

Primjena blisko infracrvene spektroskopije u detekciji fungicida Chromosul i Cuprablau prisutnih u jabukama

Severec, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:824775>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2024.

Mihaela Severec

**PRIMJENA BLISKO INFRACRVENE
SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI
FUNGICIDA CHROMOSUL I CUPRABLAU
PRISUTNIH U JABUKAMA**

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

Zahvaljujem se mojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Tamari Jurina na pomoći i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

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: Upravljanje sigurnošću hrane

PRIMJENA BLISKO INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI FUNGICIDA CHROMOSUL I
CUPRABLAU PRISUTNIH U JABUKAMA

Mihaela Severec, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058213527

Sažetak: U ovom radu glavni cilj bio je istražiti učinkovitost NIR spektroskopije (engl. *Near Infrared Spectroscopy*, NIRs) za kvalitativno određivanje prisutnosti fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG na površini jabuka. Jabuke su tretirane različitim koncentracijama istraživanih fungicida te su, tijekom trojednog vremenskog perioda, snimane pomoću tri NIR spektrofotometara u rasponu valnih duljina $\lambda = 904 - 2500$ nm.. Primjenom NIR spektara, u kombinaciji sa analizom glavnih komponenata, uspješno su razdvojeni (i) originalni uzorci suspenzija/otopina fungicida od njihovih odgovarajućih razrjeđenja te (ii) tretirani uzorci jabuka u odnosu na netretirane (kontrolne) uzorke. Kako bi se ustanovila povezanost između NIR spektara i fizikalnih karakteristika (ukupne otopljene tvari, vodljivost, boja) suspenzija/otopina istraživanih fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja, razvijeni su PLS (engl. *Partial Least Squares*) regresijski modeli koji su pokazali da postoji linearna zavisnost između absorpcijskih vrijednosti u NIR području te fizikalnih karakteristika (ukupne otopljene tvari, vodljivost) istraživanih fungicida ($R^2 \geq 0,9$).

Ključne riječi: *blisko infracrvena spektroskopija, kemometrija, fungicidi, jabuka*

Rad sadrži: 68 stranica, 33 slike, 7 tablica, 32 literaturna navoda, 19 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tamara Jurina

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 26. rujna 2024.

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: Food Safety Management

APPLICATION OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY IN THE DETECTION OF CHROMOSUL AND CUPRABLAU FUNGICIDES PRESENT IN APPLES

Mihaela Severec, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058213527

Abstract: The aim of this work was to investigate the effectiveness of Near Infrared Spectroscopy (NIRs) for the qualitative determination of the presence of fungicides Chromosul 80 and Cuprablau Z 35 WG on the surface of apples. Apples were treated with different concentrations of the fungicides and, during a three-week period, were recorded in the range $\lambda = 904 - 2500$ nm. NIR spectroscopy, in combination with Principal Component Analysis, successfully separated (i) the fungicide suspensions/solutions from their dilutions, as well as (ii) treated apple samples compared to untreated (control) samples. In order to establish the relationship between NIR spectra and physical characteristics (total dissolved solids, conductivity, color) of suspensions/solutions of the investigated fungicides and their corresponding dilutions, Partial Least Squares models were developed showing a linear relationship between NIR spectra and physical characteristics (total dissolved solids, conductivity) of the investigated fungicides ($R^2 \geq 0.9$).

Keywords: near-infrared spectroscopy, chemometrics, fungicides, apple

Thesis contains: 68 pages, 33 figures, 7 tables, 32 references, 19 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Tamara Jurina, PhD, Associate professor

Reviewers:

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

Thesis defended: September 26th, 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. JABUKA (<i>Malus domestica</i>).....	2
2.1.1. Nutritivna vrijednost jabuke.....	2
2.1.2. Biološke aktivne komponentne u jabuci.....	2
2.1.2.1. <i>Fitokemikalije</i>	3
2.1.2.2. <i>Vitamin C</i>	3
2.1.2.3. <i>Dijetalna vlakna</i>	3
2.1.2.4. <i>Pektin</i>	4
2.2. PESTICIDI.....	4
2.2.1. Utjecaj pesticida na okoliš.....	5
2.2.2. Pesticidi na jabukama.....	5
2.3. BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA.....	6
2.3.1. Principi rada blisko infracrvene spektroskopije.....	6
2.3.2. Instrumenti koji se koriste u blisko infracrvenoj spektroskopiji.....	8
2.3.3. Kemometrija.....	11
2.3.3.1. <i>Analiza glavnih komponenata</i>	12
2.3.3.2. <i>Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS)</i>	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Uzorci jabuka.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Aparatura.....	13
3.1.4. Pribor.....	13
3.2. METODE.....	14
3.2.1. Priprema uzorka.....	14
3.2.1.1. <i>Priprema originalnih suspenzija/otopina fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja</i>	14
3.2.1.2. <i>Kontaminacija jabuka istraživanim fungicidima</i>	16
3.2.2. Mjerenje ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti suspenzija/otopina istraživanih fungicida.....	18
3.2.3. Određivanje boje uzoraka suspenzija/otopina istraživanih fungicida.....	18
3.2.4. Blisko infracrvena (NIR) spektroskopija.....	19
3.2.5. Obrada dobivenih podataka.....	20
3.2.5.1. <i>Analiza glavnih komponenata</i>	20
3.2.5.2. <i>Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata</i>	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA PRIPREMLJENIH SUSPENZIJA/OTOPINA ISTRAŽIVANIH FUNGICIDA CHROMOSUL 80 I CUPRABLAU Z 35 WG TE 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.....	27
KARAKTERISTIKA ISTRAŽIVANIH FUNGICIDA	
4.2.1. Blisko infracrveni (NIR) spektri pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja.....	27

4.2.2.	Analiza glavnih komponenata izvornih spektara, snimljenih u blisko infracrvenom području, pripremljenih otopina/suspenzija istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja.....	30
4.2.3.	Modeli parcijalne linearne regresije metodom najmanjih kvadrata za fizikalne karakteristike istraživanih otopina/suspenzija fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja.....	33
4.3.	NIR SPEKTRI TRETIRANIH (PRSKANIH) TE NETRETIRANIH (KONTROLNIH) UZORAKA JABUKA TIJEKOM TROTJEDNOG VREMENSKOG PERIODA.....	39
4.4.	ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA.....	61
5.	ZAKLJUČCI.....	65
6.	LITERATURA.....	66

1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja bila bi nezamisliva bez pesticida. Vrlo su učinkoviti kao sredstvo kojima se kontrolira pojava korova toga je zabilježeno značajno povećanje njihove primjene u poljoprivrednim proizvodima. U 20. stoljeću porast svjetske populacije morao je značiti i porast proizvodnje hrane što je poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji zadalo nove izazove. Čak trećina poljoprivrednih proizvoda ovisi upravo o primjeni pesticida. Bez njihove upotrebe proizvodnja voća pala bi za 78 %, proizvodnja povrća za 54 % te proizvodnja žitarica za 78 %. Može se zaključiti da pesticidi imaju vrlo važnu ulogu u povećanju prinosa diljem planete Zemlje kako bi se osigurala dostatna količina hrane za cijelu populaciju (Tudi i sur., 2021).

Kako suvremena poljoprivreda uvelike ovisi o pesticidima vrlo je bitno provoditi i kontrole koje nam daju bolji uvid izloženosti tim tvarima u hranidbenom lancu. Ekspanzija njihove primjene i potražnje za sobom donosi i određene posljedice. Pesticidi u ekosustav ulaze putem vode i zraka i koncentriraju se cijelim putem hranidbenog lanca što posljedično dovodi do opasnosti za bioraznolikost i ljudsko zdravlje. Kako su postali neizostavan dio moderne poljoprivrede potreban je razvoj tehnologije razgradnje ostataka pesticida kako bi se sve moguće negativne posljedice na ekosustav i samu Zemlju smanjile na minimum (Roumeng i sur., 2023).

Ovaj rad bavi se ispitivanjem mogućnosti primjene blisko infracrvene spektroskopije (engl. *Near Infrared Spectroscopy*, NIRs), koja predstavlja nedestruktivnu i brzu metodu, za kvalitativnu detekciju fungicida na površini jabuka (za potrebe ovog istraživanja koristili su se Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG). Jabuke kupljene u jednom trgovačkom lancu tretirane su s različitim koncentracijama ispitivanih fungicida. Tijekom trodnevnog vremenskog razdoblja snimani su NIR spektri s tri različita uređaja, u rasponu valnih duljina $\lambda = 904 - 1699$ nm, $\lambda = 1000 - 2500$ nm te $\lambda = 900 - 1700$ nm. Snimljeni spektri obrađeni su metodom glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) kako bi se utvrdilo postoji li razlika između tretiranih i netretiranih (kontrolnih) uzoraka jabuka. Također, korištena je i parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) za analizu mogućnosti predikcije fizikalnih karakteristika (ukupne otopljene tvari, vodljivost i boja) suspenzija/otopina fungicida na temelju njihovih snimljenih NIR spektara.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JABUKA (*Malus domestica*)

Jabuke su česta namirnica na kojoj se vrše istraživanja iz nekoliko razloga: vrlo su pristupačne i jeftine te imaju visoku nutritivnu vrijednost te sadrže mnoštvo bioaktivnih komponenata što ih čini pogodnim za istraživanja iz raznih područja znanosti.

2.1.1. Nutritivna vrijednost jabuke

Jabuka je jedna od ekonomski i kulturno najznačajnijih voća koja je bogata hranjivim tvarima te se uzgaja u svim umjerenim klimatskim zonama. Cijeli plod je jestiv osim sjemenki te se od njezinog ploda proizvode sokovi, džemovi, kompoti i čajevi. Jabuke su uvijek dobrodošle u ljudskoj prehrani, budući da jačaju imunitet te imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje jer sadrže brojne bioaktivne komponente. Bioaktivne komponente kao što su polifenoli, polisaharidi, pentaciklički triterpeni i organske kiseline i biljni steroli djeluju antioksidativno, antikancerogeno te protuupalno, a njihova se koncentracija razlikuje u pulpi i koži. Također, jabuka sadrži vitamine gdje glavnu ulogu ima vitamin C, zatim vitamin E, β -karoten i esencijalne mineralne elemente kao što su kalcij, željezo, kalij, mangan, cink, magnezij, bakar i sumpor. Jabuke su dobar izvor jednostavnih ugljikohidrata, posebno fruktoze, koji je prirodno prisutni šećer u mnogim voćkama. Također, važna komponenta koju sadrži su prehrambena vlakna koja imaju ulogu u održavanju zdravlja probavnog sustava i pomažu u regulaciji razine šećera u krvi (Patocka i sur., 2020).

2.1.2. Biološke aktivne komponente u jabuci.

Jabuke imaju visoku nutritivnu vrijednost te su bogate mnogim nutrijentima, a posebice bioaktivnim komponentama kao što su fitokemikalije, vitamin C, dijetalna vlakna i pektin.

2.1.2.1. Fitokemikalije

Fitokemikalije su sekundarni metaboliti biljaka, a u jabukama su prisutni u obliku polifenola. Koncentracije fitokemikalija ovise o kultivaru, berbi i skladištenju. Najviše se gube tijekom prerade samih jabuka. Pripisuju im se mnoge zdravstvene dobrobiti, ponajprije zahvaljujući njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti. U svojoj kemijskoj strukturi posjeduju elektrone kojima „hvataju“ druge slobodne elektrone tj. slobodne radikale te sprječavaju oštećenje stanica. Smanjenjem oksidativnog stresa smanjuje se oštećenje stanica izazvano starenjem te dolazi do prevencije raznih stanja: dijabetesa tipa 2, hipertenzije, astme, kardiovaskularnih te neurodegenerativnih bolesti (Vallée Marcotte i sur., 2022).

Imaju snažno protuupalno djelovanje. Mogu inhibirati sintezu i apsorpciju kolesterola te poboljšavaju njihov metabolizam. Ubrzavaju zacjeljivanje rana, poboljšavaju kapilarnu cirkulaciju te promiču proliferaciju mišićnih stanica (Patocka i sur., 2020).

U kemijskom sastavu jabuka prisutno je pet skupina polifenola: flavonoli (kvercetin, glikozidi), fenolne kiseline (klorogena, galna i kumarinska kiselina), dihidrochalkoni (florelin glikozidi), antocijanidini i flavanoli (katehin, epikatehin, procijanidin) (Vallée Marcotte i sur., 2022).

2.1.2.2. Vitamin C

Jabuke imaju visoku koncentraciju vitamina C. Vitamin C je prisutan u voću i snažan je antioksidans. Ima bitnu ulogu u regeneraciji vitamina E te štiti stanice od oksidativnog oštećenja. Bitan je za rad enzima i kofaktora, a i sam predstavlja kofaktor u nekim enzimskim reakcijama. Nedostatak vitamina C dovodi do sporijeg zacjeljivanja rana, a na koncu i do skorbuta (Vallée Marcotte i sur., 2022). Dakle, konzumacijom ovog vitamina poboljšavamo imunitet, sprječavamo pernicioznu anemiju zahvaljujući njegovoj antioksidacijskoj aktivnosti i „anti-age“ učincima (Patocka i sur., 2019).

2.1.2.3. Dijetalna vlakna

Vlakna, iako su neprobavljivi polisaharidi, imaju povoljan utjecaj na naše zdravlje prolaskom kroz naš gastrointestinalni trakt. Smatra se da smanjuju rizike od raznih bolesti i poremećaja kao što su dijabetes, kardiovaskularne i gastrointestinalne bolesti, pretilost i karcinome. Dvije glavne skupine vlakna su topljiva i netopljiva vlakna. Topljiva se ponašaju kao spužva te tope u vodi stvarajući kemijske veze između molekula, a netopljiva vlakna svoja svojstva više ispoljavaju na fizikalnoj razini. Potiču rad crijeva sprječavajući crijevne poremećaje (hemoroidi,

zatvor, proljev), a nekoliko studija je pokazalo da visok unos vlakana može spriječiti rak debelog crijeva (Vallée Marcotte i sur., 2022).

2.1.2.4. Pektin

Pektin je polisaharid prisutan u staničnim stijenkama biljaka koji posjeduje svojstva vlakna, a ima i velik antioksidacijski kapacitet što mu pomaže u sprječavanju antioksidacijskog oštećenja. Posebnost pektina je u njegovoj visokoj topljivosti u vodenom mediju tankog crijeva gdje poprima oblik gela čime djeluje kao snažno hipoglikemijsko sredstvo. Zahvaljujući njegovoj viskoznosti za sebe veže nekoliko metala olakšavajući njihovu eliminaciju iz organizma. Djeluje i antikancerogeno te ima i prebiotičke učinke u debelom crijevu. Smanjuje kolesterol, trigliceride i lipoproteine visoke gustoće te može inhibirati apsorpciju masti što je korisno znati ljudima koji su u procesu mršavljenja (Patocka i sur., 2019). Nažalost, gotovo potpuno se uklanja iz soka tijekom filtriranja (Vallée Marcotte i sur., 2022).

2.2. PESTICIDI

Pesticidi imaju važnu ulogu u poljoprivredi budući da smanjuju gubitke poljoprivrednih proizvoda te omogućuju pristupačnost i kvalitetu hrane. Imaju ključnu ulogu u smanjenju bolesti i povećanju prinosa usjeva diljem svijeta. Koriste se za odbijanje, kontroliranje ili uništavanje bilo kakvih štetnih organizama (Tudi i sur., 2021). S obzirom na suzbijanje ciljanog organizma dijelimo ih na insekticide (kukci), akaricide (grinje), nematocide (fitoparazitski nematodi), limacide (puževi), korvifuge (ptice), rodenticide (glodavci), fungicidi (fitopatogene gljive), herbicidi (korov) i regulatore rasta (Klapan, 2022). Što se tiče kemijske strukture, klasificiramo ih na organske i anorganske pesticide. Anorganski pesticidi u svojoj kemijskoj strukturi sadrže bakrov sulfat, željezov sulfat, bakar, vapno ili sumpor. S druge strane organski pesticidi malo su složenije kemijske strukture, kao što su klorugljikovodični insekticidi, organofosforni insekticidi, karbamat insekticidi te sintetski piretroidni insekticidi (Tudi i sur., 2021).

2.2.1. Utjecaj pesticida na okoliš

Iako je ciljana skupina pesticida uglavnom svedena na jedan ili dva organizma, putujući kroz hranidbeni lanac mogu biti štetni i za druge organizme, npr. ptice, neke korisne insekte i ne-ciljane biljke, ali i za ostatak okoliša uključujući vodu, tlo i zrak. Posljedično, takvi kemijski ostaci (engl. *residue*) dopiru i do čovjeka putem okoliša i hrane (Tudi i sur., 2021). Poznato je da pesticidi imaju svojstvo bioakumulacije i postojanosti u okolišu, kao i visoke toksičnosti. Ometaju normalno funkcioniranje endokrinog i reproduktivnog sustava u živim organizmima. Zbog prekomjerne upotrebe pesticida pokušavaju se uvesti razni pristupi suzbijanja njihove upotrebe kao što je razvijanje novih sorti usjeva koji su otporni na štetnike, a sve je veća popularnost i ekološke prehrane gdje se konzumiraju namirnice koje nisu tretirane ili su barem korištene minimalne količine pesticida. Međutim, primjena kemijskih pesticida i dalje je najraširenija i najjeftinija alternativa za zaštitu usjeva (Sharma i sur., 2021).

2.2.2. Pesticidi na jabukama

Brojne zdravstvene prednosti povezane su sa konzumacijom jabuka zbog njihovog kemijskog sastava. Neka istraživanja navode da su jabuke jedna od rijetkih pojedinačnih namirnica koje smanjuju rizik obolijevanja od karcinoma. Prevencija je najučinkovitija strategija od liječenja kroničnih bolesti, međutim kako bi to bio slučaj ne smiju sadržavati toksične tvari iznad zakonski definiranih koncentracija. Najosjetljivija skupina su dakako djeca te oni sa slabijim imunološkim sustavom. Pesticidi se, u proizvodnji jabuka, najčešće koriste za kontrolu fitofaga ili štetnika koji mogu oštetiti usjeve tijekom proizvodnje, skladištenja ili transporta, te poboljšavaju i kvalitetu i rok trajanja određene hrane i njih samih (Lozowicka, 2015). U istraživanju koje je provela Lozowicka (2015) na 696 jabuka, samo 33,5 % uzoraka nije sadržavalo ostatke pesticida iznad granice detekcije. U 66,5 % uzoraka detektirana su 34 pesticida, od kojih je kod 3 % prekoračena dopuštena količina ostataka. Višestruki ostaci pesticida bili su prisutni u 35 % uzoraka s dva do šest pesticida, a jedan uzorak sadržavao je sedam spojeva. U istraživanju koje su proveli El Hawari i sur. (2019) analizirano je 212 plodova jabuka.

Analiza je pokazala sljedeće: 16 % uzoraka nije imalo ostatke pesticida, 23 % uzoraka sadržavalo je ostatke pesticida unutar maksimalne dozvoljene razine, kako je propisano od strane Europske unije. Čak 61 % uzoraka imalo je ostatke pesticida u količini koja prelazi maksimalnu dozvoljenu razinu. Ovi podaci ukazuju na zabrinjavajući trend, posebno s obzirom na to da više od polovice analiziranih uzoraka sadrži višak pesticida, što može imati ozbiljan utjecaj na zdravlje potrošača, kao i na okolinu, te ukazuje na potrebu za strožim kontrolama i regulacijama u proizvodnji hrane. Zhao i sur. (2023) proveli su istraživanja koristeći 120

uzoraka jabuka gdje je cilj istraživanja fokusiran na 14 često korištenih pesticida i 3 metabolita. 91,7 % uzoraka jabuka sadržavalo je mjerljive ostatke pesticida. Svi ostaci pesticida bili su ispod svojih maksimalnih granica ostataka. Međutim, zabranjeni pesticid klorpirifos u Europskoj uniji i Sjedinjenim Državama premašio je granice u 7,5 % jabuka. Naravno, nepravilna upotreba pesticida može imati ozbiljne posljedice po zdravlje ljudi i životinja, kao i na cjelokupni ekosustav. Europska unija propisuje stroge regulative kako bi se osigurala sigurnost hrane i minimizirala izloženost potrošača štetnim kemikalijama. Prema Uredbi (EZ) br. 396/2005, maksimalne razine ostataka pesticida (engl. *Maximum Residue Limit*, MRL) definiraju se za različite vrste hrane i pića, s ciljem zaštite zdravlja potrošača. Nepravilnosti u korištenju pesticida mogu uključivati prekomjernu primjenu, korištenje nedozvoljenih pesticida ili nepoštivanje vremena čekanja između primjene pesticida i berbe. Ove aktivnosti mogu dovesti do povećane kontaminacije hrane, što može rezultirati akutnim ili kroničnim zdravstvenim problemima, uključujući alergijske reakcije, hormonske poremećaje, pa čak i ozbiljnije bolesti. Osim što direktno utječe na zdravlje ljudi, nepravilna upotreba pesticida također može imati negativan utjecaj na ekosustave, uključujući smanjenje bioraznolikosti i kontaminaciju tla i vodenih resursa. Zbog toga je važno pridržavati se propisa i smjernica za pravilnu upotrebu pesticida, kao i educirati poljoprivrednike i potrošače o održivim praksama u poljoprivredi. U konačnici, osiguranje sigurnosti hrane zahtijeva suradnju svih sudionika uključujući vladu, poljoprivrednike, industriju i potrošače.

2.3. BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

2.3.1. Principi rada blisko infracrvene spektroskopije

Bliska infracrvena spektroskopija (engl. *Near Infrared Spectroscopy*, NIRs) vrsta je vibracijske spektroskopije koja koristi energiju fotona ($h\nu$) u energetskom rasponu od $2,65 \cdot 10^{-19}$ do $7,96 \cdot 10^{-20}$ J, odnosno rasponu valnih duljina od 750 do 2,500 nm (valni brojevi: 13 300 do 4 000 cm^{-1}). Ovim energetskim rasponom koji je i više nego dovoljan, postiže se pomicanje molekula iz njihova najniža pobuđena vibracijska stanja. Poanta NIR-a je snimiti uzorak kako bi se dobile kvalitativne i/ili kvantitativne informacije koje dolaze od interakcija bliskih infracrvenih elektromagnetskih valova sa molekulama (Pasquini, 2003).

Bliska infracrvena (NIR) spektroskopija stekla je izuzetnu vrijednost kao nedestruktivna analitička tehnika i postala je alat izbora u nekoliko područja primjene. Vrlo je praktična zbog njezine primjenjivosti na široku lepezu uzoraka te je brza, neinvazivna metoda koja stvara dobru sinergiju s prijenosnim spektrometrima koji su sposobni za analizu na licu mjesta. Takvi NIR spektrometri pojavili su se u prošlom desetljeću i doveli do značajnog skoka u evoluciji praktičnih primjena ove tehnike. NIR spektroskopija stoga je široko prihvaćena u analizama u

poljoprivredi i raznim industrijama uključujući kemijsku, farmaceutsku i prehrambenu industriju. Učinkovita metoda s kratkim vremenom od mjerenja do rezultata dobila je na popularnosti, a samim time i upotreba prijenosnih NIR spektrometara gdje je moguće mjerenja provoditi izravno na licu mjesta (Beć i sur., 2021).

Međutim, od samih početaka NIR spektroskopije do dana današnjeg gdje se razvila u vrlo korisnu analitičku tehniku bio je dug put te je prvi korak bio uopće otkriti zračenje u NIR energiji raspona koji je golom oku nevidljiv. To je pošlo za rukom znanstveniku Fredericku Williamu Herschel. Herschel je bio astronom i glazbenik koji je između ostalog izvodio eksperimente na raspršenoj bijeloj sunčevoj svjetlosti i svakoj od pristiglih boja od iste. Herschel nije prestao ispitivati što se događa s temperaturom kada stigne do kraja vidljivog područja crvene boje. Nastavio je promatranja što se događa s temperaturom postavljajući termometar iza te točke gdje je otkrio da temperatura iznenađujuće i dalje raste. Ovo je područje kasnije nazvano infracrveno, koristeći se grčkim prefiksom "infra" što znači "ispod". Iako je svjetlost u blisko infracrvenom području otkrio još 1800. godine, ovo spektralno područje svoju je popularnost steklo 1900. godine nakon što je Coblentz dobio spektre apsorbancija čistih tvari te je provjeravao njihovu korist za identifikaciju organskih funkcionalnih skupina. Razvoj i poboljšanje električkih, optičkih komponenti i pojava računala omogućila je učinkovitiju i kvalitetniju obradu informacija (Pasquini, 2003).

NIR spektar potječe od prenesene energije zračenja na mehaničku energiju povezanu s gibanjem atoma koji su povezani kemijskim vezama u molekulama. Obuhvaća karakteristike kako elektronskih, tako i vibracijskih prijelaza, a oslanja se na interakciju između infracrvenog zračenja i molekula, pri čemu se promatraju prijenosi koji nastaju kao rezultat ili vibracijskih stanja (poput savijanja, istezanja i rotacije veza u molekulama) ili prijelaza između različitih energetske nivoa. Molekule mogu vibrirati na različite načine koji su bitni za razumijevanje njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava. Molekule mogu vibrirati na dva načina. Prvi je istezanje veza koja uključuje promjenu duljine veza između atoma (može biti simetrično i asimetrično). Drugi način je deformacija kutova koji uključuje promjene kutova između veza uzrokovano pomicanjem atoma oko centara veze (može biti savijanje kutova u ravnini i izvan ravnine) (Pasquini, 2003).

Vibracije molekula opisuju se pomoću modela harmonijskog oscilatora kod kojeg se energije različitih i jednako razmaknutih razina mogu opisati pomoću formule:

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

gdje v označava vibracijski broj, h predstavlja Planckovu konstantu koja čija je vrijednost $6,62606896 \cdot 10^{-34}$ J s, k je konstanta sile i μ smanjenje mase vezanih atoma. Međutim kod ovog modela mogući su prijelazi samo između uzastopnih energetske razine stoga ovim modelom ne možemo objasniti ponašanje stvarnih molekula (u obzir nije uzeto odbijanje između atoma i disocijacija veze) (Ozack i Huck, 2021).

Model anharmonijskog oscilatora puno bolje opisuje ponašanje molekula jer razmatra neidealna ponašanja molekula. U anharmonijskom modelu energije, vibracije atoma unutar molekula nisu ravnomjerno raspoređene kao što je to slučaj kod harmonijskog oscilatora. Kada se atomi približe, dolazi do odbijanja koje rezultira povećanjem energije. S druge strane, kada su atomi u početku udaljeni, mogu se pojaviti privlačne sile, što također može dovesti do povećanja energije, a daljnjim udaljavanjem atoma dolazi do disocijacije i smanjenja energije. U modelu anharmonijskog oscilatora, za razliku od harmonijskog, moguće je da dođe do prijelaza između nesusednih vibracijskih stanja što generira fenomene poput overtone. Overtone su dodatne vibracije koje se javljaju kada molekule apsorbiraju više od jednog kvanta energije. To znači da NIR spektroskopija predstavlja kombinaciju osnovnih vibracija i overtone. Osnovne vibracije nastaju kada molekule apsorbiraju jedan kvant energije, dok prvi overtone obično ima frekvenciju koja je gotovo dvostruko veća od osnovne vibracije. Kako se energija povećava potrebna energija za pobuđivanje tih stanja nastavlja opadati. Na kraju, kada se molekule dodatno ekscitiraju, može doći do disocijacije molekula, što znači da energija premašuje granicu stabilnosti veze između atoma. Ova složenost anharmonijskog modela i interakcija između vibracijskih stanja ključna je za razumijevanje spektroskopskih tehnika i analize materijala (Ozack i Huck, 2021).

2.3.2. Instrumenti koji se koriste u blisko infracrvenoj spektroskopiji

Blisko infracrvena spektroskopija predstavlja važnu tehniku u analitičkoj kemiji i drugim znanstvenim disciplinama, a njen osnovni princip temelji se na optičkoj apsorpciji. NIR spektrometri imaju sličnu shemu dizajna kao spektrometri koji se koriste za vidljivu (engl. *Visible Spectroscopy*, VIS) spektroskopiju i dalju infracrvenu (engl. *Infrared*, IR) spektroskopiju. U praksi, to znači da se oprema razvijena za analizu u VIS i IR opsegu može koristiti i za istraživanje NIR spektara, koji obuhvaća valne duljine od otprilike 780 do 2500 nm. Ovo omogućava fleksibilnost u analitičkim metodama, jer instrumenti mogu pokrivati širok spektar valnih duljina, što je korisno za različite primjene, uključujući analizu biomaterijala, hrane, farmaceutskih proizvoda i drugih materijala. S obzirom na sve navedeno, NIR spektroskopija

predstavlja snažan alat za istraživanje i analizu, oslanjajući se na integraciju tehnologija i brzinu analitičkih metoda.

Bliska infracrvena spektroskopija (NIR) apsorpcijski je spektar koji uglavnom prikazuje organske molekule vodikovih skupina (C-H, N-H, O-H, itd.) te istežanja njihovih veza. Količina informacija iznimno je bogata (struktura elemenata, sastav...) (Wu i sur., 2009).

Kada infracrveno svjetlo stupa u interakciju s molekulama prisutnim u uzorku, njihova veza vibrira na različitim frekvencijama ovisno o vrsti. Kao što je rečeno, u NIR području najviše prevladavaju vibracijske C–H, N–H i O–H veze, određujući oblik spektra danog uzorka. Posljedično, finalni spektar karakterizira preklapanje ovih komponenta u obliku širokih vrpca. Iako se većina primjene NIR spektroskopije odnosi na kvantifikaciju sastava (npr. proteina) uzorka, NIR spektar pogodan je za određivanje i fizikalnih svojstava uzorka. Ovo obilježje karakteristično za NIR spektroskopiju razlikuje ju od ostalih instrumentalnih tehnika. Stoga NIR spektri uzoraka mogu pružiti informacije ne samo o kemijskom sastavu hrane već i o njezinoj funkcionalnosti (Cozzolino, 2021).

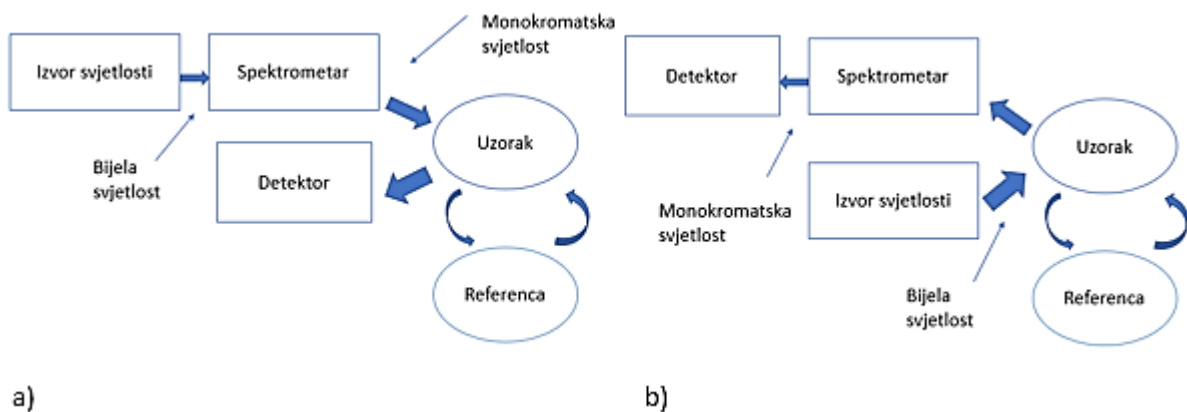
Uzorak može biti u tekućem ili krutom agregatnom stanju. Ukoliko se radi o tekućini ona se mjeri u kivetu, a krutine se mjere sondom. U oba slučaja prvo se snima referentni uzorak. Rezultati se izražavaju ili kao apsorbanca $\log_{10}(1/T)$ ili kao transmitanca (T). NIR je vrlo osjetljiv uređaj na čije rezultate utječu i vanjski čimbenici (temperatura, vanjske vibracije).

NIR spektrometri sastoje se od izvora svjetlosti, optičkog uzorka, selektora valne duljine i detektora. Konfiguracija NIR spektrometara uglavnom je ograničena na dvije vrste. Kod prve vrste uzorak je postavljen iza spektrometra i time obasjan monokromatskim svjetlom. Ova se konfiguracija često koristi za standardne stolne UV-VIS spektrometre. U drugima, uzorak se postavlja neposredno iza izvora svjetlosti i ozračuje s bijelim svjetlom. Ova se konfiguracija često koristi za NIR aplikacije i postiže detekcija velikom brzinom (Ikehata, 2021).

Fourierov transformacijski spektrometar koji se koristi za NIR područje dostupan je na tržištu pod nazivom FT-NIR (engl. *Fourier Transform-Near Infrared Spectroscopy*). Mnogo su fleksibilniji od instrumenata s određenom valnom duljinom, pa se mogu koristiti u raznim primjenama (Blanco i Villarroya, 2002).

Izvor svjetlosti koji koristi toplinsko zračenje koje nastaje zagrijavanjem žarne niti prolaskom električne struje kroz njega najpopularniji je izvor svjetlosti u NIR regiji. Halogene žarulje koje koriste volframove niti su jeftine, predstavljaju stabilan izvor toplinskog zračenja i široko su prihvaćeni u NIR spektrometrima na tržištu. Drugi izvor svjetlosti koji se često koristi su diode koje emitiraju LED svjetlost. Jeftine su, sa nešto manjom snagom pa su korisne za smanjenje cijene samog uređaja (Ikehata, 2021).

U osnovi, instrument (slika 1) koristi princip interferencije svjetlosnih zraka kako bi omogućio dobivanje spektara različitih materijala. Sastoji se od izvora svjetlosti, polupropusnog zrcala koji dijeli svjetlost na dvije zrake (djelomično reflektira jedan dio svjetlosti koji ide prema nepokretnom zrcalu, dok drugi dio svjetlosti prolazi prema pomičnom zrcalu), nepokretnog zrcala koji odbija reflektiranu zraku nazad prema polupropusnom zrcalu, pomičnog zrcala (odbija svjetlost koja dolazi iz polupropusnog zrcala (zraka koja je propuštena)), te detektora koji mjeri promjene u intezitetu svjetlosti (Ikehta i sur., 2008).



Slika 1. Shematski prikaz NIR spektrometara: a) s monokromatskim svjetlom b) s bijelim svjetlom (prema Ikehata, 2021)

Također, prijenosni NIR spektrofotometri sve više se razvijaju i dobivaju na popularnosti. Minijaturizacija optičkih komponenti potaknula je razvoj prijenosnih NIR uređaja. Oni omogućuju sposobnost obavljanja terenskih mjerenja umjesto konvencionalnog načina prikupljanja uzoraka za naknadnu analizu u laboratoriju budući da su manjih dimenzija te se mogu nositi i u ruksaku što je vrlo korisno primjerice, u poljoprivredi (Blanco i Villarroya, 2002). Međutim, treba napomenuti da većina prijenosnih NIR spektrometara koristi različitu tehnologiju i spektroskopske elemente za dobivanje spektara (Beć i sur., 2021).

2.3.3. Kemometrija

Nakon provedenih mjerenja korištenjem NIR instrumenata, kao rezultat dobijemo vrpce na NIR spektru koje sadržavaju informacije o absorbanci ili transmitanci pri određenoj valnoj duljini koja se može povezati s analitičkim podacima. Dobiveni spektri naizgled mogu izgledati isto, što ne znači da ne postoje razlike koje je teško razlikovati golim okom. Kako bi mogli obraditi snimljene NIR spektre, moramo koristiti statističke i matematičke metode analize podataka, odnosno kemometriju čija je sinergija sa blisko infracrvenom spektroskopijom dovela do revolucije u analitici u svim područjima znanosti. Bliska infracrvena spektroskopija, kao što smo rekli, nedestruktivna je, brza i ekološki prihvatljiva metoda. Najveća prednost je u tome što može mjeriti uzorke nepristrano, onakve kakvi jesu, tj. krutine i tekućine bez pripreme uzorka. Uspjeh bliske infracrvene spektroskopije ne bi bio moguć bez kemometrijske obrade podataka (Sørensen i sur., 2021).

Kemometrija je važna disciplina koja se koristi u analitičkoj kemiji i obuhvaća različite metode i pristupe za analizu složenih podataka. Njena primjena može se podijeliti u tri osnovne skupine:

- 1) kalibraciju, validaciju i testove signifikantnosti
- 2) optimizaciju mjerenja i eksperimentalnih postupaka
- 3) ekstrakciju maksimalne količine informacija o materiji iz analitičkih podataka (Lazarevski, 2021).

U kemometriju spadaju 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 diskriminantna 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 Networks*, ANNs) (Klapan, 2022).

Analiza glavnih komponentata (PCA) i parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS) dvije su od najčešće korištenih kemometrijskih metoda u obradi NIR spektara.

2.3.3.1. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata (PCA analiza) jedna je od najčešće korištenih metoda analize podataka u znanstvenim istraživanjima. Cilj je pronaći prostorno bliske skupine u višedimenzionalnom prostoru uz analizu njihovih odnosa te uložiti pojedinih varijabli u tim odnosima. Ovaj proces PCA analize omogućuje smanjenje dimenzionalnosti skupa podataka, pri čemu se zadržavaju bitne informacije. Iz izvornih, dolazi do nastanka novih varijabli koje međusobno nisu u koleraciji te se nazivaju glavnim komponentama. Njihov najveći mogući broj jednak je broju izvornih (Lazarevski, 2021).

2.3.3.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS)

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata multivarijatna je metoda koja se koristi za analizu veze između varijabli dok se istovremeno kontroliraju utjecaji drugih varijabli. Cilj je razumijevanje kako promjene u spektru analizirane supstance utječu na vrijednosti koncentracije ili bilo kojih drugih kemijsko – fizikalnih svojstava, uzimajući u obzir moguće smetnje ili utjecaje drugih faktora. Stoga, sve promjene koje se događaju moraju biti prepoznate te međusobno povezane zbog čega je potrebno analizirati veliki broj uzoraka. Matematički, promjene u podacima zapisane su u matrici te nastaju njihovi svojstveni vektori (faktori ili primarne komponente) (Sileoni i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci jabuka

Za provođenje ovog istraživanja korištene su jabuke kupljene u trgovačkom centru Konzum, Zagreb. Sorta jabuke je „Gala“. Pakira ili isporučuje ENNA Fruit d.o.o., Dugo Selo, 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 (Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Plus, Riga, Latvija)
- Konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska)
- NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm Control Development Inc., SAD)
- NIR spektrometar (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD)
- Prijenosni NIR spektrometar (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan)
- Magnetska miješalica (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- PCE-CSM 3 kolorimetar (PCE Instruments, Njemačka)

3.1.4. Pribor

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

- Menzura volumena 100 mL
- Metalna špatulica

3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzorka

3.2.1.1. Priprema originalnih suspenzija/otopina fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja

Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG komercijalni su fungicidi koji su na tržište stavljeni u obliku praha te im je vrijeme karence 14 dana. Pripremljene su 0,3 %-tna suspenzija Chromosula 80 (300g/100 L vode) i 0,05 %-tna otopina Cuprablau Z 35 WG (50 g/100 L vode). To su ujedno i doze koje proizvođač preporučuje za korištenje u programu zaštite plodova jabuke od bolesti. Iz pripremljenih originalnih suspenzija/otopina oba fungicida (koji se miješaju na magnetskoj miješalici (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka) cijelo vrijeme pri 250 rpm radi osiguranja homogenosti suspenzije) izuzimaju se izračunati volumeni potrebni za pripremu razrjeđenja otopina fungicida. U tablici 1 prikazane su oznake uzoraka te njihovo značenje.

Tablica 1. Prikaz oznaka originalnih fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja

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

Tablica 1. Prikaz oznaka originalnih fungicida i njihovih odgovarajućih razrijeđenja - nastavak

70x	Suspencija/otopina fungicida koja je sedamdeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
90x	Suspencija/otopina fungicida koja je devedeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
100x	Suspencija/otopina fungicida koja je sto puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
150x	Suspencija/otopina fungicida koja je sto pedeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
200x	Suspencija/otopina fungicida koja je dvjesto puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
350x	Suspencija/otopina fungicida koja je tristo pedeset puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
500x	Suspencija/otopina fungicida koja je petsto puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
700x	Suspencija/otopina fungicida koja je sedamsto puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
900x	Suspencija/otopina fungicida koja je devetsto puta razrijeđena u odnosu na originalnu.
1000x	Suspencija/otopina fungicida koja je tisuću puta razrijeđena u odnosu na originalnu.

3.2.1.2. Kontaminacija jabuka istraživanim fungicidima

Za kontaminaciju (prskanje) jabuka napravljene su nove originalne suspenzije/otopine fungicida od kojih je svaki fungicid razrijeđen deset, sto i tisuću puta. Za kontaminaciju originalnom suspenzijom/otopinom i odgovarajućim razrjeđenjima, kao i za kontrolnu skupinu (netretirane jabuke) korištene su po dvije jabuke koje su slične po masi, širini i dužini.

Tablica 2. Prikaz oznaka uzoraka te njihovo značenje za jabuke koje su kontaminirane fungicidima Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG

OZNAKA UZORKA	ZNAČENJE
K	Kontrolna (netretirana) jabuka
CH	Jabuka prskana originalnom suspenzijom fungicida Chromosul 80
CH ₁₀	Jabuka prskana suspenzijom deset puta razrijeđenom u odnosu na originalnu suspenziju fungicida Chromosul 80
CH ₁₀₀	Jabuka prskana suspenzijom sto puta razrijeđenom u odnosu na originalnu suspenziju fungicida Chromosul 80
CH ₁₀₀₀	Jabuka prskana suspenzijom tisuću puta razrijeđenom u odnosu na originalnu suspenziju fungicida Chromosul 80
CU	Jabuka prskana originalnom otopinom fungicida Cuprablau Z 35 WG
CU ₁₀	Jabuka prskana otopinom deset puta razrijeđenom u odnosu na originalnu otopinu fungicida Cuprablau Z 35 WG
CU ₁₀₀	Jabuka prskana otopinom sto puta razrijeđenom u odnosu na originalnu otopinu fungicida Cuprablau Z 35 WG
CU ₁₀₀₀	Jabuka prskana otopinom tisuću puta razrijeđenom u odnosu na originalnu otopinu fungicida Cuprablau Z 35 WG

Prije kontaminacije, jabuke su oprane pod mlazom vode, osušene te im je markerom napisana odgovarajuća oznaka (slika 2). U tablici 2 prikazane su oznake uzoraka te njihovo značenje.



Slika 2. Označene jabuke koje su snimane u rasponu valnih duljina $\lambda = 900 - 2500$ nm
(vlastita fotografija)

Originalna otopine istraživanih fungicida i njihova odgovarajuća razrijeđenja (10x, 100x i 1000x) pripremljene su kao i u prethodnom poglavlju 3.2.1.1. Po dvije jabuke (odgovarajuća originalna suspenzija tj. otopina/razrijeđenje) zasebno su stavljene na aluminijsku foliju te su kontaminirane sa 50 mL originalne suspenzije fungicida (0,3 % Ch odn. 0,05 % Cu) ili njihovih

odgovarajućih razrijeđenja (10x, 100x, i 1000x). Zatim su ostavljene da se suše na sobnoj temperaturi dva sata.

3.2.2. Mjerenje ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti suspenzija/otopina istraživanih fungicida

Ukupne otopljene tvari (engl. *Total Dissolved Solids*, TDS) i vodljivost originalnih suspenzija/otopina i njihovih odgovarajućih razrijeđenja mjerene su konduktometrom (SevenCompact, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska). Princip mjerenja ukupnih otopljenih tvari/vodljivosti temelji se na uranjanju sonde konduktometra u uzorak te se zatim sa uređaja očitaju vrijednosti vodljivosti odn. TDS-a. Svaki uzorak mjeran je tri puta, a kao rezultat uzimala se srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

3.2.3. Određivanje boje uzoraka suspenzija/otopina istraživanih fungicida

Boja uzoraka određivana je PCE-CSM 3 kolorimetrom (PCE Instruments, Njemačka) gdje se uzorak originalne suspenzije fungicida ili njegovog odgovarajućeg razrijeđenja ulio u kivetu i stavio u kućište instrumenta. U prehrambenoj industriji postoje brojne standardizirane instrumentalne metode određivanja boja, a jedna od njih je metoda po Hunteru kojom se određuju parametri a^* , b^* i L^* . L^* parametar označuje svjetlinu/bjelinu koja pokazuje vrijednosti od 0 do 100 (bijelo ako je $L^* = 100$, crno ako je $L^* = 0$), a^* predstavlja crvenu boju i varira od $-a^*$ do $+a^*$ ($-a^*$ = zeleno, $+a^*$ = crveno), a parametar b^* predstavlja žutu boju koja također varira od $-b^*$ za plavu do $+b^*$ za žutu. Kolorimetrija primjenjuje CIELab sustav gdje parametri a^* i b^* predstavljaju kromatske osi, a L^* akromatsku os koja je okomita na kromatske (Dorić, 2016). Uzorci su mjerani tri puta, a konačan rezultat je prikazan kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Kako bi mogli izračunati promjenu boja razrijeđenja u odnosu na originalne otopine (0,05 Cu) i suspenzije (0,3 Ch) koristila se formula:

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

L^* - svjetlina ispitivanog uzorka u CIELab prostoru boja

a^* i b^* - parametri boja odgovarajućih razrijeđenja suspenzija/otopina istraživanih fungicida

L^*_{ref} - svjetlina referentne, originalne suspenzije/otopine istraživanih fungicida

a^*_{ref} i b^*_{ref} - parametri boja originalne referentne suspenzije/otopine istraživanih fungicida.

3.2.4. Blisko infracrvena (NIR) spektroskopija

U ovom istraživanju pripravljena suspenzija/otopina Ch/Cu i njihovih odgovarajućih razrjeđenja (10x, 20x, 30x, 50x, 70x, 90x, 100x, 150x, 200x, 350x, 500x, 700x, 900x, 1000x) snimani su pomoću tri NIR instrumenta:

1. NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm Control Development Inc., SAD) koji snima absorbance u rasponu valnih duljina $\lambda = 904 - 1699$ nm. Spektri su analizirani primjenom programskog paketa Control Development Spec 32 (Control Development Inc., SAD).

2. NIR spektrometar (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) koji snima absorbance u rasponu valnih duljina $\lambda = 1000 - 2500$ nm. Spektri su analizirani primjenom programskog paketa Avasoft (Avantes, SAD).

3. Prijenosni NIR spektrometar (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) koji snima absorbance u rasponu valnih duljina $\lambda = 900 - 1700$ nm. Spektri su analizirani primjenom programskog paketa ISC-NIRScan (InnoSpectra, Tajvan).

Uzorci otopina/suspenzija istraživanih fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja snimani su u rasponu valnih duljina $\lambda = 904 - 1699$ nm te $\lambda = 1000 - 2500$ nm. Uzorci su snimani u kivetama koje su stavljene u postolje za snimanje tekućih uzoraka. NIR spektri svakog uzorka snimani su tri puta, a iz dobivenih vrijednosti izračunata je srednja vrijednost.

Kontaminirane (prskane) jabuke, kao i one netretirane (kontrolna skupina) dan snimane su pomoću NIR instrumenata koji mjere absorbance u rasponu valnih duljina $\lambda = 904 - 1699$ nm, $\lambda = 1000 - 2500$ nm te $\lambda = 900 - 1700$ nm. Nakon što su izvađene iz frižidera ostavljene su 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi njihova temperatura pri svakom mjerenju bila ista te kako ne bi došlo do fluktuacija u temperaturama što bi moglo utjecati na rezultate snimanja. NIR spektri jabuka snimani su priklanjanjem sonde na površinu jabuke. Površina svake jabuke bila je podjeljena na četiri ekvatorijalne ravnine označene kružićem, a unutar svake označene pozicije snimanje se vršilo tri puta. Spektri jabuka na NIR instrumentima snimani su tijekom trodnevnog vremenskog razdoblja. Za svaku jabuku snimljeno je dvanaest spektara, a budući da su po dvije jabuke prskane odgovarajućim dozama fungicida, za svaki uzorak (prskane i neprskane, odnosno kontrolne jabuke) kao rezultat se uzimala srednja vrijednost od 24 spektara.

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). MS Excel 2013 se koristio za izračun srednjih vrijednosti i standardne devijacije dobivenih eksperimentalnih podataka. Program Statistica 14.0 korišten je za PCA analizu. Program The Unscrambler® X 10.4 korišten je za provedbu parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata.

3.2.5.1. Analiza glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) statistička je metoda kojom se interpretiraju i vizualiziraju izmjereni podaci gdje je cilj reducirati dimenzionalnost velikih količina podataka, ali i očuvati količinu informacija koje su sadržane u početnim podacima. PCA analiza otkriva veze između varijabli koje možda nisu uočljive na prvi pogled (Strmečki, 2023). Stoga je u ovom radu provedena PCA analiza, na temelju izračunatih srednjih vrijednosti kontinuiranih izvornih NIR spektara: a) za originalne otopine/suspencije fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja, snimljenih u rasponu valnih duljina tri različita uređaja ($\lambda = 904\text{--}1699\text{ nm}$ i $\lambda = 1000\text{--}2500\text{ nm}$) te b) kontaminiranih (tretiranih) i kontrolnih (netretiranih) jabuka, snimljenih u rasponu valnih duljina korištenih uređaja.

3.2.5.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) koristi se za analizu skupa zavisnih varijabli (Y) iz skupa nezavisnih varijabli (X), odnosno za predviđanje rezultata. U svrhu predikcije fizikalnih karakteristika (ukupne otopljene tvari, vodljivost te boja), primijenjeni su PLS modeli na temelju snimljenih izvornih NIR spektara originalnih otopina/suspencija fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja. Za razvoj PLS modela korišten je set od 60 eksperimentalnih podataka: obuhvaćeno je 15 uzoraka (originalna suspenzija/otopina i odgovarajuća razrjeđenja). Četiri paralele svakog uzorka obuhvaćene su tijekom razvoja PLS modela. Nadalje, 60 podataka podijeljeno je na set podataka za kalibraciju i validaciju (30) te set podataka za predikciju (15). Set podataka za kalibraciju i validaciju modela podijeljen je u omjeru 1:1. Za kalibraciju, validaciju i predikciju modela korištene su valne duljine NIR spektara snimljene u rasponu od: a) $\lambda = 904\text{--}1699\text{ nm}$ i b) $\lambda = 1000\text{--}1900\text{ nm}$. 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. Vrijednost koeficijenta

determinacije (R^2) kreću se u rasponu od 0 do 1. Što je vrijednost R^2 bliža jedinici zaključujemo da je i čvršća veza nezavisne i zavisne varijable – teorijski model uspješno prati i izmjerene podatke (Gajdoš Kljusurić i sur., 2017; Šerbetar, 2012).

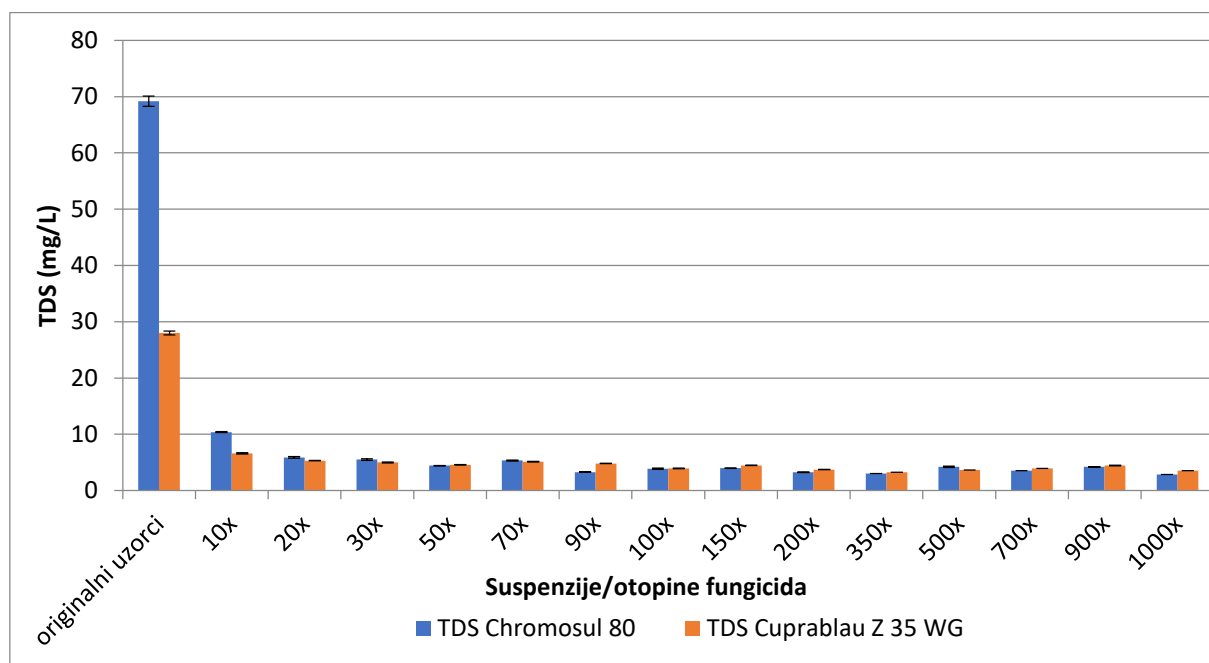
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene blisko infracrvene (NIR) spektroskopije u svrhu detekcije prisutnosti fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG na površini jabuka. Jabuke su kontaminirane (prskane) originalnim suspenzijama/otopinama istraživanih fungicida, koje su pripremljene u dozama preporučenima od strane proizvođača, te njihovim razrjeđenjima (10x, 100x i 1000x). Uzorci jabuka su snimani primjenom dva stolna i jednog prijenosnog NIR spektrometra ($\lambda = 904 - 1699$ nm, $\lambda = 1000 - 2500$ nm i $\lambda = 900 - 1700$ nm). Uzorci originalnih suspenzija/otopina fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja (10x, 20x, 30x, 50x, 70x, 90x, 100x, 150x, 200x, 350x, 500x, 700x, 900x, 1000x) snimani su primjenom dva stolna instrumenta ($\lambda = 904 - 1699$ nm te $\lambda = 1000 - 2500$ nm). Također su izmjerene i fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost i boja) pripremljenih originalnih suspenzija/otopina fungicida te njihovih razrjeđenja. Kronološki gledano, prvo su prikazani eksperimentalni rezultati fizikalnih svojstava pripremljenih originalnih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja na slikama 3 i 4 te u tablicama 3, 4 i 5. Zatim slijedi prikaz izvornih NIR spektara (slike 5 i 6) i PCA analiza (slike 7 i 8) za originalne suspenzije/otopine fungicida te njihovih pripadajućih razrjeđenja. U tablicama 6 i 7 te na slikama 9, 10, 11 i 12 prikazani su rezultati parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata (PLS modeli) s ciljem predikcije vodljivosti, boje i ukupnih otopljenih tvari za originalne suspenzije/otopine fungicida i njihovih razrjeđenja. Izvorni NIR spektri jabuka kontaminiranih sa originalnim suspenzijama/otopinama fungicida te razrjeđenjima 10x, 100x i 1000x, kao i kontrolni uzorci prikazani su na slikama od 13 do 32. PCA analiza rezultata, dobivenih na temelju izvornih NIR spektara kontaminiranih i kontrolnih (netretiranih) jabuka prikazana je u priložima od 1 do 19.

4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA PRIPREMLJENIH SUSPENZIJA/OTOPINA ISTRAŽIVANIH FUNGICIDA CHROMOSUL 80 I CUPRABLAU Z 35 WG TE NJIHOVIH ODGOVARAJUĆIH RAZRJEĐENJA

4.1.1. Ukupne otopljene tvari, vodljivost i boja istraživanih fungicida

U ovom istraživanju određivane su fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost i boja) originalnih suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG i njihovih odgovarajućih razrjeđenja.

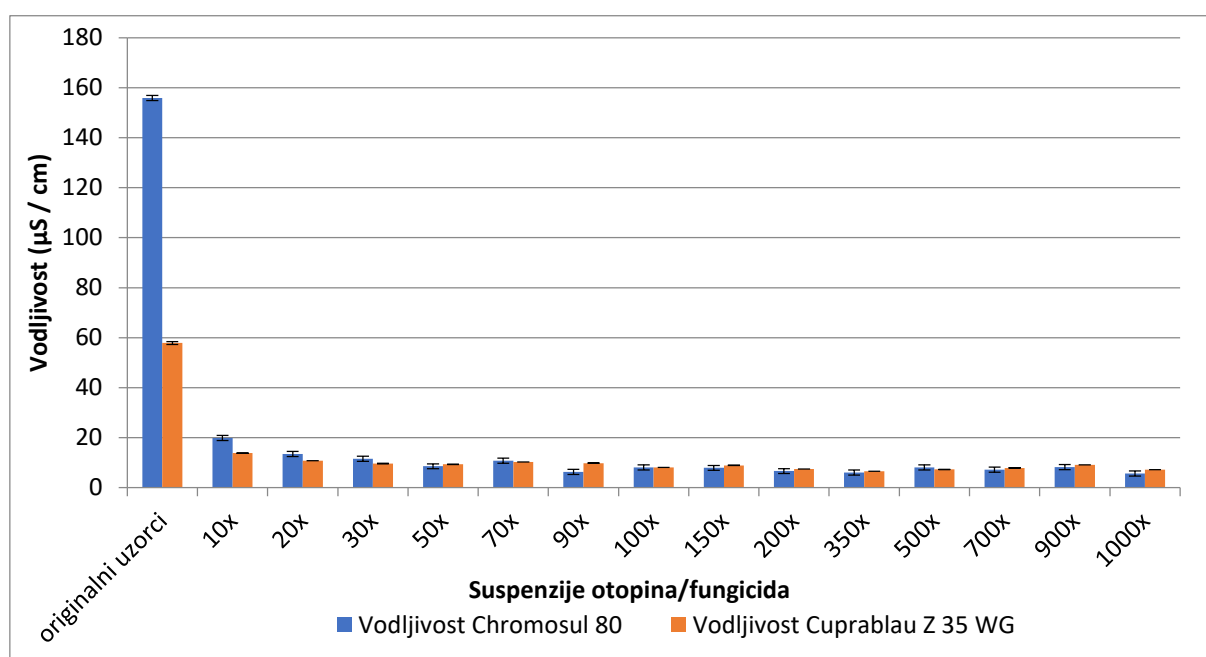


Slika 3. Grafički prikaz vrijednosti ukupnih otopljenih tvari (TDS) za originalne suspenzije/otopine fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG i njihovih odgovarajućih razrjeđenja

(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 3 vidljivo je da je najviša koncentracija ukupnih otopljenih tvari izmjerena u originalnoj suspenziji/otopini istraživanih fungicida. Za Chromosul 80 ta vrijednost iznosi $69,20 \pm 0,90$ mg/L a za Cuprablau Z 35 WG ta vrijednost iznosi $28 \pm 0,40$ mg/L. Najmanja vrijednost TDS-a izmjerena je kod fungicida Chromosul 80 kod 1000x razrijeđene otopine i iznosi 2,86 mg/L, dok kod Cuprablau Z 35 WG najmanja vrijednost iznosi 3,25 mg/L za otopinu razrijeđenu 350x. Kod originalne suspenzije fungicida Chromosul 80 i njegovih razrjeđenja uglavnom je vidljiv trend smanjenja ukupnih otopljenih tvari, izuzev razrjeđenja 70x, 100x, 150x, 500x i 900x koja ne prate očekivani padajući trend. Kod fungicida Cuprablau Z 35 WG, također je vidljiv trend

zmanjenja vrijednosti TDS-a, izuzev razrjeđenja 70x i 900x. Iako je za očekivati da se samim razrjeđivanjem otopina smanjuje koncentracija ukupnih otopljenih tvari, to u ovom istraživanju nije bio slučaj. Razlog tome može biti jer konduktometar mjeri ukupne otopljene, a ne suspendirane tvari. Chromosul 80, sam po sebi ponaša se kao suspenzija te su njegove čestice vidljive u samoj otopini, a nije nemoguće ni da je tokom samih mjerenja uzoraka na konduktometru došlo do sedimentacije (iako su uzorci prije mjerenja homogenizirani) što je uzrokovalo fluktuacije u rezultatima TDS-a.



Slika 4. Grafički prikaz vrijednosti vodljivosti za originalne suspenzije/otopine fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG i 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 4, koja prikazuje grafički prikaz vodljivosti suspenzija/otopina istraživanih fungicida i njihovih odgovarajućih razrjeđenja, vidljiv je trend kao i kod izmjerenih vrijednosti ukupnih otopljenih tvari (slika 3). Najveće vrijednosti vodljivosti očekivano su izmjerene kod originalnih suspenzija/otopina (za Chromosul 80 ona iznosi $155 \pm 0,91 \mu\text{S/cm}$, a za Cuprablau Z 35 WG $57,87 \pm 0,57 \mu\text{S/cm}$). Najmanja vrijednost, u slučaju Chromosula 80, izmjerena je kod 1000x razrijeđene originalne suspenzije i iznosi $5,66 \pm 0,05 \mu\text{S/cm}$, a u slučaju fungicida Cuprablau Z 35 WG kod 350x ($6,54 \pm 0,01 \mu\text{S/cm}$) razrijeđene originalne otopine istog fungicida. Kako se koncentracija otopina smanjuje tako se i vrijednosti vodljivosti smanjuju. Cuprablau Z 35 WG dobro provodi električnu struju zbog prisutnosti bakrovih iona (Saoudi i sur., 2017).

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

UZORAK#	CHROMOSUL 80		
	L^*	a^*	b^*
0,3 Ch	53,83 ± 0,02	0,30 ± 0,01	4,29 ± 0,02
10x	45,89 ± 0,01	-0,37 ± 0,01	0,96 ± 0,01
20x	45,57 ± 0,34	-0,34 ± 0,01	0,97 ± 0,06
30x	45,05 ± 0,01	-0,33 ± 0,01	0,89 ± 0,01
50x	45,33 ± 0,20	-0,22 ± 0,03	1,13 ± 0,05
70x	44,24 ± 0,02	0,02 ± 0,02	1,20 ± 0,05
90x	44,71 ± 0,00	-0,20 ± 0,01	1,05 ± 0,01
100x	45,43 ± 0,01	-0,33 ± 0,01	0,99 ± 0,01
150x	45,37 ± 0,01	-0,23 ± 0,22	1,10 ± 0,01
200x	44,86 ± 0,01	-0,18 ± 0,00	1,01 ± 0,01
350x	45,02 ± 0,02	-0,15 ± 0,02	1,17 ± 0,01
500x	45,39 ± 0,01	-0,32 ± 0,01	0,96 ± 0,01
700x	45,90 ± 0,01	-0,33 ± 0,01	0,98 ± 0,01
900x	45,28 ± 0,01	-0,26 ± 0,01	0,97 ± 0,01
1000x	45,38 ± 0,01	-0,38 ± 0,01	0,82 ± 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 originalni uzorak)

Analizom vrijednosti parametara L^* , a^* i b^* (tablica 3) izmjerenih za suspenziju pesticida Chromosul 80 (0,3 Ch) te njezinih odgovarajućih razrjeđenja vidljivo je kako vrijednosti parametra L^* imaju uglavnom padajući trend, kako se originalna suspenzija razrjeđivala destiliranom vodom. Najveća L^* vrijednost izmjerena je kod originalne suspenzije 0,3 Ch te iznosi 53,83 ± 0,02. Može se zaključiti kako se svjetlina uzoraka smanjuje sa smanjenjem koncentracije fungicida. Što se tiče parametra a^* , izuzev originalne suspenzije, svi uzorci imaju negativnu vrijednost što znači približavanje zelenoj boji, osim originalne suspenzije koja ima pozitivnu vrijednost i približava se crvenoj boji. Sve vrijednosti parametra b^* pokazuju pozitivnu vrijednost što znači da se približavaju žutoj boji. Najveća vrijednost parametra b^* izmjerena je za originalnu suspenziju i iznosi 4,29 ± 0,02, a najmanja vrijednost izmjerena je kod 1000x razrijeđene otopine i iznosi 0,82 ± 0,01.

Tablica 4. Određivanje parametara 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	44,60 ± 0,00	-0,03 ± 0,01	1,80 ± 0,01
10x	44,67 ± 0,01	-0,10 ± 0,02	1,03 ± 0,01
20x	45,30 ± 0,01	-0,16 ± 0,01	1,19 ± 0,00
30x	45,06 ± 0,01	-0,13 ± 0,00	1,17 ± 0,02
50x	45,47 ± 0,00	-0,25 ± 0,01	1,01 ± 0,00
70x	46,15 ± 0,01	-0,27 ± 0,01	1,12 ± 0,01
90x	44,98 ± 0,01	-0,10 ± 0,01	0,91 ± 0,01
100x	46,01 ± 0,00	-0,34 ± 0,01	0,96 ± 0,00
150x	46,39 ± 0,01	-0,45 ± 0,01	0,93 ± 0,01
200x	45,74 ± 0,11	-0,34 ± 0,02	0,90 ± 0,01
350x	45,02 ± 0,02	-0,24 ± 0,01	1,01 ± 0,03
500x	44,16 ± 0,08	-0,07 ± 0,00	1,06 ± 0,01
700x	44,58 ± 0,10	-0,11 ± 0,01	1,14 ± 0,01
900x	44,82 ± 0,01	-0,08 ± 0,01	1,06 ± 0,01
1000x	46,10 ± 0,00	-0,29 ± 0,01	1,07 ± 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 originalni uzorak)

Analizom eksperimentalnih podataka prikazanih u tablici 4. vidljivo je da je najveća vrijednost parametra L^* izmjerena kod otopine fungicida 0,05 Cu koja je 150 puta razrijeđena i iznosi $46,39 \pm 0,01$ dok je najmanja vrijednost izmjerena kod 500 puta razrijeđene otopine te iznosi $44,16 \pm 0,08$. Parametar a^* u svim izmjerenim uzorcima istraživanog fungicida Cuprabalu Z 35 W pokazuje negativnu vrijednost 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 $1,80 \pm 0,01$.

Tablica 5. Promjena boje (ΔE^*) odgovarajućih razrjeđenja suspenzija/otopina pesticida 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	8,64 ± 0,03	0,77 ± 0,01
20X	8,92 ± 0,34	0,94 ± 0,01
30X	9,44 ± 0,03	0,79 ± 0,02
50X	9,08 ± 0,15	1,20 ± 0,01
70X	10,08 ± 0,01	1,71 ± 0,01
90X	9,70 ± 0,00	0,97 ± 0,01
100X	9,04 ± 0,02	1,67 ± 0,01
150X	9,06 ± 0,04	2,03 ± 0,00
200X	9,56 ± 0,02	1,49 ± 0,10
350X	9,35 ± 0,03	0,91 ± 0,04
500X	9,09 ± 0,03	0,86 ± 0,05
700X	8,62 ± 0,02	0,66 ± 0,02
900X	9,18 ± 0,03	0,77 ± 0,00
1000X	9,16 ± 0,02	1,68 ± 0,02

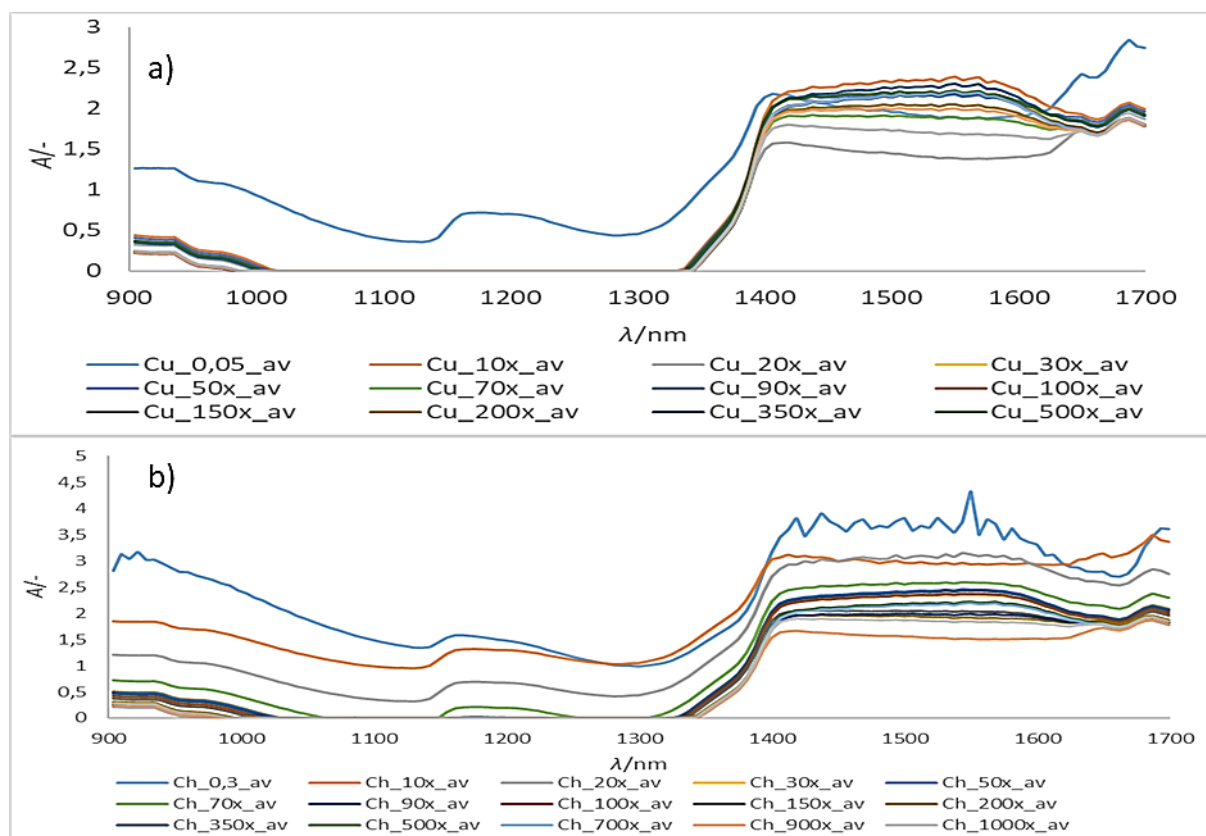
(* ΔE – promjena boje (vrijednost koja pokazuje koliko se boja pripremljenih razrjeđenja originala razlikuje od originalnog uzorka) (Uzorci su označeni oznakama 10X, 20X, 30X, 50X, 70X, 90X, 100X, 150X, 200X, 350X, 500X, 700X, 900X, 1000X ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na originalni uzorak)

U tablici 5 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 30x, 70x i 90x u odnosu na originalni uzorak. Najveća odstupanja boje za uzorke otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG zabilježeno je kod otopina razrijeđenih 100x, 150x i 1000x 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. Blisko infracrveni (NIR) spektri pripremljenih suspenzija/otopina istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja

NIR spektri pripremljenih suspenzija/otopina fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG kao i njihovih odgovarajućih razrjeđenja snimljeni su kako bi se promatrale sličnosti i razlike u apsorbancijama pri odgovarajućim valnim duljinama u svrhu kvalitativnog određivanja njihove prisutnosti. Spektri su snimani pomoću dva stolna NIR spektrometra: NIR spektrometar koji mjeri apsorbancije u području valnih duljina od 904 nm do 1699 nm (NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm Control Development Inc., SAD) te NIR spektrometar koji mjeri apsorbancije u području valnih duljina od 1000 nm do 2500 nm (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD).

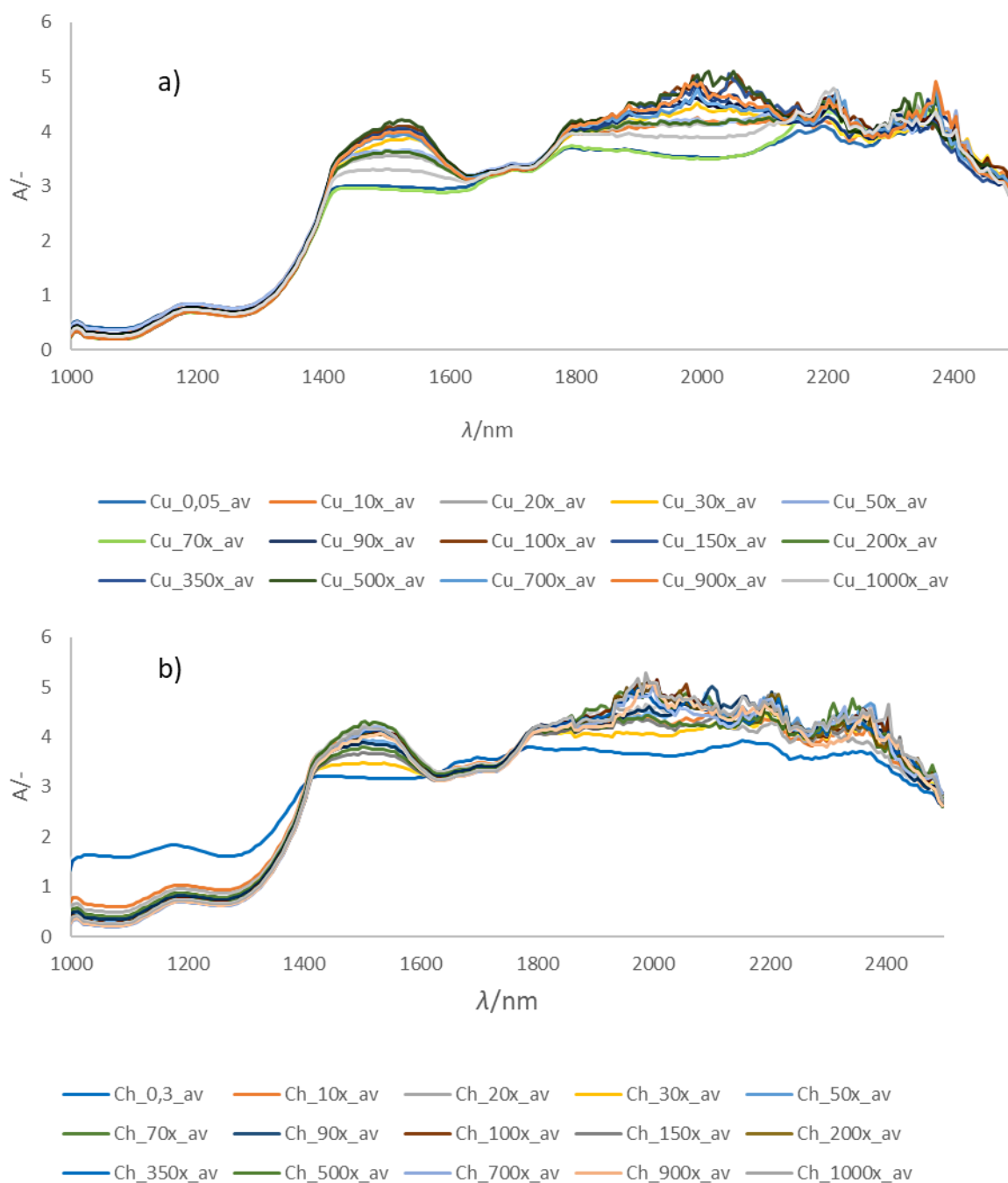


Slika 5. Izvorni NIR spektri pripremljene originalne otopine/suspenzije fungicida (a) Cuprablau Z 35 WG (0,05 Cu) i (b) Chromosul 80 (0,3 Ch) te njihovih odgovarajućih razrjeđenja snimljenih pomoću spektrometra NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , Control Development Inc., SAD ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$)

(Uzorci su označeni oznakama 10X_av, 20X_av, 30X_av, 50X_av, 70X_av, 90X_av, 100X_av, 150X_av, 200X_av, 350X_av, 500X_av, 700X_av, 900X_av, 1000X_av ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na originalni uzorak; av (average) – srednja vrijednost izvornih NIR spektara za pojedini uzorak)

Na slici 5a. vidljivo je razdvajanje uzoraka u dvije skupine, ovisno o intenzitetu apsorbancije, duž čitavog spektra. Pripremljena razrjeđenja fungicida Cuprablau Z 35 WG pripadaju istoj skupini te se minimalno razlikuju u intenzitetu apsorbance. Originalna Cu otopina pokazuje veće vrijednosti apsorbance na čitavom spektru, u usporedbi s odgovarajućim razrjeđenjima, osim na području valnih duljina od 1400 do 1600 nm, kada najveći intenzitet apsorpcije pokazuje otopina koja je 10 puta razrijeđena u odnosu na originalnu Cu otopinu. Svi pripremljeni uzorci pokazuju povećanje apsorbancije u rasponu valnih duljina od 1350-1699 nm što ukazuje na prisutnost vode u istraživanim uzorcima. U navedenom rasponu se također javljaju i vibracije N-H veza u prvom overtonu. Vibracije C – H veza u drugom overtonu pojavljuju se u području valnih duljina od 1134-1231 nm, kao i vibracije C=O veze u četvrtom overtonu. Originalni uzorak pokazuje najveću apsorbanciju pri 1699 nm; raspon valnih duljina od 1676-1698 nm odgovara vibraciji C-H veze u prvom overtonu (Klapan, 2022; Badr Eldin, 2011).

Na slici 5b. vidljivo je kako originalna suspenzija fungicida Chromosul 80 i uzorka koji je deset puta razrijeđen u odnosu na originalnu suspenziju pokazuju veće vrijednosti apsorbancije u snimanom području valnih duljina. Ostali uzorci pokazuju manje vrijednosti apsorbancije u promatranom rasponu valnih duljina. Najveću vrijednost apsorbancije pokazuju svi uzorci u području valnih duljina od 1400 - 1650 nm što ukazuje na prisutnost molekula vode u istraživanim uzorcima. Također, u ovom području je spektar originalne suspenzije Ch 0,3 šumovit u odnosu na NIR spektre ostalih uzoraka. Razlog tomu može biti priroda pripremljenih uzoraka, mjerna osjetljivost samog instrumenta te moguća pogreška mjeritelja.



Slika 6. Izvorni NIR spektri pripremljene originalne otopine/suspencije fungicida (a) Cuprablau Z 35 WG (0,05 Cu) i (b) Chromosul 80 (0,3 Ch) te njihovih odgovarajućih razrjeđenja snimljenih pomoću spektrometra NIR AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD ($\lambda = 1000 - 2500$ nm)

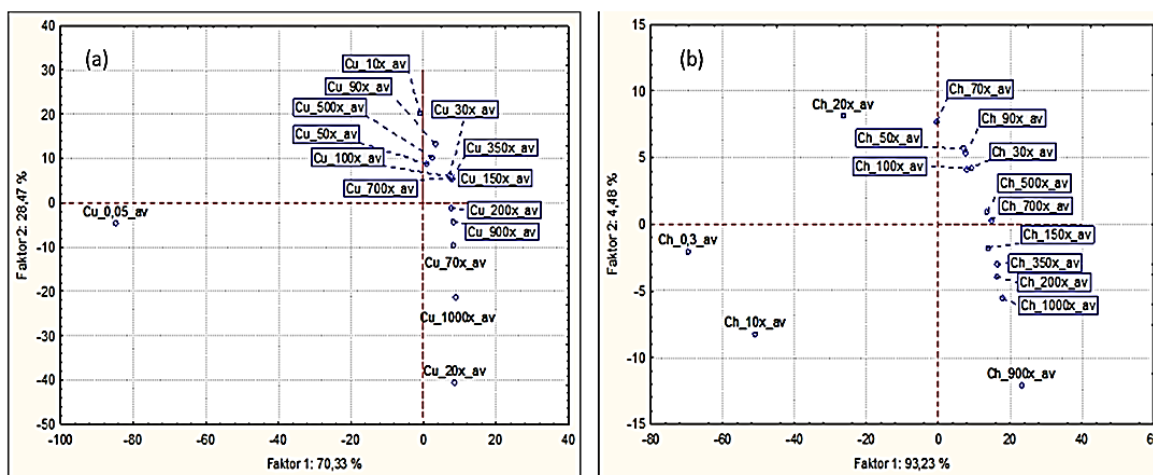
(Uzorci su označeni oznakama 10X_av, 20X_av, 30X_av, 50X_av, 70X_av, 90X_av, 100X_av, 150X_av, 200X_av, 350X_av, 500X_av, 700X_av, 900X_av, 1000X_av ovisno o tome koliko puta je uzorak razrijeđen u odnosu na originalni uzorak; av (average) – srednja vrijednost izvornih NIR spektara za pojedini uzorak)

Slika 6a. prikazuje izvorne NIR spektre otopine fungicida Cuprablau Z 35 WG i njegovih odgovarajućih razrjeđenja snimljene pomoću NIR spektrometra (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) koji mjeri intenzitet apsorpcije u rasponu valnih duljina od 1000 nm do 2500 nm. Vidljivo je preklapanje apsorpcijskih vrpca za sve pripremljene uzorke u rasponu valnih duljina od 1000 do 1400 nm. Do znatnog skoka apsorpcije dolazi kod valnih duljina između 1400 nm i 1650 nm što ukazuje na prisutnost molekula vode u istraživanim uzorcima (Badr Eldin, 2011). Snimljeni kontinuirani NIR spektri, u rasponu valnih duljina od 1000 do 1700 nm, prate trend koji je prikazan na slici 5a; razlika je u većim vrijednostima apsorpcije koje su dobivene korištenjem NIR spektrometra AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO u odnosu na spektrometar NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm . Područje valnih duljina 1800 - 2500 nm je izrazito šumovito: razlog tomu može biti priroda pripremljenih uzoraka, mjerna osjetljivost samog instrumenta te moguća pogreška mjeritelja.

Slika 6b. prikazuje izvorne NIR spektre suspenzije fungicida Chromosul 80 i njegovih odgovarajućih razrjeđenja također snimljene pomoću NIR spektrometra AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO. U rasponu valnih duljina od 1000 do 1400 nm vidljivo je preklapanje apsorpcijskih vrpca za pripremljena razrjeđenja 30x, 50x, 70x, 90x, 100x, 150x, 200x, 350x, 500x, 700x, 900x, 1000x. Apsorpcijski spektri originalne suspenzije Ch 0,3 te deset puta (10x) i dvadeset puta (20x) razrijeđenih uzoraka, u navedenom valnom području, prate isti trend apsorpcijskih spektara ostalih uzoraka ali je njihov intenzitet apsorpcije veći. Najveći intenzitet apsorpcije snimljen je za originalnu suspenziju fungicida Chromosul 80. Do znatnog skoka apsorpcije dolazi kod valnih duljina između 1400 nm i 1650 nm što ukazuje na prisutnost molekula vode u istraživanim uzorcima (Badr Eldin, 2011). Snimljeni kontinuirani NIR spektri, u rasponu valnih duljina od 1000 do 1700 nm, uglavnom prate trend koji je prikazan na slici 5b. Područje valnih duljina 1800 - 2500 nm je izrazito šumovito: razlog tomu može biti priroda pripremljenih uzoraka, mjerna osjetljivost samog instrumenta te moguća pogreška mjeritelja.

4.2.2. Analiza glavnih komponenata izvornih spektara, snimljenih u blisko infracrvenom području, pripremljenih otopina/suspenzija istraživanih fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja

U ovom radu primijenjena je analiza glavnih komponenata (PCA) kako bi se prikazale sličnosti odnosno razlike između pripremljenih originalnih otopina/suspenzija istraživanih fungicida (Cu 0,05 i Ch 0,3) te njihovih odgovarajućih razrjeđenja.

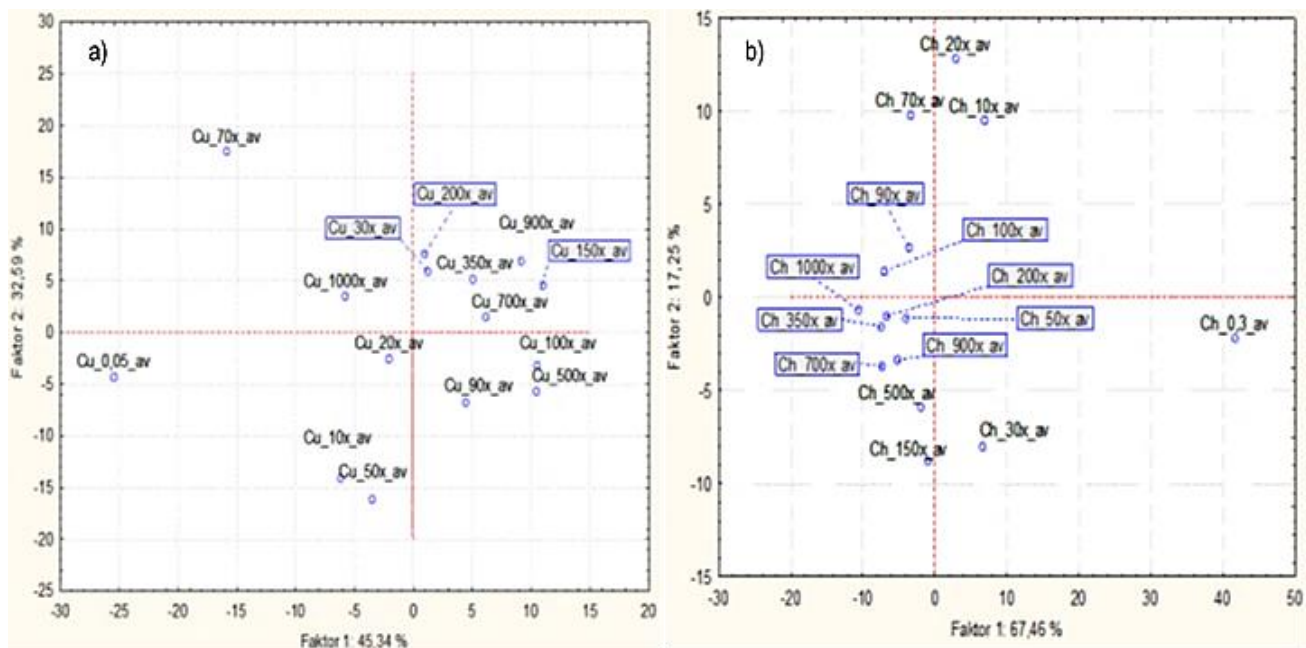


Slika 7. Analiza glavnih komponenta izvornih NIR spektara originalne otopine/suspenzije fungicida (a) Cuprablau Z 35 WG i (b) Chromosul 80 (0,3 Ch) te njihovih odgovarajućih razrjeđenja snimljenih pomoću spektrometra NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , Control Development Inc., SAD ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$)

(Cu_0,05_av-originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, Ch_0,3_av-originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, oznake Cu_10x_av, Cu_20x_av, Cu_30x_av, Cu_50x_av, Cu_70x_av, Cu_90x_av, Cu_100x_av, Cu_150x_av, Cu_200x_av, Cu_350x_av, Cu_500x_av, Cu_700x_av, Cu_900x_av, Cu_1000x_av, Ch_10x_av, Ch_20x_av, Ch_30x_av, Ch_50x_av, Ch_70x_av, Ch_90x_av, Ch_100x_av, Ch_150x_av, Ch_200x_av, Ch_350x_av, Ch_500x_av, Ch_700x_av, Ch_900x_av, Ch_1000x_av označavaju koliko je puta ta otopina fungicida razrijeđena u odnosu na originalan uzorak; av (average) – srednja vrijednost izvornih NIR spektara za pojedini uzorak)

Uzorak originalne otopine pesticida Cuprablau Z 35 WG (Cu_0,05_av) smjestio se u treći kvadrant, razdvojivši se od ostalih uzoraka (slika 7a). U prvom i četvrtom kvadrantu smjestila su se razrjeđenja istraživanog fungicida. PCA analiza ukazuje na razlike između originalne otopine fungicida Cuprablau od ostataka uzoraka, odnosno razdvojila je uzorke fungicida na temelju njihovih različitih koncentracija. Faktor 1 objašnjava 70,33 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok Faktor 2 doprinosi sa 28,47 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 98,80 % svih varijanci u promatranom skupu podataka.

Na slici 7b. vidljivo je da se uzorak originalne suspenzije pesticida Chromosul 80 (Ch_0,3_av) smjestio u treći kvadrant, zajedno sa deset puta razrijeđenom originalnom suspenzijom (Ch_10x_av). Razrjeđenja od dvadeset (Ch_20x_av) i sedamdeset (Ch_70x_av) puta smjestila su se u drugi kvadrant. Blizina uzoraka (Ch_20x_av) i (Ch_70x_av) ukazuje na određene sličnosti ovisno o ispitivanim faktorima. Preostala razrjeđenja smještena su u prvi i četvrti kvadrant. Na temelju rezultata vidljivo je da je PCA analiza razdvojila uzorke fungicida Chromosul 80 na temelju njihovih različitih koncentracija. Faktor 1, odnosno prva glavna komponentna objašnjava 93,23 % svih interakcija u obrađenom skupu podataka, a Faktor 2 (druga glavna komponenta) doprinosi sa 2,48 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 95,71 % svih varijanci u promatranom skupu podataka.



Slika 8. Analiza glavnih komponenta izvornih NIR spektara originalne otopine/suspenzije fungicida (a) Cuprablau Z 35 WG i (b) Chromosul 80 (0,3 Ch) te njihovih odgovarajućih razrjeđenja snimljenih pomoću spektrometra (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$)

(Cu_0,05_av-originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, Ch_0,3_av-originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, oznake Cu_10x_av, Cu_20x_av, Cu_30x_av, Cu_50x_av, Cu_70x_av, Cu_90x_av, Cu_100x_av, Cu_150x_av, Cu_200x_av, Cu_350x_av, Cu_500x_av, Cu_700x_av, Cu_900x_av, Cu_1000x_av, Ch_10x_av, Ch_20x_av, Ch_30x_av, Ch_50x_av, Ch_70x_av, Ch_90x_av, Ch_100x_av, Ch_150x_av, Ch_200x_av, Ch_350x_av, Ch_500x_av, Ch_700x_av, Ch_900x_av, Ch_1000x_av označavaju koliko je puta ta otopina fungicida razrijeđena u odnosu na originalan uzorak; av (average) – srednja vrijednost izvornih NIR spektara za pojedini uzorak)

Uzorak originalne otopine fungicida Cuprablau Z 35 WG (Cu_0,05_av), zajedno sa (Cu_10x_av), (Cu_20x_av) i (Cu_50x_av) smjestio se u treći kvadrant. Uzorci (Cu_70x_av) i (Cu_1000x_av) smjestili su se u drugi kvadrant, a ostali uzorci smješteni su u prvom i četvrtom kvadrantu (slika 8a). Prva glavna komponenta objašnjava 45,34 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok druga glavna komponenta doprinosi sa 32,59 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 77,93 % svih varijanci u promatranom skupu podataka.

Na slici 8b. vidljivo je da se originalna suspenzija (Ch_0,3_av) izdvojila u četvrti kvadrant zajedno sa trideset puta (Ch_30x_av) razrijeđenom suspenzijom. U prvi kvadrant smješteni su uzorci (Ch_10x_av) i (Ch_20x_av). U drugom i trećem kvadrantu smješteni su ostali uzorci. Faktor 1, odnosno prva glavna komponentna objašnjava 67,46 % svih interakcija u obrađenom skupu podataka, a Faktor 2 (druga glavna komponenta) doprinosi sa 17,25 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 84,71 % svih varijanci u promatranom skupu podataka.

4.2.3. Modeli parcijalne linearne regresije metodom najmanjih kvadrata za fizikalne karakteristike istraživanih otopina/suspencija fungicida te njihovih odgovarajućih razrjeđenja

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) je model gdje ulazne varijable predstavljaju valne duljine izvornih NIR spektara snimljenih pomoću dva stolna NIR instrumenta (spektrometra NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm i spektrometra AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, a izlazne varijable predstavljaju fizikalne karakteristike (vodljivost, TDS i boja) istraživanih fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG i njihovih pripadajućih razrjeđenja. S obzirom da se kod NIR instrumenta koji mjeri apsorbance u rasponu valnih duljina od 1000 nm do 2500 nm pri valnoj duljini od 1900 nm pa nadalje javljaju šumovi apsorpcijskih spektara, za razvoj PLS modela upotrebljeno je područje valnih duljina u rasponu od 1000 nm do 1900 nm.

Tablica 6. Izračunati koeficijenti determinacije (R^2) za PLS regresijske modele, za fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost i boja) otopina/suspencija fungicida Cuprablau Z 35 WG i Chromosul 80, na temelju izvornih NIR spektara snimljenih pomoću NIR spektrometra NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm

Cuprablau Z 35 WG	$R^2_{\text{kal}^{**}}$	$^{\circ}\text{RMSE}_{\text{kal}^{**}}$	$R^2_{\text{val}^{**}}$	$^{\circ}\text{RMSE}_{\text{val}^{**}}$	$R^2_{\text{pred}^{**}}$	$^{\circ}\text{RMSE}_{\text{pred}^{**}}$
TDS ⁺	0,9838	0,5554	0,9721	0,9026	0,9916	0,5477
Vodljivost	0,9810	1,2478	0,9883	1,7866	0,9898	1,2395
ΔE^*	0,6034	0,2728	0,5352	0,3048	0,5958	0,2756
Chromosul 80	$R^2_{\text{kal}^{**}}$	$^{\circ}\text{RMSE}_{\text{kal}^{**}}$	$R^2_{\text{val}^{**}}$	$^{\circ}\text{RMSE}_{\text{val}^{**}}$	$R^2_{\text{pred}^{**}}$	$^{\circ}\text{RMSE}_{\text{pred}^{**}}$
TDS ⁺	0,9980	0,7282	0,9985	0,7534	0,9988	0,6162
Vodljivost	0,9987	1,3357	0,9989	1,2791	0,9989	1,2399
ΔE^*	0,7749	0,1858	0,8338	0,1551	0,8248	0,1599

PLS – parcijalna regresija metodom najmanjeg kvadrata (engl. *Partial Least Squares*)

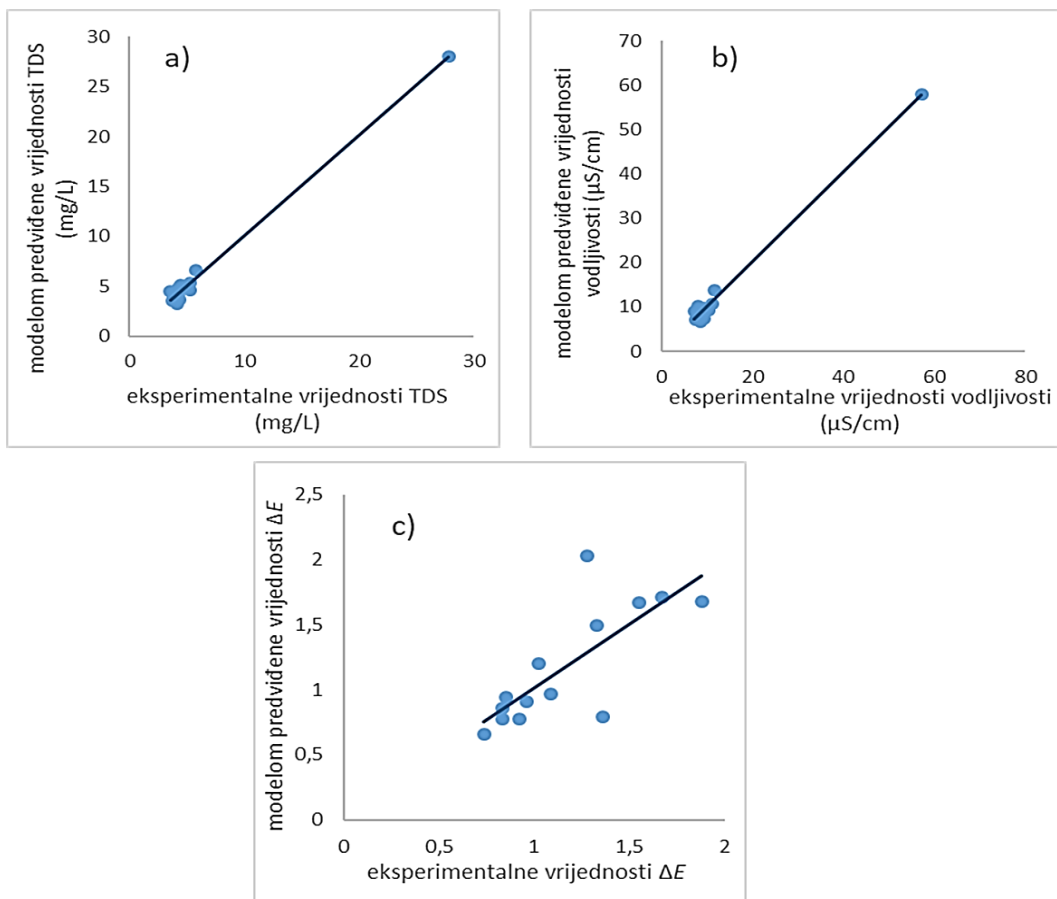
NIR – blisko infracrveni (engl. *Near Infrared*)

kal-kalibracija, val-validacija, pred-predikcija

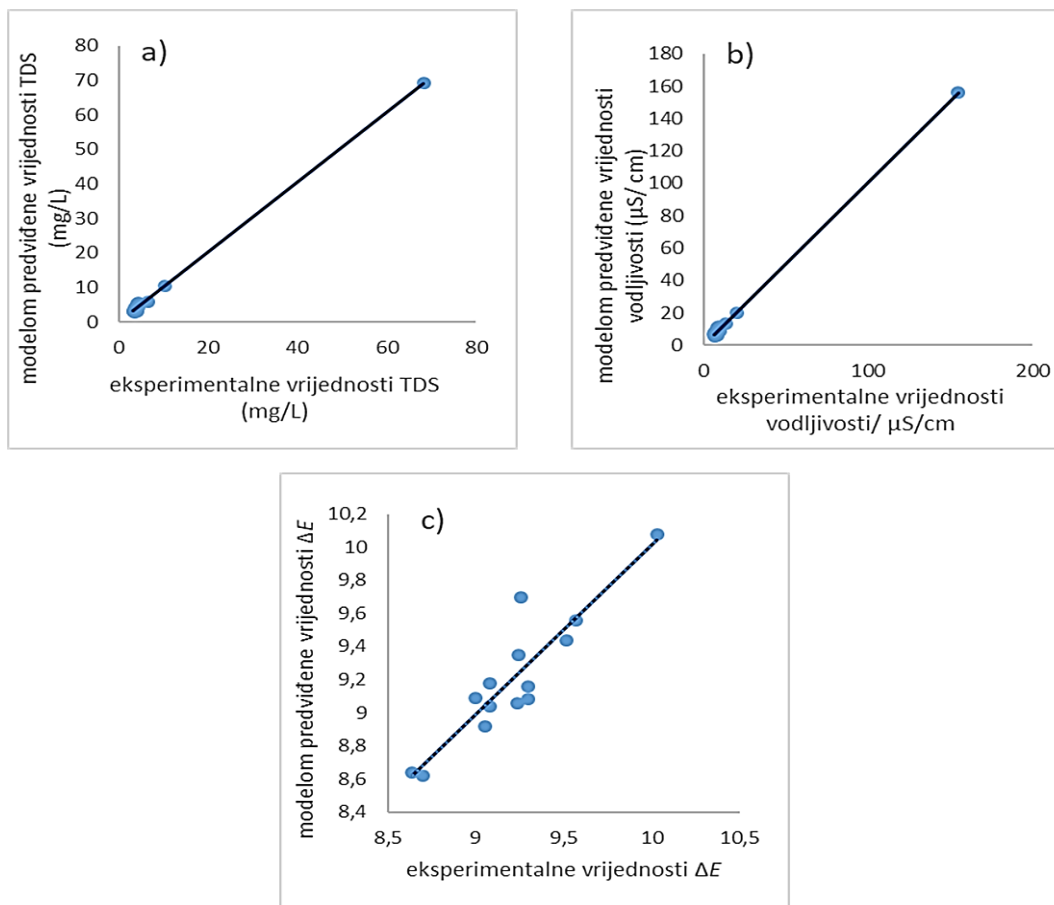
RMSE - korijen srednjeg kvadratnog odstupanja (engl. *Root Mean Squared Error*)

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

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



Slika 9. Rezultati primjene parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata u predikciji vrijednosti a) TDS-a, b) vodljivosti i c) ΔE za fungicid Cuprablau Z 35 WG (originalna suspenzija te pripremljena odgovarajuća razrjeđenja) na temelju izvornih NIR spektara snimljenih NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$



Slika 10. Rezultati primjene parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata u predikciji vrijednosti a) TDS-a, b) vodljivosti i c) ΔE za fungicid Chromosul 80 (originalna suspenzija te pripravljena odgovarajuća razrjeđenja) na temelju izvornih NIR spektara snimljenih NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$

Izračunati koeficijenti determinacije za razvijene PLS modele na temelju izvornih NIR spektara snimljenih NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm te rezultati primjene PLS-a u predikciji fizikalnih karakteristika istraživanih otopina/suspenzija fungicida i njihovih pripremljenih razrjeđenja, prikazani su u tablici 6 i na slikama 9 i 10. Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između NIR spektara fungicida Cuprablau Z 35 WG i eksperimentalnih vrijednosti TDS-a (slika 9a). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,9721 do 0,9916. RMSE vrijednosti kretale su se u rasponu od 0,5477 do 0,9026 (tablica 6). Također je utvrđeno da postoji linearna zavisnost između NIR spektara istog fungicida i eksperimentalnih vrijednosti vodljivosti (slika 9b). Vrijednosti koeficijenta determinacije za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,9810 do 0,9898, a RMSE vrijednosti između 1,2395 i 1,7866 (tablica 6). Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji slaba zavisnost između NIR spektara uzoraka fungicida Cuprablau Z 35 WG i eksperimentalnih vrijednosti ΔE (slika 9c), budući da

su se vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kretale u rasponu od 0,5352 do 0,6034 a RMSE vrijednosti između 0,2728 i 0,3048 (tablica 6).

U slučaju fungicida Chromosul 80, primjenom PLS modela također je utvrđeno da postoji linearna zavisnost između NIR spektara i eksperimentalnih vrijednosti TDS-a (slika 10a). Koeficijenti determinacije za kalibraciju, validaciju i predikciju u rasponu su od 0,9980 do 0,9988. Vrijednosti za RMSE kretale su se u rasponu od 0,6162 do 0,7534 (tablica 6). Utvrđena je i linearna zavisnost NIR spektara istog fungicida i eksperimentalnih vrijednosti vodljivosti (slika 10b). Vrijednosti koeficijenta determinacije za kalibraciju, validaciju i predikciju kretale su se u rasponu od 0,9987 do 0,9989, a RMSE vrijednosti između 1,2399 i 1,3357 (tablica 6). Postoji i linearna zavisnost spektara fungicida Chromosul 80 i eksperimentalnih podataka ΔE (slika 10c). Vrijednosti R^2 za kalibraciju, validaciju i predikciju u rasponu su od 0,7749 do 0,8338, a za RMSE u rasponu od 0,1551 do 0,1858 (tablica 6).

Tablica 7. Izračunati koeficijenti determinacije (R^2) za PLS regresijske modele, za fizikalne karakteristike (TDS, vodljivost i boja) otopina/suspenzija fungicida Cuprablau Z 35 WG i Chromosul 80, na temelju izvornih NIR spektara snimljenih pomoću NIR spektrometra (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 1900$ nm

Cuprablau Z 35 WG	$R^2_{kal^{**}}$	$^{\circ}RMSE_{kal^{**}}$	$R^2_{val^{**}}$	$^{\circ}RMSE_{val^{**}}$	$R^2_{pred^{**}}$	$^{\circ}RMSE_{pred^{**}}$
TDS ⁺	0,9733	0,9747	0,9490	1,5091	0,9729	0,9866
vodljivost	0,9730	2,0334	0,9285	3,6569	0,9713	2,1065
ΔE	0,9146	0,1265	0,7894	0,2236	0,8780	0,1513
Chromosul 80	$R^2_{kal^{**}}$	$^{\circ}RMSE_{kal^{**}}$	$R^2_{val^{**}}$	$^{\circ}RMSE_{val^{**}}$	$R^2_{pred^{**}}$	$^{\circ}RMSE_{pred^{**}}$
TDS ⁺	0,9940	1,2474	0,9847	2,2644	0,9945	1,8804
vodljivost	0,9943	2,773	0,9873	4,7439	0,9952	4,2400
ΔE	/	/	/	/	/	/

PLS – parcijalna regresija metodom najmanjeg kvadrata (engl. *Partial Least Squares*)

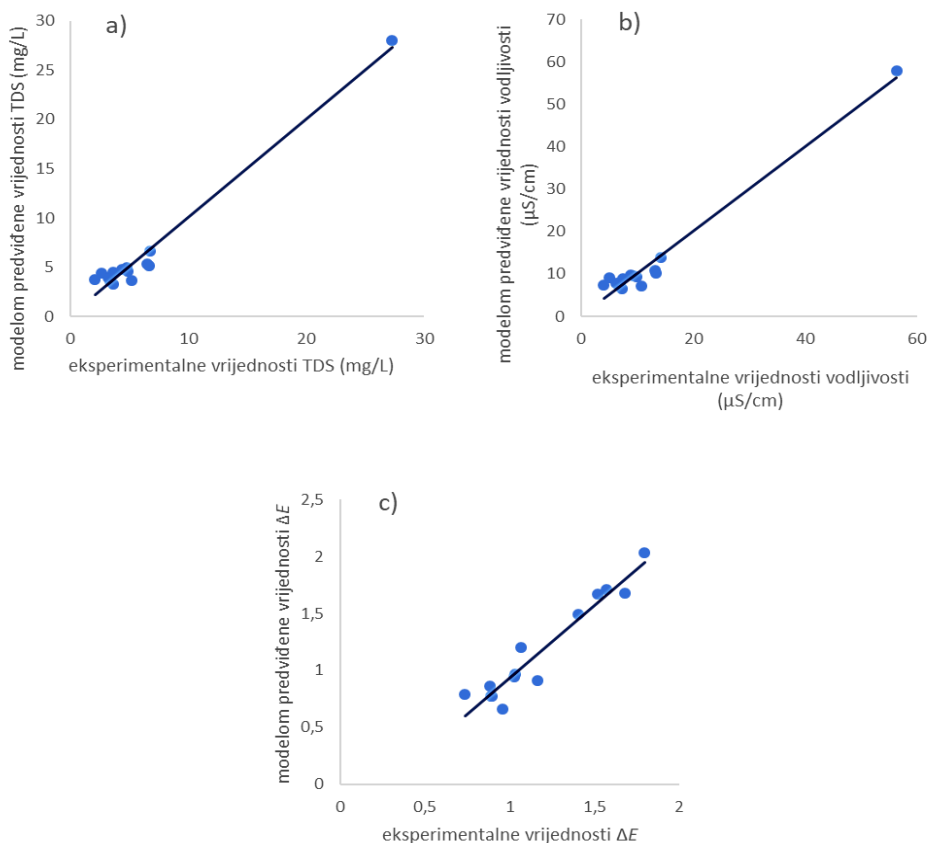
NIR – blisko infracrveni (engl. *Near Infrared*)

kal-kalibracija, val-validacija, pred-predikcija

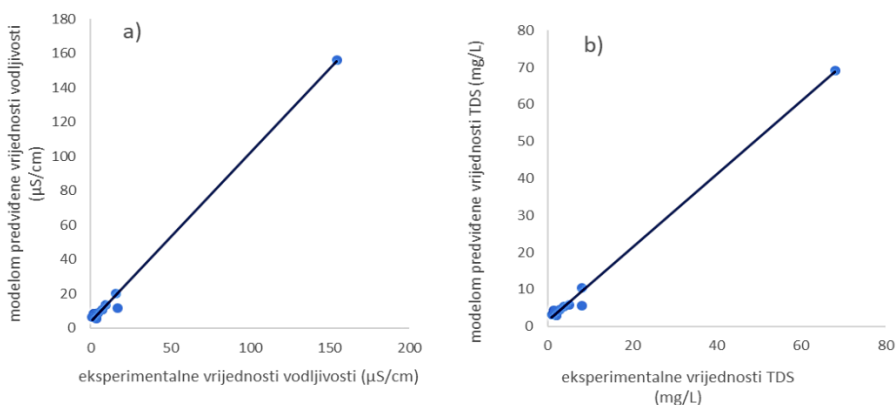
RMSE - korijen srednjeg kvadratnog odstupanja (engl. *Root Mean Squared Error*)

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

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



Slika 11. Rezultati primjene parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata u predikciji vrijednosti a) TDS-a, b) vodljivosti i c) ΔE za fungicid Cuprablau Z 35 WG (originalna suspenzija te pripremljena odgovarajuća razrjeđenja) na temelju izvornih NIR spektara snimljenih NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 1900$ nm



Slika 12. Rezultati primjene parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata u predikciji vrijednosti a) TDS-a, b) vodljivosti i za fungicid Chromosul 80 (originalna suspenzija te pripremljena odgovarajuća razrjeđenja) na temelju izvornih NIR spektara snimljenih NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 1900$ nm

Izračunati koeficijenti determinacije za razvijene PLS modele na temelju NIR spektara snimljenih NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) te rezultati primjene PLS-a u predikciji fizikalnih karakteristika istraživanih otopina/suspenzija fungicida i njihovih pripremljenih razrjeđenja, prikazani su u tablici 7 i slikama 11 i 12. Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između NIR spektara fungicida Cuprablau Z 35 WG i eksperimentalnih vrijednosti TDS-a (slika 11a). Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,9490 do 0,9733. RMSE vrijednosti kretale su se u rasponu 0,9747 do 1,5091 (tablica 7). Također je utvrđeno da postoji linearna zavisnost između NIR spektara istog fungicida i eksperimentalnih vrijednosti vodljivosti (slika 11b). Vrijednosti koeficijenta determinacije za kalibraciju, validaciju i predikciju kreću se u rasponu od 0,9285 do 0,9730, a RMSE vrijednosti između između 2,0334 i 3,6569 (tablica 7). Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji slaba zavisnost između NIR spektara uzoraka fungicida Cuprablau Z 35 WG i eksperimentalnih vrijednosti ΔE (slika 11c), budući da su se vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za kalibraciju, validaciju i predikciju kretale u rasponu od od 0,7894 do 0,9146 a RMSE vrijednosti između od 0,1265 do 0,2236 (tablica 7).

U slučaju fungicida Chromosul 80, primjenom PLS modela također je utvrđeno da postoji linearna zavisnost između NIR spektara i eksperimentalnih vrijednosti TDS-a (slika 11a). Koeficijenti determinacije za kalibraciju, validaciju i predikciju u rasponu su od 0,9847 do 0,9945. Vrijednosti za RMSE kretale su se u rasponu od 1,2474 do 2,2644 (tablica 7). Utvrđena je i linearna zavisnost NIR spektara istog fungicida i eksperimentalnih vrijednosti vodljivosti (slika 11b). Vrijednosti koeficijenta determinacije za kalibraciju, validaciju i predikciju kretale su se u rasponu od 0,9873 do 0,9952, a RMSE vrijednosti između 2,773 i 4,7439 (tablica 7).

U slučaju ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti za oba istraživana fungicida čiji pripremljeni uzorci su snimani pomoću NIR spektrometra NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , vrijednosti koeficijenta determinacije za predikciju su $\geq 0,9$ 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 ΔE tiče, R^2 vrijednost za Chromosul 80 je nešto niža ($R^2_{\text{pred}} = 0,8248$) u odnosu na R^2 vrijednosti dobivene za TDS i vodljivost (tablica 6) što ukazuje na manju primjenjivost PLS modela za opisivanje eksperimentalno dobivenih ΔE vrijednosti za Chromosul 80. U slučaju fungicida Cuprablau Z 35 WG, R^2_{pred} za ΔE iznosi 0,5958 te se PLS model ne može primijeniti za opis eksperimentalno dobivenih vrijednosti ΔE za Cuprablau Z 35 WG.

U slučaju ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti za oba istraživana fungicida čiji pripremljeni uzorci su snimani pomoću NIR spektrometra (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD)

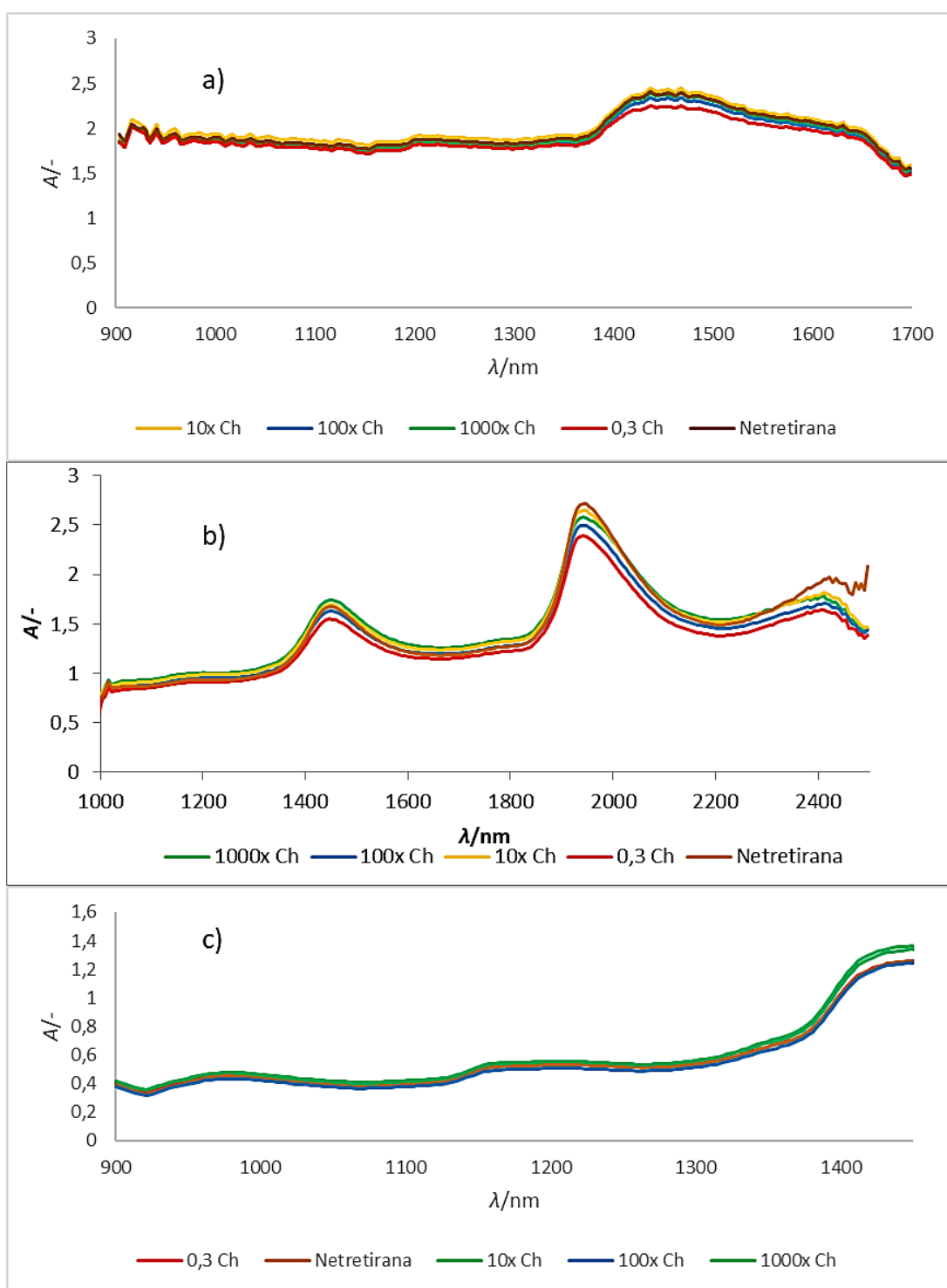
za raspon $\lambda = 1000 - 1900$ nm, vrijednosti koeficijenta determinacije su jednaki ili veći od 0,9 što ukazuje na dobru korelaciju eksperimentalno dobivenih podataka i modelom predviđenih vrijednosti što bi značilo da se razvijeni PLS modeli mogu koristiti za validaciju, kalibraciju i predikciju TDS-a i vodljivosti pesticida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG. Što se promjene boje tiče, u slučaju fungicida Cuprablau Z 35 WG, PLS modeli pokazuju manju primjenjivost za opisivanje eksperimentalno dobivenih ΔE vrijednosti (R^2 se kreće u rasponu od 0,7894 do 0,9146). U slučaju fungicida Chromosul 80 te njegovih eksperimentalno dobivenih podataka snimljenih NIR uređajem za raspon $\lambda = 1000 - 1900$ nm PLS modeli nisu se mogli izračunati (tablica 7).

U istraživanju koje su proveli Lapcharoensuk i sur. (2023) utvrđeno je da se primjenom PLS modela može utvrditi odsutnost ili prisutnost pesticida (klorpirifosa); izračunate vrijednosti koeficijenta determinacije iznosile su $R^2 \geq 0,9$. Također, dokazano je da se parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata također uspješno može koristiti za detekciju viših ili nižih koncentracija pesticida (profenofosa) na rajčicama sa točnošću iznad 0,82 (Nazarloo i sur., 2021).

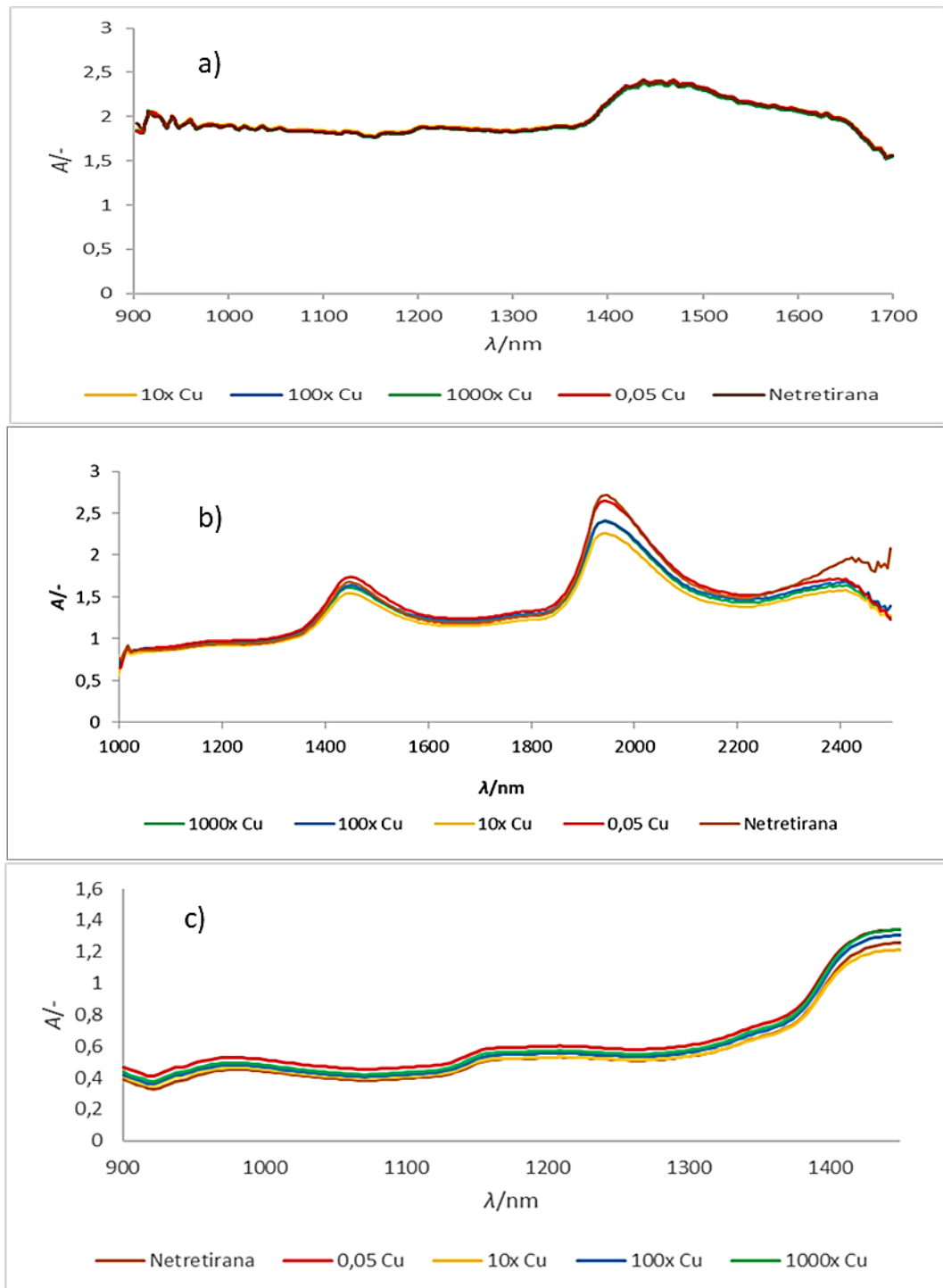
U istraživanju koje su proveli González-Martín i sur. (2021), 106 uzoraka propolisa (područje Španjolske i Čilea) testirano je na prisustvo pesticida triadimefona te je zaključeno kako se PLS metoda može koristiti za predviđanje navedenog pesticida, pri čemu je vrijednost koeficijenta determinacije iznosila $R^2 \geq 0,81$. Yazici i sur. (2019) u svome istraživanju razvili su PLS modele za predviđanje ostataka pesticida na površini jagoda (boskalid i piraklostrobin) sa vrijednostima $R^2_{kal^{**}} \geq 0,89$, $R^2_{pred^{**}} \geq 0,83$ i $R^2_{kal^{**}} \geq 0,85$.

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

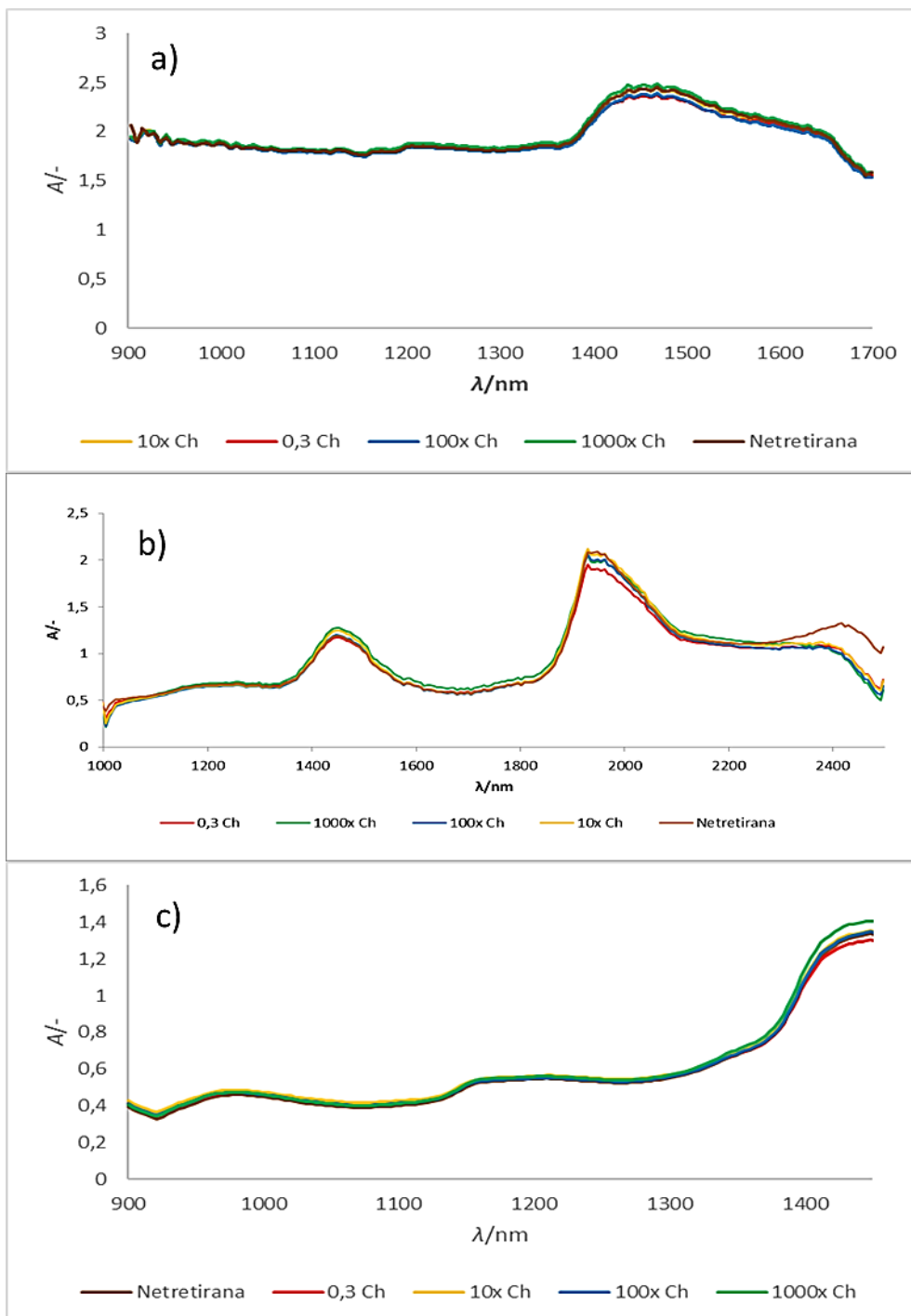
Snimljeni NIR spektri jabuka, koje su tretirane određenim koncentracijama otopina/suspenzija fungicida, koristili su se kako bi se promotrile sličnosti odn. razlike u apsorbancijama pri određenim valnim duljinama kako bi se potencijalno kvalitativno mogla odrediti prisutnost istraživanih fungicida (Cuprablau Z 35 WG i Chromosul 80). NIR spektri jabuka snimani su: NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699$ nm), NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500$ nm) te prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450$ nm).



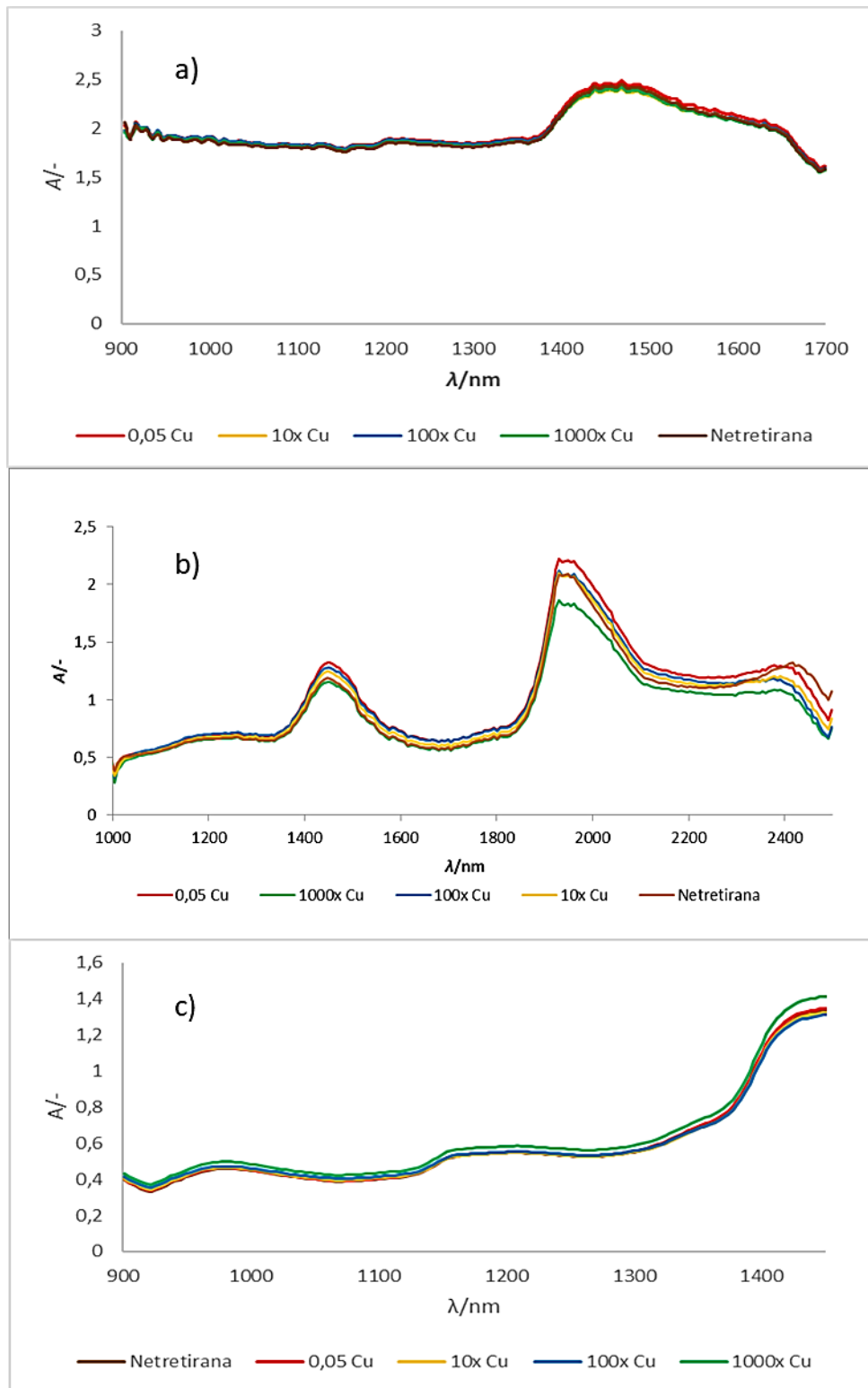
Slika 13. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za nulti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



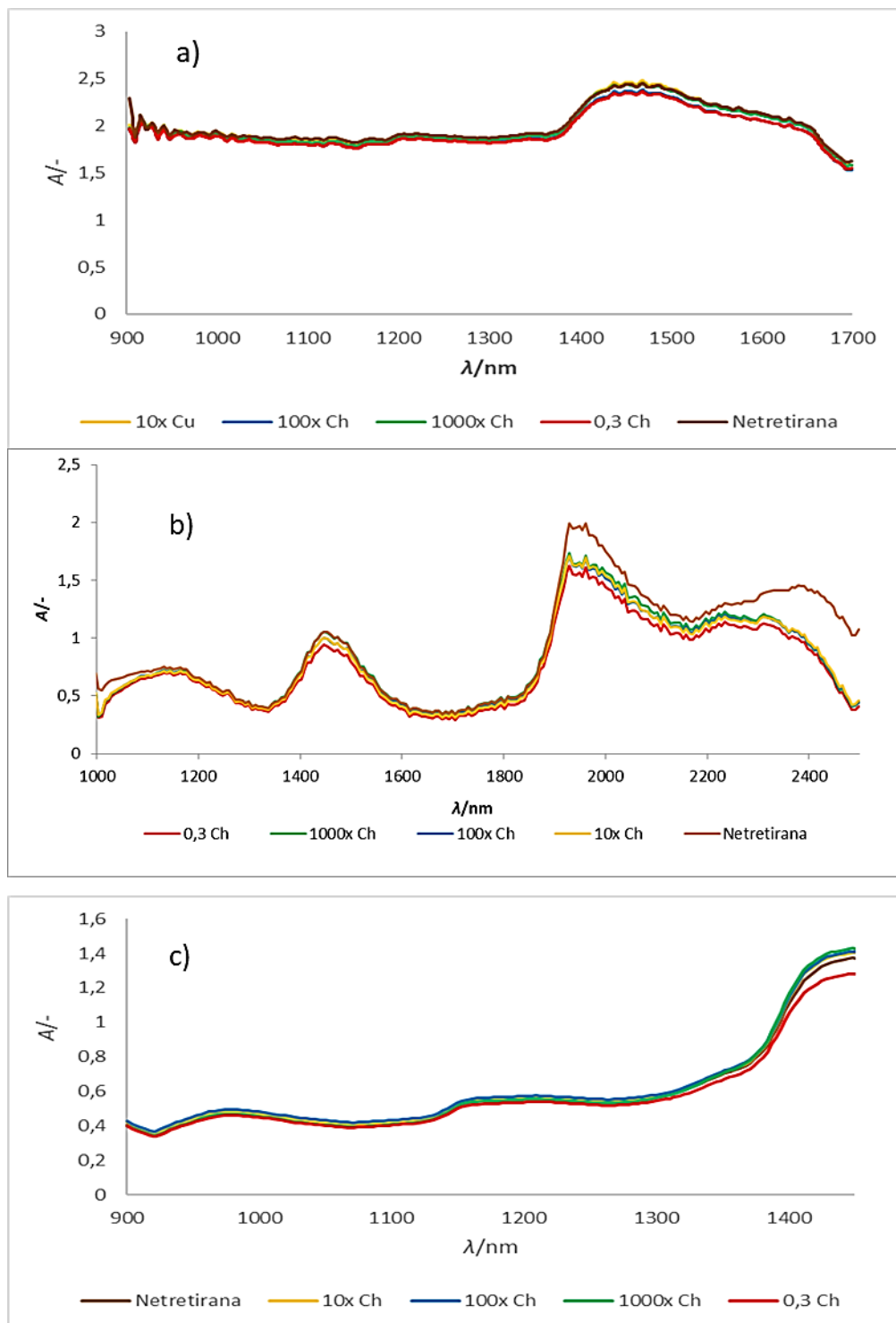
Slika 14. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za nulti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$ c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$



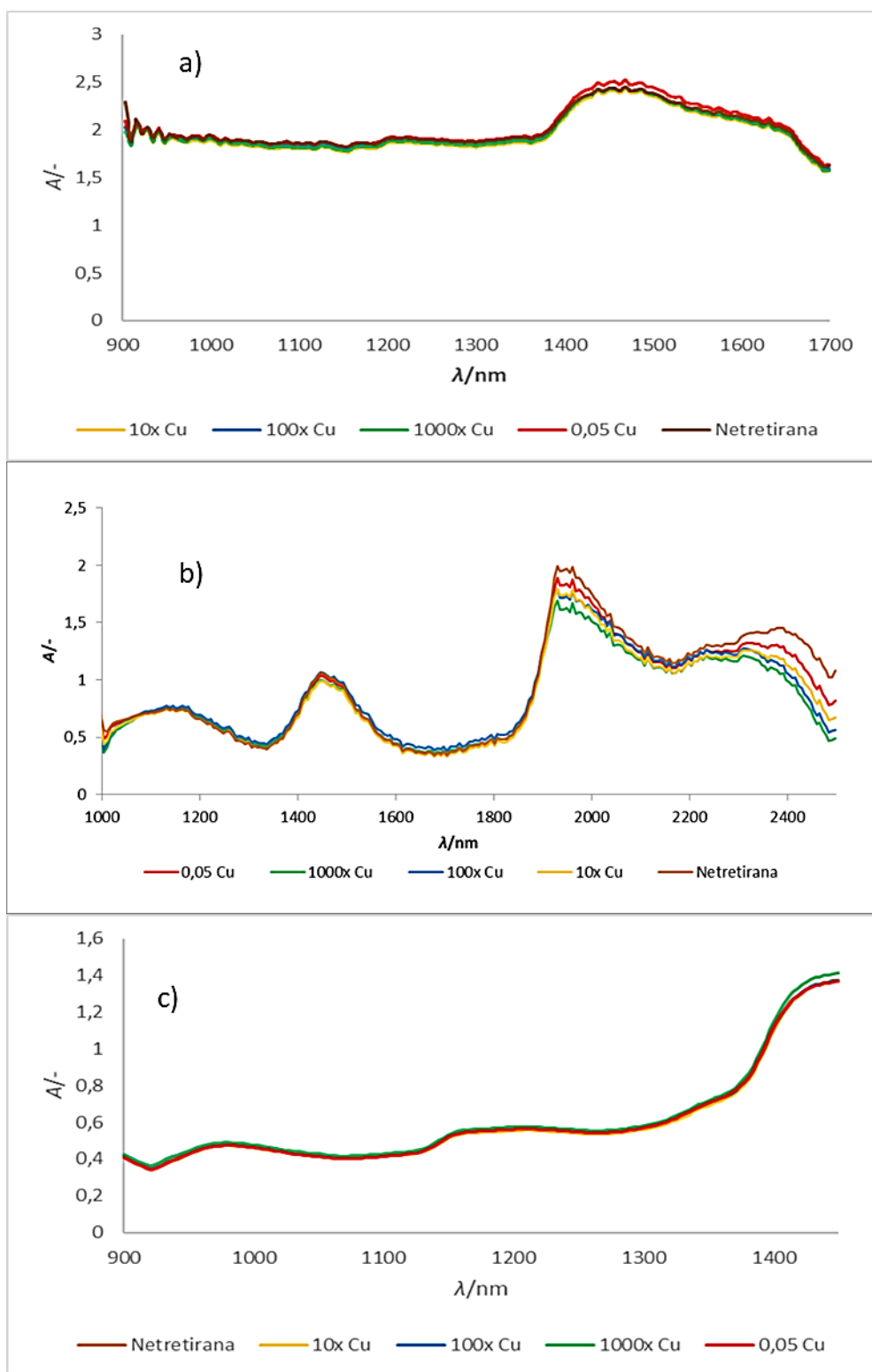
Slika 15. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za treći dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



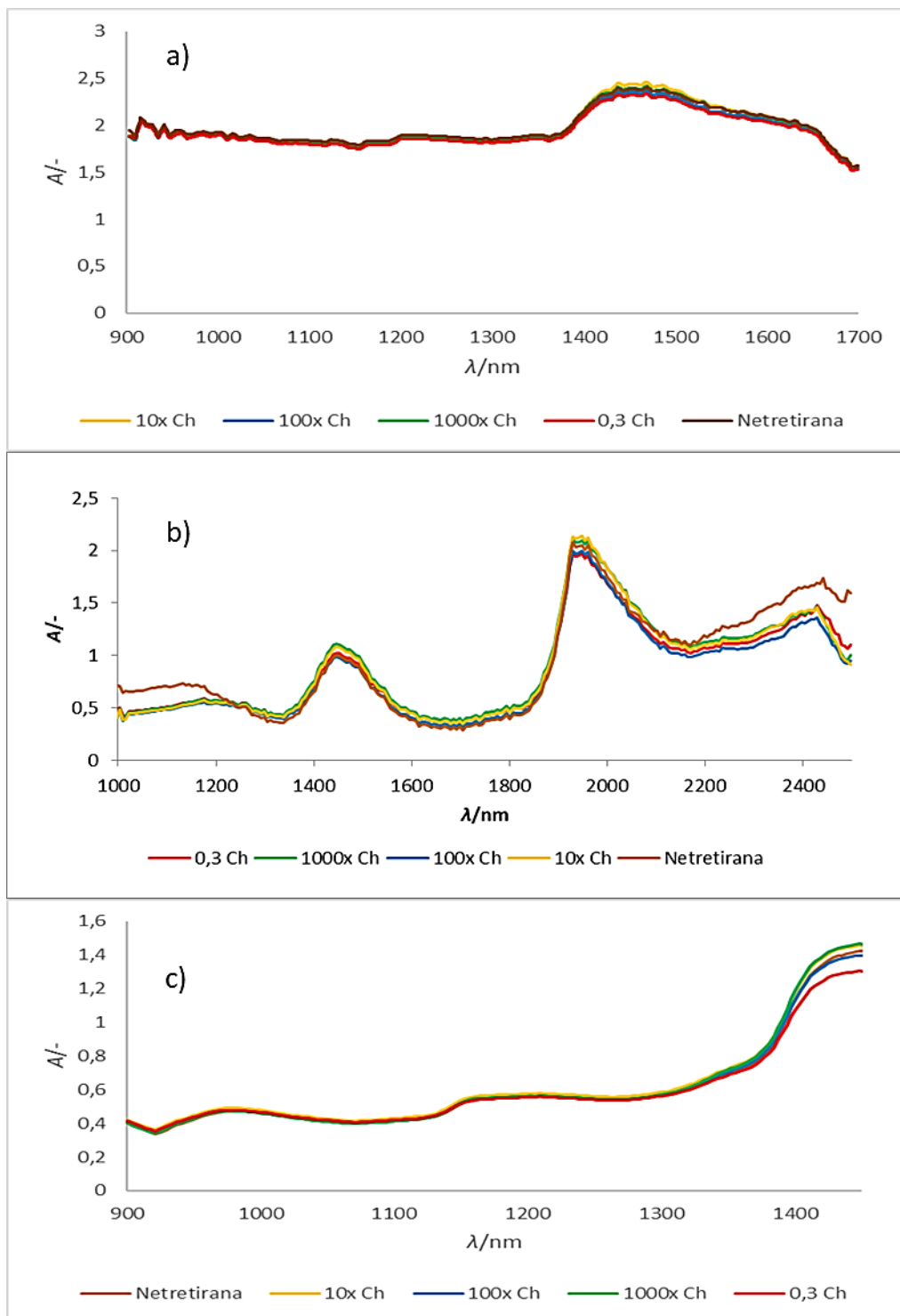
Slika 16. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za treći dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



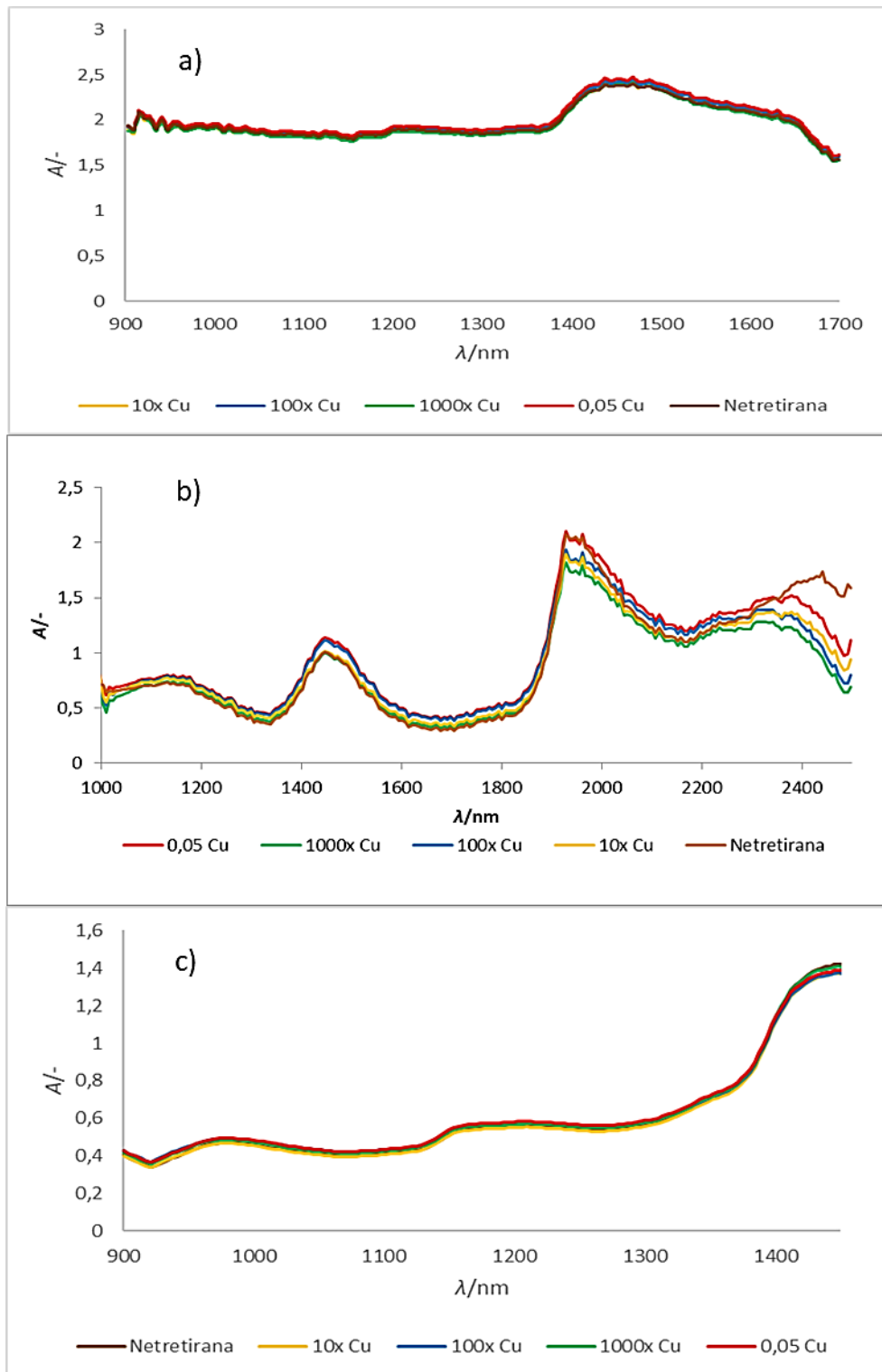
Slika 17. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za četvrti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



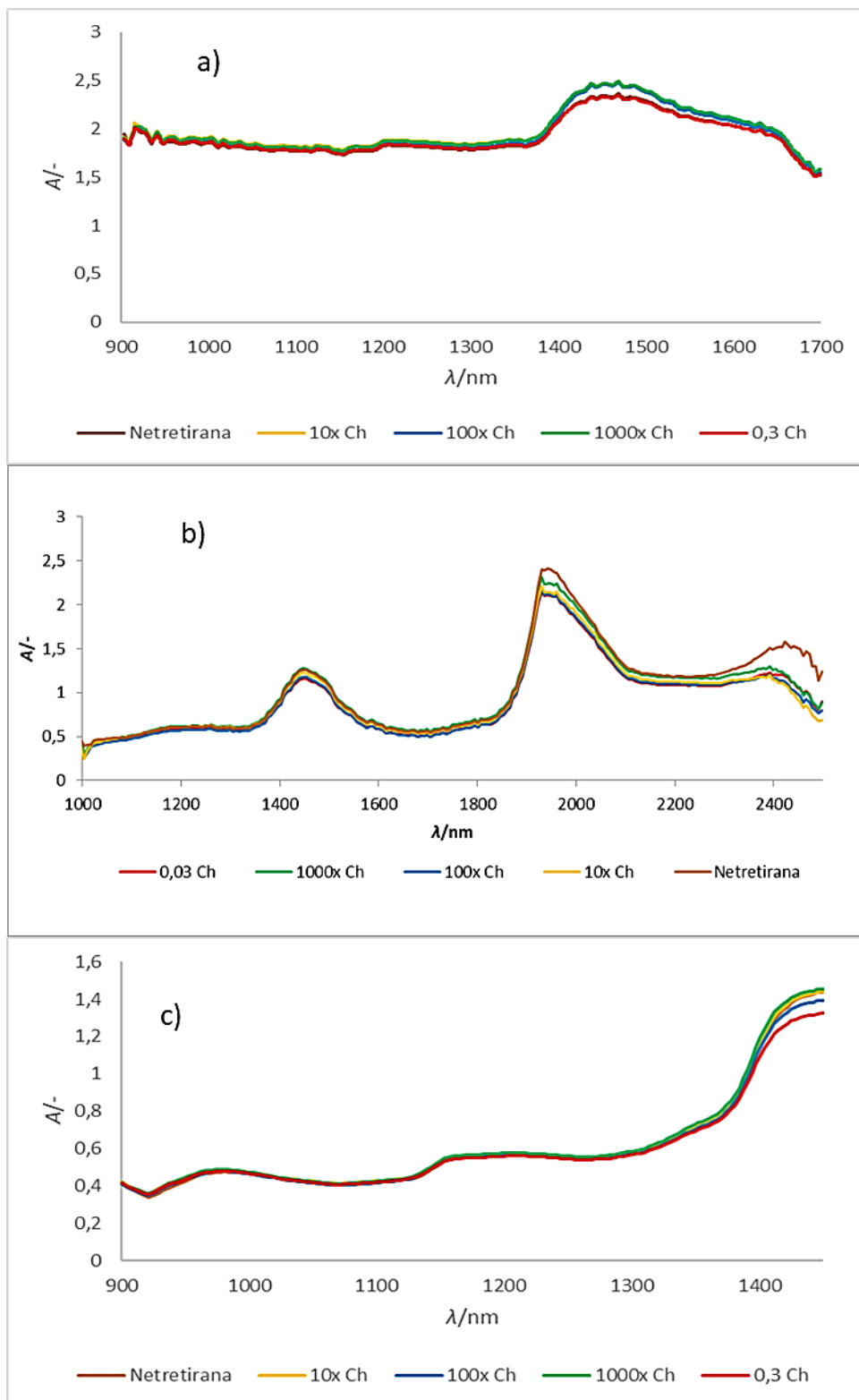
Slika 18. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za četvrti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



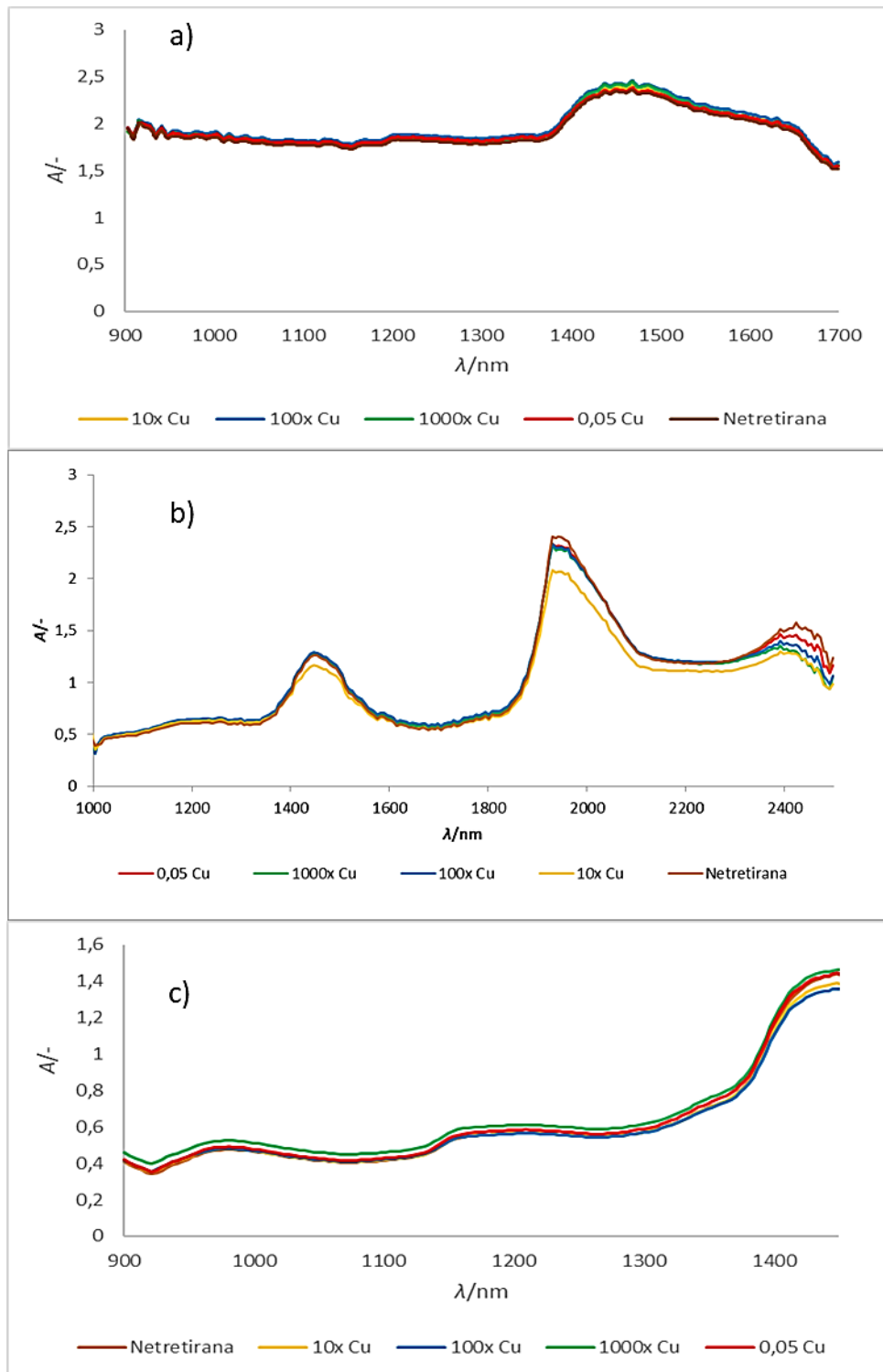
Slika 19. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za šesti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



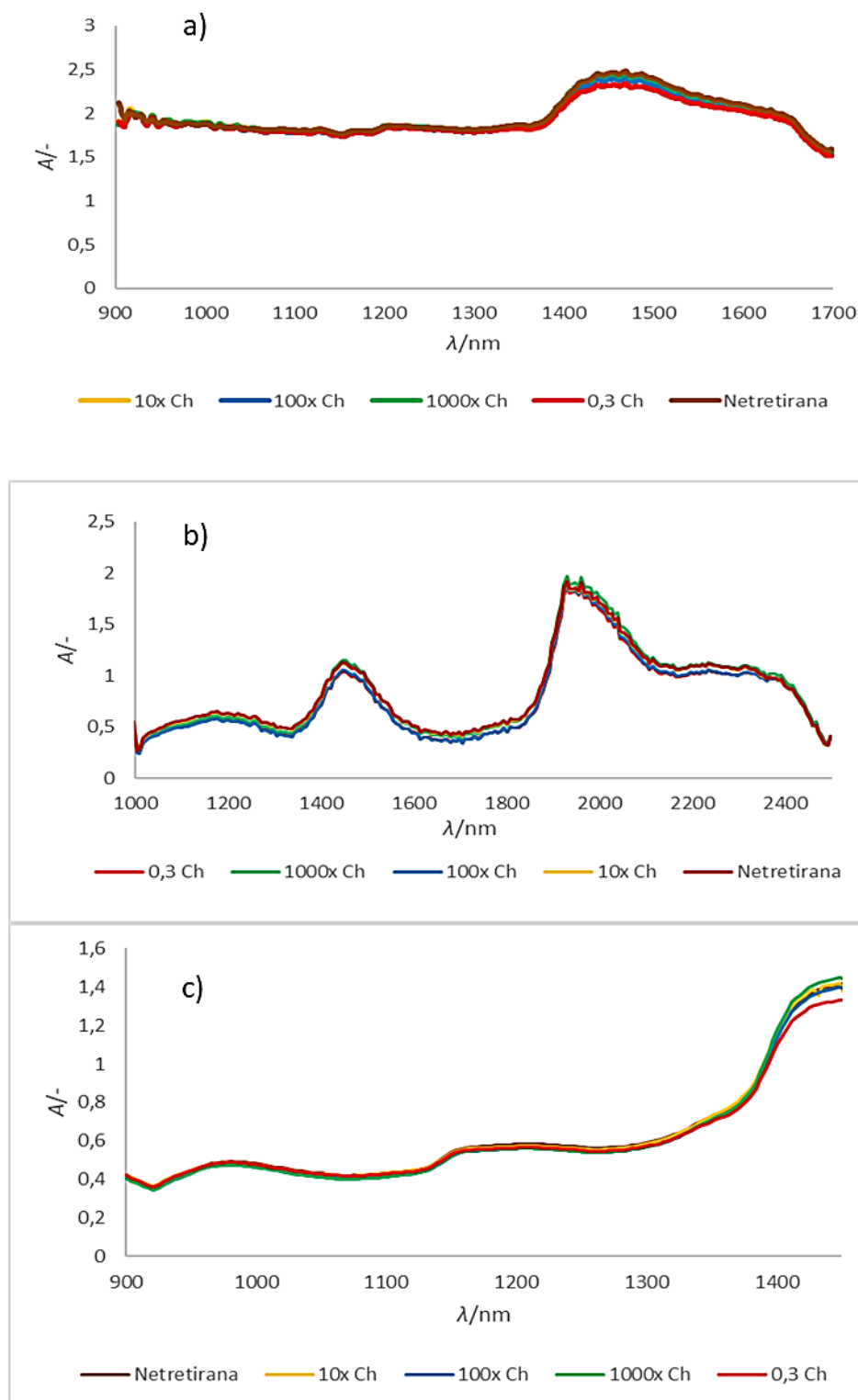
Slika 20. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za šesti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



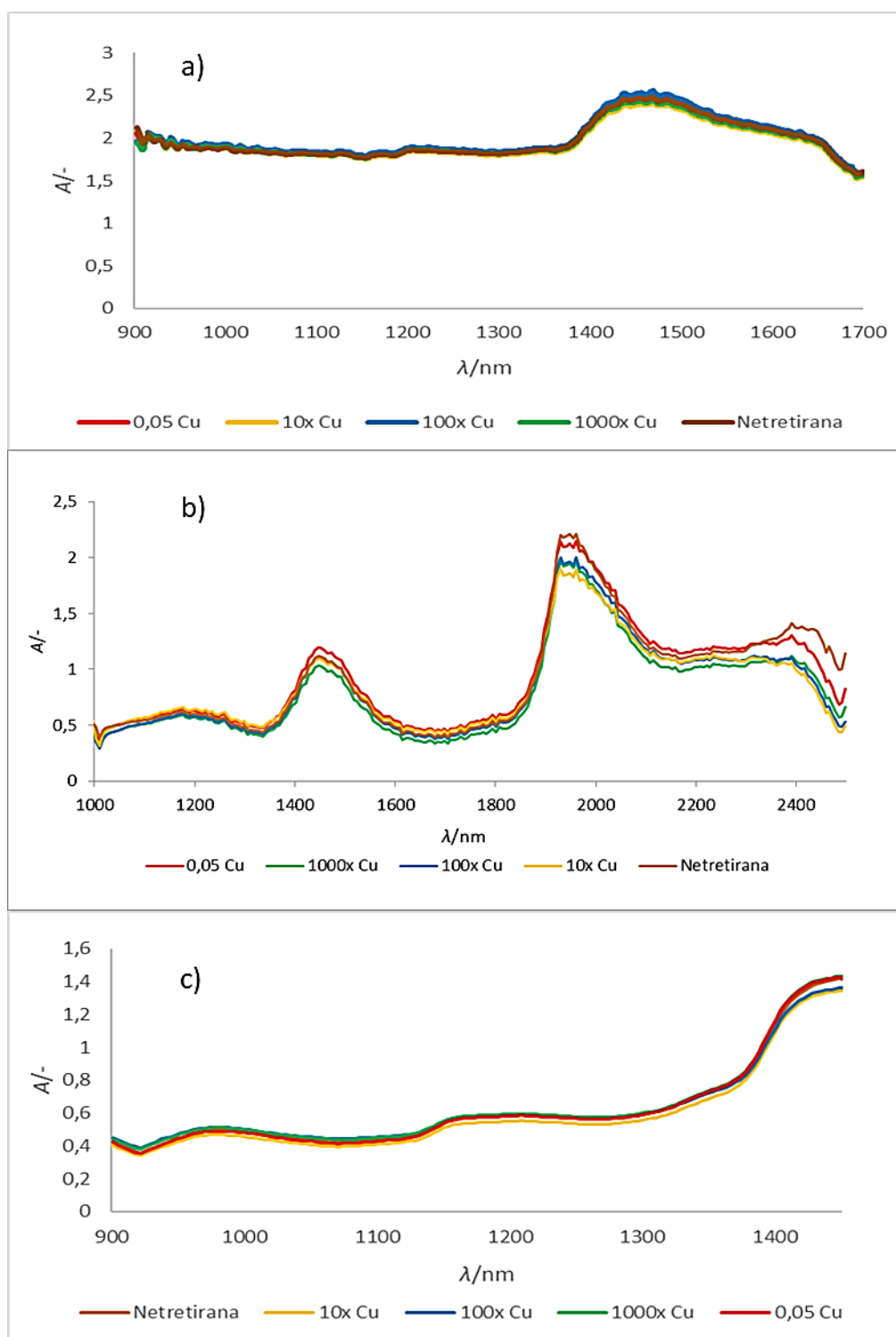
Slika 21. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za sedmi dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch–suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch–suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch–suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



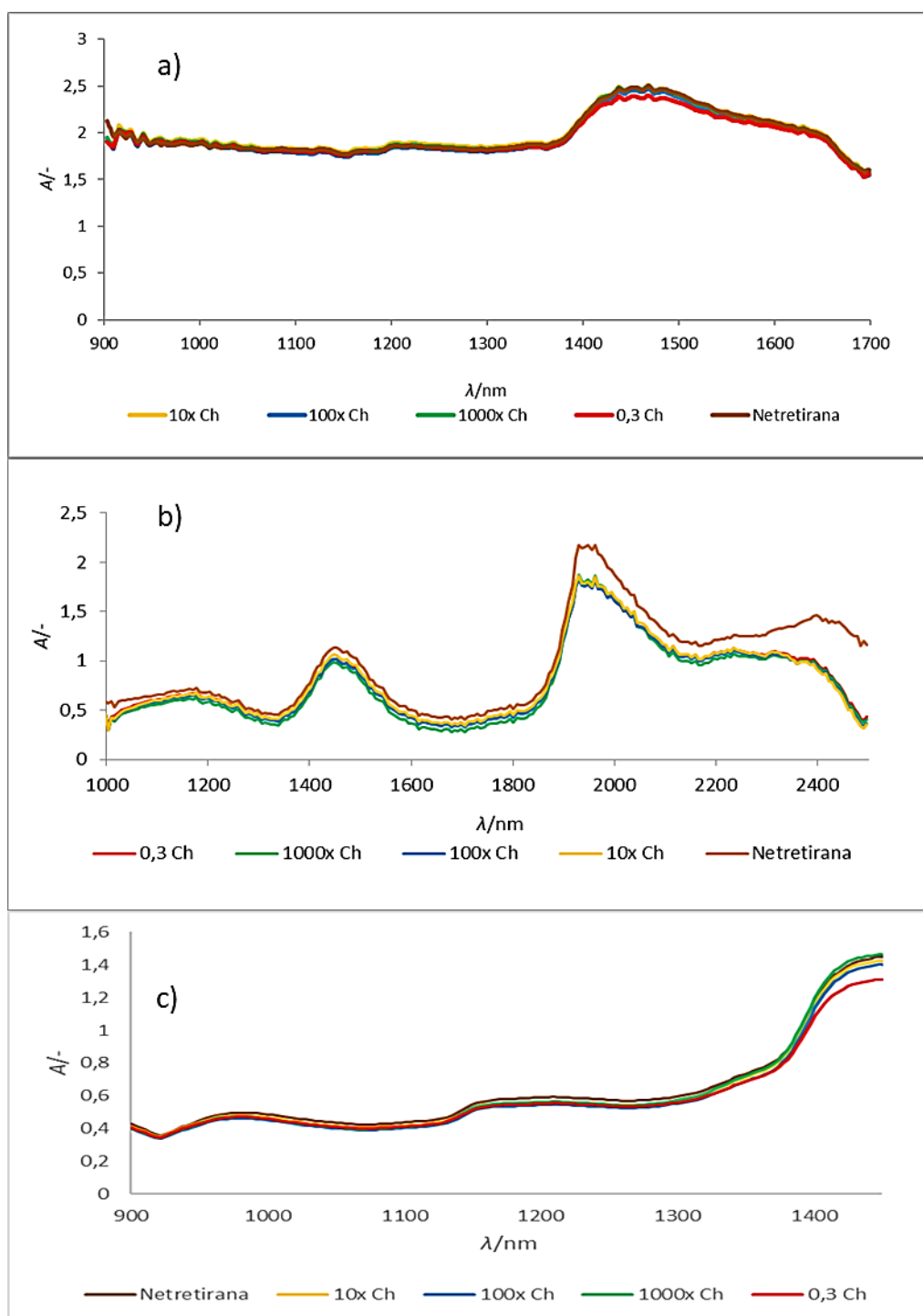
Slika 22. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za sedmi dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



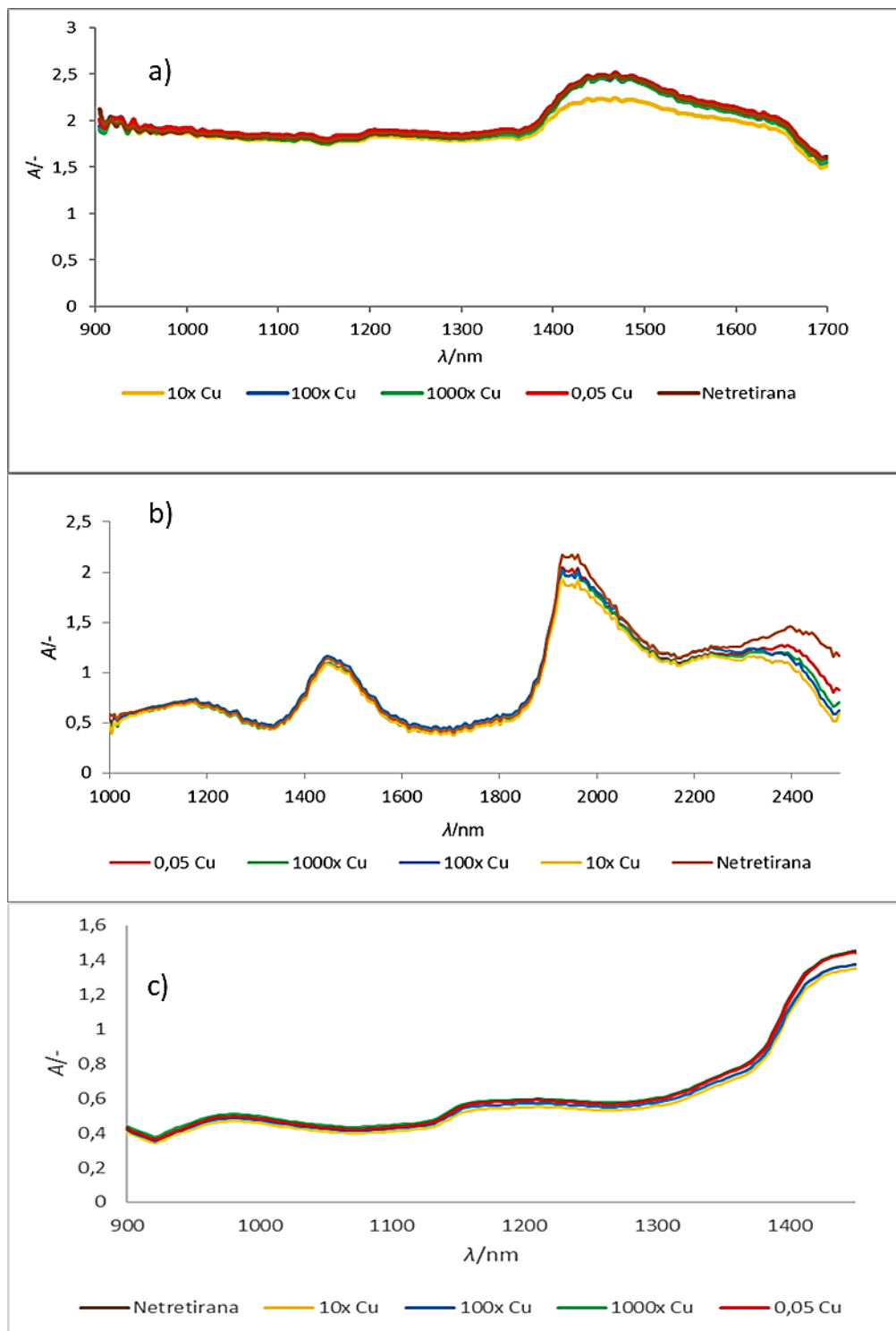
Slika 23. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za jedanaesti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



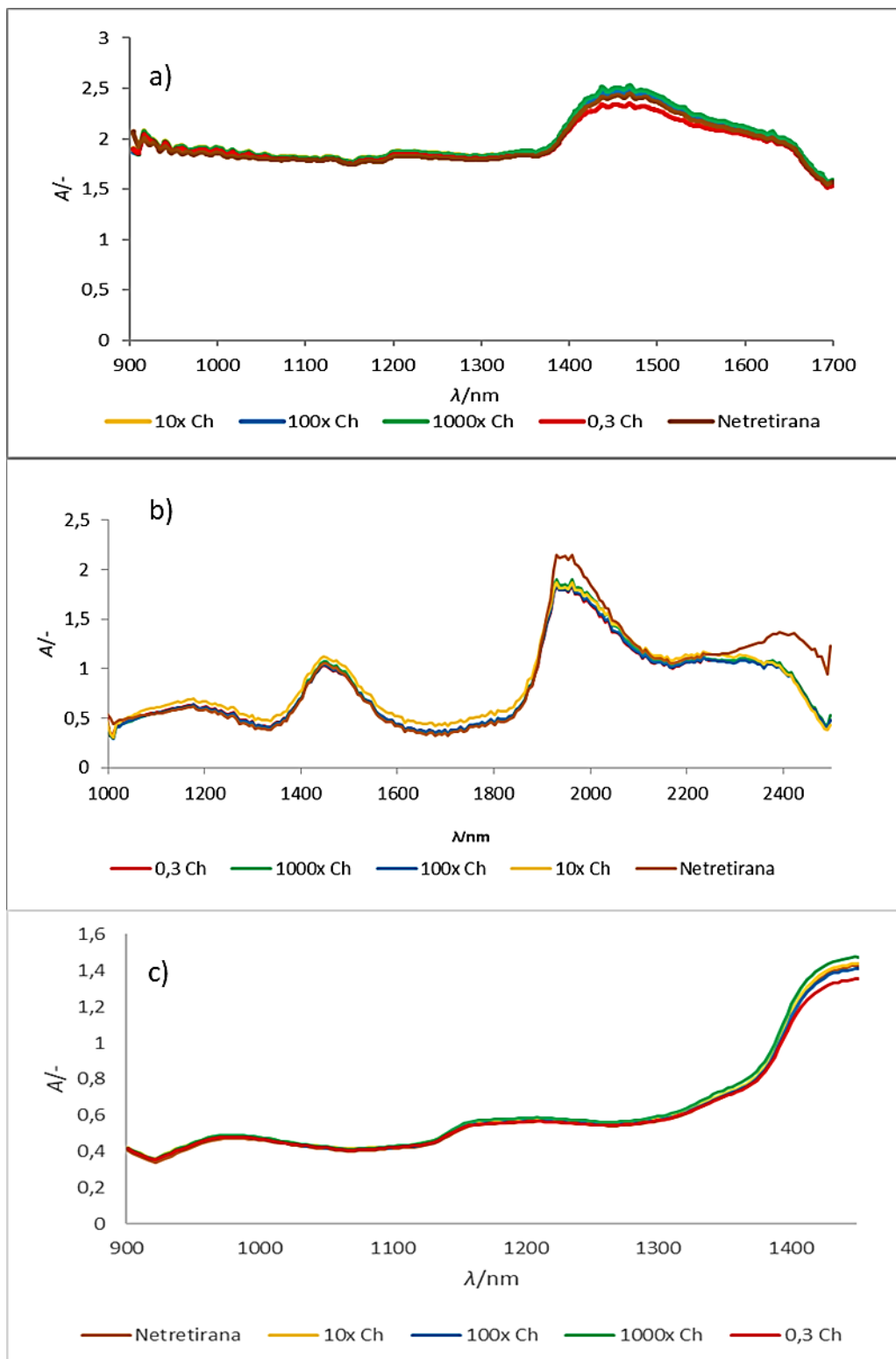
Slika 24. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za jedanaesti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu-otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu-otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu-otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



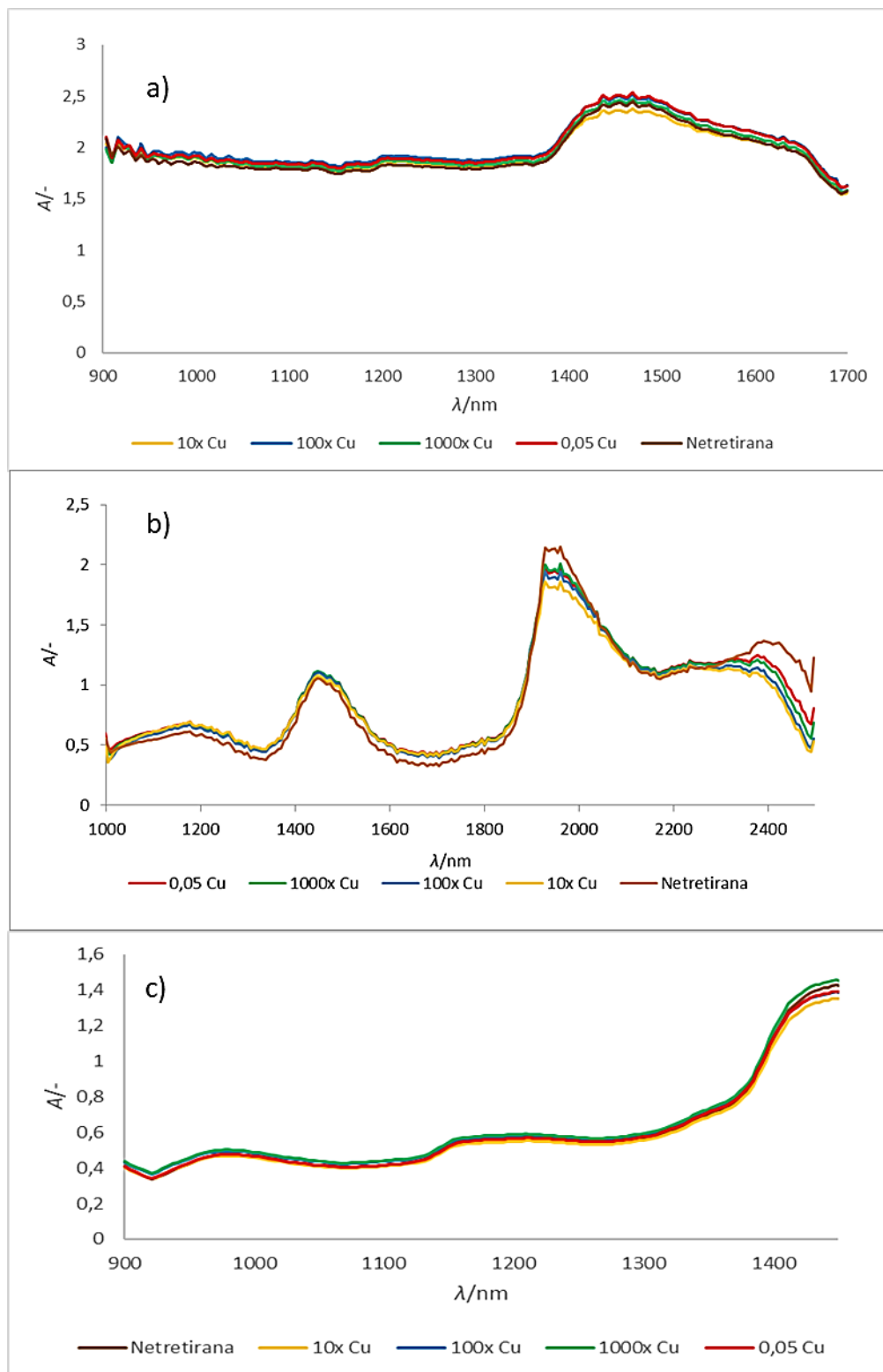
Slika 25. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za dvanaesti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



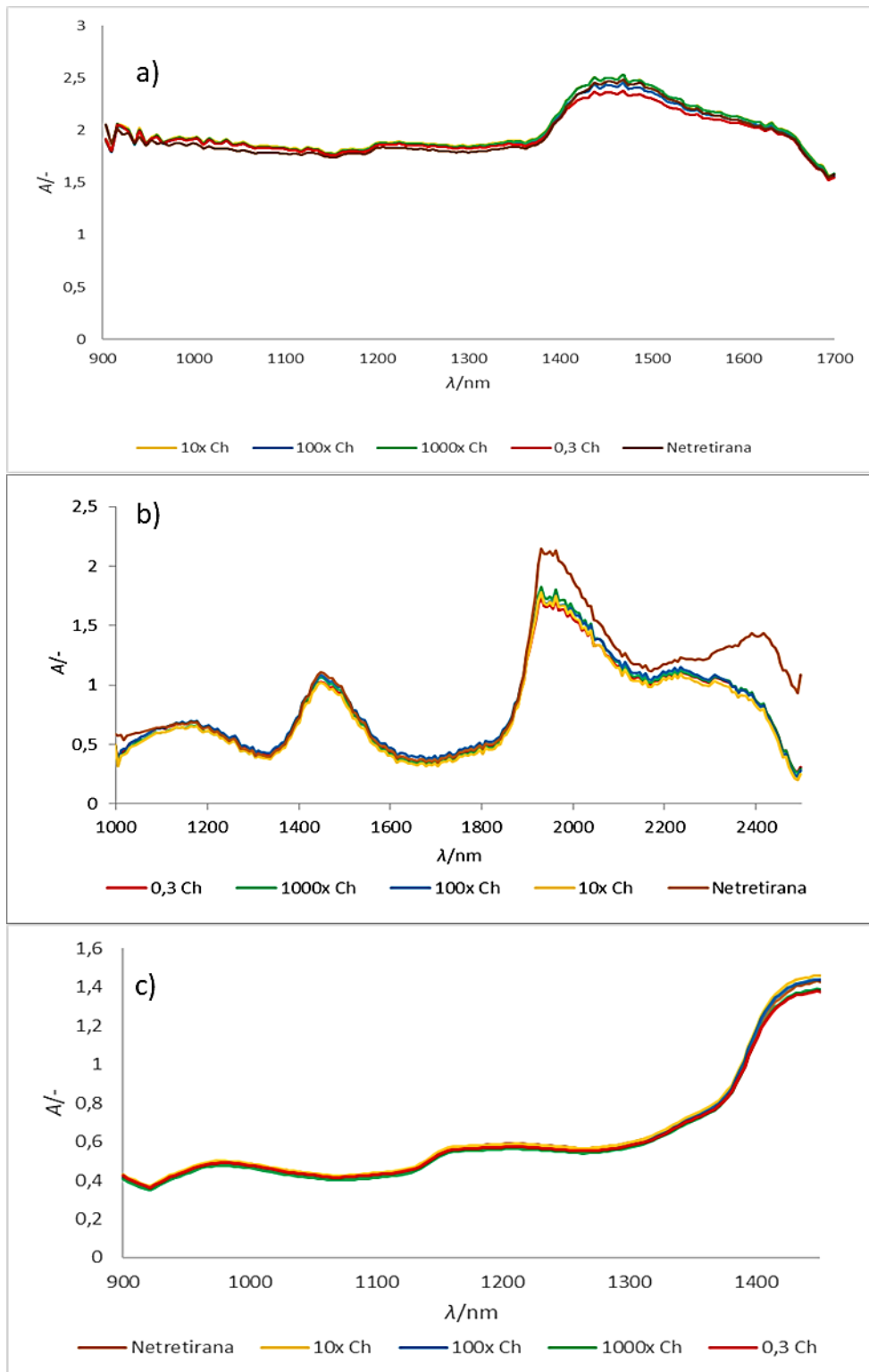
Slika 26. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za dvanaesti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



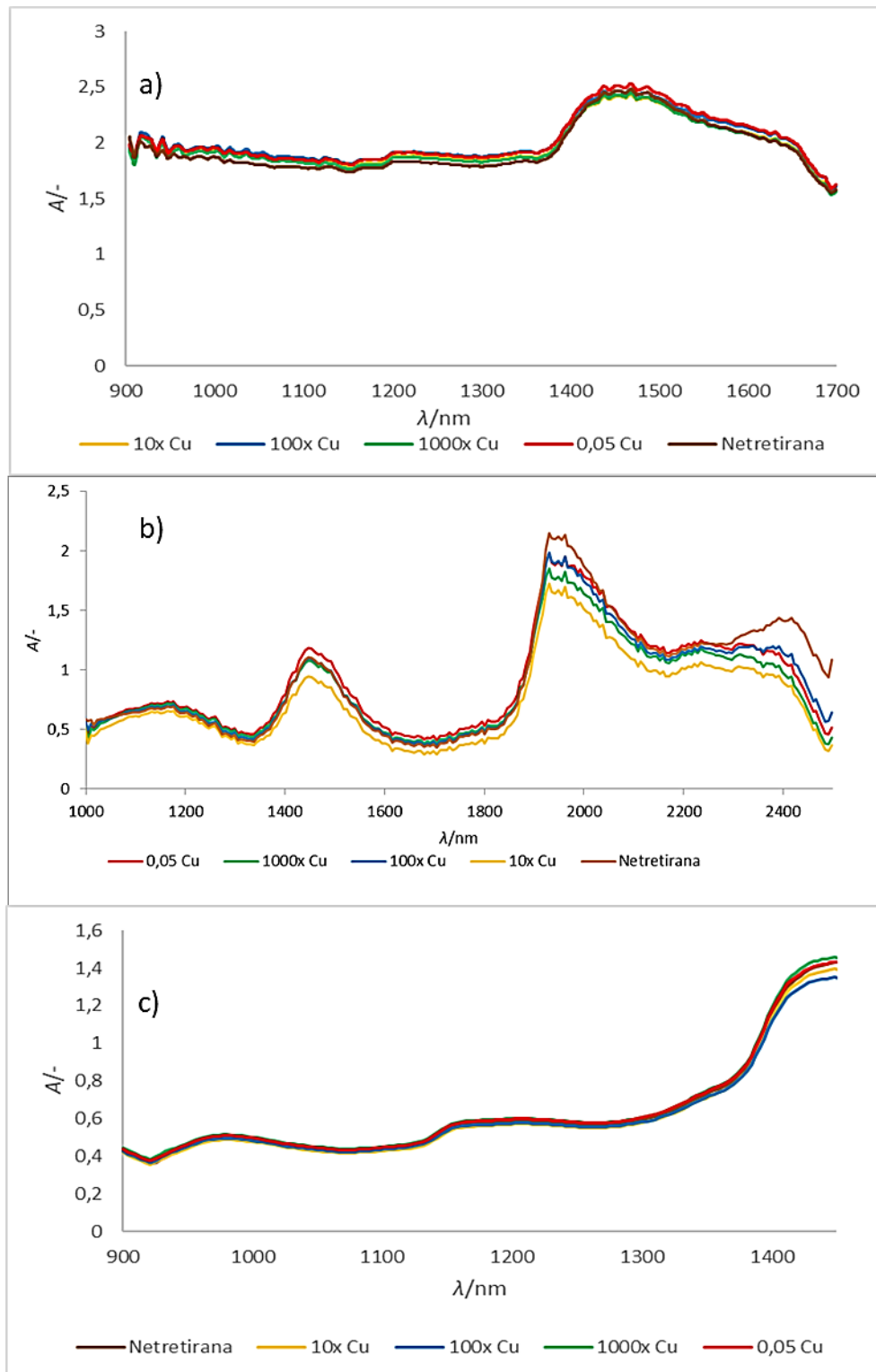
Slika 27. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za trinaesti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



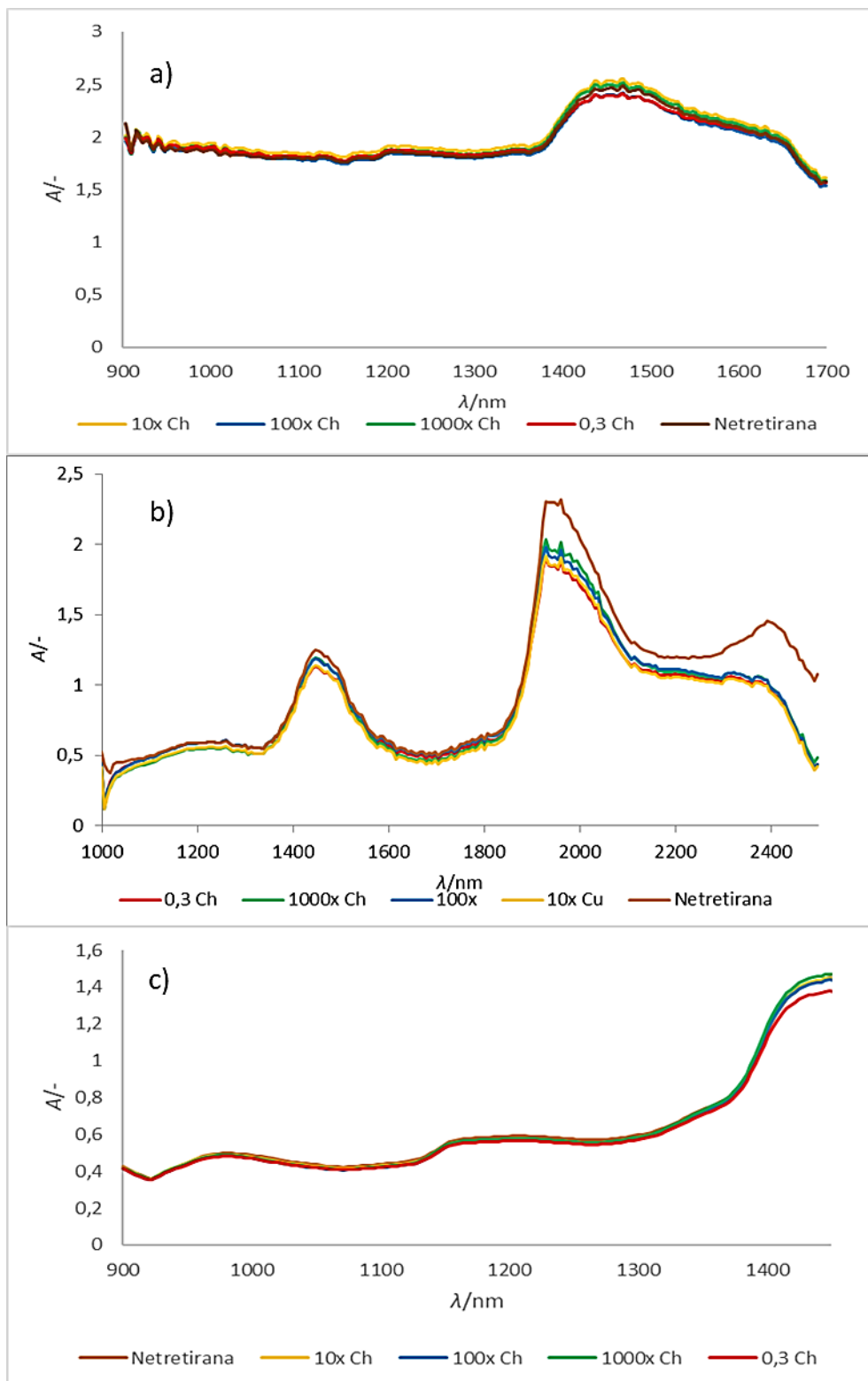
Slika 28. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za trinaesti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



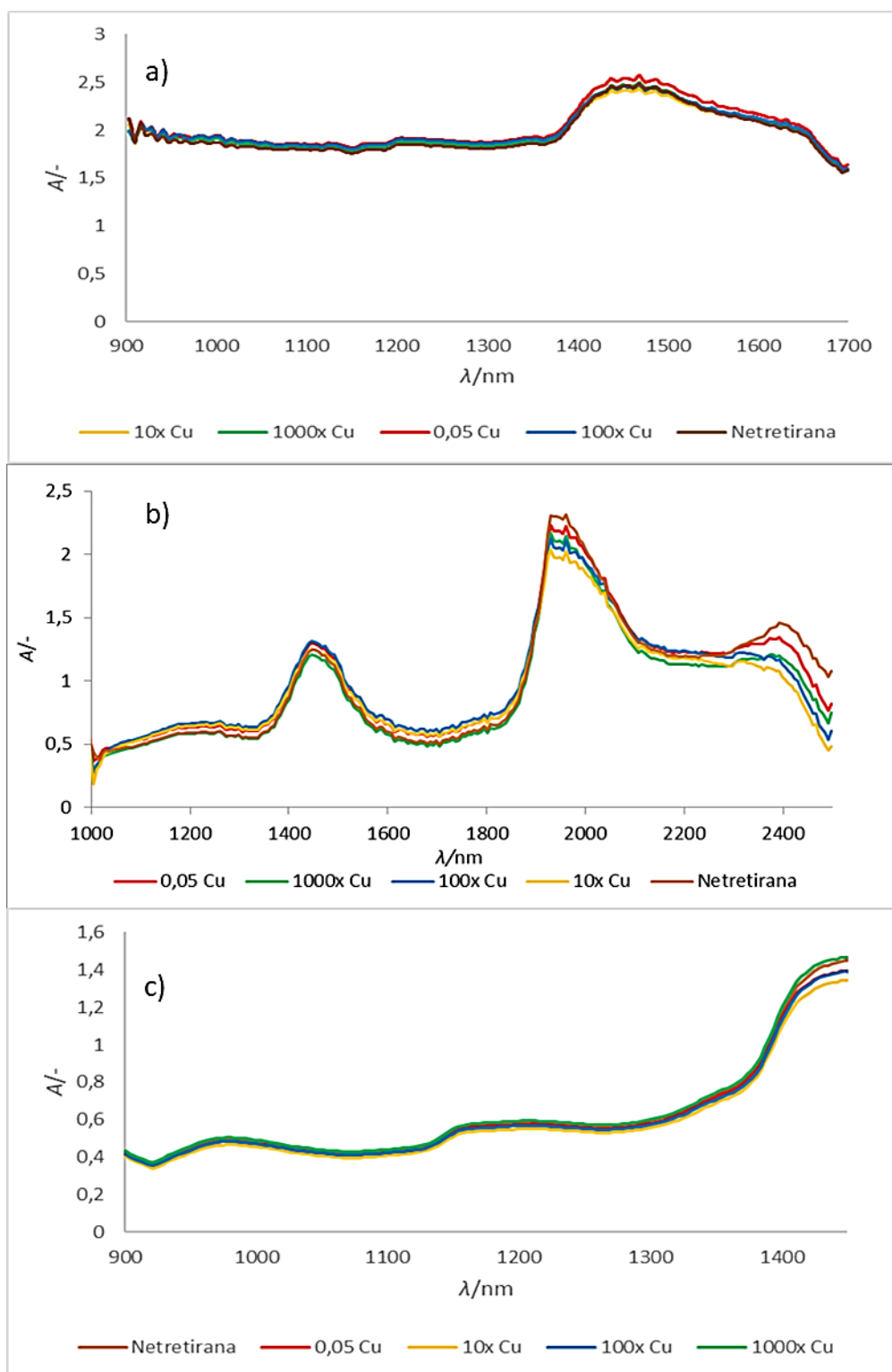
Slika 29. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za osamnaesti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch–suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch–suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch–suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



Slika 30. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za osamnaesti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu-otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu-otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu-otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



Slika 31. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Chromosul 80 za dvadeseti dan (0,3 Ch–originalna suspenzija fungicida Chromosul 80, 10x Ch-suspenzija koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Ch-suspenzija koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Ch-suspenzija koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm



Slika 32. Izvorni NIR spektri netretiranih i kontaminiranih jabuka s pesticidom Cuprablau Z 35 WG za dvadeseti dan (0,05 Cu–originalna otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG, 10x Cu–otopina koja je deset puta razrjeđenija od originalne, 100x Cu–otopina koja je sto puta razrjeđenija od originalne, 1000x Cu–otopina koja je tisuću puta razrjeđenija od originalne) snimljeni a) NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm, b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) za raspon $\lambda = 1000 - 2500$ nm c) prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) za raspon valnih duljina $\lambda = 900 - 1450$ nm

Na slikama od 13 – 32 prikazani su NIR spektri jabuka (kontrolnih odn. netretiranih uzoraka, uzoraka kontaminiranih tj. prskanih originalnim otopinama/suspencijama fungicida i uzoraka kontaminiranih tj. prskanih 10x, 100x i 1000x razrijeđenim originalnim otopinama/suspencijama fungicida Chromosul 80 i Cuprablaz Z 35 WG). Slike 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 i 31 odnose se na uzorke jabuka tretirane fungicidom Chromosul 80 i njegovim razrijeđenjima (10x, 100x, 1000x). Jabuke su snimane pomoću dva stolna i jednim prijenosnim NIR instrumentom tijekom istraživanog perioda. Iz priloženih slika, vidljivo je kako se NIR spektri, snimani pomoću sva tri NIR spektrometra, uglavnom preklapaju duž čitavog spektra valnih duljina tijekom istraživanog vremenskog perioda. Na slici 13 (nulti dan) prikazani su NIR spektri jabuka kontaminiranih sa originalnim suspencijama pesticida Chromosul 80 i njegovih razrijeđenja (10x, 100x, 1000x), kao i NIR spektri kontrolnih uzoraka. Iz NIR spektara snimanih NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm (slika 13a) vidi se kako se spektri preklapaju. Takav trend uglavnom pokazuju i NIR spektri snimani NIR spektrometrom AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO (slika 13b) kao i NIR spektri snimani prijenosnim NIR spektrometrom NIR-M-R2, (slika 13c). Do znatnog skoka apsorbancije došlo je u rasponu valnih duljina od 1400 nm do 1600 nm gdje se pojavljuju vibracije N-H veze u prvom overtonu i O-H veze u prvom overtonu što sugerira na prisutnost vode u istraživanim uzorcima (slika 13).

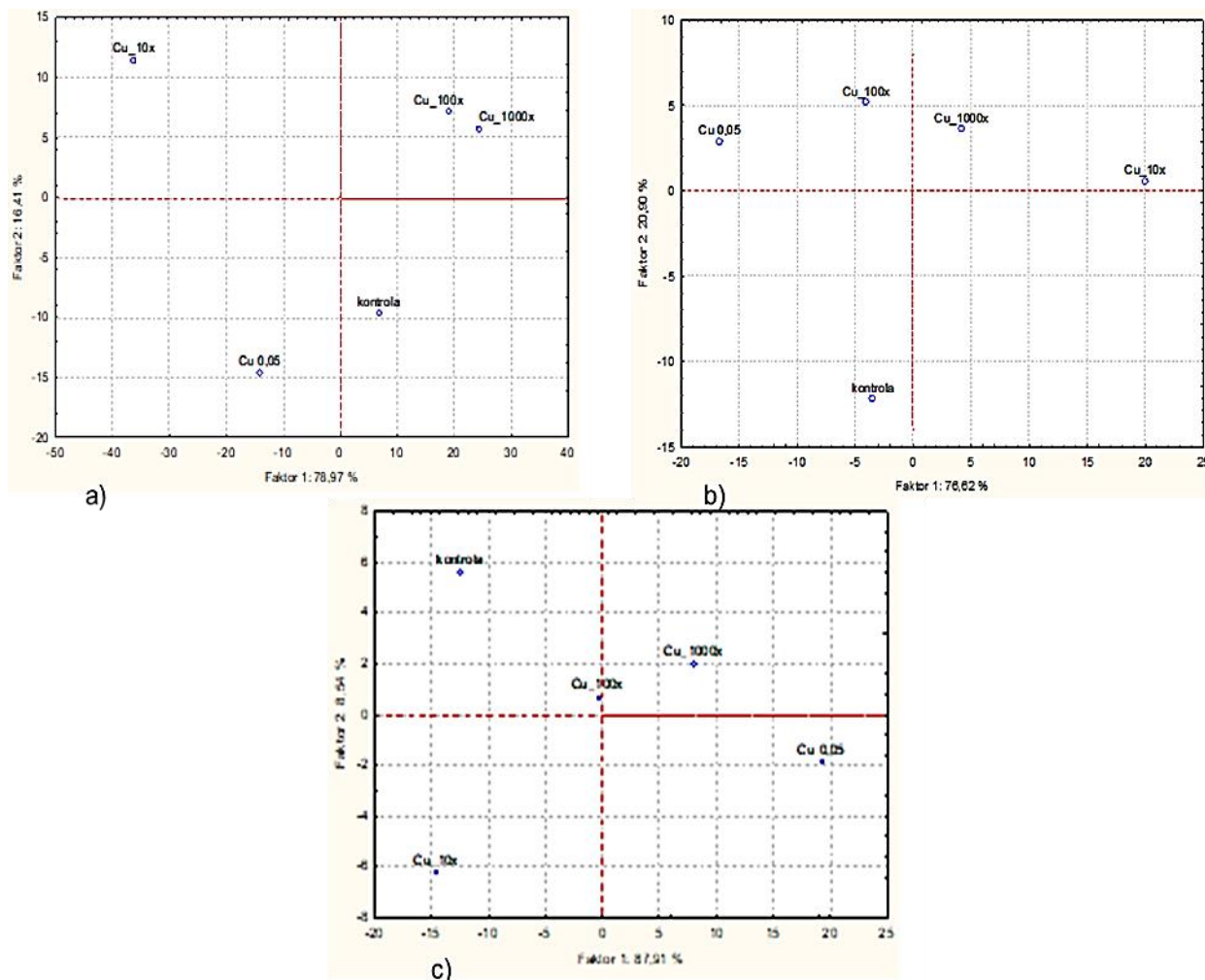
Pri valnim duljinama od 900 – 925 nm (slika 13a) također dolazi do povećanja apsorbancije što se objašnjava vibracijama C-H veze u trećem overtonu te vibracijama O-H veze u drugom overtonu (Klapan, 2022). Sa slika je vidljivo kako uzorak kontaminiran originalnom suspencijom pesticida Chromosul 80 uglavnom pokazuje najvišu apsorbanciju (što je i očekivano), iako je to na nekim grafovima teško uočljivo budući da su vrpce preklapljene, ali dovoljno jasne kako bi se mogla provesti kvalitativna analiza.

Slike 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 odnose se na uzorke jabuka tretirane fungicidom Cuprablau Z 35 WG i njegovim razrijeđenjima (10x, 100x i 1000x). Jabuke su snimane pomoću dva stolna i jednim prijenosnim NIR instrumentom tijekom trodnevnog perioda. Tu se, kao i u slučaju Chromosula, vrpce uglavnom preklapaju. Na slici 14 (koja predstavlja nulti dan tj. dan kada su jabuke tretirane fungicidima) vidi se da se apsorbancija uzorka koji je kontaminiran sa originalnom otopinom fungicida (0,05 Cu) izdvaja od ostalih uzoraka. Sedmi dan kontaminacije dolazi do promjene odn. razlike u apsorbancijama uzoraka sve su teže vidljive golim okom (slika 22). Iako originalna otopina fungicida tijekom trodnevnog perioda u većini slučajeva pokazuje veću apsorbanciju (NIR spektri snimani primjenom sva tri NIR spektrometra), uzorci kontaminirani sa 1000x razrijeđenom otopinom fungicida (prijenosni NIR spektrometar) pokazuju veću vrijednost apsorbancije dvadeseti dan snimanja (slika 32b), kao i kontrolni uzorak (netretirana jabuka) (slika 32c).

Na slikama 13 – 32 prikazani izvorni NIR spektri jabuka kontaminiranih istraživanim fungicidima (0,3 Ch i 0,05 Cu) i kontrolni uzorci uglavnom slijede isti trend tijekom istraživanog vremenskog perioda. NIR spektri snimani NIR spektrometrom AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO pokazuju skok u apsorbanciji u rasponu valnih duljina od 1800 nm do 2200 nm. Također NIR spektri snimani spektrometrom AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO pokazuju razlike u vrijednostima apsorbancije snimanih uzoraka te su, u odnosu na NIR spektre snimane preostalim dvama instrumentima, šumoviti što može ukazivati na osjetljivost instrumenta prilikom mjerenja odn. otežati kvalitativnu identifikaciju fungicida.

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, pomoću tri NIR instrumenta obrađeni su analizom glavnih komponenata (engl. Principal Component Analysis, PCA). PCA se koristila s ciljem reduciranja dimenzionalnosti skupa NIR spektralnih podataka (kod multidimenzionalnih podataka teško je uočiti sličnosti i razlike među podacima) (Jolliffe i Cadima, 2016). Cilj PCA analize je prikazati sličnosti odn. razlike između netretiranih i jabuka tretiranih različitim koncentracijama istraživanih fungicida.



Slika 33. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenom koncentracijom (Cu_10x), 100 puta razrijeđenom koncentracijom (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenom koncentracijom (Cu_1000x) pesticida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka nulti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)

PCA analizom iz podataka koji su dobiveni NIR spektroskopijom za netretirane (kontrolne) i jabuke prskane (tretirane) odgovarajućim koncentracijama otopine fungicida Cuprablau Z 35 WG za nulti dan na slici 33 je vidljivo je razdvajanje netretiranih jabuka (kontrola) od jabuka koje su tretirane odgovarajućim koncentracijama otopine fungicida Cuprablau Z 35 WG. Slika 33a prikazuje grupiranje uzoraka jabuka tretiranih koncentracijama fungicida Cu_100x, Cu_1000x u prvi kvadrant, uzorak jabuke tretiran s koncentracijom Cu_10x smjestio se u drugi kvadrant, uzorak jabuke tretiran s originalnom otopinom (Cu 0,05) smjestio se u treći a kontrolni uzorak (netretirana jabuka) u četvrti kvadrant. Faktor 1 objašnjava 78,97 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok Faktor 2 doprinosi sa 16,41 % pojašnjenja varijanci u

promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 95,38 % svih varijanci u promatranom skupu podataka. Slika 33b prikazuje grupiranje uzoraka jabuke tretiranih s originalnom otopinom Cu 0,05 i njegovih odgovarajućih razrjeđenja u prvom i drugom kvadrantu dok se kontrolni uzorak smjestio u treći kvadrant. Faktor 1 objašnjava 76,62 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok Faktor 2 doprinosi sa 20,90 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 97,52 % svih varijanci u promatranom skupu podataka. Slika 33c prikazuje kontrolni uzorak (netretirana jabuka) smješten u drugom kvadrantu dok se uzorak jabuke tretiran originalnom otopinom (Cu 0,05) smjestio u četvrtom kvadrantu. Ostali uzorci razmješteni su u prvom, drugom i trećem kvadrantu. Faktor 1 objašnjava 87,91 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok Faktor 2 doprinosi sa 8,54 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 96,45 % svih varijanci u promatranom skupu podataka.

Što se tiče Chromosul-a 80 (prilog 1), PCA analizom također je vidljivo razdvajanje netretiranih jabuka (kontrola) od jabuka koje su tretirane odgovarajućim koncentracijama istraživanog fungicida. Prilog 1a prikazuje grupiranje uzoraka jabuka tretiranih koncentracijama fungicida Ch_100x, Ch_1000x u četvrti kvadrant, uzorak jabuke tretiran s koncentracijom Ch_10x smjestio se u drugi kvadrant, uzorak jabuke tretiran s originalnom suspenzijom (Ch 0,3) smjestio se u prvi, a kontrolni uzorak (netretirana jabuka) u treći kvadrant. Faktor 1 objašnjava 95,49 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok Faktor 2 doprinosi sa 4,01 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 99,5 % svih varijanci u promatranom skupu podataka. Prilog 1b prikazuje grupiranje uzoraka jabuka tretiranih s originalnom suspenzijom Ch 0,3 sa uzorcima jabuka tretiranih sa 100x razrijeđenom suspenzijom fungicida u prvi kvadrant. Kontrolni uzorak smjestio u treći kvadrant, a ostatak uzoraka u drugi. Faktor 1 objašnjava 83,19 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok Faktor 2 doprinosi sa 16,23 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 99,44 % svih varijanci u promatranom skupu podataka. Prilog 1c prikazuje kontrolni uzorak (netretirana jabuka) smješten u četvrtom kvadrantu dok se uzorak jabuke tretiran originalnom suspenzijom (Ch 0,3) smjestio u prvi kvadrant zajedno sa uzorcima jabuka koji su tretirani sa 100x razrijeđenom originalnom suspenzijom fungicida. Ostatak je smješten u drugi kvadrant. Faktor 1 objašnjava 91,34 % svih interakcija u promatranom skupu podataka dok Faktor 2 doprinosi sa 4,58 % pojašnjenja varijanci u promatranom skupu podataka odnosno ukupno se može objasniti 95,92 % svih varijanci u promatranom skupu podataka.

Prilozi 2 – 19 prikazuju PCA analizu izvornih NIR spektara jabuka tretiranih (prskanih) odgovarajućim koncentracijama fungicida 0,5 Cu i 0,03 Ch i kontrolnih (netretiranih) jabuka treći, četvrti, šesti, sedmi, jedanaesti, dvanaesti, trinaesti, osamnaesti i dvadeseti dan.

Kod analize uzoraka koji su snimani treći dan (prilozi 2a,b i 3a,b) PCA analiza uspješno je razdvojila kontrolni uzorak (netretirana jabuka) od tretiranih. PCA analizom izvornih NIR spektara snimljenih prijenosnim NIR spektrometrom, kontrolni uzorak i uzorak tretiran originalnom otopinom Cu 0,05 pozicionirani su u četvrtom kvadrantu (Prilog 2c), dok je u slučaju tretiranja jabuka fungicidom Ch 0,3 uspješno razdvojila kontrolni uzorak od tretiranih jabuka (Prilog 3c).

Prilozi 5, 6, 8, 11, 13, 15, 16, 17, 18 i 19 prikazuju uspješno razdvajanje uzoraka jabuka tretiranih fungicidima Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG od kontrolnog uzorka na temelju NIR spektara snimljenih primjenom sva tri NIR spektrometra. Može se zaključiti kako je uspješnije razdvajanje postignuto za uzorke tretirane fungicidom Chromosul 80 (0,3 Ch) i njegovim odgovarajućim razrjeđenjima.

Iz priloga 18 vidljivo je kako su se uzorci tretirani 0,5 Cu pozicionirali u treći ili u četvrti kvadrant (prilog 18), a uzorci kontaminirani 0,03 Ch smješteni su u prvi, odnosno četvrti kvadrant (Prilog 19). Kontrolni uzorci pozicionirani su u treći ili četvrti kvadrant (Prilog 18, Prilog 19). Također je, na kraju istraživanog vremenskog perioda vidljivo kako je PCA analiza uspješno razdvojila jabuke tretirane istraživanim fungicidima od kontrolnih (netretiranih) jabuka.

U istraživanju koje su proveli Martino i sur. (2021) na uzorcima koji su kontaminirani sa šest različitih vrsta pesticida, PCA analiza uspješno ih je razdvojila po skupinama, kao i kontrolnu grupu, te su autori dokazali važnost i praktičnost ove statističke metode. PCA analizu u svom su istraživanju primijenili Marcolin i sur. (2021) šest uzoraka meda iz Brazila testirano je na ostatke 103 pesticida QuEChERS metodom, ali nijedan od uzoraka u konačnici nije sadržavao pesticide. Međutim, PCA analizom uzorci meda grupirani su prema nekim fizikalno – kemijskim karakteristikama kao što su vlaga, kiselost, koncentracija reducirajućih šećera i saharoze, a posljedično prema tim karakteristikama uzorci su grupirani po geografskom podrijetlu, čak i godišnjem dobu kada je med proizveden.

5. ZAKLJUČCI

1. Eksperimentalno izmjerene vrijednosti ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti za suspenzije/otopine fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG uglavnom su pokazivale padajući trend kako se smanjivala koncentracija fungicida. Najveće promjene boje (ΔE) zabilježene su kod suspenzija fungicida Chromosul 80 razrijeđene trideset puta, sedamdeset puta i devedeset puta i otopina fungicida Cuprablau Z 35 WG razrijeđene sto puta, stopešest puta i tisuću puta.
2. PCA analiza uzoraka originalnih suspenzija/otopina istraživanih fungicida kao i njihovih odgovarajućih razrjeđenja uspješno je razdvojila uzorke originalnih otopine fungicida Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG od njihovih odgovarajućih razrjeđenja, na temelju NIR spektara snimljenih u rasponu valnih duljina $\lambda = 904 - 1699$ nm te $\lambda = 1000 - 2500$ nm. Analiza glavnih komponenata pokazala se najuspješnijom koristeći podatke dobivene NIR spektrometrom za raspon $\lambda = 904 - 1699$ nm.
3. Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost NIR spektara (snimljenih NIR spektrometrom u rasponu $\lambda = 904 - 1699$ nm) između TDS-a i vodljivosti za oba fungicida (Chromosul 80 i Cuprablau Z 35 WG). Utvrđena je slabija primjenjivost PLS modela za opisivanje eksperimentalno dobivenih ΔE vrijednosti ($R^2 \leq 0,82$ za Chromosul 80). Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost NIR spektara (snimljenih NIR spektrometrom u rasponu $\lambda = 1000 - 1900$ nm) između TDS-a i vodljivosti za oba fungicida. PLS modeli pokazali su slabiju primjenjivost modela za opisivanje eksperimentalno dobivenih ΔE vrijednosti ($R^2 \leq 0,92$), dok se za fungicid Chromosul 80 PLS model nije mogao razviti.
4. Iako se vrpce NIR spektara (snimljenih NIR spektrometrima u rasponu $\lambda = 904 - 1699$ nm, $\lambda = 1000 - 2500$ nm, $\lambda = 900 - 1450$ nm) međusobno preklapaju (pogotovo nakon 7. dana od tretiranja istraživanim fungicidima) ipak može se uočiti razlika u apsorbancijama tretiranih (prskanih) jabuka i kontrolnih (netretiranih) uzoraka jabuka). Najuočljivije razlike među apsorpcijskim vrpcama jabuka tretiranih istraživanim fungicidima i kontrolnih (netretiranih) uzoraka vidljive su u području valnih duljina $\lambda = 1000 - 2500$ nm. Također, na temelju NIR spektara snimljenih u rasponu $\lambda = 904 - 1699$ nm, $\lambda = 1000 - 2500$ nm te $\lambda = 900 - 1450$ nm PCA analiza kvalitetno je razdvojila uzorke tretiranih od netretiranih jabuka tijekom istraživanog vremenskog perioda što dokazuje da se NIR spektroskopija u kombinaciji sa PCA analizom može primijeniti za uočavanje sličnosti, odnosno razlika između tretiranih i netretiranih jabuka.

6. LITERATURA

- Beć KB, Grabaska J, Huck CW (2021) Principles and Applications of Miniaturized Near-Infrared (NIR) Spectrometers. *Chem Eu J* **27**, 1514 – 1532. <https://doi.org/10.1002/chem.202002838>
- Blanco M, Villarroya I (2002) NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC, Trends Anal Chem* **21**, 240 – 250. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)
- Cozzolino D (2021) The Ability of Near Infrared (NIR) Spectroscopy to Predict Functional Properties in Foods: Challenges and Opportunities. *Molecules* **26**, 22. <https://doi.org/10.3390/molecules26226981>
- Dorić M (2016) Reološka i teksturna svojstva soka voća klementine (Citrus x clementina) obrađenog visokim hidrostatskim tlakom (završni rad), Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- 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 Part B Surveill* **12**, 81 – 89. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1564370>
- Francini A, Sebastiani L (2013) Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. *Antioxidants* **2**, 181-193. <https://doi.org/10.3390/antiox2030181>
- 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.
- González-Martín M, Revilla I, Vivar-Quintana A, Salcedo EB (2017) Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy. *Talanta* **165**, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.061>
- Ikehata A (2021) NIR Optics and Measurement Methods. U: Ozaki Y, Huck C, Tsuchikawa S, Engelsen SB (ured.) Near-Infrared Spectroscopy. Springer, Singapore, str. 211 – 235.
- 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. *Applied Spectroscopy* **62**, 517 – 524. <https://doi.org/10.1366/000370208784344343>
- Jolliffe IT, Cadima J (2016) Principal component analysis: A review and recent developments. *Philos Trans R Soci A: Math Phys Eng Sci* **374**, 2065. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Klapan A (2022) Primjena blisko infracrvene spektroskopije u detekciji pesticida prisutnih u jabuci (diplomski rad), Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Lapcharoensuk R, Fhaykamta C, Anurak W, Chadwut W, Sitorus A (2023) Nondestructive Detection of Pesticide Residue (Chlorpyrifos) on Bok Choi (*Brassica rapa* subsp. *Chinensis*) Using a Portable NIR Spectrometer Coupled with a Machine Learning Approach. *Foods* **12**, 5. <https://doi.org/10.3390/foods12050955>
- Lazarevski J (2021) Analitičke i kemometrijske strategije u fingerprint karakterizaciji prirodnih bioaktivnih tvari (završni specijalistički rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Lozowicka B (2015) Health risk for children and adults consuming apples with pesticide residue. *Sci Total Environ* **502**, 184 – 198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.026>

- Marcolin LC, Lima RM, Arias JL, Begambre Berrio AC, Kupski L, Barbosa SC i sur. (2021) Meliponinae and Apis mellifera honey in southern Brazil: Physicochemical characterization and determination of pesticides. *Food Chem* **363**, 2. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130175>
- Martino L, D'Angelo C, Marinelli C, Cepeda R (2021) Identification and detection of pesticide in chard samples by laser-induced breakdown spectroscopy using chemometric methods. *Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy* **177**, 106031. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.106031>
- Ozaki Y, Huck CW (2021) Introduction. U: Ozaki Y, Huck C, Tsuchikawa S, Engelsen SB (ured.) *Near-Infrared Spectroscopy*. Springer, Singapore, str. 3-11.
- Pasquini C (2003) Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *J Braz Chem Soc* **14**, 198-219. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200006>
- Patocka J, Bhardwaj K, Klimova B, Nepovimova E, Wu Q, Landi M i sur. (2020) Malus domestica: A Review on Nutritional Features, Chemical Composition, Traditional and Medicinal Value. *Plants* **9**, 1408. <https://doi.org/10.3390/plants9111408>
- Ruomeng B, Meihao Ou, Siru Z, Shichen G, Yixian Z, Junhong C i sur. (2023) Degradation strategies of pesticide residue: From chemicals to synthetic biology. *Synth Syst Biotechnol* **8**, 302 – 313. <https://10.1016/j.synbio.2023.03.005>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.10.032>
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Singh Sidhu GP, Handa N i sur. (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl Sci* **1**, 1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Sileoni V, Marconi O, Perretti G, Fantozzi P (2013) Evaluation of different validation strategies and long term effects in NIR calibration models. *Food Chem* **141**, 2639-2648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.110>
- Soltani Nazarloo A, Rasooli Sharabiani V, Abbaspour Gilandeh Y, Taghinezhad E, Szymanek M, Sprawka M (2021) Feasibility of using VIS/NIR spectroscopy and multivariate analysis for pesticide residue detection in tomatoes. *Process* **9**, 1 - 13. <https://doi.org/10.3390/pr9020196>
- Strmečki D (2023) Analiza glavnih komponenti. Zagreb (diplomski rad), Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Sørensen KM, Berg F, SB Engelsen (2021) NIR Data Exploration and Regression by Chemometrics – A Primer. U: Ozaki Y, Huck C, Tsuchikawa S, Engelsen SB (ured.) *Near-Infrared Spectroscopy*. Springer, Singapore, str. 127 – 193.
- Šerbetar I (2012) Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata: primjer izveden na podacima iz motoričkog fitnesa. *Croat J Edu* **14**, 917 – 932.
- Tudi M, Ruan HD, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D i sur. (2021) Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 3. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>

UREDBA (EZ) br. 396/2005 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 23. veljače 2005. o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla i o izmjeni Direktive Vijeća 91/414/EEZ. Narodne novine 115, Zagreb. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396>. Pristupljeno 10. kolovoza 2024.

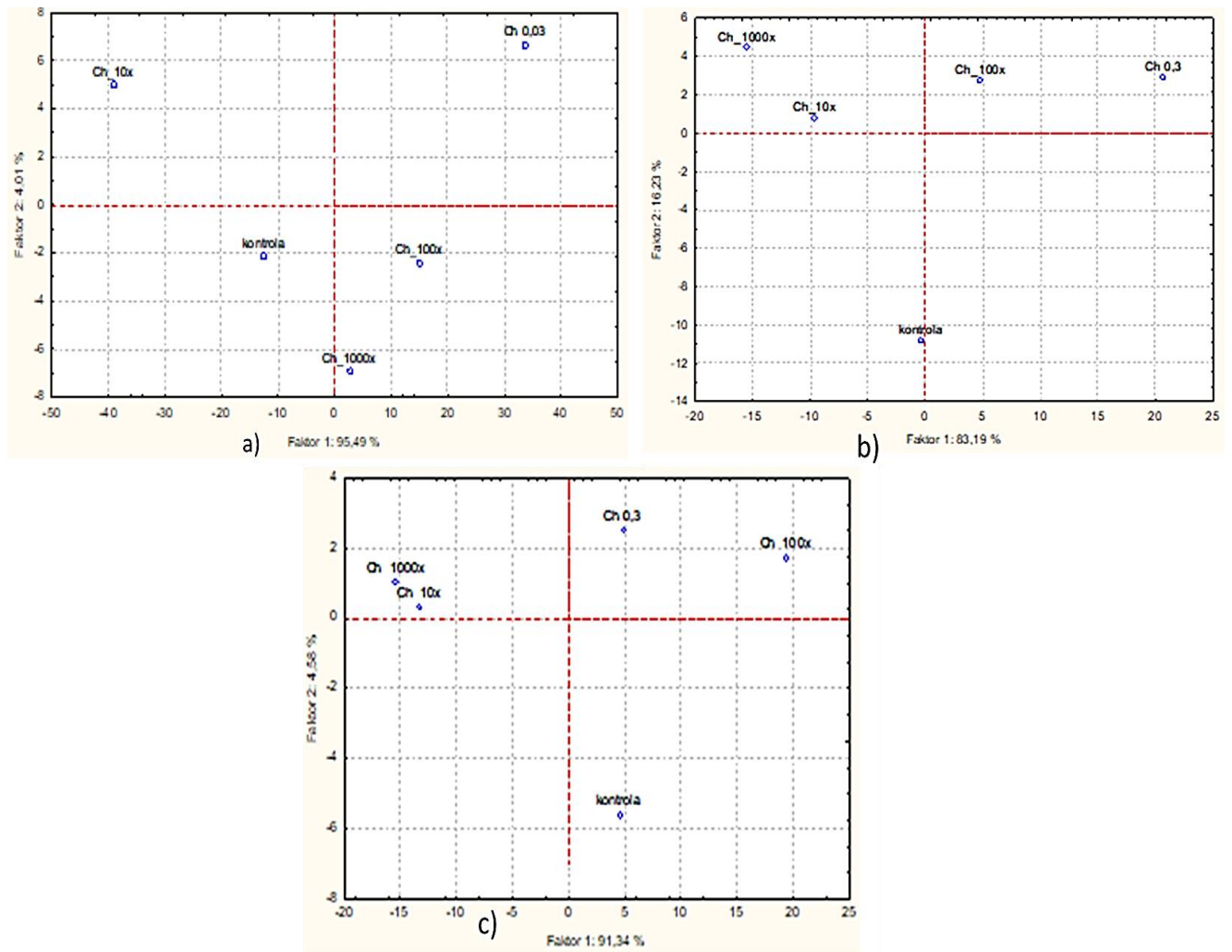
Vallée Marcotte B, Verheyde M, Pomerleau S, Doyen A, Couillard C (2022) Health Benefits of Apple Juice Consumption: A Review of Interventional Trials on Humans. *Nutrients* **14**, 1 - 21. <https://doi.org/10.3390/nu14040821>

Wu J, Liu C, Chen Y, Chen, Xu Y (2009) Study on detection technology of pesticide residues in Vegetables based on NIR. *Computer and Computing Technologies in Agriculture II* **3**, 2217 – 2222. https://10.1007/978-1-4419-0213-9_73

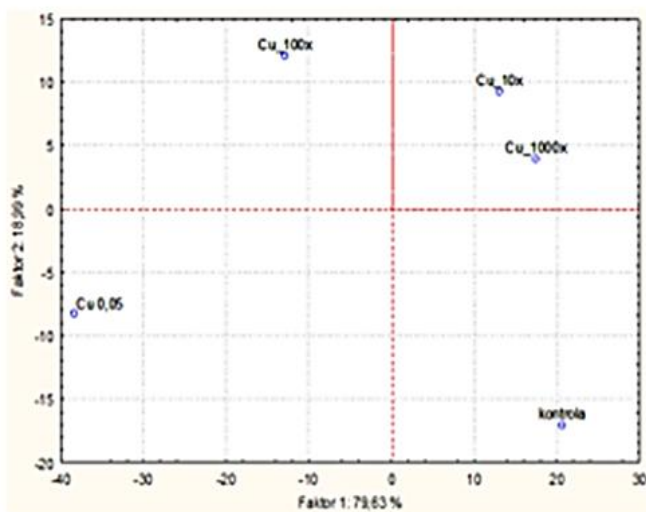
Yazici A, Tiryaki GY, Ayvaz H (2019) Determination of Pesticide Residual Levels in Strawberry (*Fragaria*) By Near-Infrared Spectroscopy. *J Sci Food Agric* **100**, 1980–1989. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10211>

Zhao H, Li R, Hu J (2023) Frequently used pesticides and their metabolites residues in apple and apple juice from markets across China: Occurrence and health risk assessment. *LWT* **178**, 2. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114610>

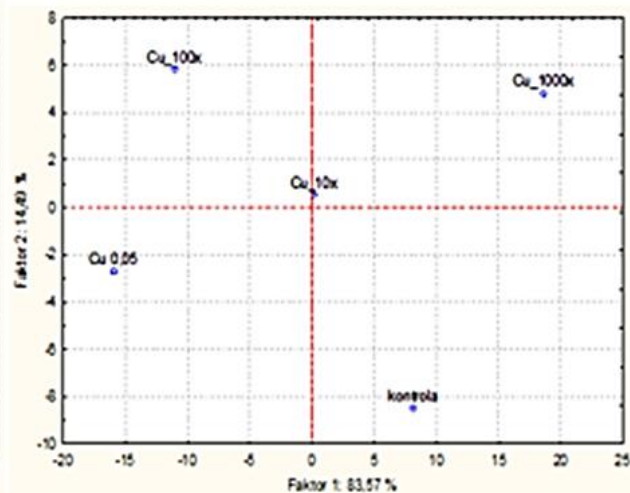
7. PRILOZI



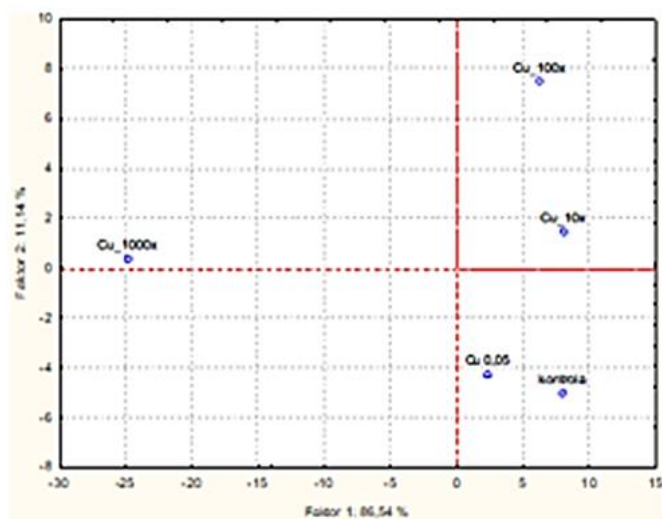
Prilog 1. Analiza glavnih komponenata (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch_0,3), 10 puta razrijeđenom koncentracijom (Ch_10x), 100 puta razrijeđenom koncentracijom (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenom koncentracijom (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka nulti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

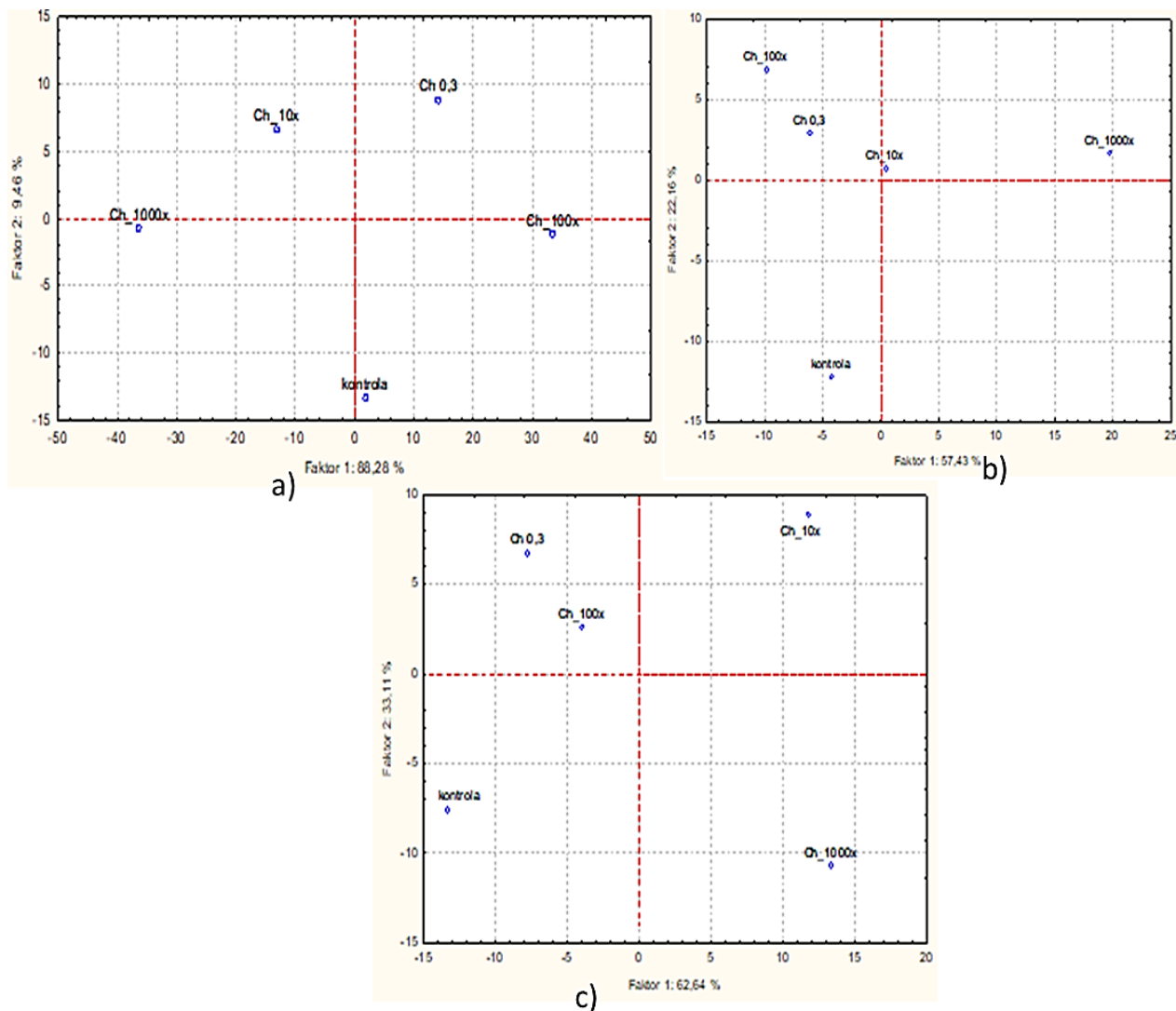


b)

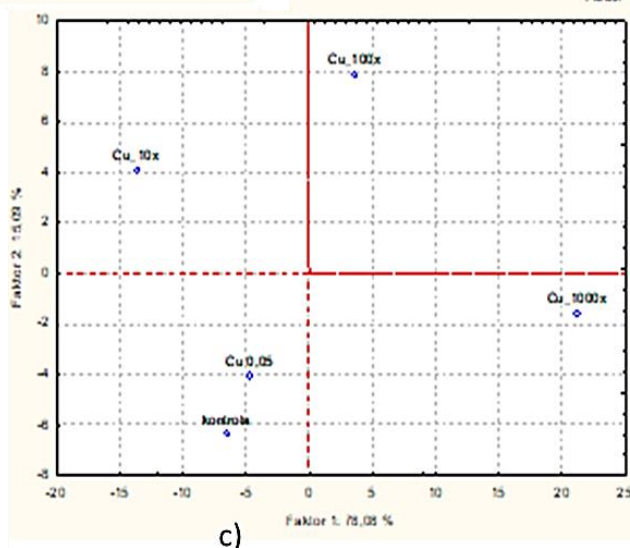
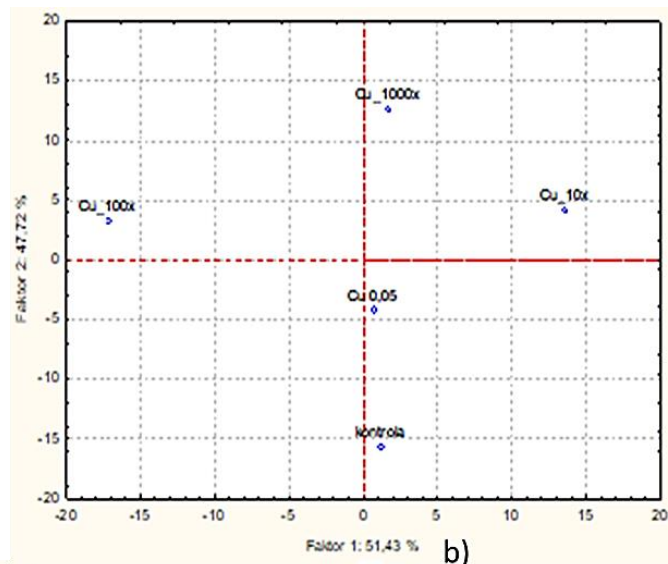
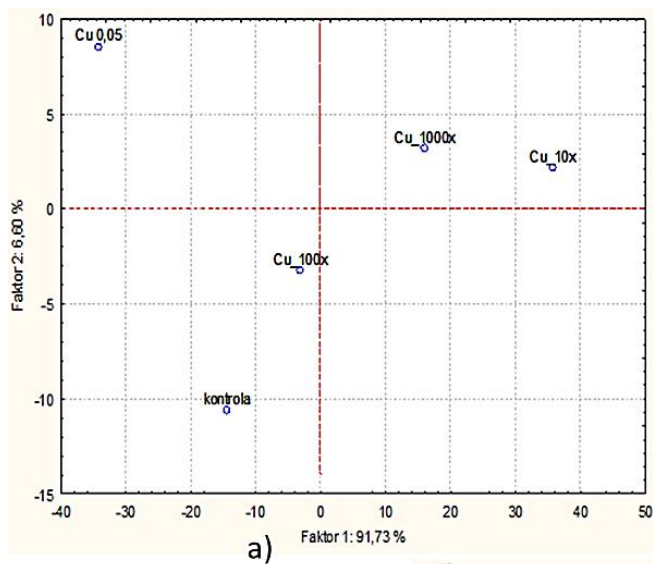


c)

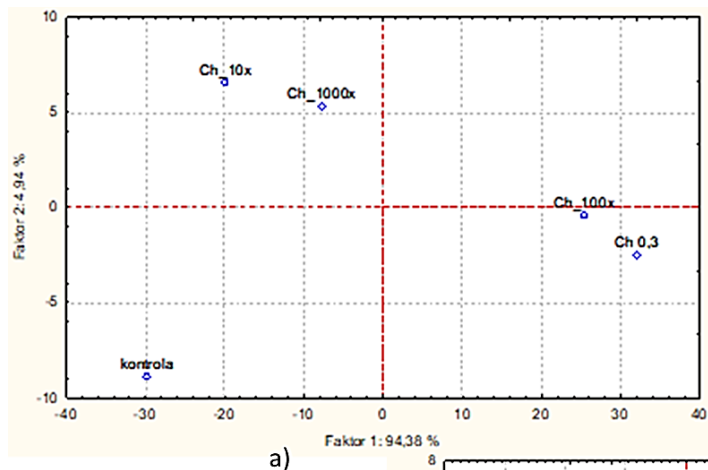
Prilog 2. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka treći dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



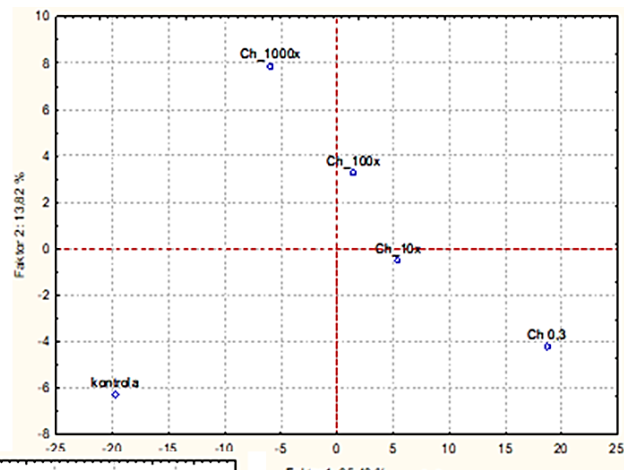
Prilog 3. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch_0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka treći dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



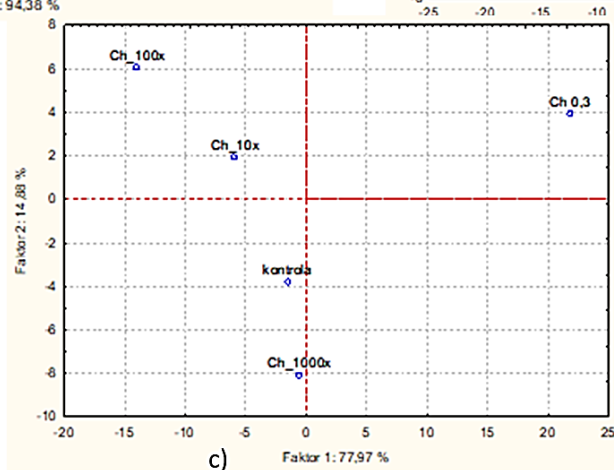
Prilog 4. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka četvrti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

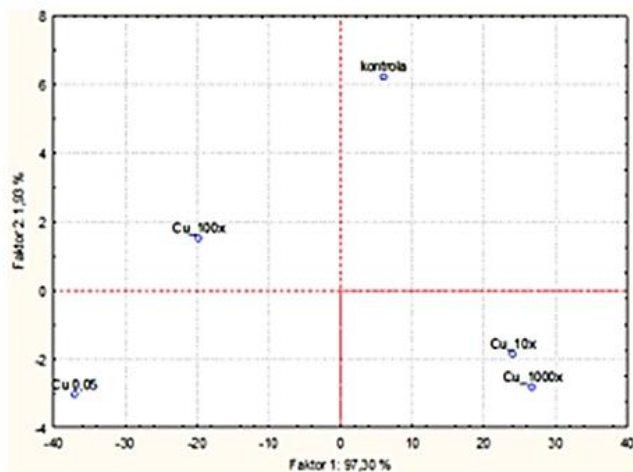


b)

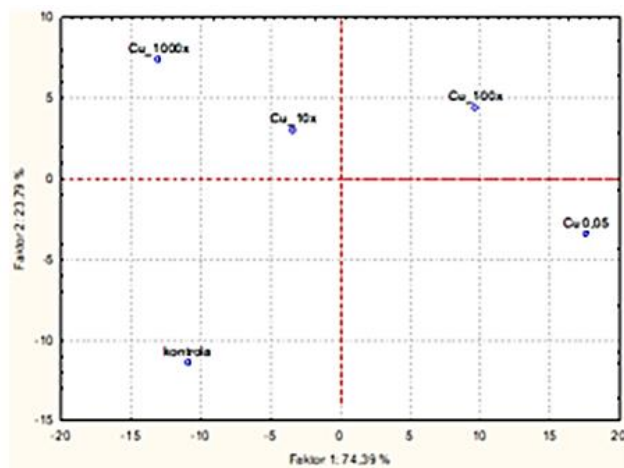


c)

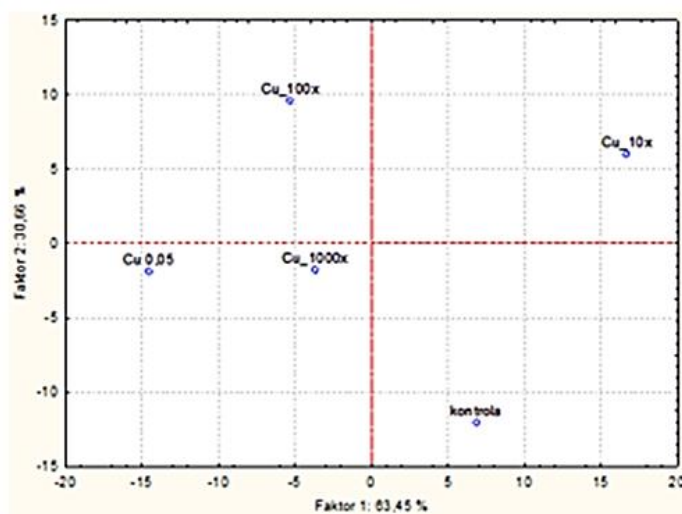
Prilog 5. Analiza glavnih komponentata (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch 0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka četvrti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

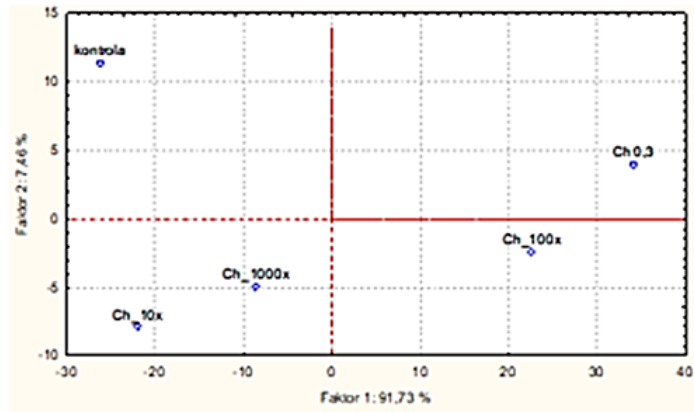


b)

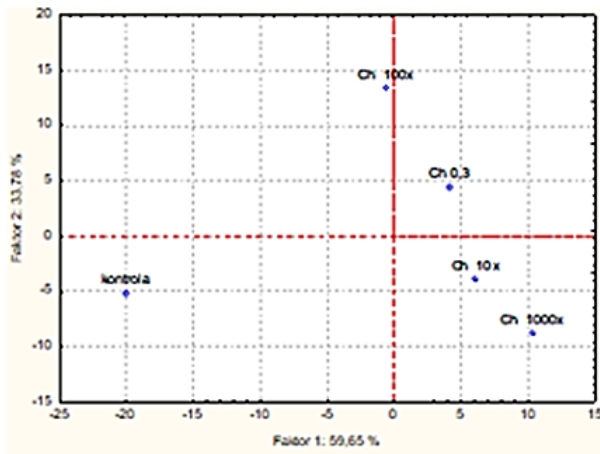


c)

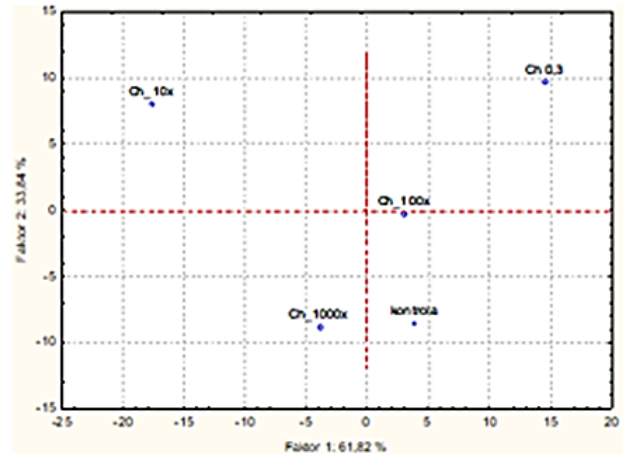
Prilog 6. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka šesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

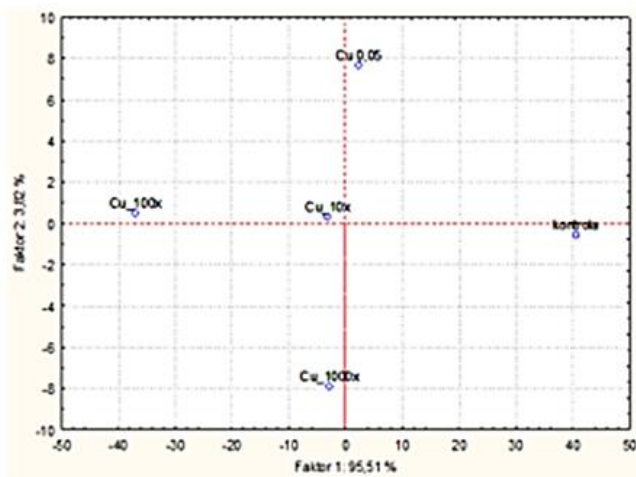


b)

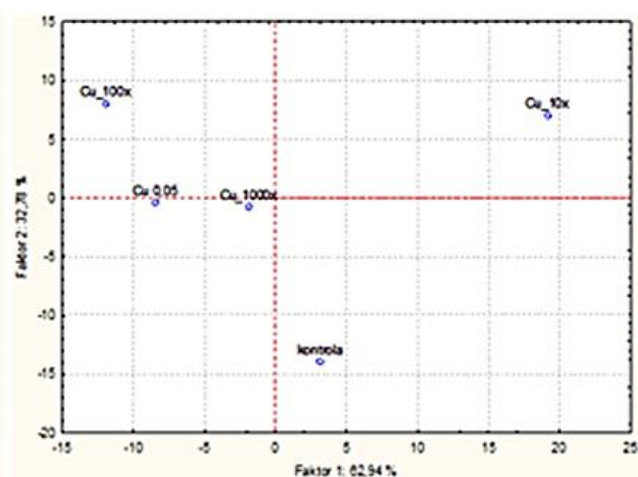


c)

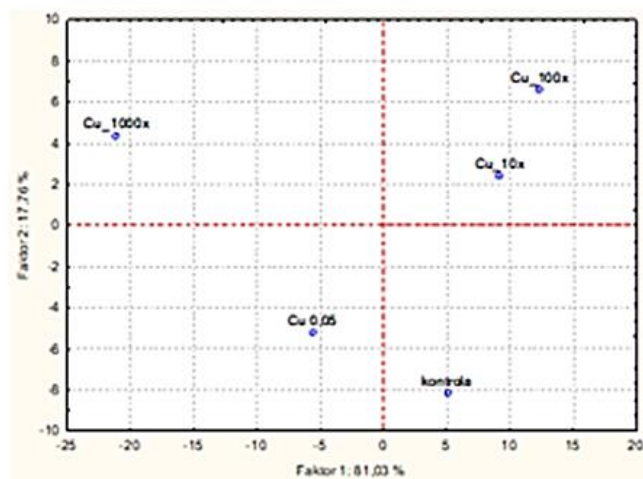
Prilog 7. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch 0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka šesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

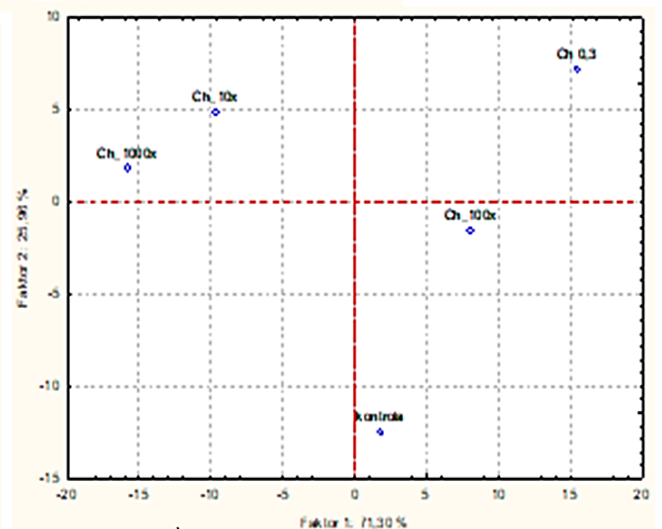
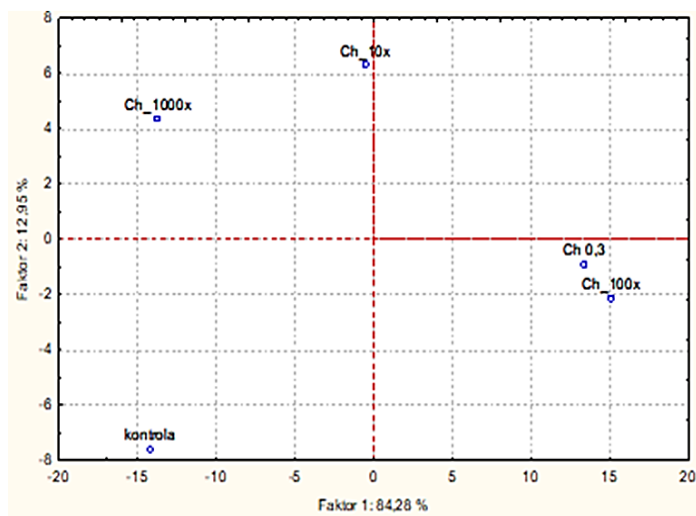
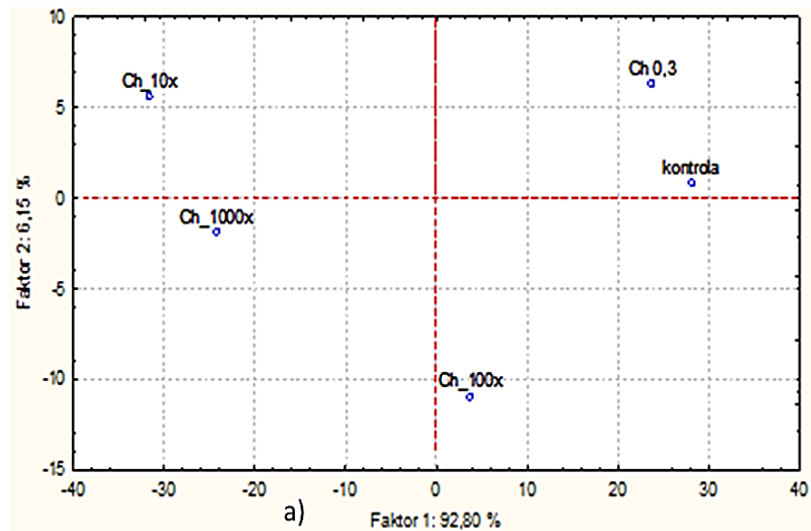


b)

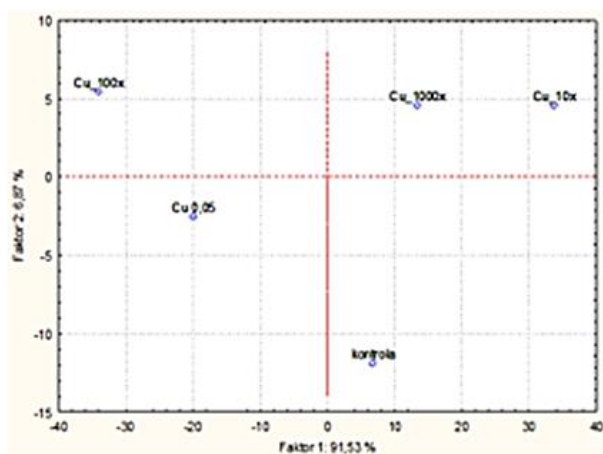


c)

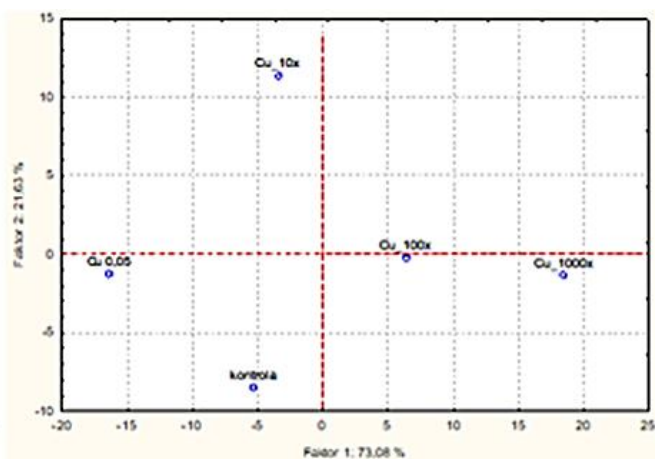
Prilog 8. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka sedmi dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



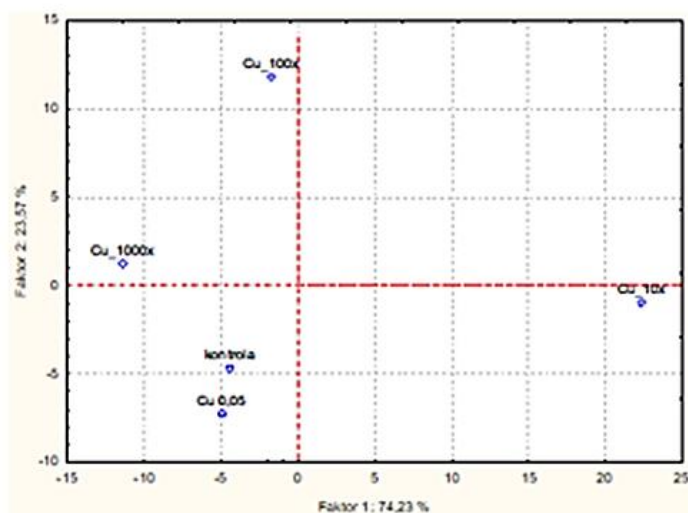
Prilog 9. Analiza glavnih komponenata (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch 0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka sedmi dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

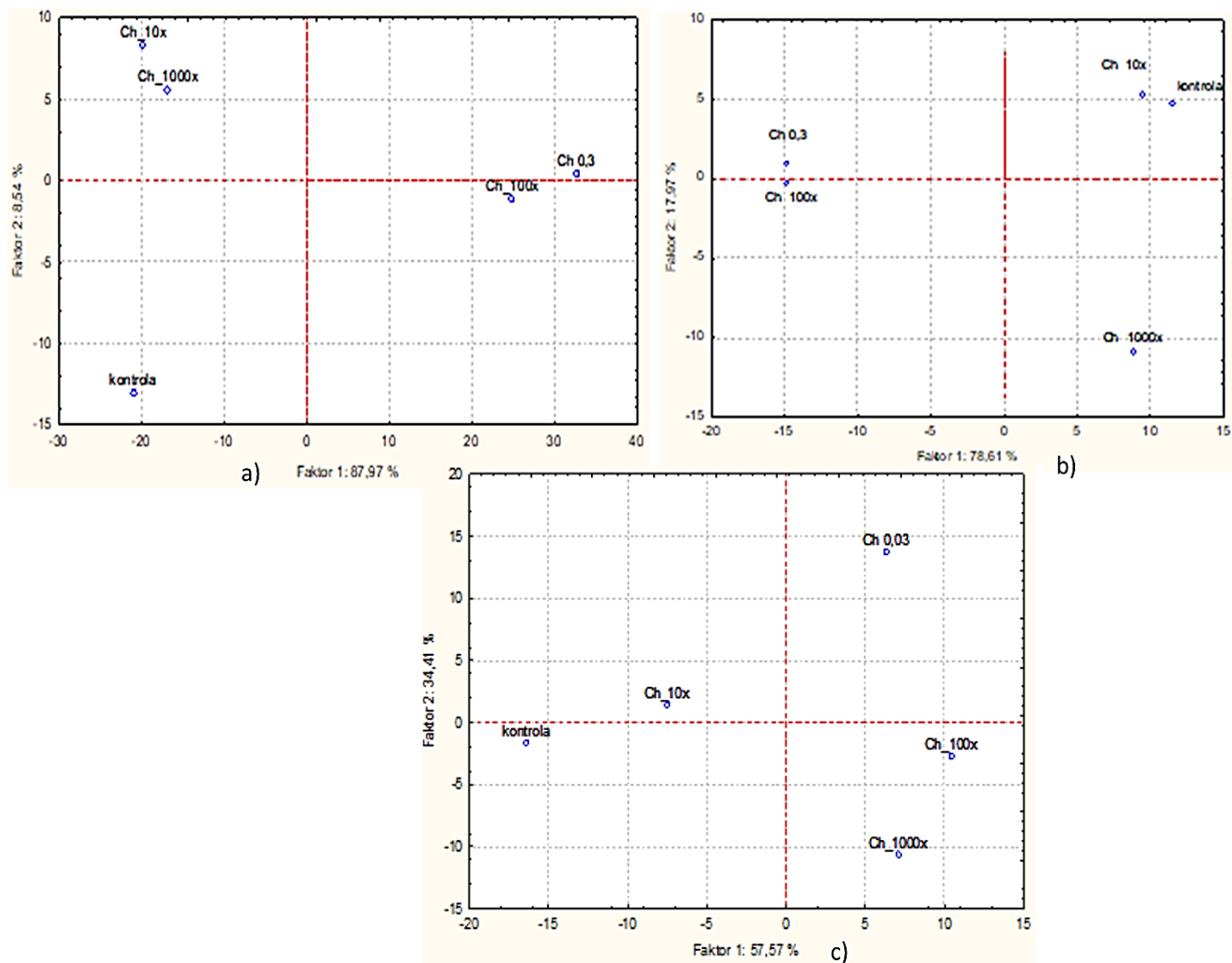


b)

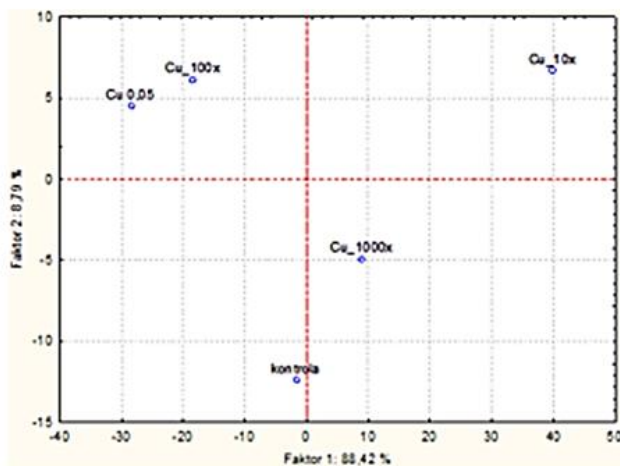


c)

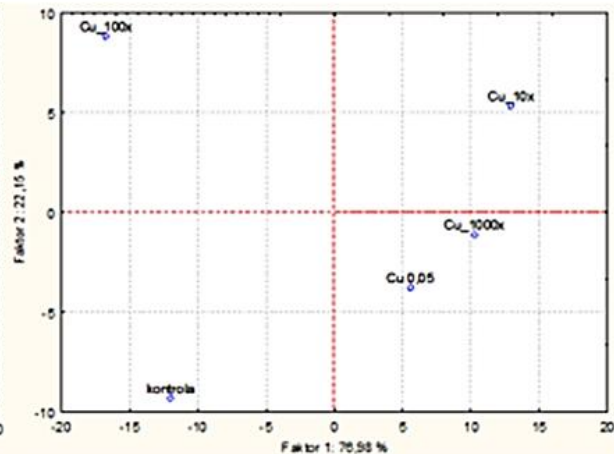
Prilog 10. Analiza glavnih komponenata (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka jedanaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



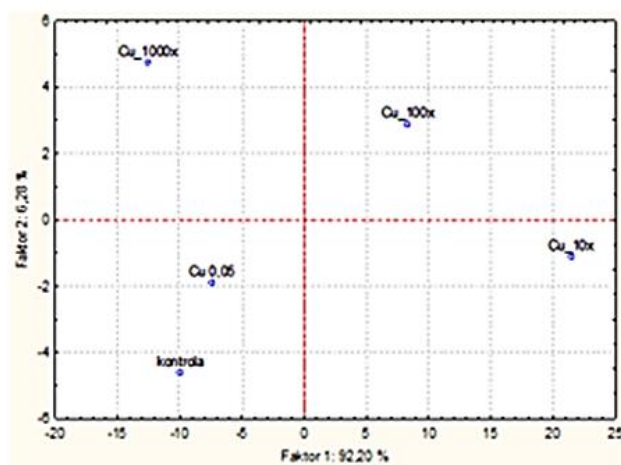
Prilog 11. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch 0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka jedanaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

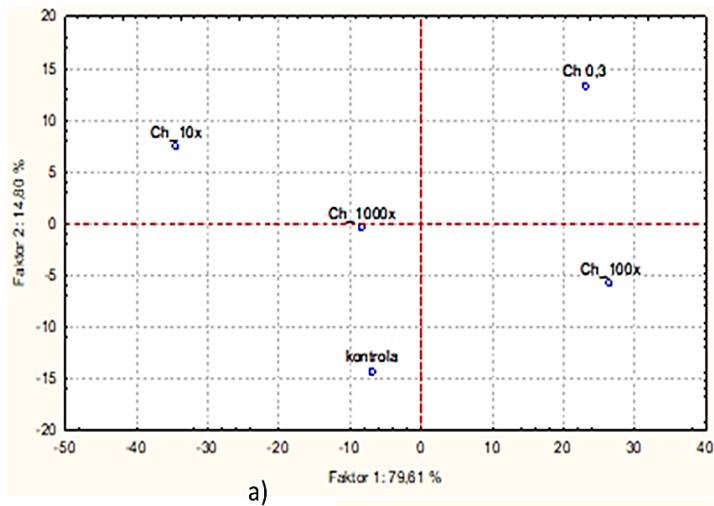


b)

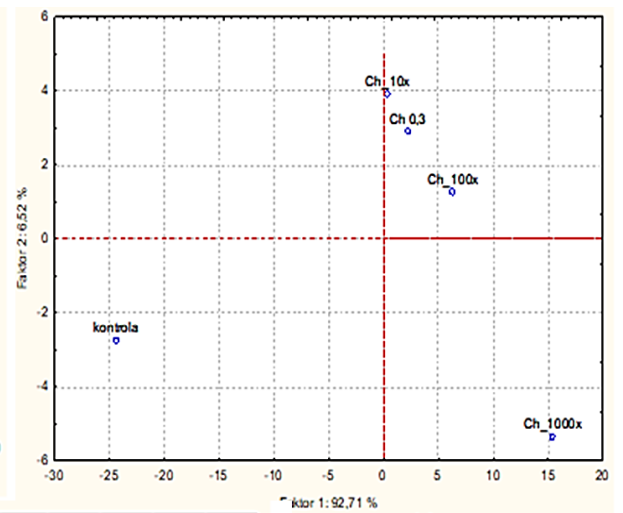


c)

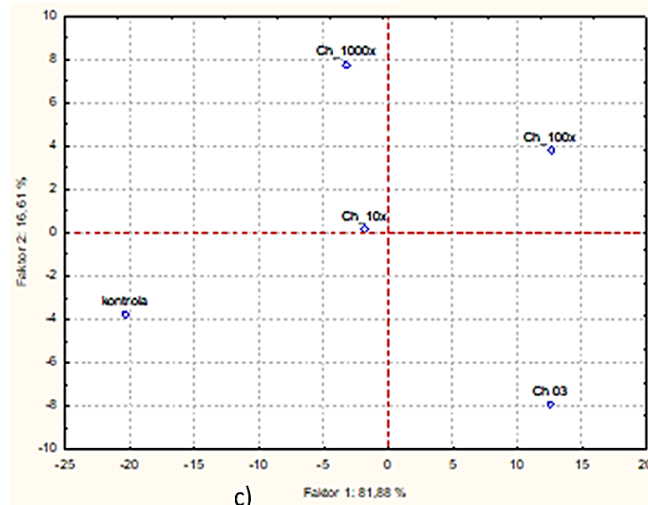
Prilog 12. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka dvanaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

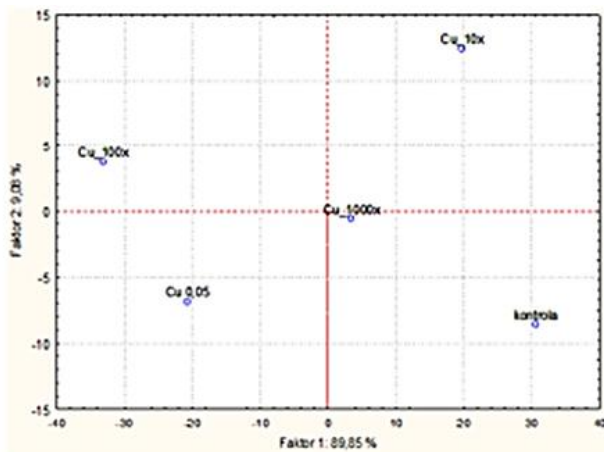


b)

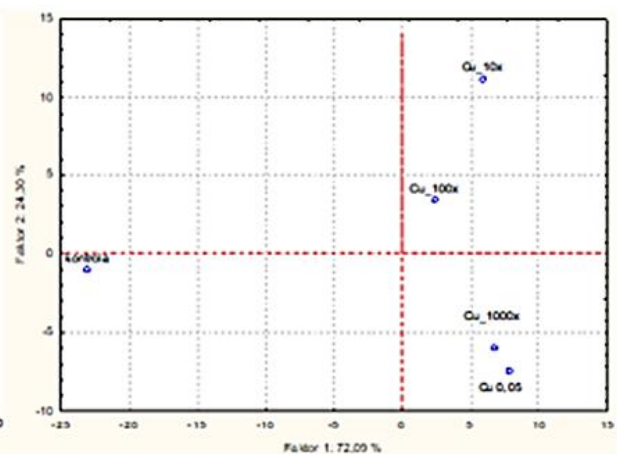


c)

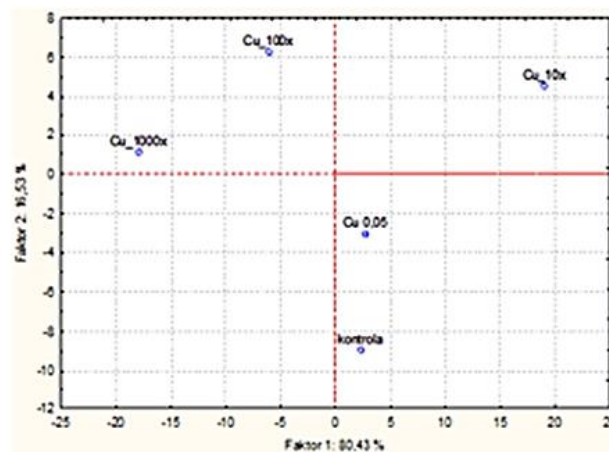
Prilog 13. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch 0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka dvanaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

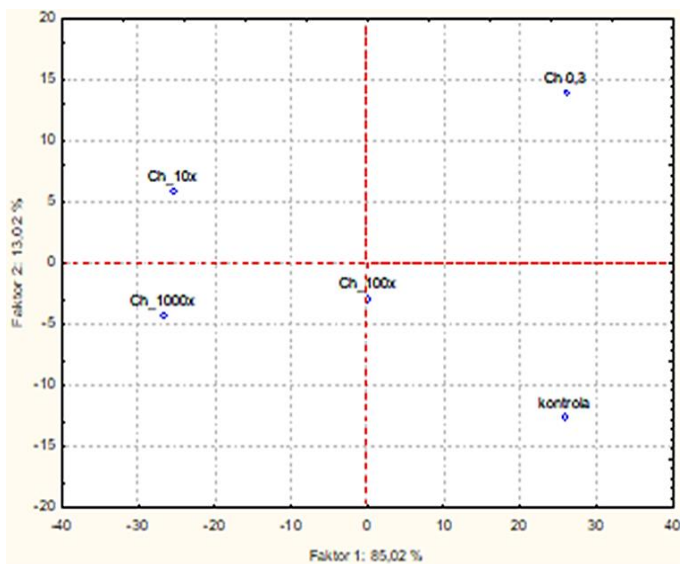


b)

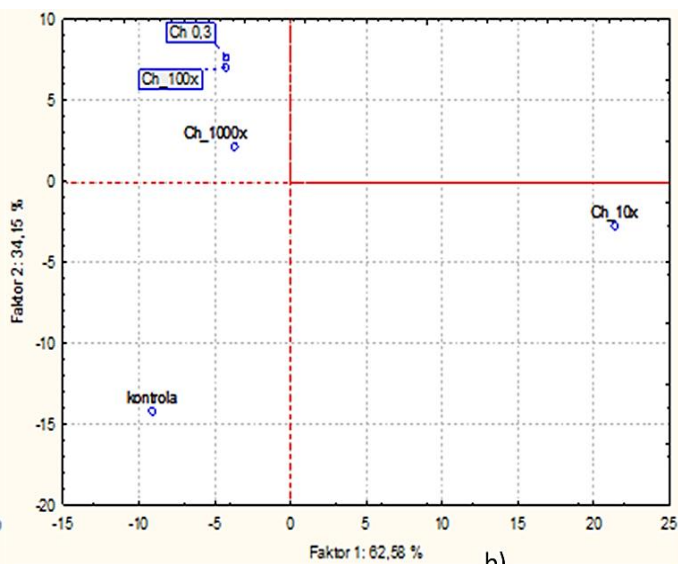


c)

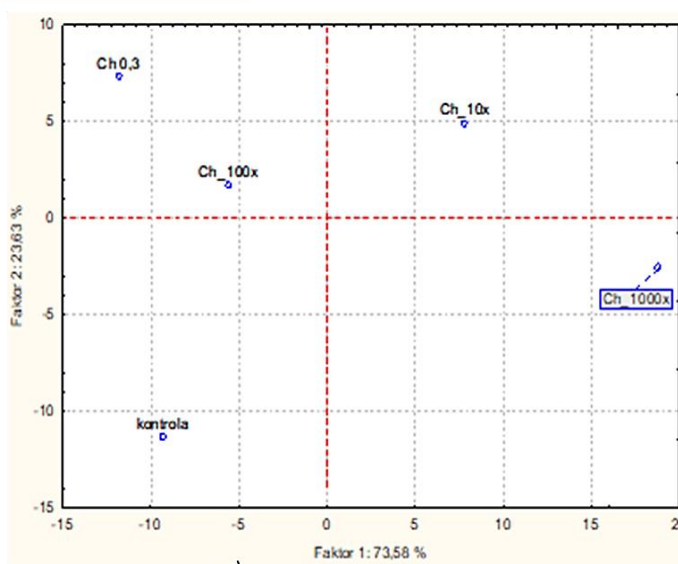
Prilog 14. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka trinaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

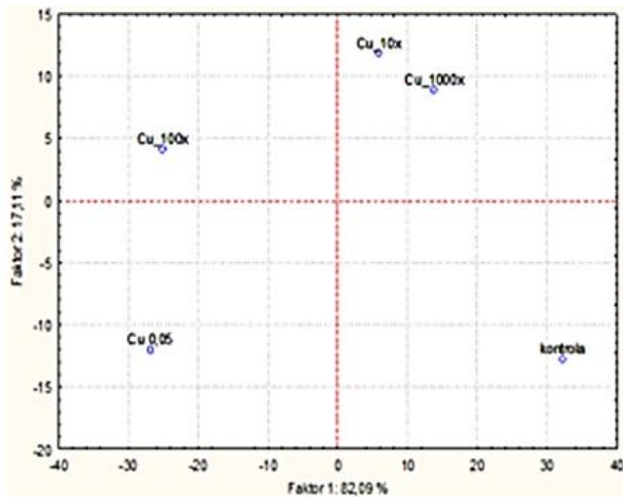


b)

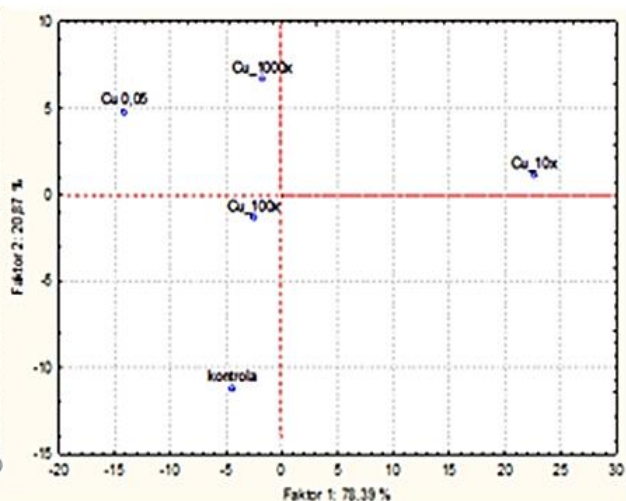


c)

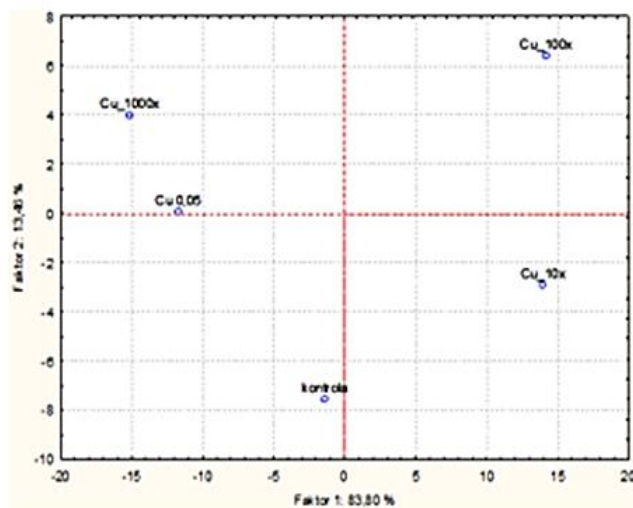
Prilog 15. Analiza glavnih komponenata (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch 0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka trinaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

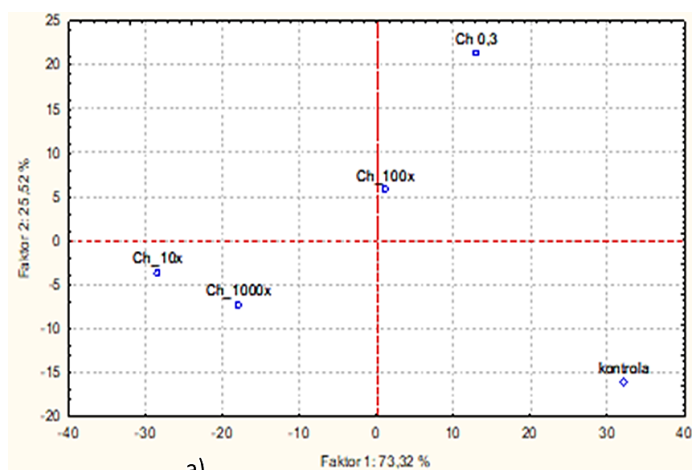


b)

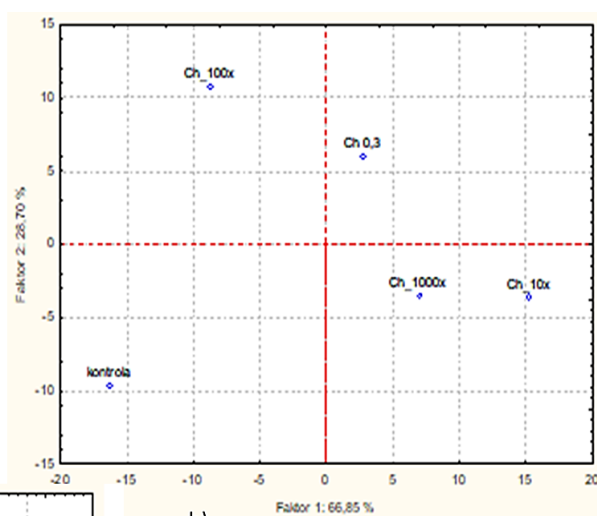


c)

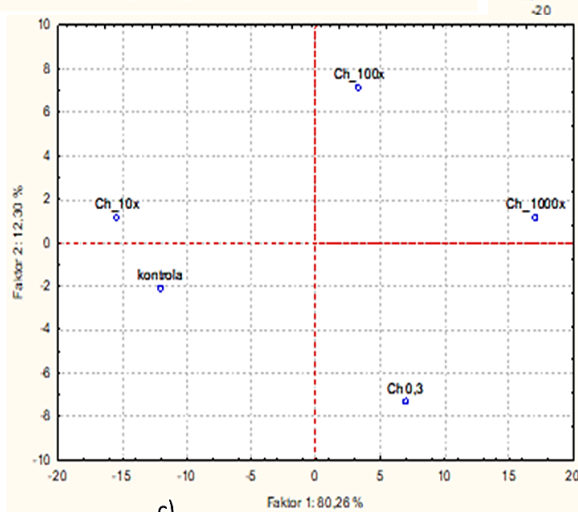
Prilog 16. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka osamnaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



a)

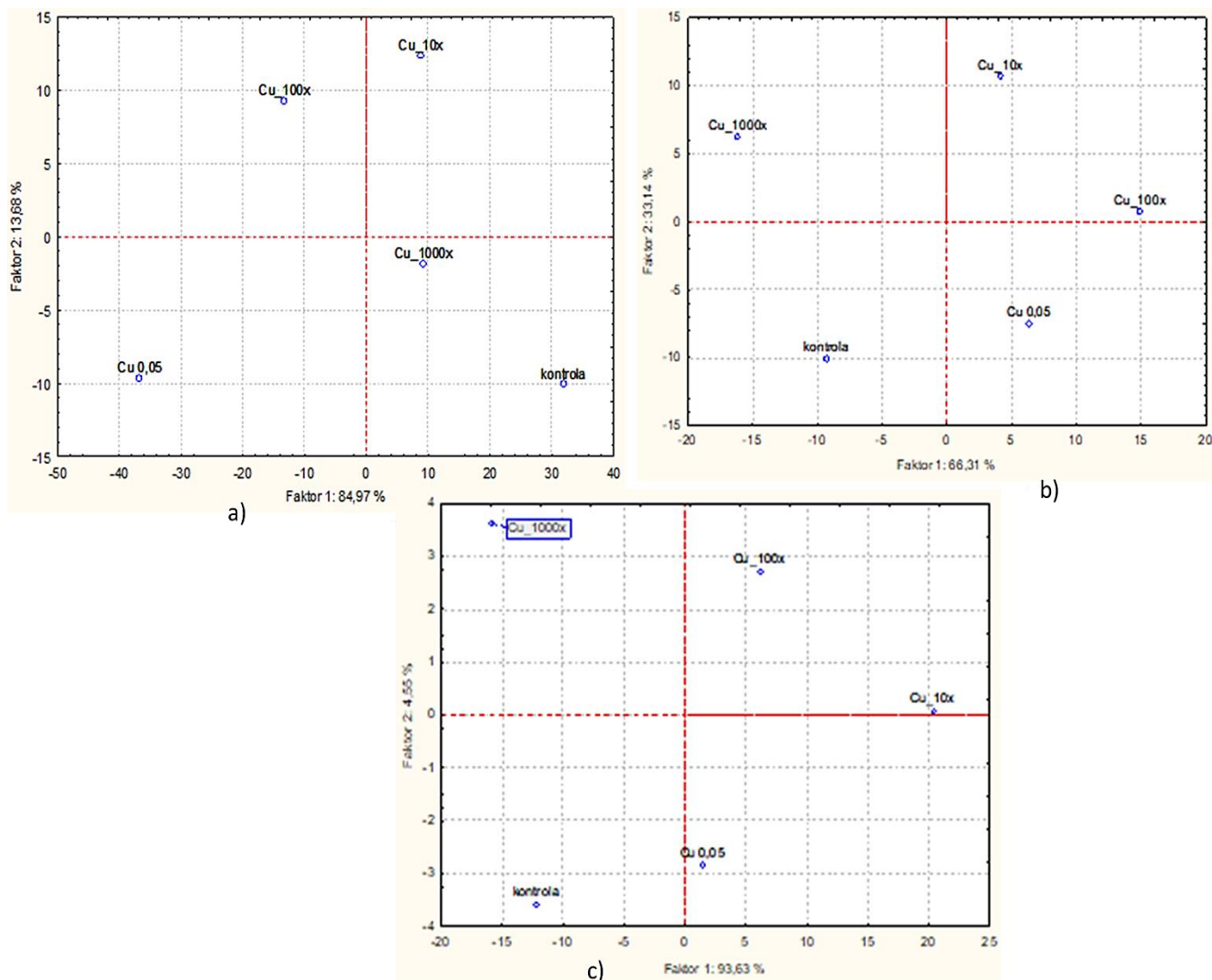


b)

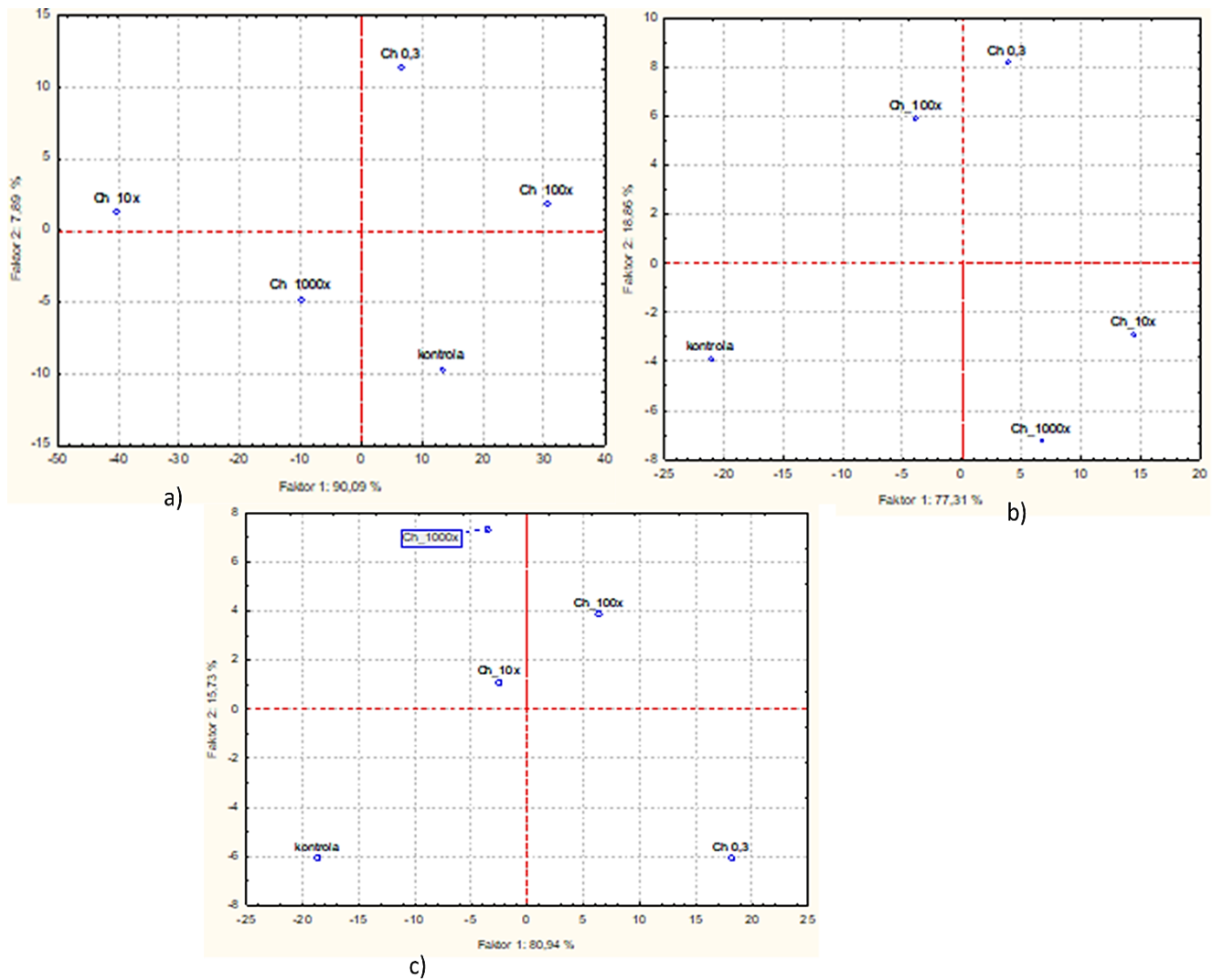


c)

Prilog 17. Analiza glavnih komponentata (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch 0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka osamnaesti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



Prilog 18. Analiza glavnih komponenata (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Cu_0,05), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Cu_1000x) fungicida Cuprablau Z 35 WG te netretiranih (kontrola) jabuka dvadeseti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)



Prilog 19. Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara jabuka tretiranih originalnom koncentracijom (Ch_0,3), 10 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_10x), 100 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_100x) te 1000 puta razrijeđenim koncentracijama (Ch_1000x) fungicida Chromosul 80 te netretiranih (kontrola) jabuka dvadeseti dan: a) snimano NIR spektrometrom NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm ($\lambda = 904 - 1699 \text{ nm}$), b) NIR spektrometrom (AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD) ($\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$), c) snimano prijenosnim NIR spektrometrom (NIR-M-R2, InnoSpectra, Tajvan) ($\lambda = 900 - 1450 \text{ nm}$)

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Mihaela Severec 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