobiveni NIR spektroskopijom obrađeni su metodom analize glavnih komponenta (PCA) kako bi se prikazale sličnosti odnosno razlike između netretiranih jabuka i onih koje su tretirane tj. prskane odgovarajućim koncentracijama suspenzija/otopina navedenih fungicida što je prikazano na slici 40 te prilozi 1, 2, 3, 4 i 5. Na slici 40 su prikazani NIR spektri netretiranih jabuka i jabuka tretiranih originalnom suspenzijom/otopinom te odgovarajućim razrjeđenjima istraživanih fungicida za nulti, petnaesti i dvadeseti i prvi dan koji, su obrađeni PCA metodom. Na slikama u prilogu (prilozi 1, 2, 3, 4, 5) su prikazani pojedinačno za svaki pesticid, NIR spektri netretiranih jabuka i jabuka tretiranih originalnom suspenzijom/otopinom te odgovarajućim razrjeđenjima istraživanih fungicida tijekom trotjednog vremenskog perioda koji su obrađeni PCA metodom.

4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA PRIPREMLJENIH SUSPENZIJA/OTOPINA ISTRAŽIVANIH FUNGICIDA I NJIHOVIH ODGOVARAJUĆIH RAZRJEĐENJA

4.1.1. Ukupne otopljene tvari, vodljivost i boja istraživanih fungicida

Određivanjem fizikalnih karakteristika kao što su ukupne otopljene tvari (engl. *Total Dissolved Solids*, *TDS*), vodljivost i boja promatrane su sličnosti odnosno razlike u svojstvima komercijalnih pripravaka Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG.

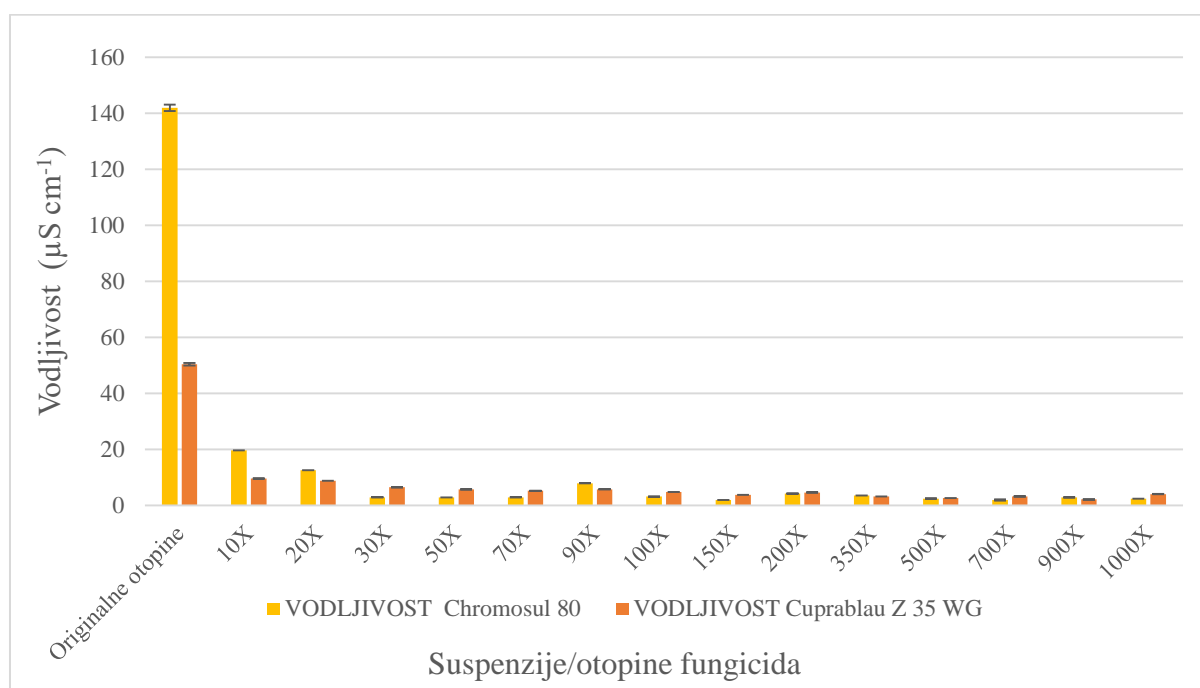


Slika 4. Grafički prikaz vrijednosti TDS-a za pripremljenu suspenziju/otopinu fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG (originalne otopine) te njihovih odgovarajućih razrjeđenja (Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na originalni uzorak).

Slika 4 prikazuje kako se vrijednosti ukupnih otopljenih tvari mijenjaju s različitim koncentracijama fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG. Vrijednosti TDS-a za Chromosul 80 imaju padajući trend kako se originalna suspenzija razrjeđivala s destiliranom vodom. Najveća vrijednost TDS-a izmjerena je za originalan uzorak i iznosi $70,67 \text{ mg L}^{-1} \pm 1,51 \text{ mg L}^{-1}$, a najmanja vrijednost TDS-a izmjerena je na razrjeđenju od 700x i iznosi $0,89 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$. Na razrjeđenjima od 90x, 100x, 200x, 350x, 500x, 900x i 1000x su izmjerene veće vrijednosti TDS-a i ne prate očekivani padajući trend. Razlog tome može biti što su se

mjerile ukupne otopljenje tvari umjesto ukupne suspendirane tvari. Walton u svom radu navodi da je granica između otopine i koloidne suspenzije veličina čestica od 0,45 μm , pri čemu je ta granica određena veličinom mreže filtera (Walton, 1989), a u pripremljenim uzorcima s fungicidom Chromosul 80 čestice su bile vidljive golim okom. Ukupne suspendirane tvari (engl. *Total Suspended Solids, TSS*) su parametar koji određuje kvalitetu vode i definiran je kao količina suspendirane tvari u poznatom volumenu vode. Još nisu razvijeni linearni odnosi između TDS-a i TSS-a koji mogu biti korisni za predviđanje jednog parametra pomoću drugog (Butler i Ford, 2018).

Što se fungicida Cuprablau Z 35 WG tiče, vrijednosti TDS-a padaju kako se koncentracija otopine fungicida smanjuje. Najveća vrijednost TDS-a je izmjerena za originalan uzorak i iznosi $25,03 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,64 \text{ mg L}^{-1}$, a najmanja vrijednost TDS-a je izmjerena na razrjeđenju od 900x i iznosi $1,04 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ (slika 4).



Slika 5. Grafički prikaz vrijednosti vodljivosti za pripremljenu suspenziju/otopinu fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG (originalne otopine) te njihovih odgovarajućih razrjeđenja (Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na originalni uzorak).

Na slici 5 je vidljivo da je najveća vrijednost vodljivosti izmjerena u originalnim otopinama te za Chromosul 80 iznosi $141,97 \pm 1,16 \mu\text{S cm}^{-1}$, a za Cuprablau Z 35 WG iznosi $50,40 \pm 0,46 \mu\text{S cm}^{-1}$. Kako se koncentracija otopina smanjuje tako se i vrijednosti vodljivosti smanjuju.

Cuprablau Z 35 WG dobro provodi električnu struju zbog prisutnosti bakrenih iona (Saoudi i sur., 2017).

Tablica 4. Određivanje boje pripremljenoj suspenziji fungicida Chromosul 80 (0,3 Ch) te njezinim odgovarajućim razrjeđenjima

| UZORAK [#] | CHROMOSUL 80 | | |
|---------------------|--------------|--------------|-------------|
| | L^* | a^* | b^* |
| 0,3 Ch | 50,13 ± 0,03 | 0,53 ± 0,01 | 5,92 ± 0,01 |
| 10x | 46,11 ± 0,03 | -1,14 ± 0,01 | 1,75 ± 0,01 |
| 20x | 42,31 ± 0,28 | -0,65 ± 0,03 | 1,54 ± 0,01 |
| 30x | 41,94 ± 0,06 | -0,63 ± 0,01 | 1,51 ± 0,01 |
| 50x | 42,65 ± 0,05 | -0,77 ± 0,01 | 1,52 ± 0,01 |
| 70x | 41,78 ± 0,57 | -0,67 ± 0,01 | 1,51 ± 0,01 |
| 90x | 42,93 ± 0,03 | -0,75 ± 0,01 | 1,44 ± 0,03 |
| 100x | 42,92 ± 0,03 | -0,76 ± 0,01 | 1,56 ± 0,01 |
| 150x | 43,28 ± 0,06 | -0,81 ± 0,02 | 1,53 ± 0,01 |
| 200x | 43,35 ± 0,01 | -0,82 ± 0,01 | 1,54 ± 0,00 |
| 350x | 42,98 ± 0,01 | -0,76 ± 0,01 | 1,51 ± 0,01 |
| 500x | 42,53 ± 0,44 | -0,70 ± 0,01 | 1,52 ± 0,01 |
| 700x | 41,42 ± 0,01 | -0,60 ± 0,01 | 1,58 ± 0,01 |
| 900x | 41,51 ± 0,01 | -0,61 ± 0,01 | 1,54 ± 0,01 |
| 1000x | 41,31 ± 0,01 | -0,55 ± 0,01 | 1,57 ± 0,01 |

[#]Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na 0,3 Ch uzorak)

Analizirajući izmjerene vrijednosti parametara L^* , a^* i b^* iz tablice 4 za pripremljenu suspenziju fungicida Chromosul 80 (0,3 Ch) i njezina odgovarajuća razrjeđenja može se zaključiti kako vrijednosti parametra L^* imaju uglavnom padajući trend kako se originalna suspenzija razrjeđivala destiliranom vodom. Najveća L^* vrijednost je izmjerena kod uzorka originalne suspenzije fungicida (0,3 Ch) i iznosi 50,13 ± 0,03, a najmanja kod uzorka koji je tisuću puta razrijeđen i iznosi 41,31 ± 0,01. Možemo zaključiti kako se svjetlina uzoraka smanjuje sa smanjenjem koncentracije fungicida. Iz tablice 4 vidljivo je da svi uzorci osim originalnog (0,3 Ch) imaju negativne vrijednosti parametra a^* što označava približavanje zelenoj boji. Kod uzorka originalne otopine (0,3 Ch) zabilježena je pozitivna vrijednost

parametra a^* što označava približavanje crvenoj boji. Kod svih uzoraka za parametar b^* su izmjerene pozitivne vrijednosti, što znači da se uzorci približavaju žutoj boji, a najveća vrijednost je izmjerena za originalni uzorak i iznosi $5,92 \pm 0,01$.

Tablica 5. Određivanje boje pripremljenoj otopini fungicida Cuprablau Z 35 WG (0,05 Cu) te njezinim odgovarajućim razrjeđenjima

| UZORAK [#] | CUPRABLAU Z 35 WG | | |
|---------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| | L^* | a^* | b^* |
| 0,05 Cu | $42,16 \pm 0,01$ | $-0,77 \pm 0,01$ | $1,66 \pm 0,41$ |
| 10x | $45,63 \pm 0,01$ | $-1,21 \pm 0,01$ | $1,51 \pm 0,01$ |
| 20x | $45,72 \pm 0,01$ | $-1,17 \pm 0,00$ | $1,51 \pm 0,01$ |
| 30x | $45,98 \pm 0,01$ | $-1,17 \pm 0,01$ | $1,54 \pm 0,01$ |
| 50x | $45,90 \pm 0,01$ | $-1,15 \pm 0,01$ | $1,54 \pm 0,01$ |
| 70x | $45,79 \pm 0,02$ | $-1,13 \pm 0,01$ | $1,50 \pm 0,00$ |
| 90x | $45,90 \pm 0,02$ | $-1,14 \pm 0,02$ | $1,52 \pm 0,02$ |
| 100x | $45,90 \pm 0,01$ | $-1,17 \pm 0,01$ | $1,47 \pm 0,01$ |
| 150x | $45,73 \pm 0,01$ | $-1,14 \pm 0,01$ | $1,51 \pm 0,01$ |
| 200x | $44,89 \pm 0,12$ | $-0,95 \pm 0,02$ | $1,56 \pm 0,01$ |
| 350x | $44,52 \pm 0,01$ | $-0,88 \pm 0,01$ | $1,55 \pm 0,01$ |
| 500x | $45,43 \pm 0,01$ | $-1,07 \pm 0,01$ | $1,52 \pm 0,01$ |
| 700x | $45,77 \pm 0,23$ | $-1,13 \pm 0,04$ | $1,52 \pm 0,01$ |
| 900x | $45,71 \pm 0,01$ | $-1,11 \pm 0,01$ | $1,53 \pm 0,01$ |
| 1000x | $45,67 \pm 0,01$ | $-1,10 \pm 0,02$ | $1,55 \pm 0,02$ |

[#]Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na 0,05 Cu uzorak)

Analizirajući izmjerene vrijednosti parametara L^* , a^* i b^* iz tablice 5 za pripremljenu otopinu fungicida Cuprablau Z 23 WG (0,05 Cu) i njezina odgovarajuća razrjeđenja vidljivo je da je najveća L^* vrijednost izmjerena kod uzorka koji je razrijeđen 30x i iznosi $45,98 \pm 0,01$, a najmanja kod originalne otopine fungicida (0,05 Cu) i iznosi $42,16 \pm 0,01$. Iz tablice 5 je vidljivo da svi uzorci imaju negativne vrijednosti parametra a^* , što znači da se uzorci približavaju zelenoj boji. Kod svih uzoraka za parametar b^* su izmjerene pozitivne vrijednosti, što znači da se uzorci približavaju žutoj boji, a najveća vrijednost je izmjerena za originalni uzorak i iznosi $1,66 \pm 0,41$.

Tablica 6. Promjena boje (ΔE^*) odgovarajućih razrjeđenja suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG u usporedbi s bojom originalnih suspenzija/otopina navedenih fungicida

| UZORAK [#] | ΔE^* | |
|---------------------|--------------|-------------------|
| | CHROMOSUL 80 | CUPRABLAU Z 35 WG |
| 10x | 6,03 ± 0,03 | 3,52 ± 0,01 |
| 20x | 9,04 ± 0,21 | 3,60 ± 0,00 |
| 30x | 9,37 ± 0,08 | 3,86 ± 0,00 |
| 50x | 8,77 ± 0,06 | 3,77 ± 0,01 |
| 70x | 9,52 ± 0,53 | 3,67 ± 0,02 |
| 90x | 8,57 ± 0,03 | 3,77 ± 0,01 |
| 100x | 8,53 ± 0,05 | 3,78 ± 0,01 |
| 150x | 8,24 ± 0,06 | 3,61 ± 0,00 |
| 200x | 8,18 ± 0,04 | 2,76 ± 0,12 |
| 350x | 8,50 ± 0,03 | 2,38 ± 0,01 |
| 500x | 8,87 ± 0,38 | 3,31 ± 0,01 |
| 700x | 9,80 ± 0,04 | 3,65 ± 0,24 |
| 900x | 9,73 ± 0,03 | 3,59 ± 0,01 |
| 1000x | 9,89 ± 0,04 | 3,54 ± 0,01 |

[#] Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na 0,3 Ch/0,05 Cu uzorak

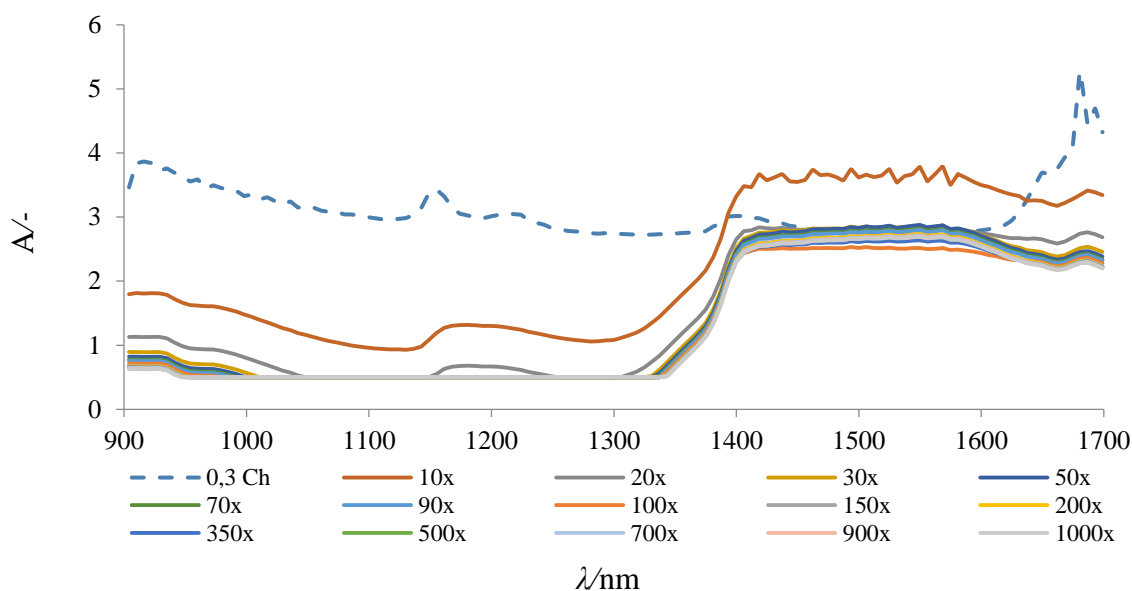
* ΔE – promjena boje (vrijednost koja pokazuje koliko se boja pripremljenih razrjeđenja fungicida razlikuje od originalnog uzorka)

U tablici 6. prikazane su izračunate ΔE^* vrijednosti, koje prikazuju vrijednosti odgovarajućih razrjeđenja suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 W, u odnosu na boju originalnih otopina/suspenzija istraživanih fungicida. Može se zaključiti da su najveća odstupanja boje za uzorke suspenzija fungicida Chromosul 80 zabilježene kod suspenzija koje su razrijeđene 700x, 900x i 1000x u odnosu na originalni uzorak. Najveća odstupanja boje za uzorke otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG zabilježeno je kod otopine razrijeđene 30x u odnosu na originalnu otopinu.

4.2. PRIMJENA PARCIJALNE REGRESIJE METODOM NAJMANJIH KVADRATA U PROMATRANJU ODNOSA NIR SPEKTARA I FIZIKALNIH KARAKTERISTIKA ISTRAŽIVANIH FUNGICIDA

4.2.1. NIR spektri pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja

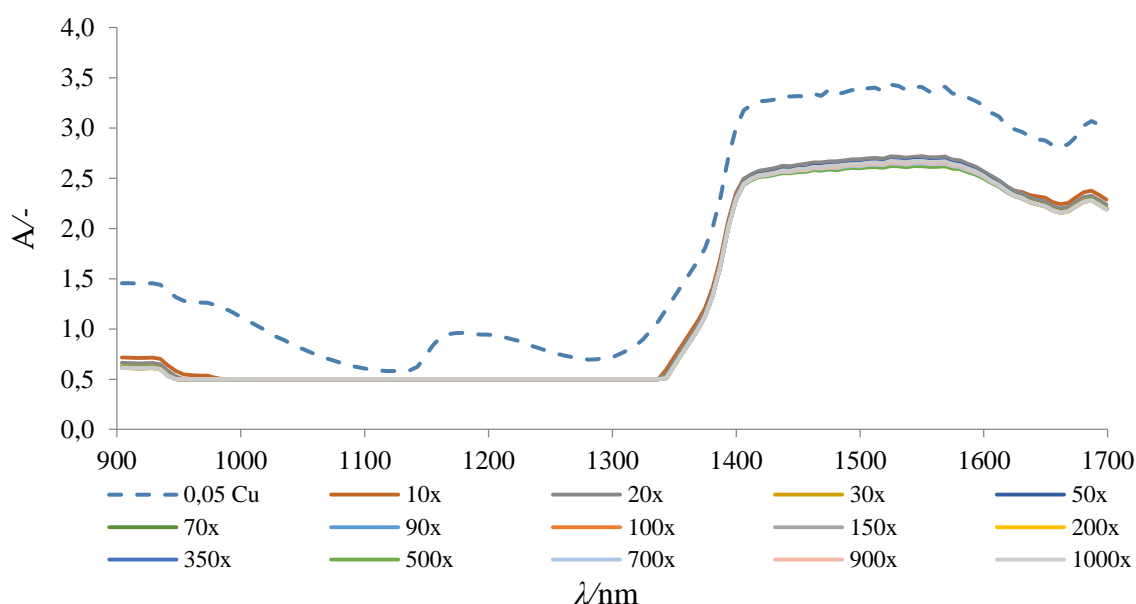
Na snimljenim NIR spektrima pripremljenih suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG i njihovim odgovarajućim razrjeđenjima promatrane su sličnosti i razlike u apsorbancijama na određenim valnim duljinama kako bi se potencijalno kvalitativno odredila prisutnost navedenih fungicida.



Slika 6. Izvorni NIR spektri pripremljene suspenzije Chromosul 80 (0,3 Ch) te njezinih odgovarajućih razrjeđenja (Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na 0,3 Ch uzorak)

Na slici 6 može se vidjeti razdvajanje uzoraka u tri skupine ovisno o intenzitetu apsorbancije u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1400 nm te od 1590 nm do 1699 nm. NIR spektri snimljeni za razrjeđenja suspenzije fungicida Chromosul 80 od 20x, 30x, 50x, 70x, 90x, 100x, 150x, 200x, 350x, 500x, 700x, 900x, 1000x čine prvu skupinu i razlikuju se u intenzitetu apsorbancije. NIR spektri originalne (0,3 Ch) suspenzije fungicida i razrjeđenja od 10x pokazuju veće vrijednosti apsorbancije od ostalih uzoraka u navedenom području valnih duljina. NIR spektar za suspenziju fungicida koja je 10x razrijeđena pokazuje veće vrijednosti apsorbancije od

ostalih razrjeđenja diljem čitavog spektra valnih duljina s tim da je vidljivo kako u području valnih duljina od 1400-1600 nm NIR spektar je "šumovit" u odnosu na NIR spektre ostalih uzoraka. Do znatnog skoka apsorbancije za uzorak suspenzije (0,3 Ch) dolazi u valnom području od 1134-1178 nm, a za uzorak koji je 10x razrjeđeniji od originalne suspenzije u valnom području od 1144-1231 nm. Za sve uzorke uočeno je povećanje apsorbancije u rasponu valnih duljina od 1350-1699 nm. U području valnih duljina od 1134-1231 nm pojavljuju se vibracije C-H veza u drugom overtonu te vibracije C=O veze u četvrtom overtonu. Jači signal je izražen u rasponu od 1400 – 1699 nm, zbog udjela vode (Badr Eldin, 2011). U tom rasponu također se pojavljuju i vibracije N-H veza u prvom overtonu. Originalni uzorak suspenzije fungicida pokazuje najveću vrijednost apsorbancije i to pri 1680 nm koja odgovara vibraciji C-H veze u prvom overtonu (Badr Eldin, 2011).



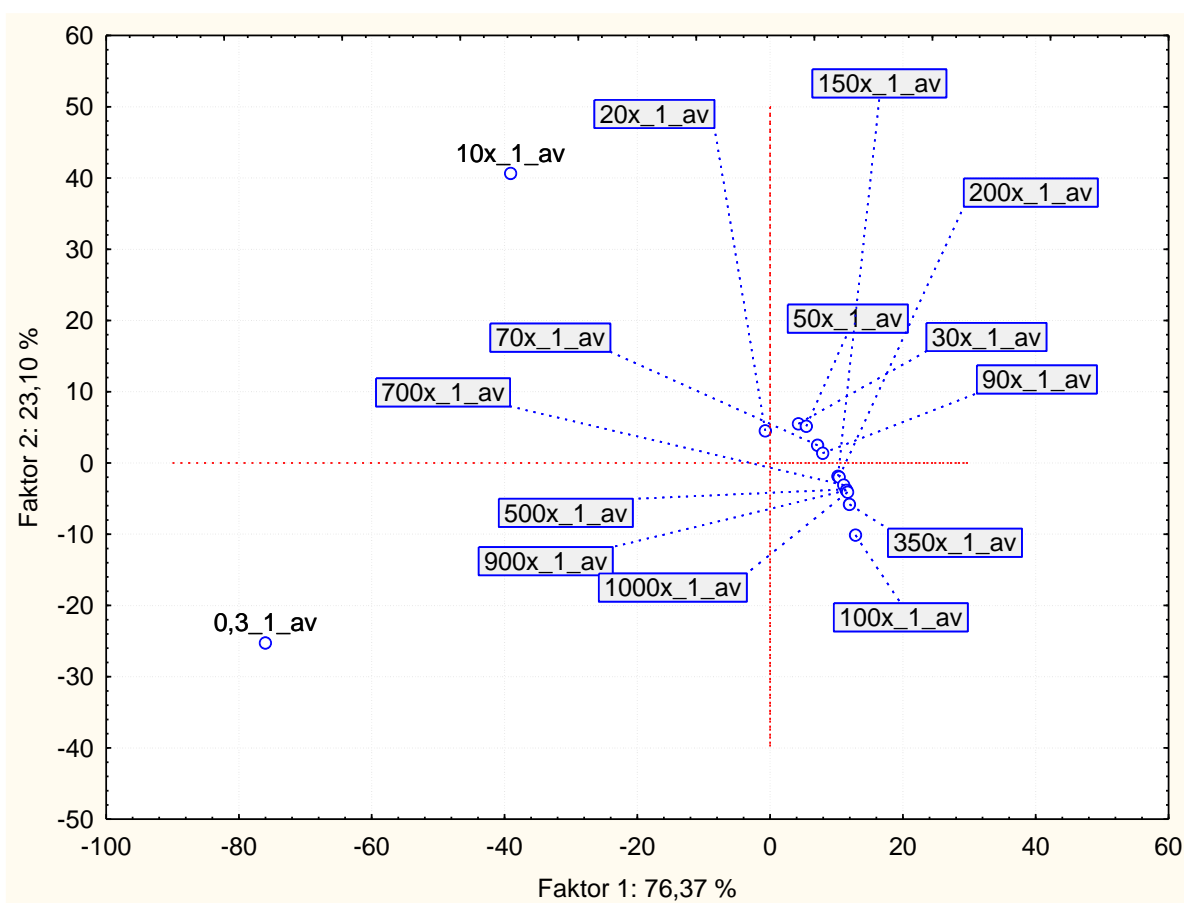
Slika 7. Izvorni NIR spektri pripremljene otopine Cuprblau Z 35 WG (0,05 Cu) te njezinih odgovarajućih razrjeđenja (Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na 0,05 Cu uzorak)

Na slici 7 se vidi razdvajanje NIR spektara u dvije grupe duž čitavog spektra valnih duljina ovisno o intenzitetu apsorbancije. Prvu skupinu čine NIR spektri odgovarajućih razrjeđenja otopina fungicida Cuprblau Z 35 WG (10x 20x, 30x, 50x, 70x, 90x, 100x, 150x, 200x, 350x, 500x, 700x, 900x, 1000x) koji pokazuju blage razlike u apsorbanciji te im se NIR spektri gotovo preklapaju. NIR spektar za originalnu otopinu fungicida (0,05 Cu) pokazuje veće vrijednosti apsorbancije u odnosu na NIR spektre odgovarajućih razrjeđenja. Do znatnog skoka apsorbancije za uzorak originalne otopine fungicida Cupralau Z 35 WG dolazi u području valnih duljina od 1140 nm do 1250 nm; u tom području se pojavljuju vibracije C-H veza u

drugom overtonu te vibracije C=O veza u četvrtom overtonu (Badr Eldin, 2011). NIR spektri svih uzoraka pokazuju povećanje apsorbancije u području valnih duljina od 1350-1699 nm, što ukazuje na prisutnost vode u istraživanim uzorcima te području od 1676-1698 nm što odgovara vibraciji C-H veze u prvom overtonu (Badr Eldin, 2011).

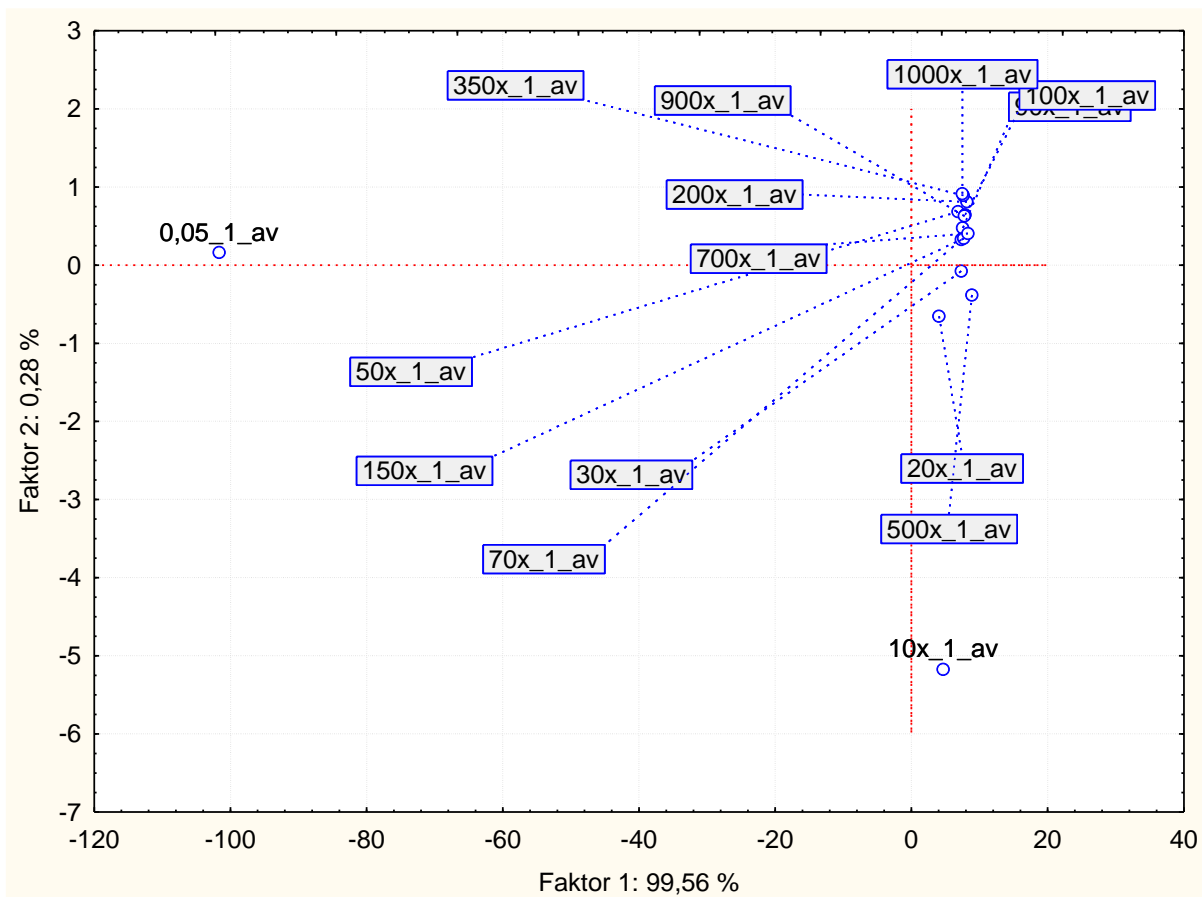
4.2.2. Analiza glavnih komponenata izvornih NIR spektara pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja

U ovom radu PCA metoda je korištena kako bi se prikazale sličnosti odnosno razlike između pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja.



Slika 8. PCA analiza izvornih NIR spektara suspenzije fungicida Chromosul 80 te pripremljenih odgovarajućih razrjeđenja (0,3_1_av-originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, oznake 10x_1_av, 20x_1_av, 30x_1_av, 50x_1_av, 70x_1_av, 90x_1_av, 100x_1_av, 150x_1_av, 200x_1_av, 350x_1_av, 500x_1_av, 700x_1_av, 900x_1_av, 1000x_1_av označavaju koliko je puta ta suspenzija fungicida razrijeđena u odnosu na originalan uzorak)

Na slici 8 vidljivo je da se uzorak originalne suspenzije fungicida Chromosul 80 (0,3_1_av) razdvojio od ostalih uzoraka i smjestio u treći kvadrant. Osim originalnog uzorka razdvojio se i uzorak suspenzije fungicida koji je deset puta razrjeđeniji od originalnog (10x_1_av) i smjestio se u drugi kvadrant. Razrjeđenja od trideset (30x_1_av), pedeset (50x_1_av), sedamdeset (70x_1_av), devedeset (90x_1_av), sto pedeset (150x_1_av) i dvjesto (200x_1_av) puta smještena su u prvom kvadrantu te prema njihovoj blizini možemo zaključiti da su vrlo slična s obzirom na ispitivane faktore. Ostala razrjeđenja su smještena u četvrti kvadrant. Iz slike je vidljivo da je PCA analiza razdvojila uzorke fungicida na temelju njihovih različitih koncentracija. Prva glavna komponenta (Faktor 1) objašnjava 76,37 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok druga glavna komponenta (Faktor 2) doprinosi sa 23,10 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka.



Slika 9. PCA analiza izvornih NIR spektara otopine fungicida Cuprablau Z 35 WG te pripremljenih odgovarajućih razrjeđenja (0,05_1_av-originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, oznake 10x_1_av, 20x_1_av, 30x_1_av, 50x_1_av, 70x_1_av, 90x_1_av, 100x_1_av, 150x_1_av, 200x_1_av, 350x_1_av, 500x_1_av, 700x_1_av, 900x_1_av, 1000x_1_av označavaju koliko je puta ta otopina fungicida razrijeđena u odnosu na originalan uzorak)

Na slici 9 vidljivo je da se uzorak originalne otopine fungicida Cuprablau Z 35 WG (0,05_1_av) razdvojio od ostalih uzoraka i smjestio u drugi kvadrant. Razrjeđenja od deset (10x_1_av), dvadeset (20x_1_av) i petsto puta (500x_1_av) su smještena u treći kvadrant, a sva ostala razrjeđenja otopine fungicida su smještena u prvi kvadrant. Iz slike je vidljivo da je PCA analiza razdvojila uzorke otopina fungicida na temelju njihovih različitih koncentracija te je originalna otopina (0,05_1_av) s najvećom koncentracijom razdvojena od ostalih uzoraka i takvo pozicioniranje uzoraka u različite kvadrante sugerira na postojanje razlike među navedenim uzorcima.

Prva glavna komponenta (Faktor 1) objašnjava 99,56 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok druga glavna komponenta (Faktor 2) doprinosi sa 20,28 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka.

4.2.3. PLS regresijski modeli za fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost, boja) suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS) predstavlja model u kojem su ulazne varijable valne duljine NIR spektara dok su izlazne varijable fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost i boja) istraživanih fungicida (Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG)

Tablica 7. Koeficijenti determinacije (R^2) za PLS regresijske modele za fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost, boja) suspenzija fungicida Chromosul 80

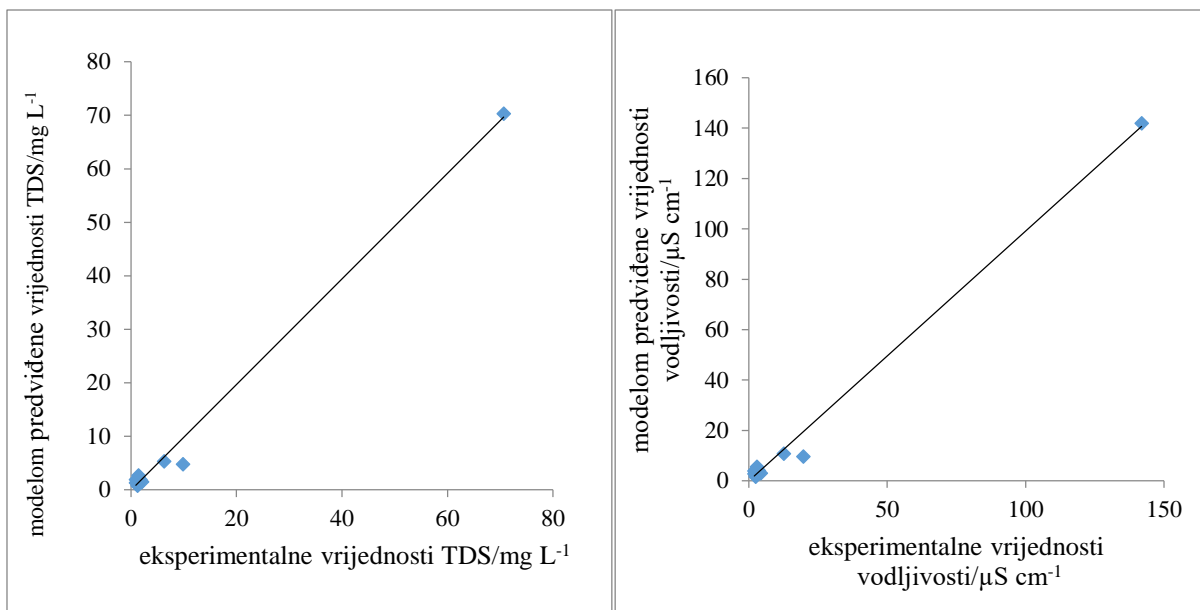
| Chromosul 80 | $R^2_{kal^*}$ | $^{\circ}RMSE_{kal}$ | $R^2_{val^*}$ | $^{\circ}RMSE_{val}$ | $R^2_{pred^*}$ | $^{\circ}RMSE_{pred}$ |
|------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| TDS [§] | 0,9922 | 1,4982 | 0,9941 | 1,5908 | 0,9926 | 1,4767 |
| Vodljivost | 0,9927 | 2,9622 | 0,9890 | 3,1089 | 0,9927 | 2,9518 |
| ΔE^* | 0,9585 | 0,1972 | 0,8668 | 0,3772 | 0,9281 | 0,2538 |

* kal-kalibracija, *val-validacija, *pred-predikcija

[°]RMSE - korijen srednjeg kvadratnog odstupanja (engl. *Root Mean Squared Error, RMSE*)

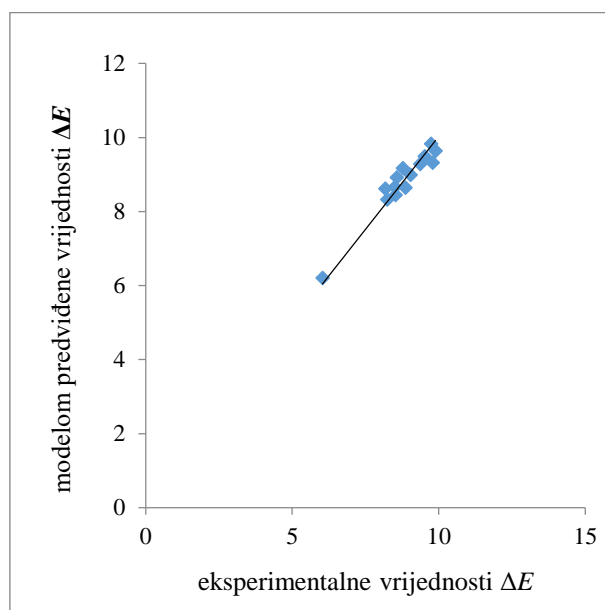
[§]TDS – ukupne otopljene tvari (engl. *Total Dissolved Solids*)

* ΔE – promjena boje (vrijednost koja pokazuje koliko se boja pripremljenih razrjeđenja fungicida razlikuje od originalnog uzorka)



a)

b)



c)

Slika 10. Rezultati primjene PLS-a u predikciji vrijednosti a) TDS-a, b) vodljivosti i c) ΔE za fungicid Chromosul 80 za originalnu suspenziju te pripremljena odgovarajuća razrjeđenja

Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između NIR spektara uzoraka fungicida Chromosul 80 i eksperimentalnih vrijednosti TDS-a (slika 10a). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,9922 do 0,9941 dok su se RMSE vrijednosti kretale u rasponu od 1,4767 do 1,5908 (tablica 7). Također je utvrđeno da postoji linearna ovisnost uzoraka fungicida Chromosul 80 i

eksperimentalnih vrijednosti vodljivosti za istraživani fungicid (slika 10b). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,9890 do 0,9927 dok su se RMSE vrijednosti kretale u rasponu od 2,9622 do 3,1089 (tablica 7). Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između NIR spektara uzoraka fungicida Chromosul 80 i eksperimentalnih vrijednosti ΔE (slika 10c). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,8668 do 0,9585 dok su se RMSE vrijednosti kretale u rasponu od 0,1972 do 0,3772 (tablica 7).

Tablica 8. Koeficijenti determinacije (R^2) za PLS regresijske modele za fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost i boja) otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG

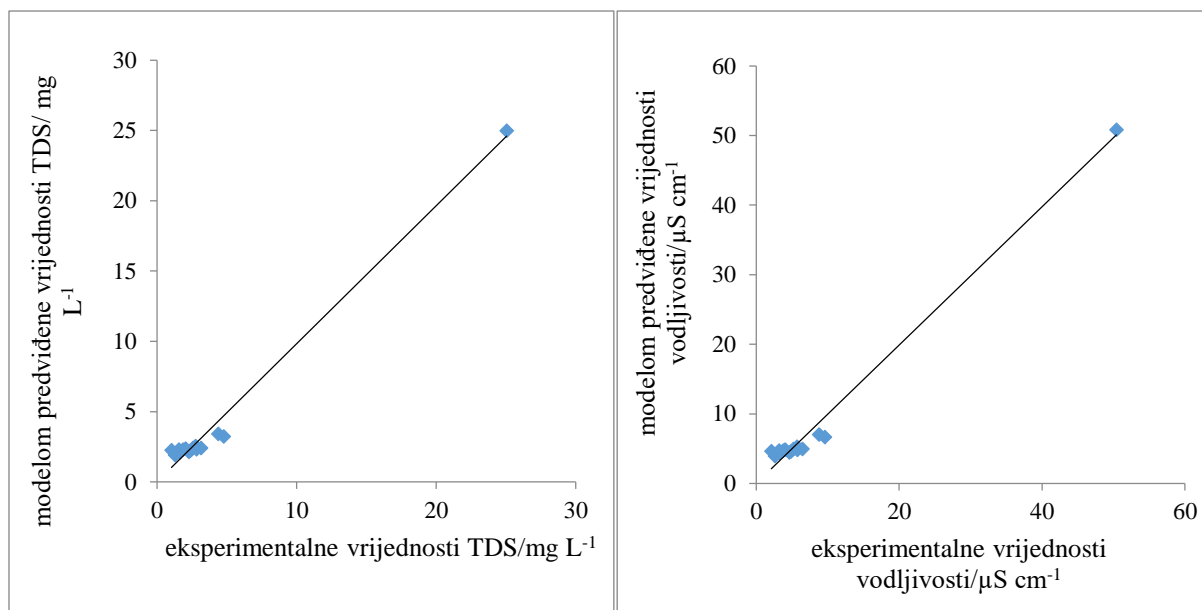
| Cuprablau Z 35 WG | $R^2_{kal^*}$ | $^{\circ}RMSE_{kal}$ | $R^2_{val^*}$ | $^{\circ}RMSE_{val}$ | $R^2_{pred^*}$ | $^{\circ}RMSE_{pred}$ |
|--------------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| TDS [§] | 0,9848 | 0,7002 | 0,9796 | 0,7643 | 0,9855 | 0,6877 |
| vodljivost | 0,9852 | 1,3949 | 0,9815 | 1,4452 | 0,9854 | 1,3901 |
| ΔE^* | 0,7069 | 0,2168 | 0,7518 | 0,2157 | 0,7368 | 0,2064 |

* kal-kalibracija, val-validacija, pred-predikcija

[°]RMSE - korijen srednjeg kvadratnog odstupanja (engl. *Root Mean Squared Error, RMSE*)

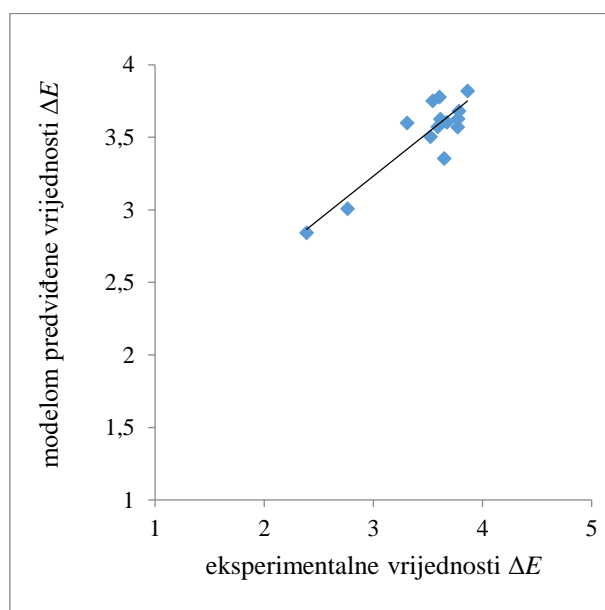
[§] TDS – ukupne otopljene tvari (engl. *Total Dissolved Solids*)

* ΔE – promjena boje (vrijednost koja pokazuje koliko se boja pripremljenih razrjeđenja fungicida razlikuje od originalnog uzorka)



a)

b)



c)

Slika 11. Rezultati primjene PLS-a u predikciji vrijednosti a) TDS-a, b) vodljivosti i c) ΔE za fungicid Cuprablau Z 35 WG za originalnu suspenziju te pripremljena odgovarajuća razrjeđenja

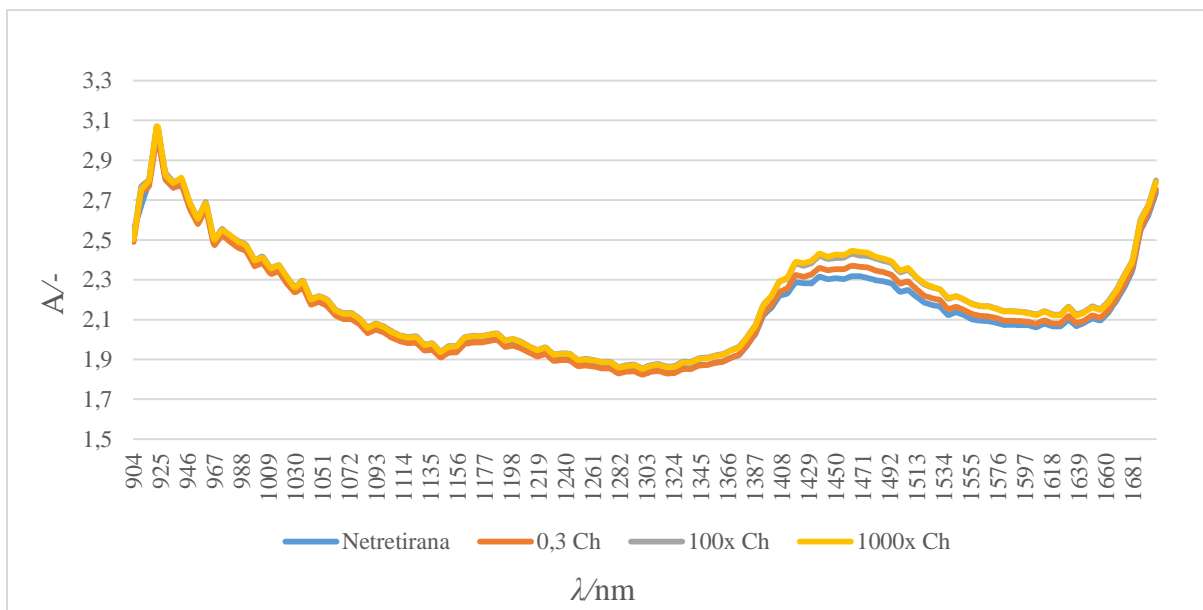
Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između NIR spektara uzoraka fungicida Cuprablau Z 35 WG i eksperimentalnih vrijednosti TDS-a (slike 11a). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu 0,9796 do 0,9855 dok su se RMSE vrijednosti kretale u rasponu od 0,6877 do 0,7643 (tablica 8). Također je utvrđeno da postoji linearna ovisnost uzoraka fungicida Cuprablau Z 35 WG i

eksperimentalnih vrijednosti vodljivosti za istraživani fungicid (slika 11b). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu 0,9815 od 0,9854 dok su se RMSE vrijednosti kretale u rasponu od 1,3901 do 1,4452 (tablica 8). Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između NIR spektara uzoraka fungicida Cuprablau Z 35 WG i eksperimentalnih vrijednosti ΔE (slika 11c). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,7069 do 0,7518 dok su se RMSE vrijednosti kretale u rasponu od 0,2064 do 0,2168 (tablica 8).

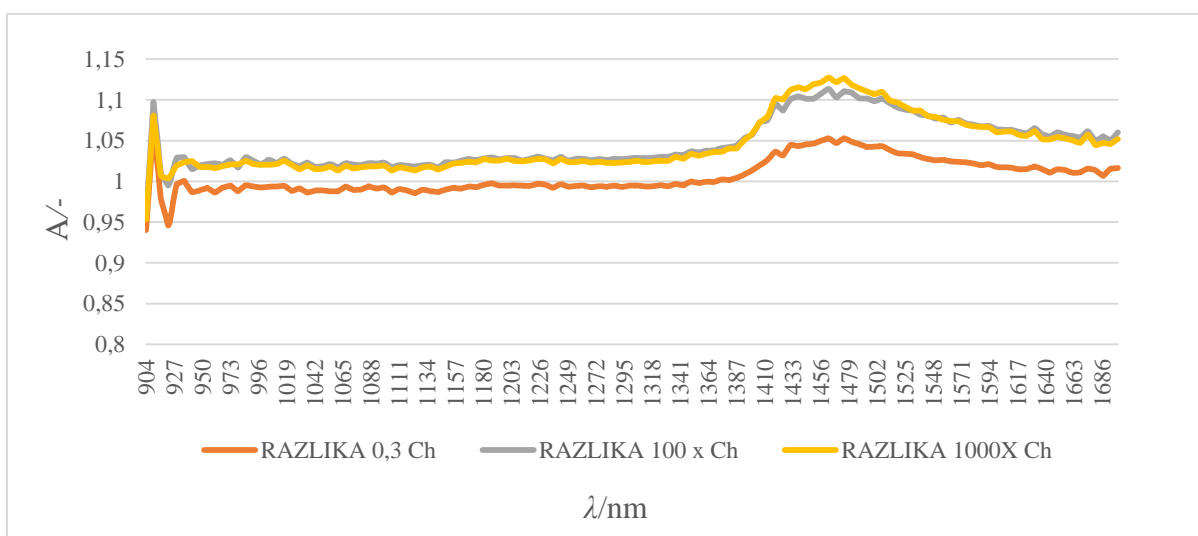
Vrijednosti koeficijenta determinacije R^2 prilično su visoke ($R^2 \geq 0,9$), što ukazuje na dobru povezanost eksperimentalno dobivenih podataka TDS-a i vodljivosti s razvijenim PLS modelima. Može se zaključiti kako se PLS modeli mogu koristiti za kalibraciju, validaciju te predikciju fizikalnih karakteristika (TDS i vodljivost) istraživanih fungicida. Što se boje tiče, R^2 vrijednosti su nešto niže u odnosu na R^2 vrijednosti dobivene za TDS i vodljivost, što ukazuje na manju primjenjivost PLS modela za opisivanje eksperimentalno dobivenih ΔE vrijednosti. Primjenu PLS modela su u svom radu prethodno opisali Nazarloo i suradnici (2021) koji su utvrdili da se PLS modeli mogu uspješno koristiti za predviđanje ostataka pesticida profenofosa na uzorcima rajčica. Shan i sur. (2020) su utvrdili da se PLS modeli mogu uspješno koristiti za predviđanje sorpcije atrazina u tlo i da se NIR može koristiti kao brza i jednostavna metoda za predviđanje sastava tla i apsorpcije pesticida dok su Yazici i sur. (2019), Yi i sur. (2010) i Sharabiani i sur. (2019) utvrdili da se PLS modeli mogu uspješno koristiti za predviđanje pesticida na površini jagoda, sadržaja dušika u lišću naranče i sadržaja proteina pšenice.

4.3. NIR SPEKTRI TRETIRANIH (PRSKANIH) TE NETRETIRANIH (KONTROLNIH) UZORAKA JABUKA TIJEKOM TROTJEDNOG VREMENSKOG PERIODA

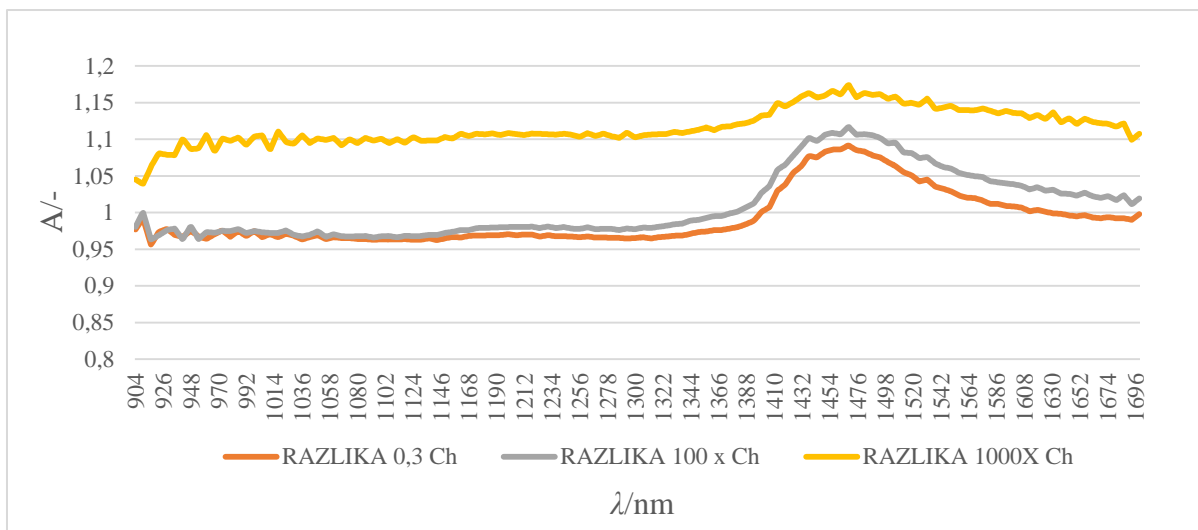
Na snimljenim NIR spektrima jabuka prskanih odgovarajućim koncentracijama suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG promatrane su sličnosti i razlike u apsorbcijama na određenim valnim duljinama kako bi se potencijalno kvalitativno odredila prisutnost navedenih fungicida.



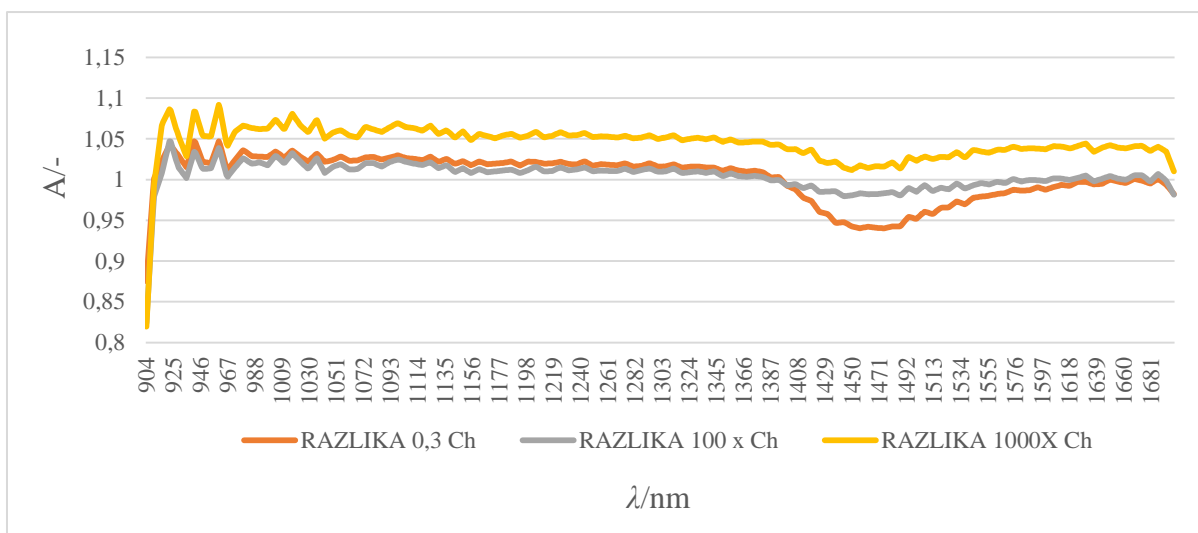
Slika 12. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s fungicidom Chromosul 80 za nulti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne)



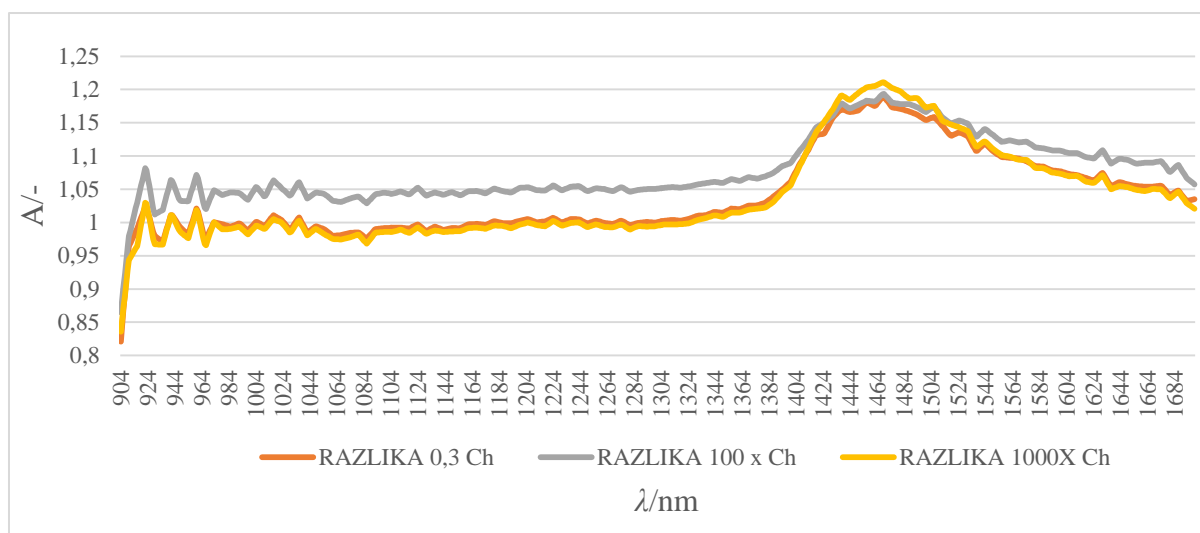
Slika 13. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za nulti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



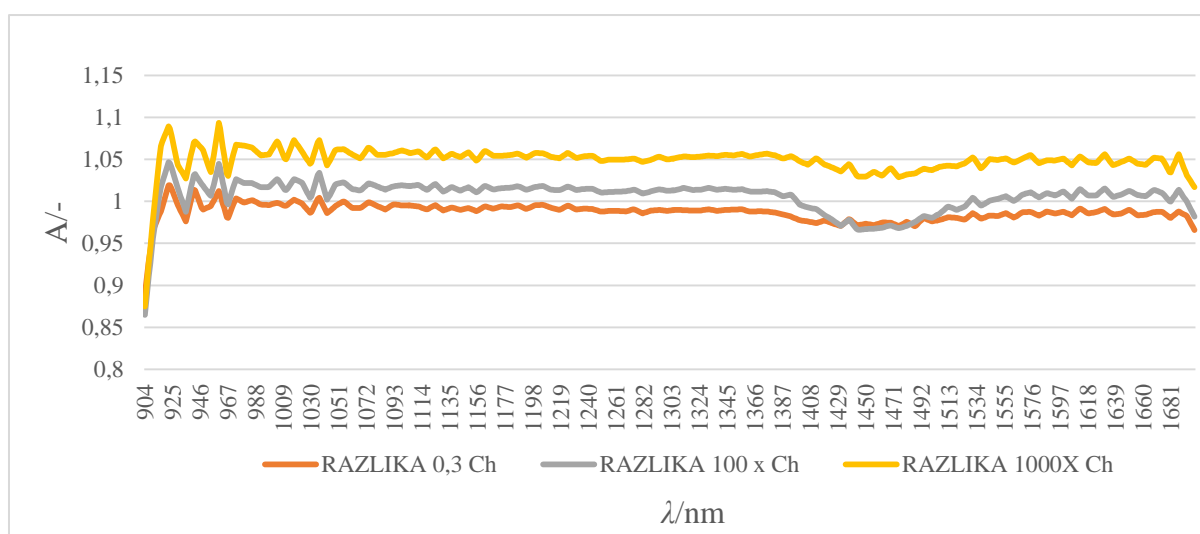
Slika 14. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za prvi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



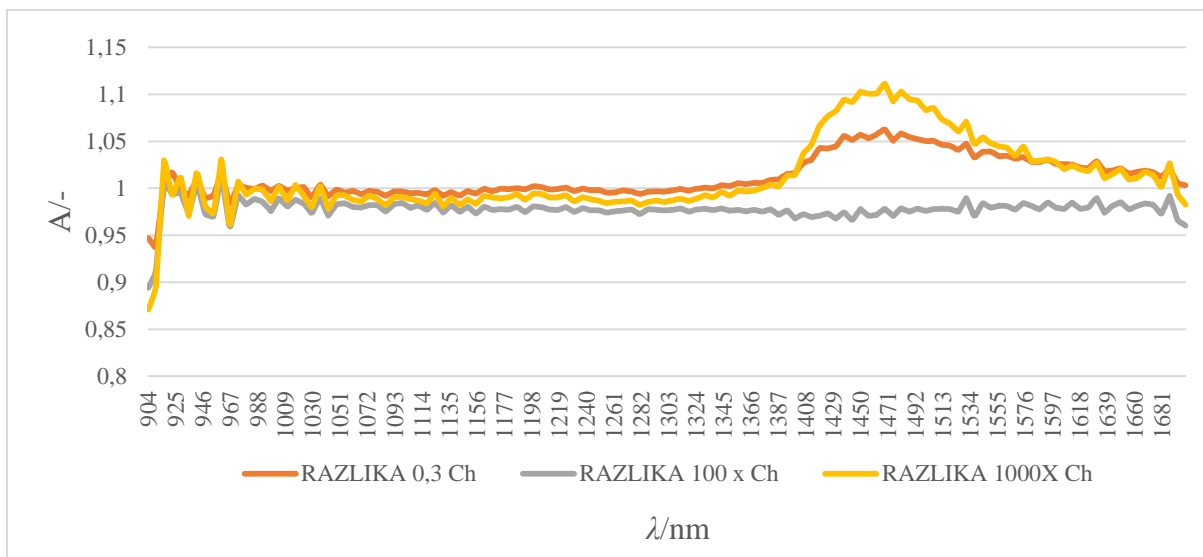
Slika 15. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za dan četvrti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



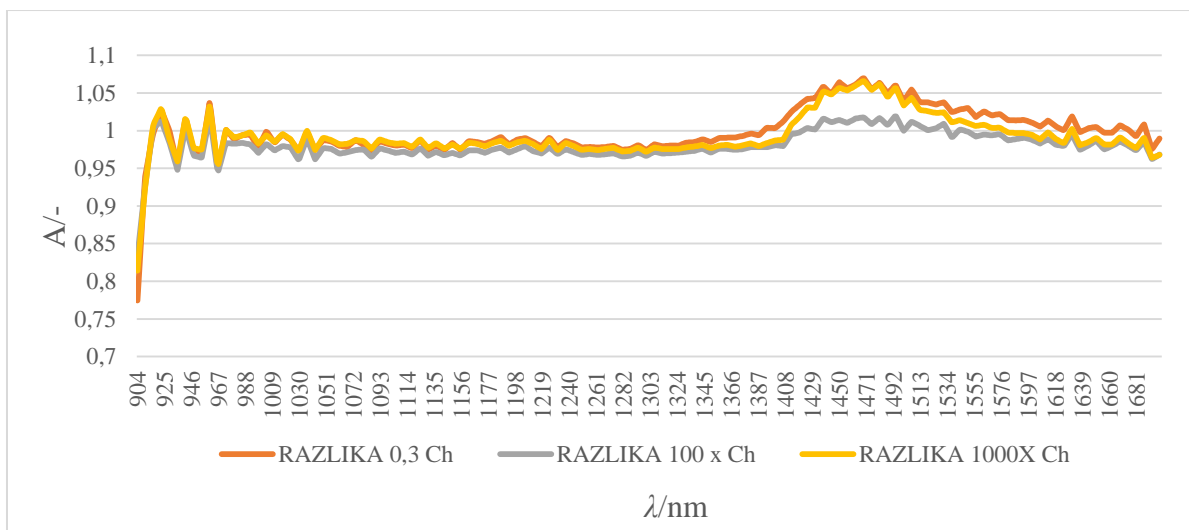
Slika 16. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za peti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



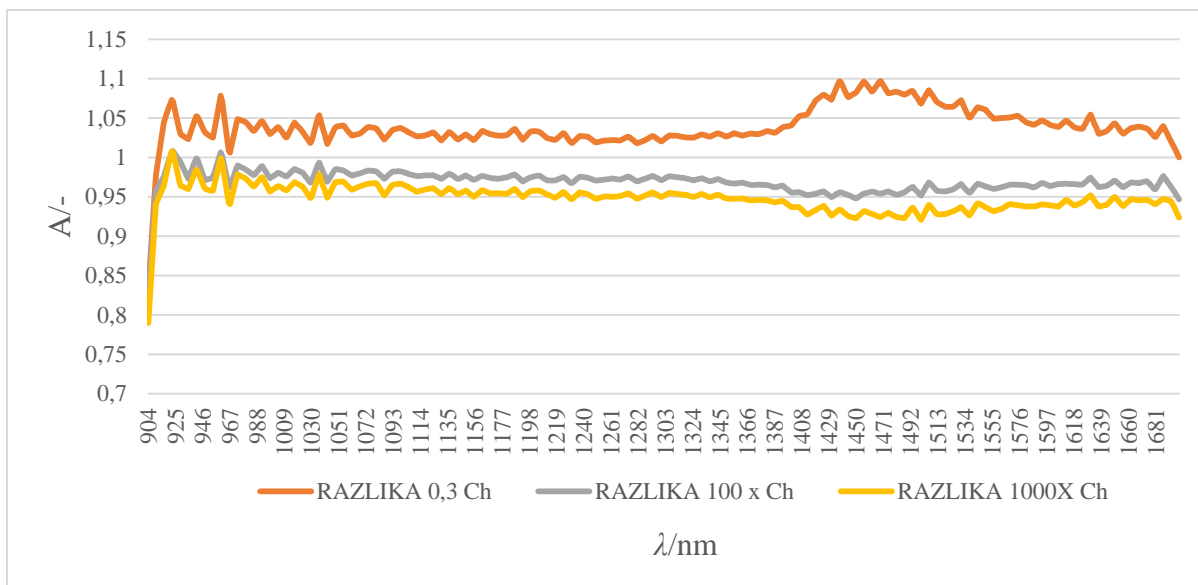
Slika 17. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za šesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



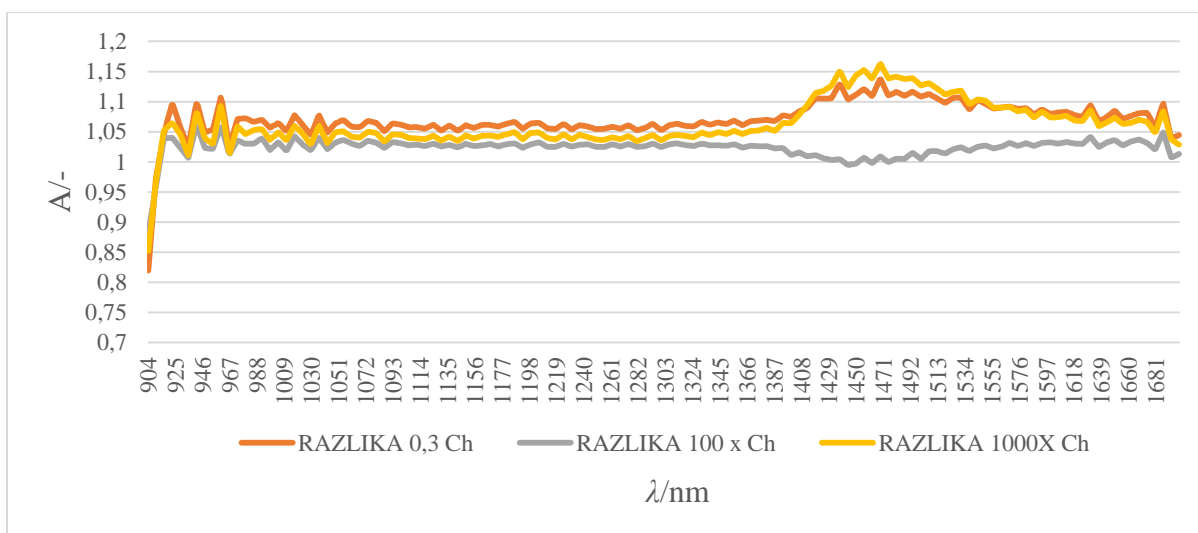
Slika 18. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za sedmi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



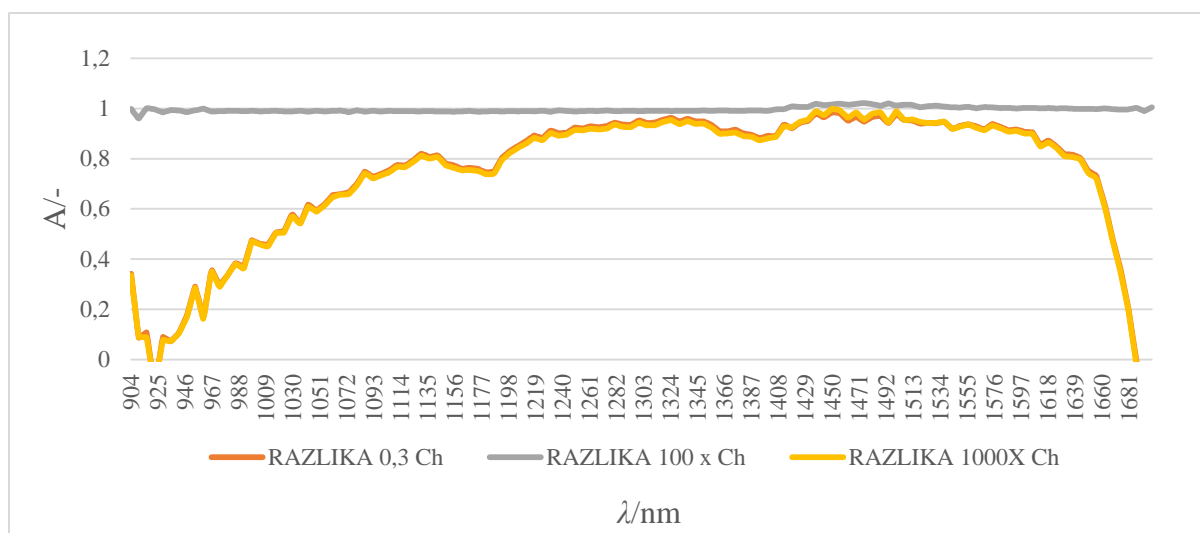
Slika 19. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za osmi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



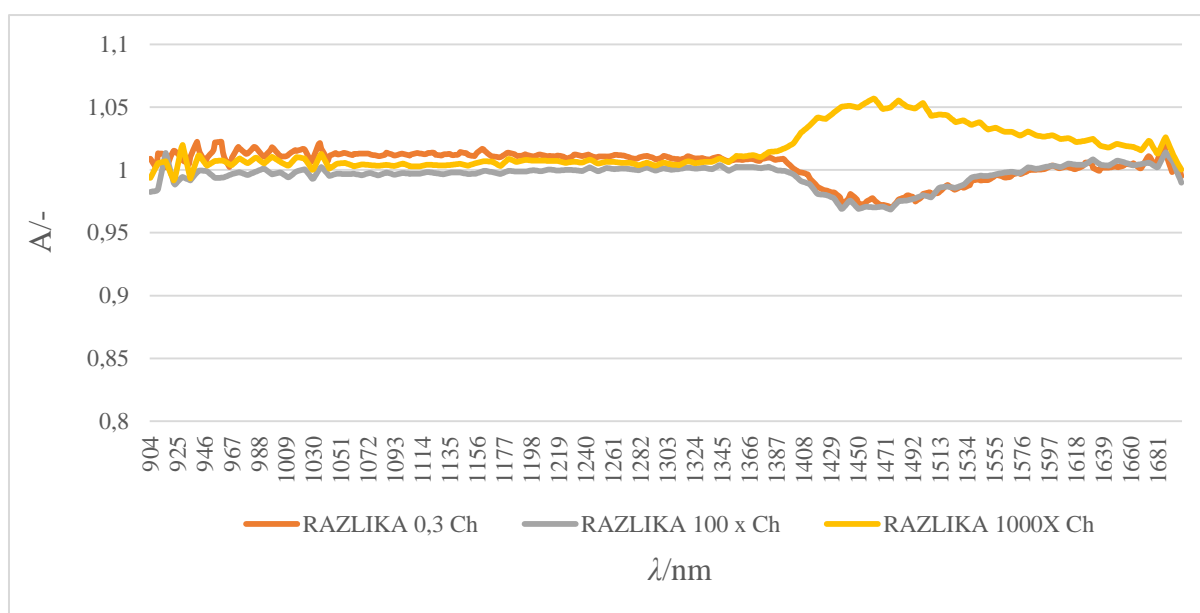
Slika 20. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za jedanaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



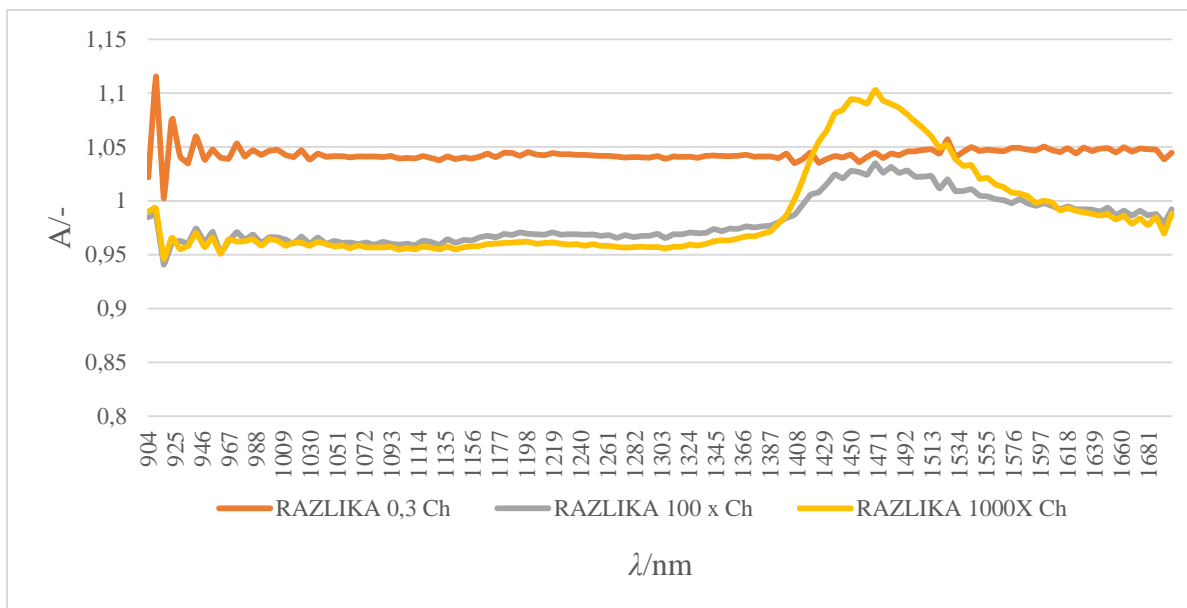
Slika 21. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za dvanaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



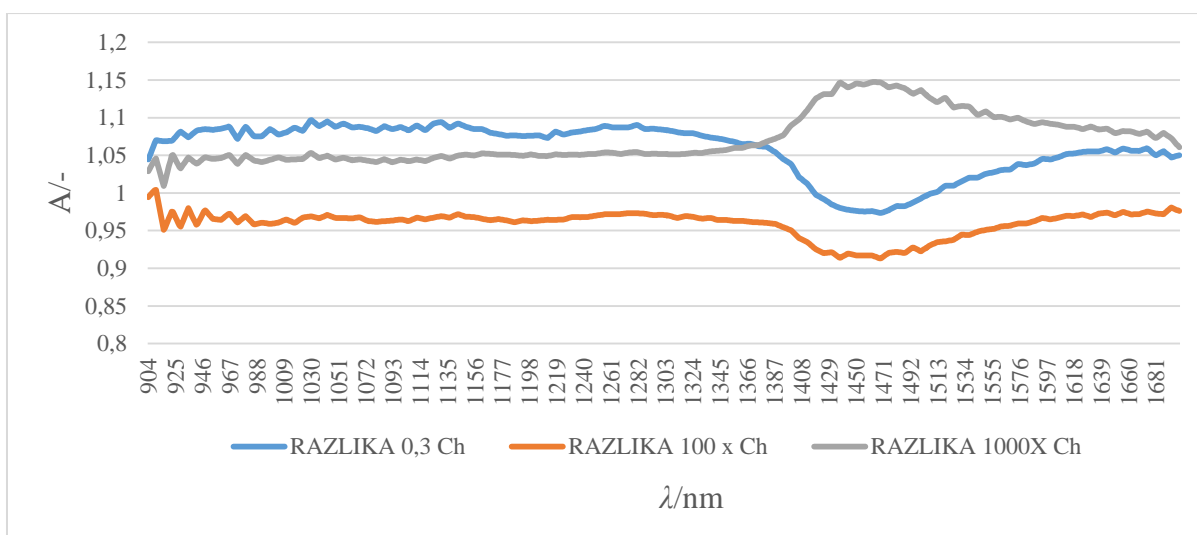
Slika 22. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za trinaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrijeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



Slika 23. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za četrnaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrijeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



Slika 24. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za petnaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



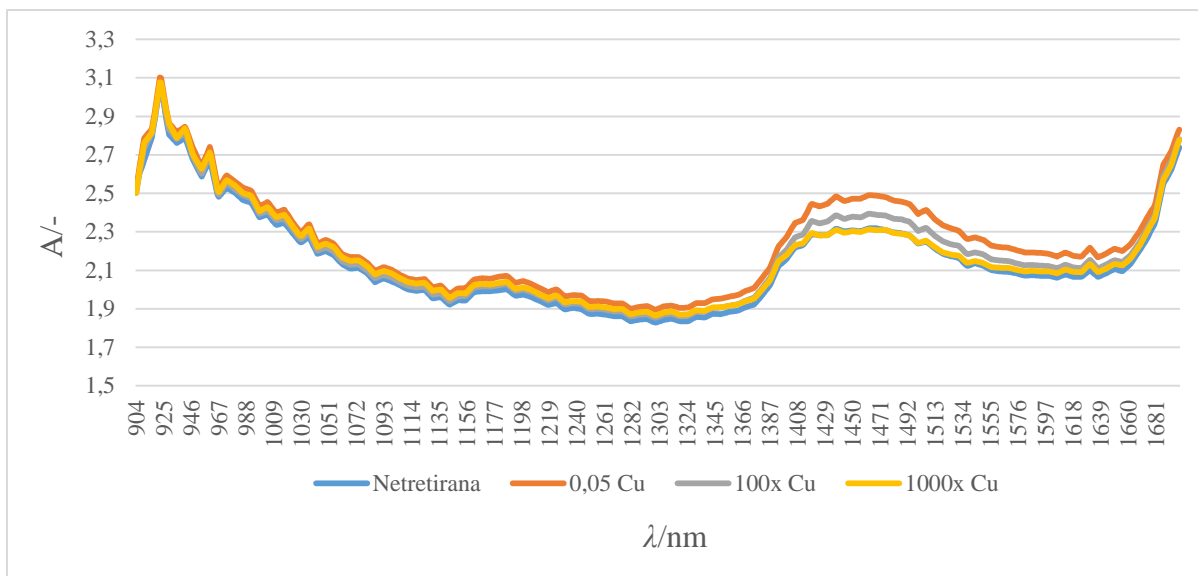
Slika 25. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Chromosul 80) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za dvadeset i prvi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih suspenzija (RAZLIKA 0,3 Ch) i suspenzija koje su sto (RAZLIKA 100X Ch) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Ch) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)

Blisko infracrvena spektroskopija (engl. *Near Infrared Spectroscopy, NIR*) je cijenjeno analitičko sredstvo i često se koristi za otkrivanje prisutnosti određenih funkcionalnih skupina u molekuli tj. identifikaciju neke tvari. Međutim, složena priroda NIR spektara stvara poteškoće u njihovoj izravnoj interpretaciji (Beć i sur., 2021). NIR spektri sadrže puno informacija koje se koriste u kvalitativne i kvantitativne kemijske i fizikalne analitičke svrhe. Ponekad je NIR spektar teško koristiti kao izvor za kvalitativnu identifikaciju uzorka jer složenost spektra onemogućava njegovu izravnu upotrebu. Za kvalitativnu analizu izvornih NIR spektara koriste se korelacijski grafikoni koji pokazuju gdje se apsorpcijske vrpce O-H, C-H, N-H, S-H veza različitih spojeva nalaze u NIR spektralnom području (Pasquini, 2003).

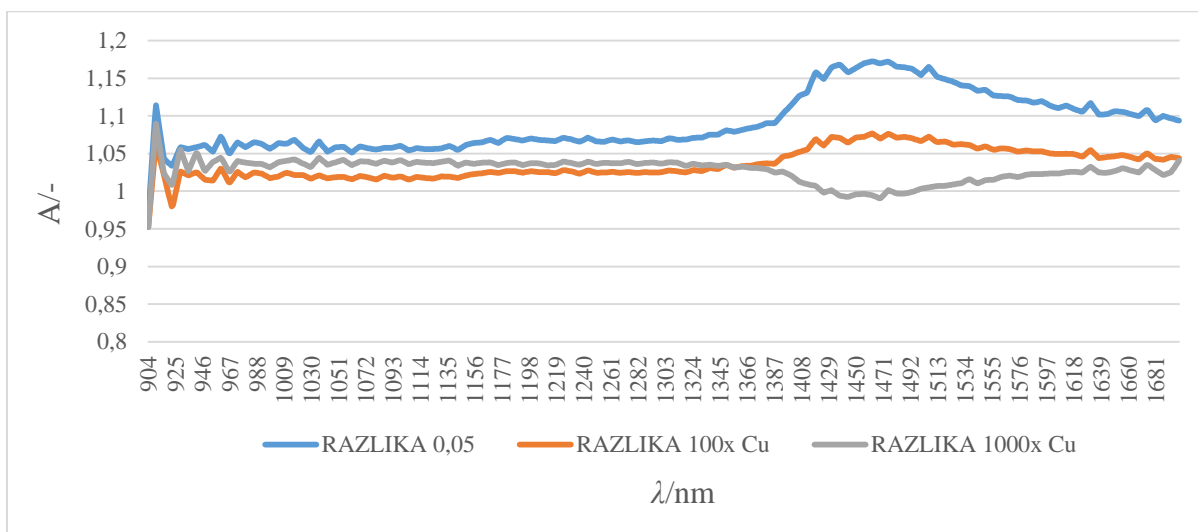
Na slici br. 12 prikazane su srednje vrijednosti izvornih NIR spektara za netretirane i tretirane (kontaminirane) jabuke s fungicidom Chromosul 80 za nulti dan mjerenja. Može se vidjeti da su NIR spektri gotovo preklopljeni diljem čitavog spektra valnih duljina. Do znatnog skoka apsorbancije, za sve promatrane uzorke dolazi na valnoj duljini od 926 nm, u rasponu valnih duljina od 1400-1500 nm te od 1600-1699 nm. U području valnih duljina 850-950 nm pojavljuju se vibracije C-H veze u trećem overtonu te vibracije O-H veze u drugom overtonu (Badr Eldin, 2011; Jamshidi, 2017), u području od 1400 nm do 1600 nm pojavljuju se vibracije N-H veze u prvom overtonu i O-H veze u prvom overtonu te povećanje apsorbancije u tom području valnih duljina sugerira na prisutnost vode u istraživanim uzorcima. Povećanje apsorbancije u valnom području 1600- 1699 nm odgovara vibraciji C-H veze u prvom overtonu (Jamshidi, 2017).

Na slikama br. 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 prikazani su NIR spektri prskanih (tretiranih) jabuka fungicidom Chromosul 80 nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka. Povećanje apsorbancije uočeno je za sve uzorke na valnim duljinama 910 nm, 917 nm, 923 nm, 943 nm, 960 nm (slike 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 i 22) kod NIR spektara koji su snimani tijekom karence za Chromosul 80 koja traje četrnaest dana. U NIR području između 900 nm i 950 nm očekuje se da će se pojaviti tri spektralne linije sumpora, i to na 921,3 nm, 922,8 nm i 923,8 nm (Gazeli i sur., 2021). Četvrti, peti, šesti, sedmi, osmi dan nakon kontaminacije jabuka snimljeno je povećanje apsorbancije na 923 nm za sve uzorke (Slike 15, 16, 17, 18 i 19). Jedanaesti i dvanaesti dan je snimljeno povećanje apsorbancije na 921 nm za sve uzorke (Slike 20 i 21). Petnaesti dan je snimljeno povećanje apsorbancije na 922 nm, ali samo za jabuku koja je kontaminirana s originalnom suspenzijom fungicida (Slika 24). Možda se radi o sumporu jer povećanje apsorbancije na tim valnim duljinama nije vidljivo dvadeset i prvi dan nakon

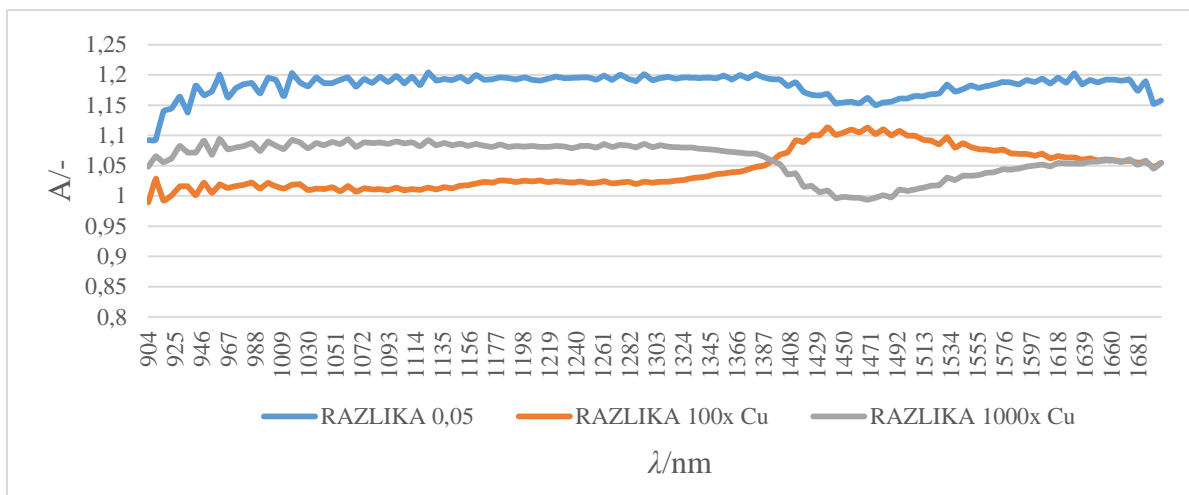
kontaminacije jabuka (Slika 25). Što bi značilo da na kontaminiranim jabukama nisu prisutni ostaci pesticida, ali zbog ograničene razlučivosti NIR spektara ove NIR spektralne linije sumpora ne mogu se koristiti u kvalitativne svrhe (Gazeli i sur., 2021). Povećanje apsorbancije na valnim duljinama od 1400 nm do 1500 nm povezano je s O-H rastezanjem veze (Slike. 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 i 25) (Jamshidi i sur., 2015).



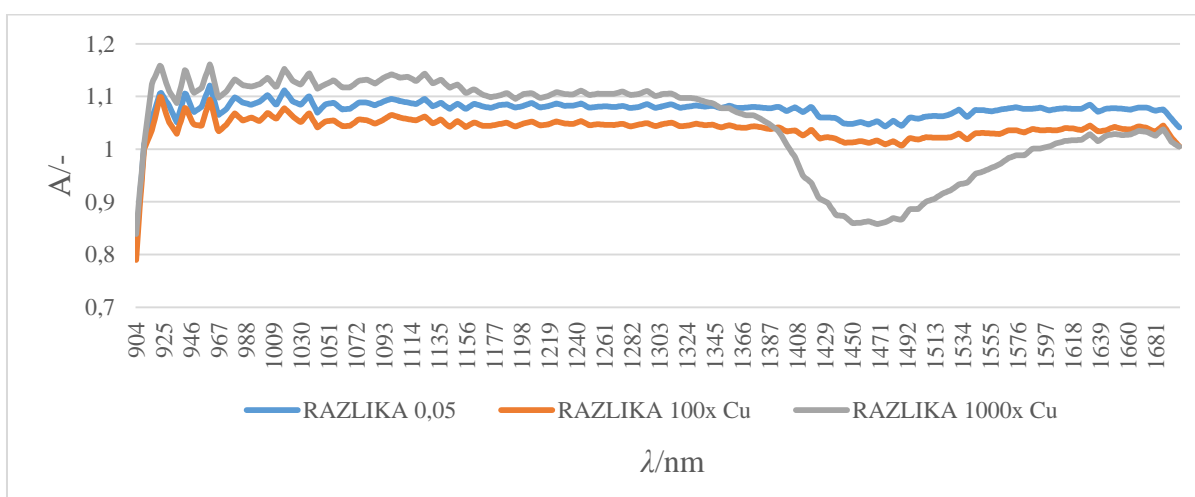
Slika 26. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s fungicidom Cuprablau Z 35 WG za nulti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 100x Ch-otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne)



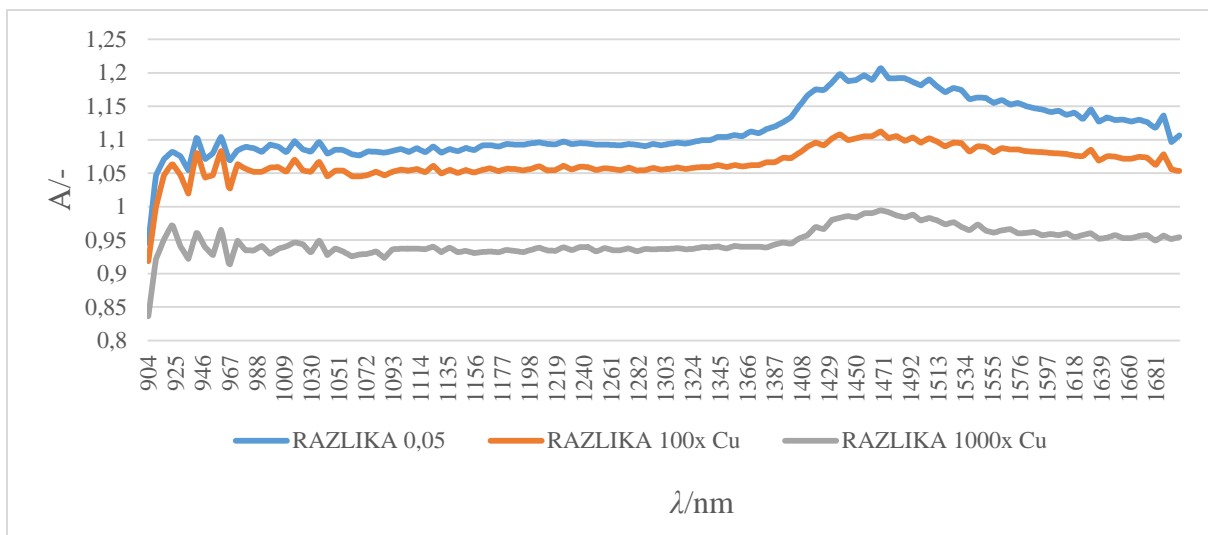
Slika 27. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za nulti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



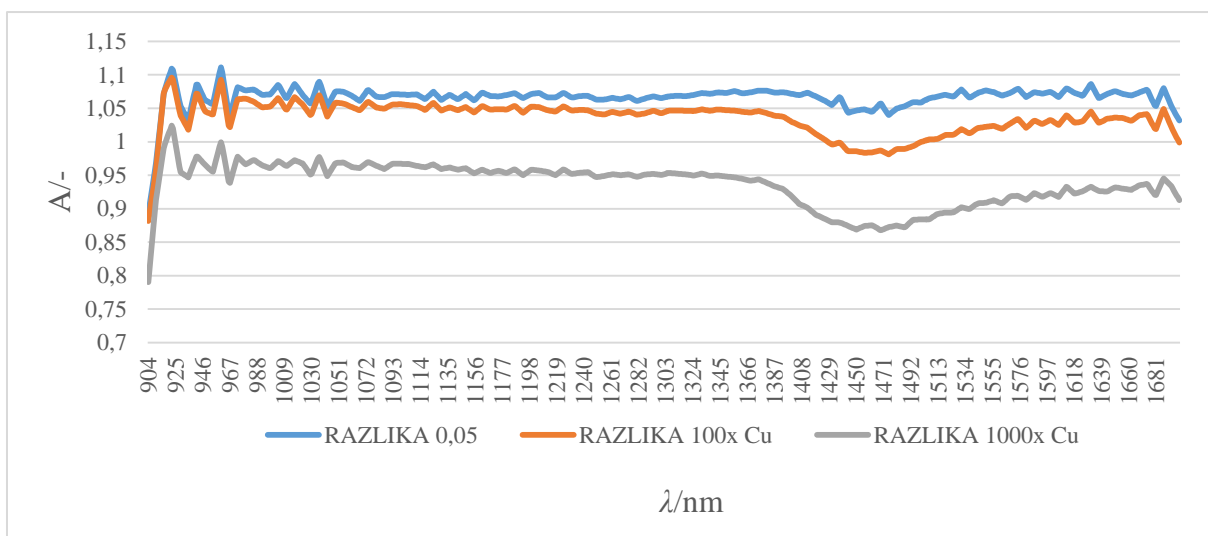
Slika 28. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za prvi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



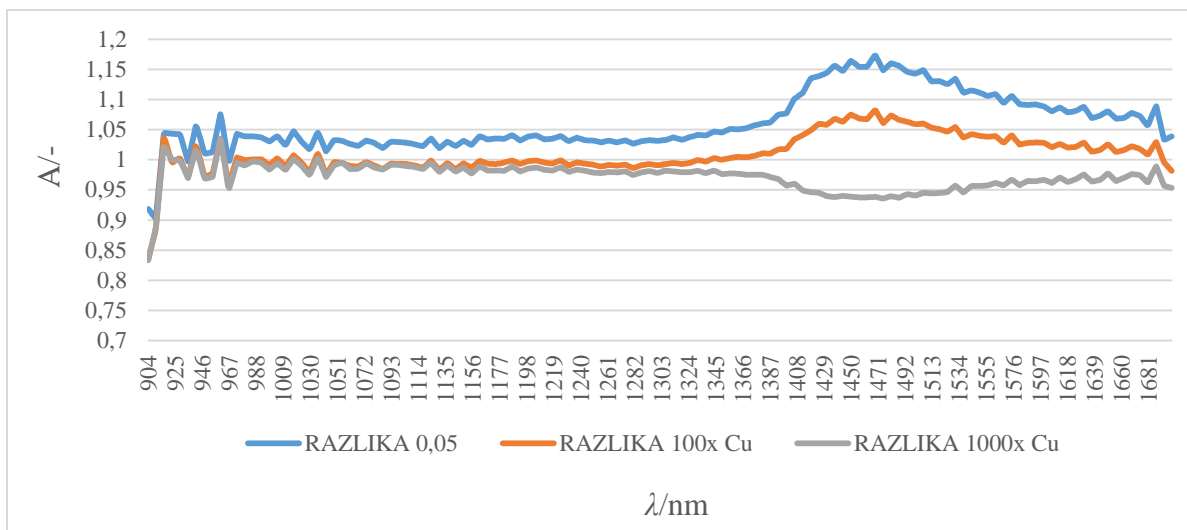
Slika 29. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za četvrti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



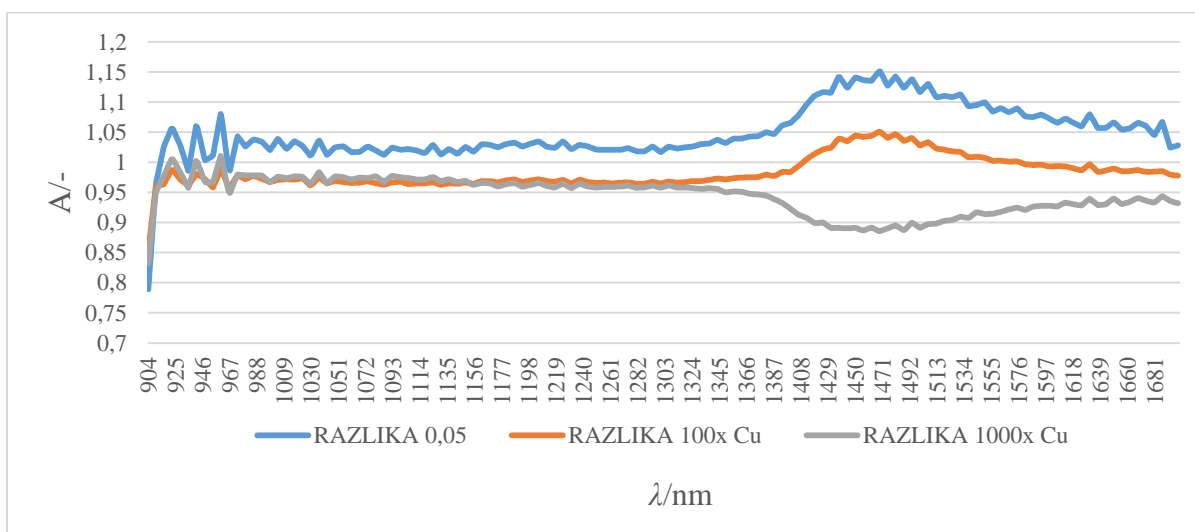
Slika 30. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za peti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



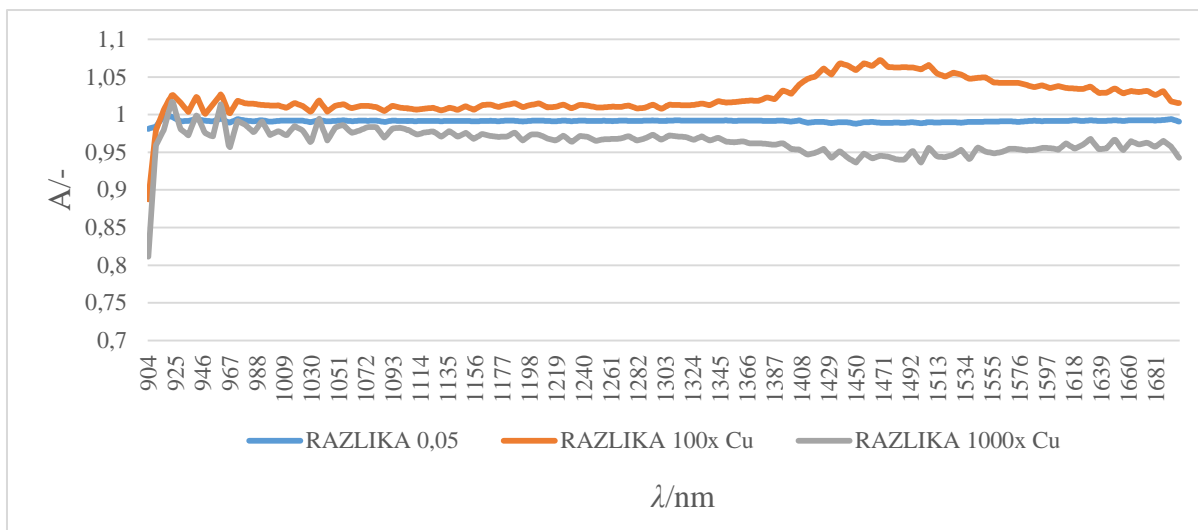
Slika 31. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za šesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



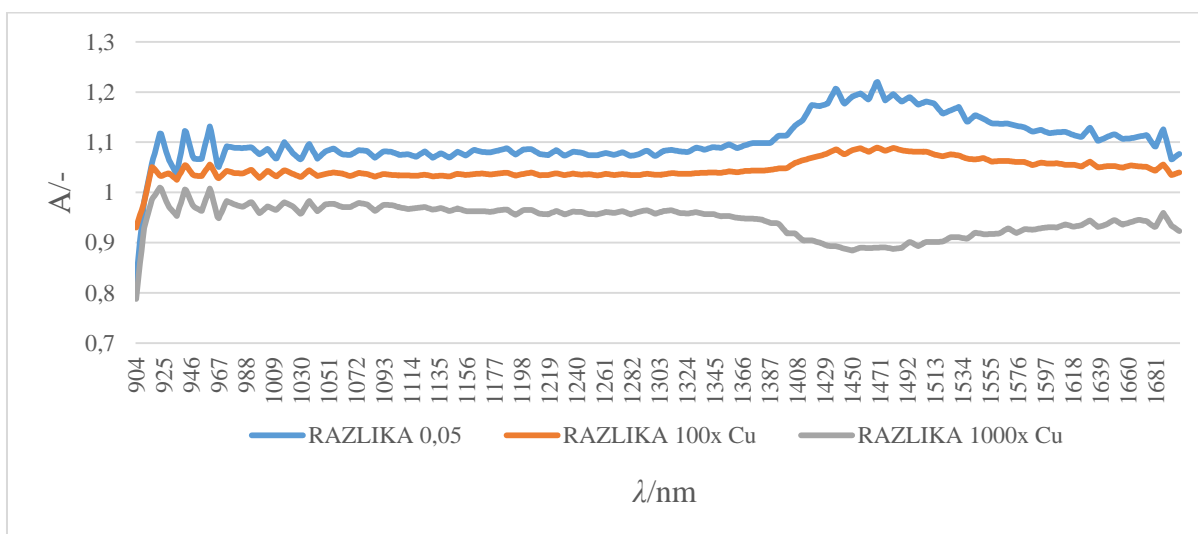
Slika 32. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za sedmi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



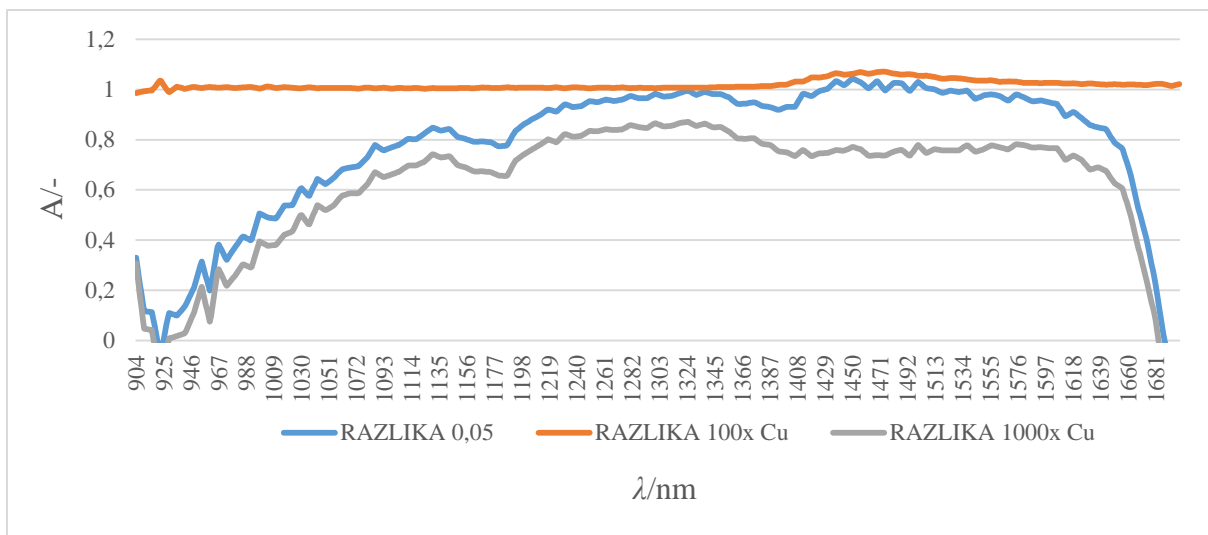
Slika 33. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za osmi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



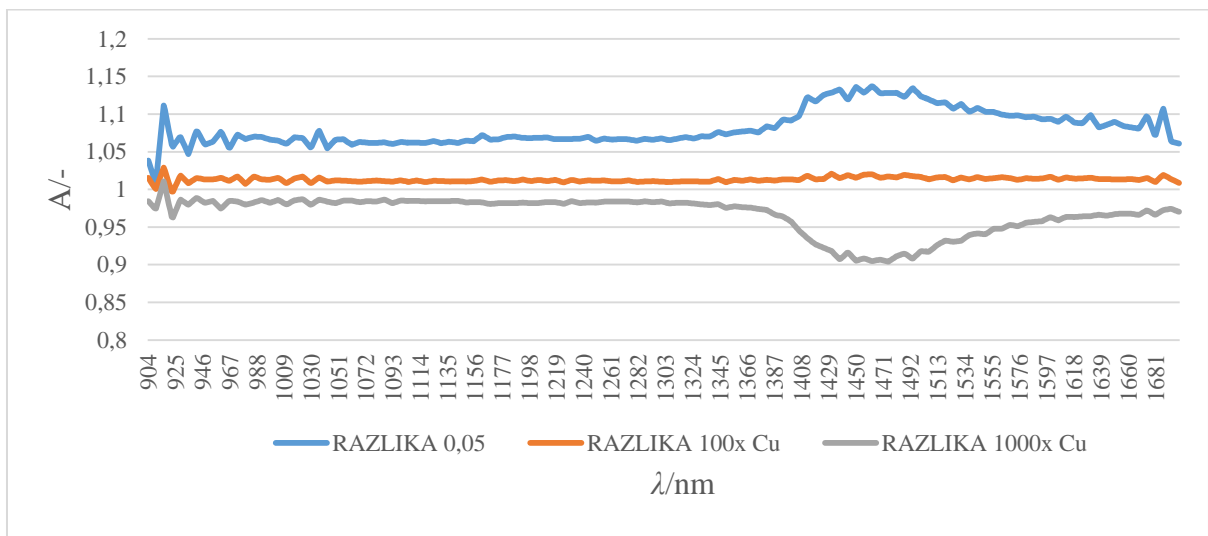
Slika 34. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za jedanaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



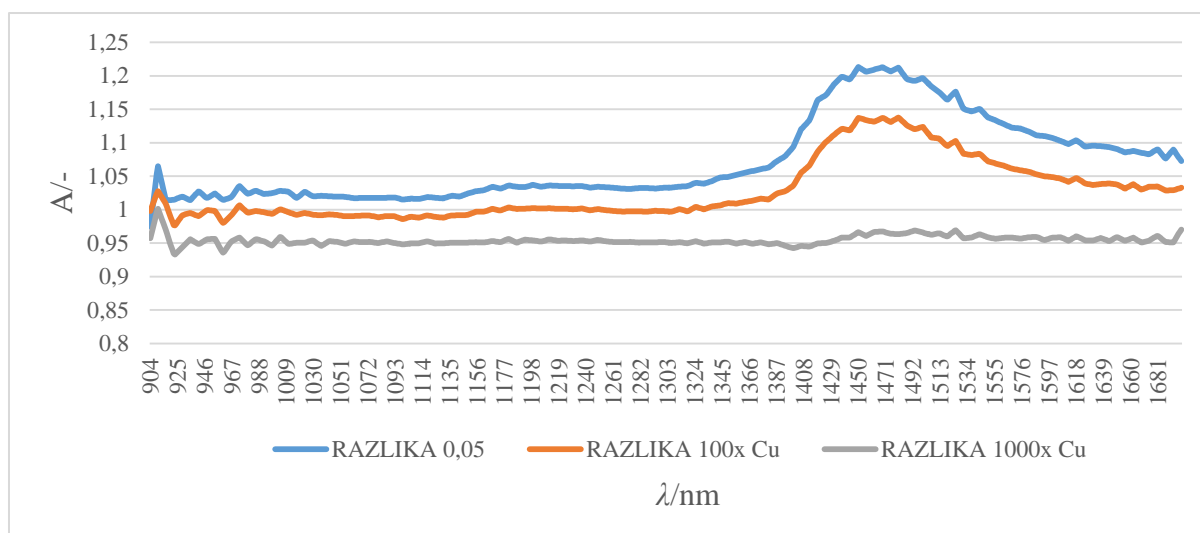
Slika 35. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za dvanaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



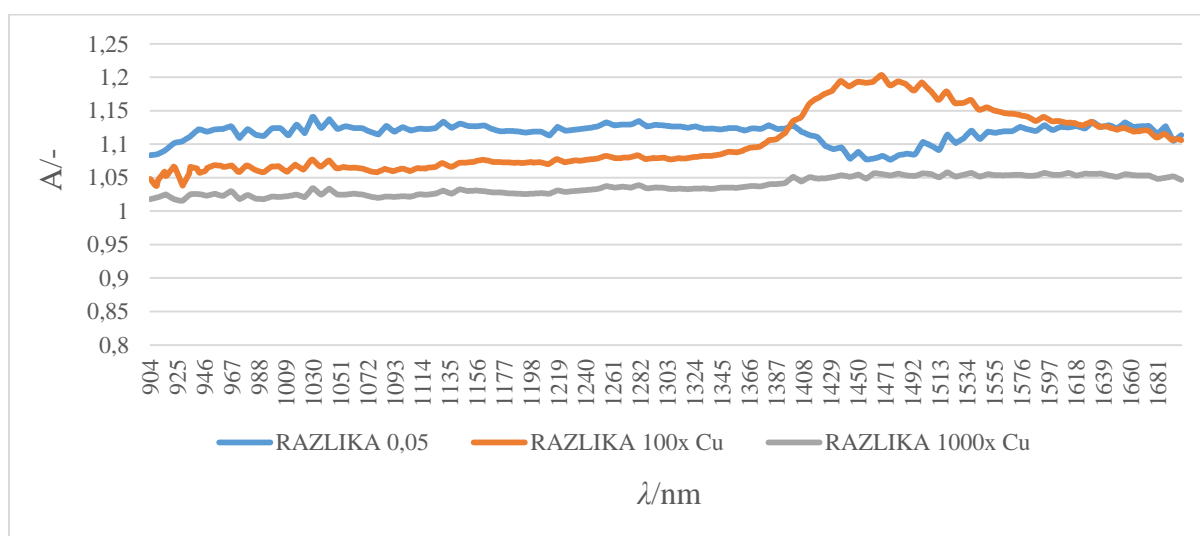
Slika 36. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za trinaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



Slika 37. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za četrnaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



Slika 38. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za petnaesti dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)



Slika 39. Prikaz NIR spektara kontaminiranih jabuka (Cuprablau Z 35 WG) nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbancija umanjile za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka za dvadeset i prvi dan (srednje vrijednosti apsorbancija originalnih otopina (RAZLIKA 0,05 Cu) i otopina koje su sto (RAZLIKA 100X Cu) i tisuću puta (RAZLIKA 1000X Cu) razrjeđenije od originalne, umanjene za srednje vrijednosti apsorbancija netretiranih jabuka)

Za kvalitativnu analizu izvornih NIR spektara koriste se korelacijski grafikoni koji pokazuju gdje se apsorpcijske vrpce različitih veza nalaze u NIR spektralnom području (Pasquini, 2003).

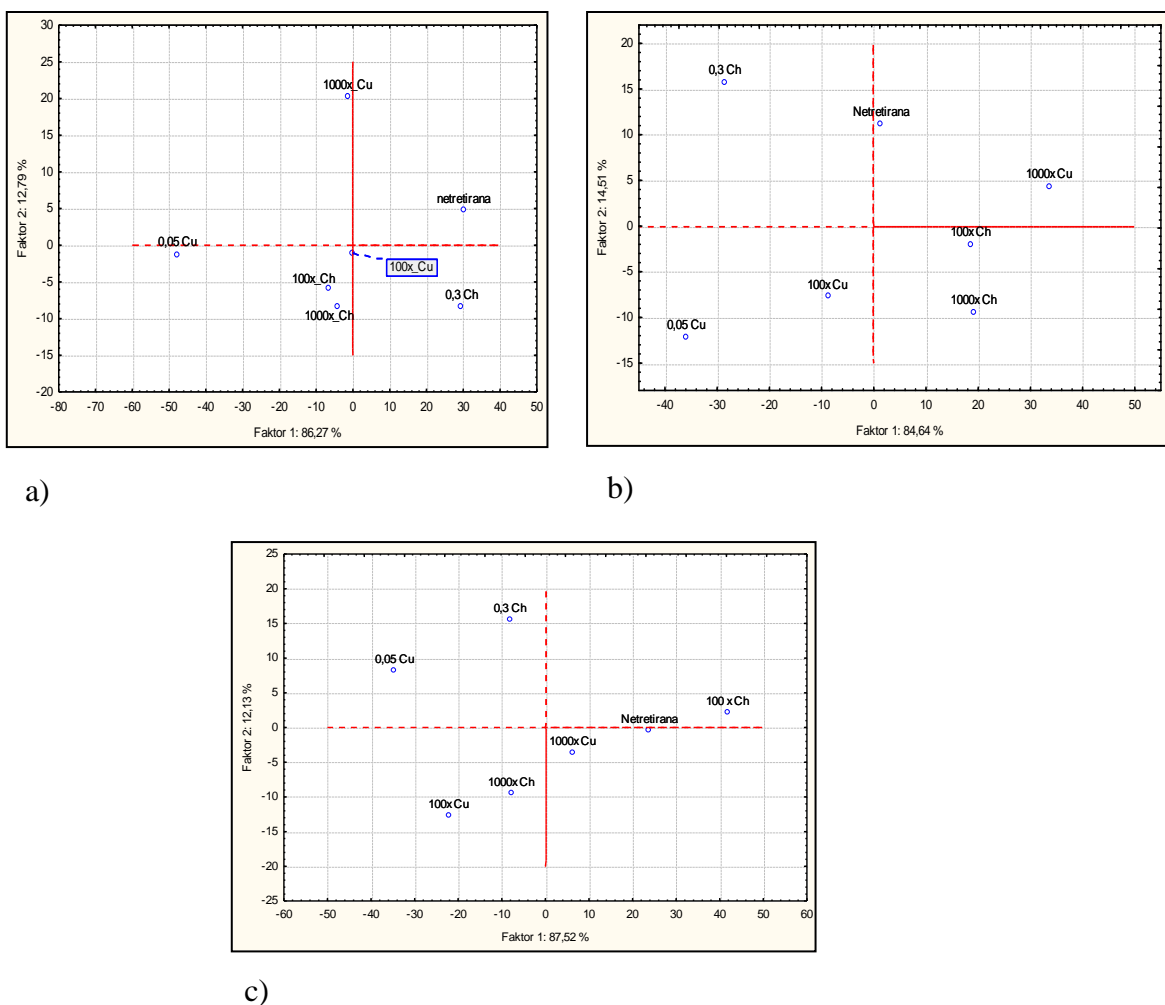
Na slici br. 26 prikazane su srednje vrijednosti izvornih NIR spektara za netretirane i tretirane (kontaminirane) jabuke s fungicidom Cuprablau Z 35 WG za nulti dan mjerenja. Na slici je vidljivo da su se NIR spektri podijelili u dvije grupe u području od 1383 nm do 1519 nm i to tako da se NIR spektar jabuke kontaminirane originalnom otopinom fungicida Cuprablau Z 35 WG odvojio od NIR spektara ostalih uzoraka i pokazuje veći intenzitet apsorbcije. Do znatnog skoka apsorbcije, za sve promatrane uzorke dolazi na valnoj duljini od 926 nm, u rasponu valnih duljina od 1400-1500 nm te od 1600-1699 nm. U području valnih duljina 850-950 nm pojavljuju se vibracije C-H veze u trećem overtonu te vibracije O-H veze u drugom overtonu (Badr Eldin, 2011; Jamshidi, 2017), u području od 1400 nm do 1600 nm pojavljuju se vibracije N-H veze u prvom overtonu i O-H veze u prvom overtonu te povećanje apsorbcije u tom području valnih duljina sugerira na prisutnost vode u ispitivanim uzorcima. Povećanje apsorbcije u valnom području 1600-1699 nm odgovara vibraciji C-H veze u prvom overtonu (Jamshidi, 2017) i moglo bi se pripisati prisutnosti celuloze u jabukama (Redaelli i Berardo, 2014).

Na slikama br. 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 i 39 prikazani su NIR spektri tretiranih (kontaminiranih) jabuka Cuprablau Z 35 WG nakon što su se srednje vrijednosti njihovih apsorbcija umanjile za srednje vrijednosti apsorbcija netretiranih (kontrolnih) jabuka. Povećanje apsorbcije uočeno je na NIR spektrima u rasponu valnih duljina od 1400 nm do 1500 nm za jabuke koje su kontaminirane originalnom otopinom fungicida i za jabuke koje su kontaminirane otopinom koja je sto puta razrjeđenija od originalne otopine, ali takvo povećanje nije uočeno na NIR spektrima za jabuke koje su kontaminirane otopinom koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne otopine (slike 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 i 39). Povećanje apsorbcije u rasponu valnih duljina od 1400 nm do 1500 nm povezano je s O-H rastezanjem veze, prvi overton. Voda u tekućem agregatnom stanju sadrži vrpce u navedenom području valnih duljina. Molekula dibakrovog klorida trihidroksida sadrži tri O-H veze, ali vrpce vode mogu interferirati s vrpcama dibakrovog klorida trihidroksida te je teško iz tog dijela spektra kvalitativno odrediti prisutnost fungicida (Jamshidi i sur., 2015).

NIR spektre na slikama br. 29 i 31 zbog šumovitosti je teško koristiti za kvalitativnu identifikaciju uzorka.

4.4. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA

Rezultati koji su dobiveni snimanjem netretiranih (kontrolnih) jabuka i jabuka prskanih (tretiranim) odgovarajućim koncentracijama suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG obrađeni su metodom analize glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis, PCA*). PCA se koristila u svrhu smanjenja dimenzionalnosti skupa NIR spektralnih podataka (kod multidimenzionalnih podataka teško je uočiti sličnosti i razlike među podacima) (Jolliffe i Cadima, 2016). U ovom radu PCA metoda je korištena kako bi se prikazale sličnosti odnosno razlike između netretiranih jabuka i onih koje su tretirane tj. prskane odgovarajućim koncentracijama suspenzija/otopina navedenih fungicida



Slika 40. PCA analiza izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnim koncentracijama (0,3 Ch; 0,05 Cu), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (100x_Ch; 100x_Cu) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (1000x_Ch; 1000x_Cu) fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG te kontrolnih (Netretirana) jabuka: a) nulti dan nakon tretiranja, b) petnaesti dan nakon tretiranja, c) dvadeset i prvi dan nakon tretiranja

Provedbom PCA analize s podacima koji su dobiveni NIR spektroskopijom za netretirane (kontrolne) i jabuke prskane (tretirane) odgovarajućim koncentracijama suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG za nulti, petnaesti i dvadeset i prvi dan nakon tretiranja vidljivo je da je na slici koja prikazuje nulti dan nakon tretiranja došlo do razdvajanja netretiranih jabuka od jabuka koje su tretirane odgovarajućim koncentracijama suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG (slika 40a). Netretirane jabuke su se pozicionirale u prvi kvadrant dok su se jabuke tretirane originalnom suspenzijom/otopinom fungicida pozicionirale u četvrti kvadrant za fungicid Chromosul 80 i treći kvadrant za fungicid Cuprablau Z 35 WG (slika 40a). Takvo razdvajanje netretiranih jabuka od onih kontaminiranih različitim koncentracijama suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG ukazuje na to da je PCA analiza razdvojila sve jabuke ovisno o tome jesu li tretirane s fungicidima ili nisu. Kod analize uzoraka koji su snimani petnaesti dan (slika 40b) i dvadeset i prvi dan (slika 40c) netretirane jabuke su se pozicionirale u isti kvadrant kao i jabuke koje su tretirane s otopinom fungicida Cuprablau Z 35 WG koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne otopine dok su se jabuke tretirane s originalnim suspenzijama/otopinama (0,3 Ch i 0,05 Cu) i jabuke tretirane suspenzijama/otopinama koje su sto puta razrjeđenije od originalne razdvojile od njih. Takvo pozicioniranje uzoraka u isti kvadrant ukazuje na sličnosti među uzorcima (slika 40b i 40c) (Jamshidi i Yazdanfar, 2022). Razlog takvog pozicioniranja jabuka koje su tretirane (kontaminirane) odgovarajućim razrjeđenjima suspenzija/otopina istraživanih fungicida u iste kvadrante s jabukama koje nisu tretirane ili su tretirane originalnom otopinom je nemogućnost NIR-a da detektira preniske koncentracije fungicida. Na slici 40 je vidljivo kako je za nulti, petnaesti i dvadeset i prvi dan PCA razdvojila jabuke koje su tretirane originalnim suspenzijama/otopinama (0,3 Ch i 0,05 Cu) istraživanih fungicida od jabuka koje nisu tretirane. Takvo pozicioniranje uzoraka u različite kvadrante sugerira na postojanje razlike među navedenim uzorcima (Kljusurić i sur., 2016).

Primjena PCA bila je učinkovita jer su se ispitivani uzorci razdvojili ovisno o tome s kojom su koncentracijom fungicida tretirani. Primjenu PCA u svojem su radu prethodno opisali Jamshidi i Yazdanfar (2022) koji su snimali NIR spektre na netretiranim (intaktnim) krastavcima iz polja i staklenika te na krastavcima koji su bili tretirani s odgovarajućim koncentracijama nitrata. NIR spektri obrađeni su metodom analize glavnih komponenata te je utvrđeno učinkovito razdvajanje krastavaca na temelju maksimalne granice nakupljanja nitrata prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization, WHO*). Primjenu PCA u svojim radovima su također opisali Kljusurić i suradnici (2016), Moniruzzaman i suradnici (2014) koji

su utvrdili da je PCA učinkovita u razdvajanju različitih vrsta bobičastog voća te različitih uzoraka meda.

Provedbom PCA analize s podacima koji su dobiveni NIR spektroskopijom za netretirane (kontrolne) i jabuke prskane (tretirane) odgovarajućim koncentracijama suspenzija fungicida Chromosul 80 vidljivo je da je gotovo na svim slikama došlo do razdvajanja netretiranih jabuka od jabuka koje su tretirane odgovarajućim koncentracijama suspenzija fungicida Chromosul 80 (prilog 1: a), b), d), e), f), prilog 2: a), b), c), d), f) i prilog 5: a)). Netretirane jabuke su u nultom, prvom, petom i dvanaestom danu pozicionirane u prvom kvadrantu (prilog 1: a), b), d) i prilog 2: c)) dok su za sljedeće dane pozicionirane u drugom (prilog 2: a), d) i f)), trećem (prilog 1: f) i prilog 2: b)) i četvrtom kvadrantu (prilog 1: e) i prilog 5: a)). U prilogu 1: a), prilogu 2: a), c), d), f) i prilogu 5: a) vidljivo je da je osim razdvajanja netretiranih jabuka od onih tretiranih odgovarajućim koncentracijama suspenzije fungicida Chromosul 80 došlo i do međusobnog razdvajanja jabuka kontaminiranih različitim koncentracijama suspenzija fungicida Chromosul 80 što ukazuje na to da je PCA analiza razdvojila sve jabuke ovisno o tome kojom su koncentracijom fungicida tretirane. Kod analize uzorka koji su snimani prvi, četvrti i šesti dan jabuke koje su prskane/kontaminirane većim koncentracijama fungicida (0,3 Ch i 100x Ch) pozicionirale su se u isti kvadrant i to u prvom (prilog 1: c), e)) i četvrtom kvadrantu (prilog 1: b)). Takvo pozicioniranje uzoraka u isti kvadrant sugerira na postojanje sličnosti među navedenim uzorcima (Jamshidi i Yazdanfar, 2022). Kod analize uzorka koji su snimani pet i sedmi dan jabuke koje su prskane originalnom suspenzijom (0,3 Ch) i suspenzijom koja je razrijeđena tisuću puta (1000x Ch) od originalnog uzorka pozicionirale su se u isti kvadrant i to u drugom (prilog 1: f)) i četvrtom kvadrantu (prilog 1: d)). Iz slike koja prikazuje PCA analizu izvornih NIR spektara jabuka za četrnaesti dan nakon tretiranja, jabuke koje su prskane koncentracijom koja je sto puta razrijeđenija od originalnog uzorka su pozicionirane u isti kvadrant kao i netretirane jabuke čime se sugerira postojanje sličnosti među navedenim uzorcima (prilog 2: e)). Na slikama koje prikazuju PCA analizu izvornih NIR spektara jabuka koje su prskane (tretirane) odgovarajućim koncentracijama fungicida Cuprablau Z 35 WG može se uočiti da je došlo do razdvajanja netretiranih jabuka od jabuka tretiranih odgovarajućim koncentracijama fungicida (prilog 3: c), d) e), prilog 4: a), b), c), f) i prilog 5: b)). Na slikama se može vidjeti da je za četvrti, peti, osmi, jedanaesti, dvanaesti dan i dvadeset i prvi dan također došlo do razdvajanja i jabuka koje su tretirane odgovarajućim koncentracijama otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG (Prilog 3: c), d), prilog 4: a), b), c), f) i prilog 5: b)) što ukazuje na to da se PCA analizom mogu uspješno kvalitativno razdvojiti uzorci jabuka na temelju

različitih koncentracija otopina fungicida kojima su tretirane. U prilogu 3: a), b), f) i prilogu 4: d), e) netretirane jabuke su se grupirale u isti kvadrant s jabukama tretiranim sa sto (100x Cu) ili tisuću (1000x Cu) puta razrjeđenijom otopinom, ali su se odvojile od jabuka koje su tretirane s originalnom otopinom (0,05 Cu); takvo pozicioniranje uzoraka u različite kvadrante sugerira na postojanje razlike među navedenim uzorcima (Kljusurić i sur., 2016). U prilogu 3: e) i prilogu 4: f) vidljivo je da su se jabuke tretirane originalnom otopinom (0,05 Cu) i one tretirane s razrjeđenjem od sto puta su se pozicionirale u isti kvadrant, ali su se razdvojile od jabuka koje su netretirane i tretirane s razrjeđenjem od tisuću puta što ukazuje na to da je PCA razdvojio jabuke prskane s većim koncentracijama otopine fungicida od netretiranih i kontaminiranih s otopinom najmanje koncentracije fungicida. Primjena PCA u razdvajanju uzoraka tretiranih i netretiranih jabuka fungicidom Cuprablau Z 35 WG bila je učinkovita jer su se ispitivani uzorci razdvojili ovisno o tome s kojom su koncentracijom tretirani. Primjenu PCA u svom radu su opisali Scripcă i Amariei (2021) koji su utvrdili da PCA može uspješno razdvojiti uzorke meda s obzirom na ostatke pesticida koji su prisutni u medu. U njihovom istraživanju PCA je uspješno razdvojila med od suncokreta u kojem su uočeni ostaci aldrina, endrina, klordana i klorpirifosmetila od meda uljane repice u kojem su uočeni ostaci ostaci lindana i endosulfana. Metodu analize glavnih komponenata u svojim radovima također su koristili Jamshidi i Yazdanfar (2022), Kljusurić i suradnici (2016), Moniruzzaman i suradnici (2014) koji su utvrdili da je PCA učinkovita u razdvajanju krastavaca na temelju maksimalne granice nakupljanja nitrata, razdvajanju različitih vrsta bobičastog voća i različitih uzoraka meda.

5. ZAKLJUČCI

1. Vrijednosti TDS-a i vodljivosti za suspenzije/otopine istraživanih fungicida uglavnom su pokazivale padajući trend kako se smanjivala koncentracija fungicida. Najveće promjene boje (ΔE^*) zabilježene su kod suspenzija fungicida Chromosul 80 koje su razrijeđene 700 puta, 900 puta i 1000 puta i otopine fungicida Cuprablau Z 35 WG koja je razrijeđena 30 puta u odnosu na originalne uzorke.
2. NIR spektri odgovarajućih razrjeđenja suspenzije fungicida Chromosul 80 imaju jako slične apsorbancije diljem čitavog spektra valnih duljina. Veće vrijednosti apsorbancija zabilježene su kod NIR spektara za originalnu suspenziju i suspenziju fungicida Chromosul 80 koja je razrijeđena 10 puta. NIR spektri za pripremljenu otopinu fungicida Cuprablau Z 35 WG te njegovih odgovarajućih razrjeđenja razdvojili su se u dvije skupine (originalna otopina i odgovarajuća razrjeđenja) diljem čitavog spektra valnih duljina.
3. Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između NIR spektara i fizikalnih karakteristika suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja. PLS modeli se mogu koristiti za kalibraciju, validaciju i predikciju TDS-a i vodljivosti istraživanih fungicida ($R^2 \geq 0,9$). Utvrđena je manja primjenjivost PLS modela za opisivanje eksperimentalno dobivenih ΔE vrijednosti ($R^2 \leq 0,75$).
4. NIR spektri netretiranih i jabuka prskanih (tretiranih) istraživanim fungicidima bili su slabo informativni u pronalaženju razlika među njima. Razlog tome je složena priroda NIR spektara koja stvara poteškoće u njihovoj izravnoj interpretaciji.
5. Analiza glavnih komponentata (PCA) uspješno je razdvojila uzorke suspenzija/otopina istraživanih fungicida i njihovih razrjeđenja, pri čemu su se originalne suspenzije/otopine fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG razdvojile od njihovih odgovarajućih razrjeđenja. PCA je kvalitativno razdvojila uzorke jabuka tretiranih originalnom suspenzijom/otopinom istraživanih fungicida od netretiranih. Kombinacijom snimljenih NIR spektara i primjenom PCA analize uspješno se mogu uočiti sličnosti odnosno razlike među promatranim uzorcima (tretirane i netretirane jabuke).

6. LITERATURA

- Abdi H (2010) Partial least square regression, projection on latent structure regression, PLS-Regression. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* **2**, 97-106.
- Beć KB, Grabska J, Badzoka J, Huck, CW (2021) Spectra-structure correlations in NIR region of polymers from quantum chemical calculations. The cases of aromatic ring, C=O, C≡N and C-Cl functionalities. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **5**, 262.
- Berrueta LA, Alonso-Salces RM, Héberger K (2007) Supervised pattern recognition in food analysis. *J. Chromatogr* **1158**, 196–214.
- Blanco M, Villarroya I (2002) NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC, Trends Anal. Chem* **21** (4), 240–250.
- Bogdanović T, Pleadin J, Murati T, Kmetić I (2017) Kemijska onečišćivala iz okoliša i njihovi ostaci u hrani životinjskog podrijetla. *HČPTBN* **12**, 19–29.
- Boyer J, Liu RH (2004) Apple Phytochemicals and Their Health Benefits. *Nutr* **12**, 3-5
- Badr Eldin A (2011) Near Infra Red Spectroscopy. U: Akyar I (ured.) Wide Spectra of Quality Control, InTech, Rijeka, str. 238-248.
- Burns D A, Ciurczak W (2008) Handbook of near infrared analysis, 3. izd., Taylor & Francis Group, Boca Raton, str. 50-100.
- Butler B A, Ford R G (2018) Bewertung der Beziehungen zwischen der Gesamtsumme gelöster Feststoffe und der gesamten Schwebstoff-Fracht in einem bergbaubeeinflussten Wassereinzugsgebiet. *Mine Water Environ* **37** (1), 18–30.
- Commision Regulation (EC) 396/2005, 1881 1 (2006). <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20100701:EN:PD>
- Crocombe, R. A. (2018) Portable spectroscopy. *Appl Spectro* **72**, 1701-1751.
- Damos P, Colomar LA, Ioriatti C (2015) Integrated Fruit Production and Pest Management in Europe: The Apple Case Study and How Far We Are from the Original Concept? *Insects* **6**, 626–657.
- Davies AMC (2000) William Herschel and the Discovery of near Infrared Energy. *NIR News* **11** (2), 3–5.

- Dragović R (2017) Značenje oznaka na sredstvima za zaštitu bilja. Agro klub Hrvatska. <https://www.agroklub.com/poljoprivredne-vijesti/znacenje-oznaka-na-sredstvima-za-zastitu-bilja/36701/>. Pristupljeno 10. svibnja 2022.
- Državni zavod za statistiku, <<https://dzs.gov.hr/>> Pristupljeno 19. lipnja 2022.
- El Hawari K, Mokh S, Al Iskandarani M, Halloum W, Jaber F (2019) Pesticide residues in Lebanese apples and health risk assessment. *Food Addit Contam: B Surveill* **12** (2), 81–89.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2022) The 2020 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* **20** (3): 7215.
- Eustaquio A, Blanco M, Jee R D, & Moffat, A. C. (1999) Determination of paracetamol in intact tablets by use of Near Infrared Transmittance Spectroscopy. *Anal Chim Acta* **383** (3), 283-290.
- Ferretti G, Turco I, Bacchetti T (2014) Apple as a Source of Dietary Phytonutrients: Bioavailability and Evidence of Protective Effects against Human Cardiovascular Disease. *Food Sci Nutr* **5** (13), 1234–1246.
- Gajdoš Kljusurić J, Valinger D, Jurinjak Tušek A, Benković M, Jurina T (2017) Application of Near Infrared Spectroscopy (NIRs), PCA and PLS models for the analysis of dried medicinal plants. U: Méndez-Vilas A (ured.) Science within Food: Up-to-date Advances on Research and Educational Ideas, Formatex Research Center, Badajoz, str. 28-35.
- Gazeli O, Stefas D, Couris S (2021) Sulfur detection in soil by laser induced breakdown spectroscopy assisted by multivariate analysis. *Materials* **14** (3), 1–16.
- Guthrie J, Wedding B, Walsh K (1998) "Robustness of NIR Calibrations for Soluble Solids in Intact Melon and Pineapple," *J Near Infrared Spectrosc* **6**, 259-265.
- Hanely QS (2012) Fourier transforms simplified: computing an infrared spectrum from an interferogram. *J Chem Educ* **89**, 391–396.
- Heberger K (2008) Chapter 7 – Chemoinformatics – multivariate mathematical – statistical methods for data evaluation. U: Vekey K, Telekes A, Vertes A (ured.) Medical applications of Mass Spectrometry, Elsevier, Amsterdam str.141-169.
- Hervik A K, Svihus B (2019) The role of fiber in energy balance. *J Nutr and Metab* 1-6.

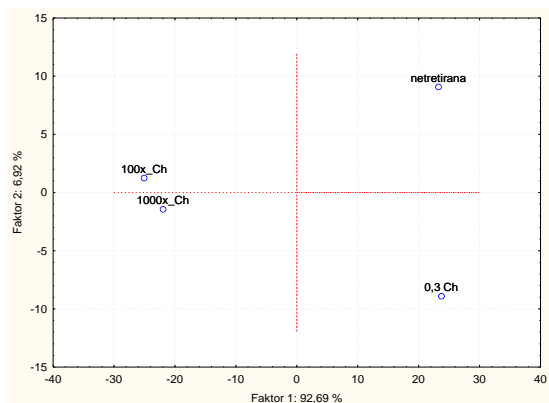
- Huck CW (2021) New Trend in Instrumentation of NIR Spectroscopy—Miniaturization. U: Ozaki Y, Huck C, Tsuchikawa S, Engelsen SB (ured.) Near-Infrared Spectroscopy. Springer, Singapore, str. 193- 210.
- Hyson DA (2011) A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Adv Nutr* **2** (5), 408–420.
- Ikehata A, Ohara K, Shinzawa H, Ozaki Y (2008) Sensitive detection and identification of organic liquids using the second derivative of surface plasmon resonance near-infrared spectra. *Appl Spectrosc* **62** (5), 517–524.
- Jamshidi B, Mohajerani E, Jamshidi J, Minaei S, Sharifi A (2015) Non-destructive detection of pesticide residues in cucumber using visible/near-infrared spectroscopy. *Food Addit Contam - Chem Anal Control Expo Risk Assess* **32** (6), 857–863.
- Jamshidi B (2017) Non-destructive safety assessment of agricultural products using Vis/NIR spectroscopy. *NIR News* **28** (1) 4-8.
- Jamshidi B, Yazdanfar N (2022) Development of a spectroscopic approach for non-destructive and rapid screening of cucumbers based on maximum limit of nitrate accumulation. *J food compos anal* **110**, 5-6.
- Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem Ind* **62**, 71-80.
- Jensen EN, Buch-Andersen T, Ravn-Haren G, Dragsted L (2009) Mini-Review: The Effects of Apples on Plasma Cholesterol Levels and Cardiovascular Risk—A Review of the Evidence. *J Hortic Sci Biotechnol* 34-41.
- Jolliffe IT, Cadima J(2016) Principal component analysis: A review and recent developments. *Philos Trans R Soci A: Math Phys Eng Sci* 374(2065).
- Jolliffe IT (2006) Principal Component Analysis, 2. izd. Springer, New York, str. 1-10.
- Khan N, Yaqub G, Hafeez T (2020) Tariq, M. Assessment of Health Risk due to Pesticide Residues in Fruits, Vegetables, Soil, and Water. *J Chem* 1–7.
- Kljusurić JG, Mihalev K, Bečić I, Polović I, Georgieva M, Djaković S, Kurtanjek Ž (2016) Near-infrared spectroscopic analysis of total phenolic content and antioxidant activity of berry fruits. *Food Technol Biotechnol* **54** (2), 236–242.

- Lara-Espinoza C, Carvajal-Millán E, Balandrán-Quintana R, López-Franco Y, Rascón-Chu, A (2018) Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules* **23** (4) 1-35.
- Lee CY (2012) Common Nutrients and Nutraceutical Quality of Apples. *New York Fruit Quarterly* **20** (3), 3.
- Levaj B (2018) Minimalno procesiranje voća i povrća. Nastavni materijal, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SN, Michotte Y, Kaufmann L (1988) Chemometrics: A Textbook, Elsevier, Amsterdam str. 298-299.
- Mathias O (2007) Chemometrics, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Matijević B, Blazić M (2008) Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo* **58** (2) 151-169.
- Mausser GA, Hartigan JA (1977) Clustering Algorithms. *J Mark Res* **14** (1), 124.
- Mokrzycki WS, Tatol M (2011) Color difference Delta E - A survey. *Mach Grap Vis* **20**, 383-411
- Moniruzzaman M, Chowdhury MAZ, Rahman MA, Sulaiman SA, Gan SH (2014) Determination of mineral, trace element, and pesticide levels in honey samples originating from different regions of Malaysia compared to Manuka honey. *BioMed Res Int* **2014**, 4–7.
- Monteiro ARD, Feital TS, Pinto, JC (2017) Statistical Aspects of Near-Infrared Spectroscopy for the Characterization of Errors and Model Building. *Appl Spectrosc* **71** (7), 1665–1676.
- Murati T, Šimić B, Kniewald J, Pleadin J, Kmetič I (2014) Organoklorovi insekticidi – mehanizmi toksičnog djelovanja. *Croat J Food Sci Technol* **9**, 97 – 109.
- Nazarloo AS, Sharabiani VR, Gilandeh YA, Taghinezhad E, Szymanek M, Sprawka M (2021) Feasibility of using VIS/NIR spectroscopy and multivariate analysis for pesticide residue detection in tomatoes. *Process* **9** (2), 1–13.
- Ozaki Y, Huck CW (2021) Introduction. U: Ozaki Y, Huck C, Tsuchikawa S, Engelsen SB (ured.) Near-Infrared Spectroscopy. Springer, Singapore, str. 3-35.

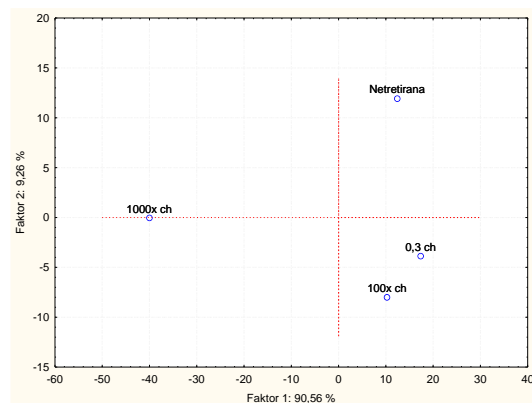
- Palfi M, Knežević N, Vrandečić K, Ćosić, J (2018) *Glasiilo biljne zaštite* 4/2020. 18, 427–433.
- Pasquini, C. (2003). Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical application. *J Braz Chem Soc* **14** (2), 210.
- Pem D, Jeewon R (2015) Fruit and vegetable intake: Benefits and progress of nutrition education interventions-narrative review article. Iran. *J Public Health* **44**, 1309–1321.
- Redaelli R, Berardo N (2014) Evaluation of groat percentage in oats (*avena sativa* L.) by near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc* **10**, 4.
- Saoudi O, Ghaouar N, Othman T (2017) Conductivity measurements of laccase for various concentrations, pH and ionic liquid solutions. *Fluid Ph Equilibria* **433**, 184–192.
- Scripcă LA, Amariei S (2021) The influence of chemical contaminants on the physicochemical properties of unifloral and multifloral honey. *Foods* **10** (5).
- Shan R, Chen Y, Meng L, Li H, Zhao Z, Gao M, Sun X (2020) Rapid prediction of atrazine sorption in soil using visible near-infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* **224**, 117455
- Sharabiani VR, Nazarloo AS, Taghinezhad E (2019) Prediction of Protein Content of Winter Wheat by Canopy of Near Infrared Spectroscopy (NIRS), Using Partial Least Squares Regression (PLSR) and Artificial Neural Network (ANN) Models. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Derg*, **29**, 43–51
- Singh DK (2012) *Toxicology: Agriculture And Environment: Pesticide Chemistry And Toxicology*, Bentham Science Publishers, Delhi, str.3.
- Slavin JL, Lloyd B (2012) Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Adv Nutr* **3**, 506–516.
- Smetiško J (2018) Application of Nir Spectroscopy in the Study of Allopurinol Dissolution From Immediate Release Uncoated Tablets. University of Zagreb, Zagreb.
- Song W, Wang H, Maguire P, Nibouche O (2017) Differentiation of organic and non-organic apples using near infrared reflectance spectroscopy - A pattern recognition approach. *Proc IEEE Sens* 2–5.
- Thajuddin N (2011) *Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects*, IntechOpen, London.

- Umeljić V (2004) U svijetu cvijeća i pčela: atlas medonosnog bilja, Split.
- Vallée Marcotte B, Verheyde M, Pomerleau S, Doyen A, Couillard C (2022) Health Benefits of Apple Juice Consumption: A Review of Interventional Trials on Humans. *Nutrients* **14** (4), 1–21.
- Van Den Broek WHAM, Derks EPPA, Van De Ven EW, Wienke D, Geladi P, Buydens LMC (1996) Plastic identification by remote sensing spectroscopic NIR imaging using kernel partial least squares (KPLS). *Chemom Intell Lab Syst* **35** (2), 187–197
- Walton NRG (1989) Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids—What is Their Precise Relationship? *Desalination* **72** (3), 275–292.
- Wold S, Sjöström M (1998) Chemometric, present and future success. *Chemom Intell Lab Syst*, **44**, 3-14.
- Yazici A, Tiryaki GY, Ayvaz H (2019) Determination of Pesticide Residual Levels in Strawberry (*Fragaria*) By Near-Infrared Spectroscopy. *J Sci Food Agric* **100**, 1980–1989.
- Yi S, Deng L, He S, Zheng Y, Zhang X (2010) Research on nitrogen content of leaf of Jincheng orange cultivar using visible near infrared spectroscopy model. *J Fruit Sci* **27**, 13–17.

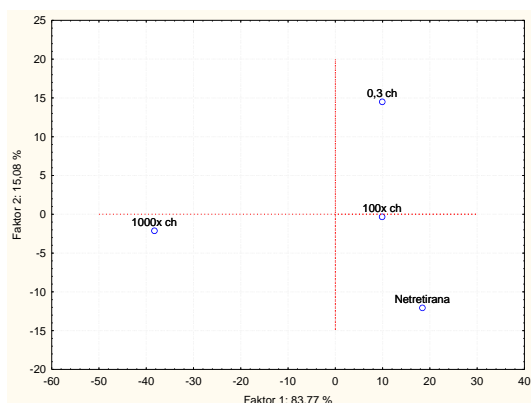
7. PRILOZI



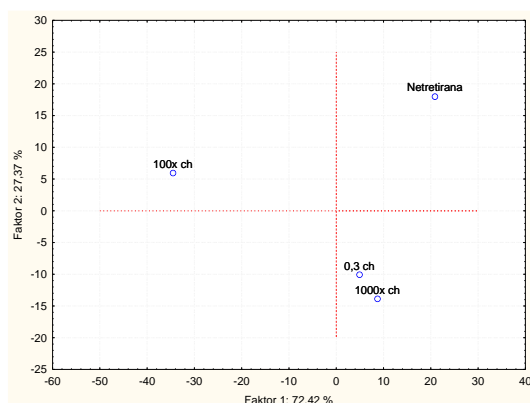
a)



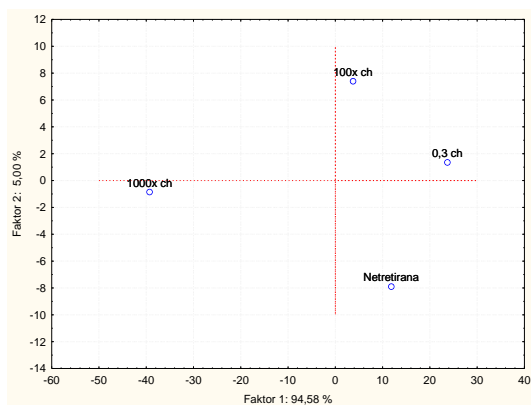
b)



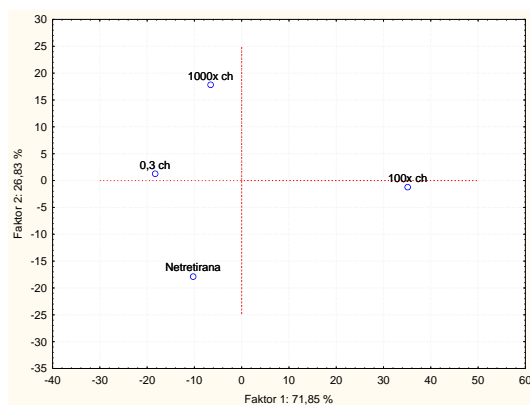
c)



d)

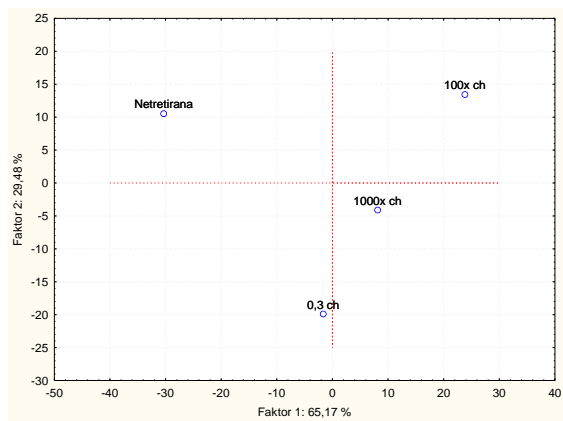


e)

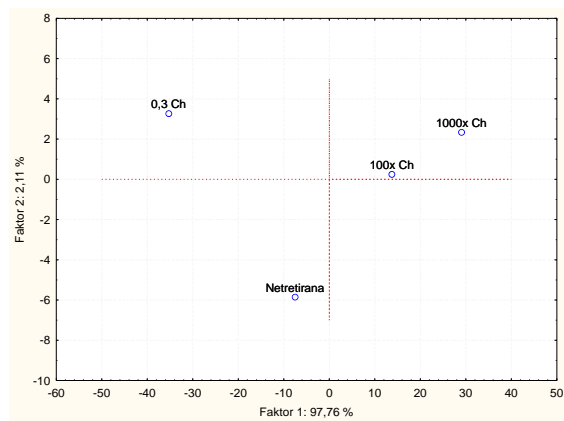


f)

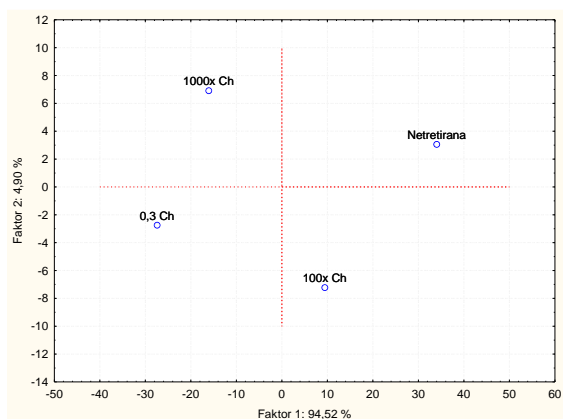
Prilog 1. PCA analiza izvornih NIR spektara jabuka tretiranih a) nulti, b) prvi, c) četvrti, d) peti, e) šesti i f) sedmi dan originalnom koncentracijom (0,3 Ch), 100 puta razrijeđenom koncentracijom (100x_Ch) te 1000 puta razrijeđenom koncentracijom (1000x_Ch) fungicida Chromosul 80 te kontrolnih (netretirana) jabuka



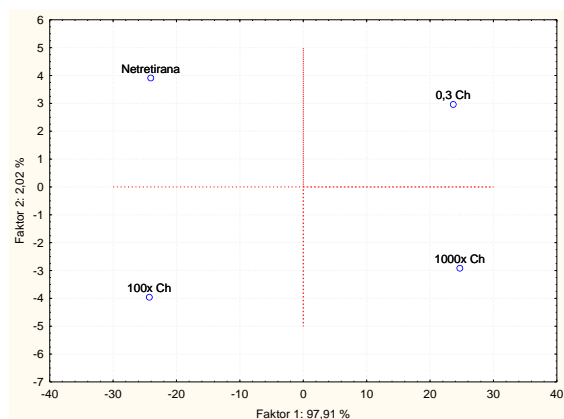
a)



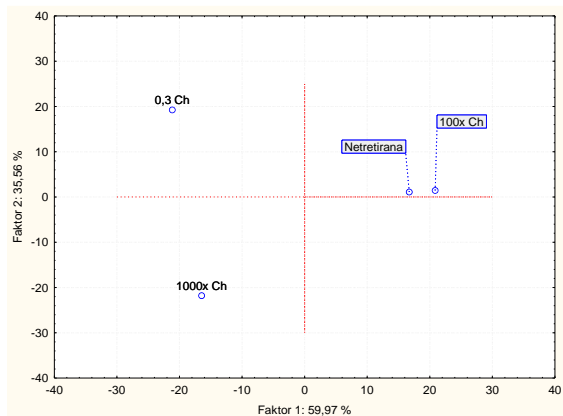
b)



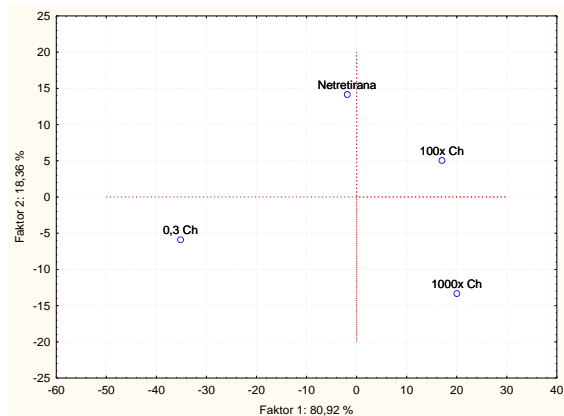
c)



d)

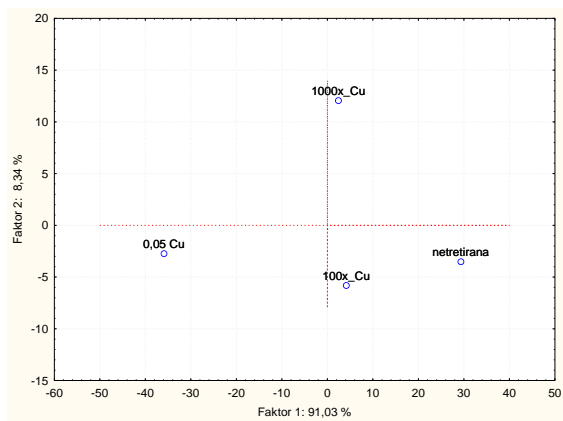


e)

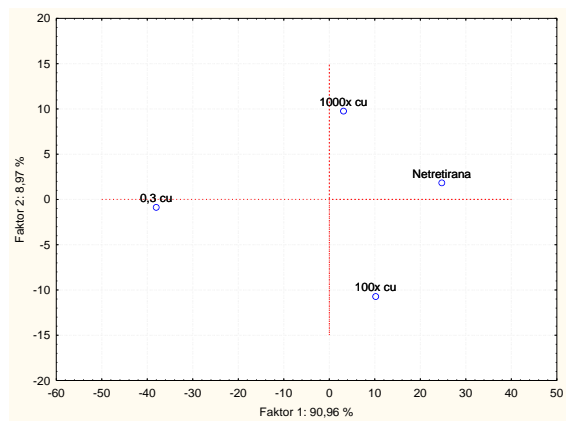


f)

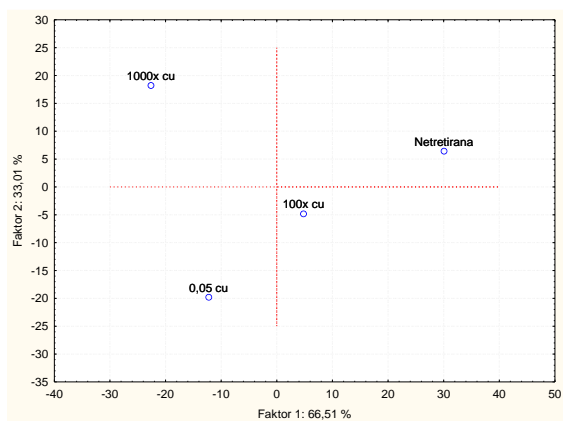
Prilog 2. PCA analiza izvornih NIR spektara jabuka tretiranih a) osmi, b) jedanaesti, c) dvanaest, d) trinaesti, e) četrnaesti i f) petnaesti dan originalnom koncentracijom (0,3 Ch), 100 puta razrijeđenom koncentracijom (100x_Ch) te 1000 puta razrijeđenom koncentracijom (1000x_Ch) fungicida Chromosul 80 te kontrolnih (netretirana) jabuka



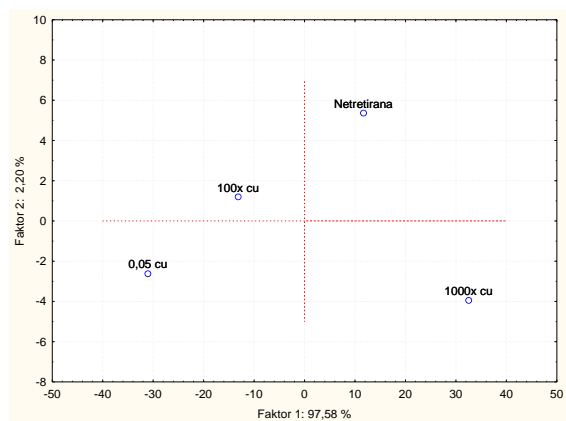
a)



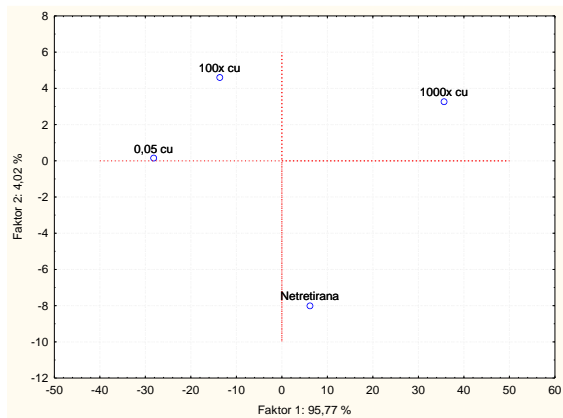
b)



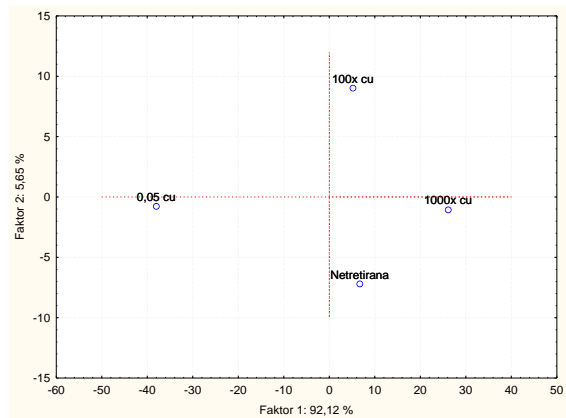
c)



d)

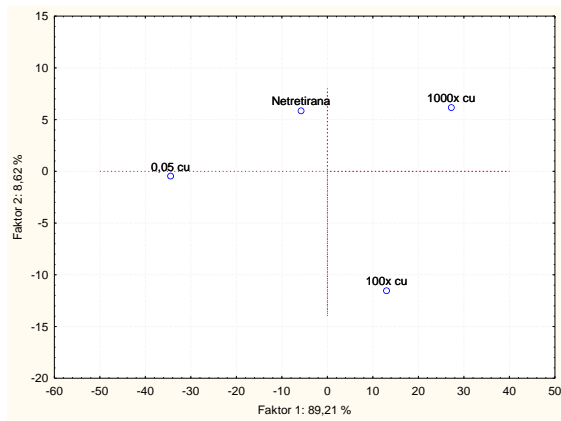


e)

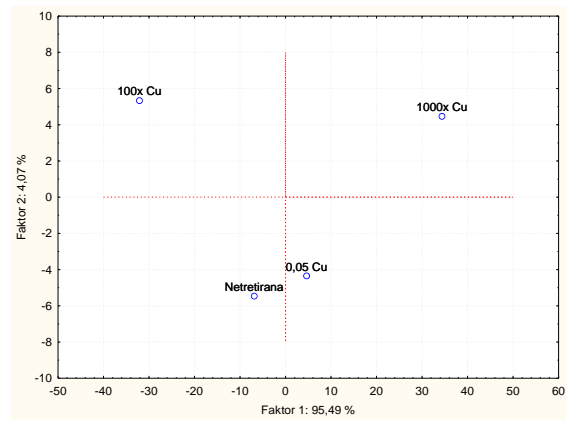


f)

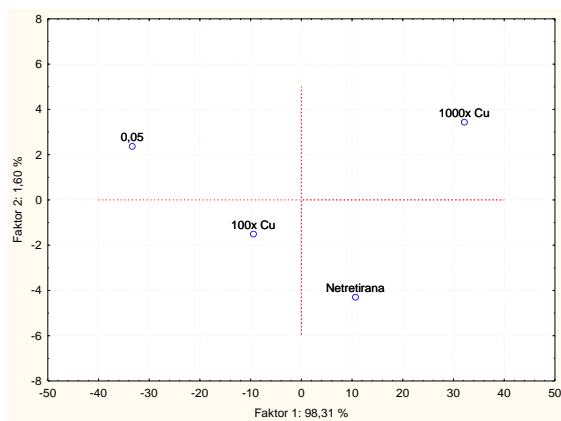
Prilog 3. PCA analiza izvornih NIR spektara jabuka tretiranih a) nulti, b) prvi, c) četvrti, d) peti, e) šesti i f) sedmi dan originalnom koncentracijom (0,0 Cu), 100 puta razrijeđenom koncentracijom (100x_Cu) te 1000 puta razrijeđenom koncentracijom (1000x_Cu) fungicida Cuprablau Z 35 WG te kontrolnih (netretirana) jabuka



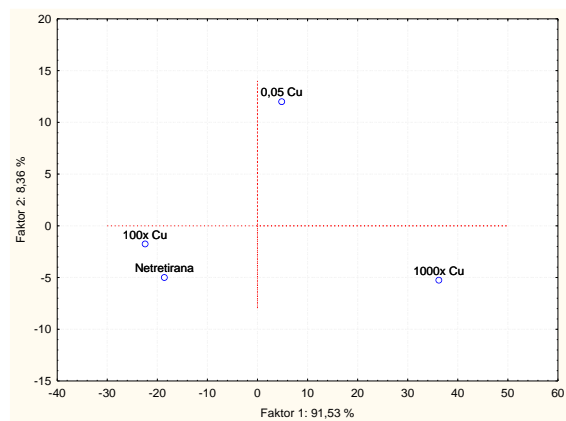
a)



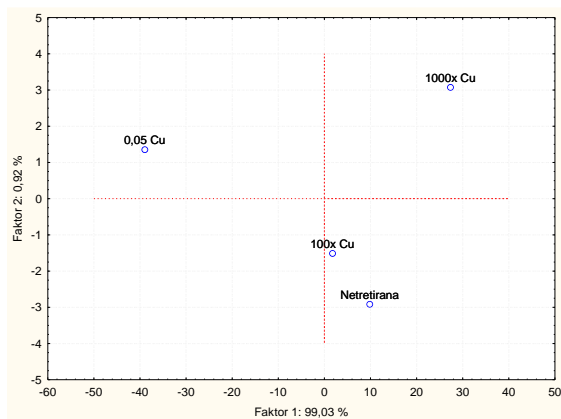
b)



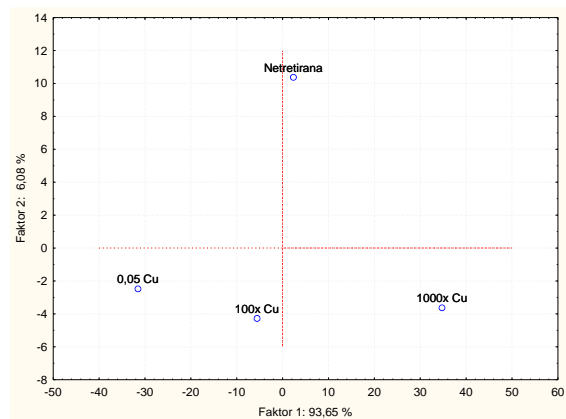
c)



d)

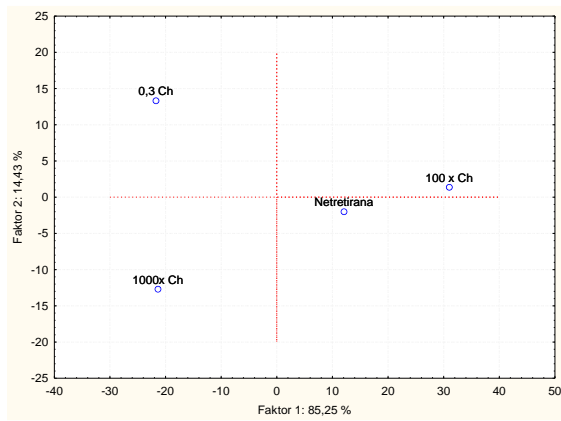


e)

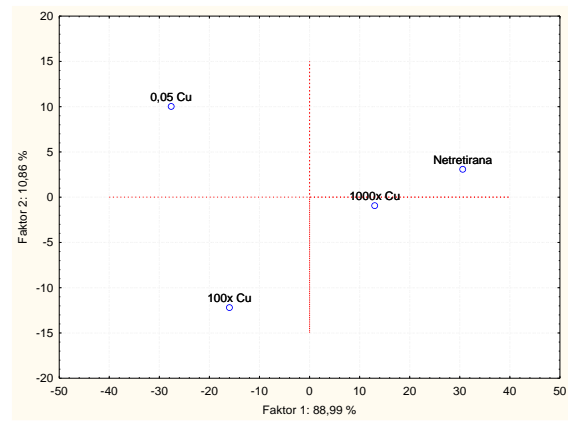


f)

Prilog 4. PCA analiza izvornih NIR spektara jabuka tretiranih a) osmi, b) jedanaesti, c) dvanaesti, d) trinaesti, e) četrnaesti i f) petnaesti dan originalnom koncentracijom (0,0 Cu), 100 puta razrijeđenom koncentracijom (100x_Cu) te 1000 puta razrijeđenom koncentracijom (1000x_Cu) fungicida Cuprablau Z 35 WG te kontrolnih (netretirana) jabuka



a)



b)

Prilog 5. PCA analiza izvornih NIR spektara jabuka tretiranih dvadeset i prvi dan originalnim koncentracijama (0,3 Ch; 0,05 Cu), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (100x_Ch; 100x_Cu) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (1000x_Ch; 1000x_Cu) fungicida Chromosul 80 (a) i Cuprablau Z 35 WG (b) te kontrolnih (Netretirana) jabuka

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis