

Mogućnost primjene NIR spektroskopije za kontrolu kvalitete tableta s acetilsalicilnom kiselinom kao aktivnom tvari

Skef, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:650926>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Lara Skef

7477/PT

**Mogućnost primjene NIR-spektroskopije za kontrolu
kvalitete tableta s acetilsalicilnom kiselinom kao
aktivnom tvari**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet: Mjerenje i upravljanje procesima u prehrambenoj
industriji**

Mentor: doc. dr. sc. Davor Valinger

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Mogućnost primjene NIR-spektroskopije za kontrolu kvalitete tableta s acetilsalicilnom kiselinom kao aktivnom tvari

Lara Skef, 7477/PT

Sažetak:

Svaki dio procesa proizvodnje tableta je strogo reguliran od regulatornih agencija u svrhu dobivanja ponovljivog proizvoda s minimalnim rizicima po ljudsko zdravlje. U tu svrhu važno je imati brzu i jednostavnu analitičku metodu koja će omogućiti preciznu analizu procesa proizvodnje. Cilj ovoga rada bio je ispitati potencijal primjene blisko infracrvene spektroskopije (NIRs) u praćenju kvalitete lijekova. U ovom radu razvijeni su kemometrijski modeli za određivanja koncentracije acetilsalicilne kiseline u tabletama dostupnim na hrvatskom tržištu. NIRs u kombinaciji s umjetnim neuronskim mrežama (ANN) za tablete/prahove s vrijednosti većom od 99 % pokazao je iznimnu sposobnost određivanja koncentracije acetilsalicilne kiseline i vrsti tableta/praha, dok je kolorimetrija samo prikazala grupiranje pojedinih tableta odnosno prahova prema boji. NIRs u kombinaciji s ANN uspio je u rasponu od 99 do najmanje 91% povezati koncentraciju acetilsalicilne kiseline, vrijednosti izmjerene električnom vodljivošću i ukupnim otopljenim tvarima za tekuće uzorke u kojima je bila različita koncentracija acetilsalicilne kiseline.

Ključne riječi: acetilsalicilna kiselina, analiza glavnih komponenti, blisko-infracrvena spektroskopija, kontrola kvalitete, umjetne neuronske mreže

Rad sadrži: 33 stranice, 25 slika, 10 tablica, 20 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Davor Valinger

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Maja Benković

Datum obrane: 8.rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Process engineering
Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Potential application of near infrared spectroscopy in quality monitoring of drugs with acetylsalicylic acid as active substance

Lara Skef, 7477/PT

Abstract:

Each part of the tablet production process is strictly regulated by regulatory agencies for the purpose of obtaining a repeatable product with minimal risks to human health. Therefore, it is important to have a quick analytical method that will enable a precise analysis. The aim of this study was to examine the potential application of near-infrared spectroscopy (NIRs) in drug quality monitoring. In this work, chemometric models for determination of acetylsalicylic acid concentration in tablets available on the Croatian market were developed. NIRs in combination with artificial neural networks (ANN) for tablets/powders showed exceptional ability (99 %) for determination of acetylsalicylic acid concentration and tablets/powder type, while colorimetry only showed the classification of individual tablets/powders. For liquid samples NIRs in combination with ANN was able to correlate the concentration of acetylsalicylic acid, values measured by electrical conductivity and total dissolved solids with 99 % to at least 91% accuracy.

Keywords: acetylsalicylic acid, near infrared spectroscopy, principal component analysis, artificial neural networks, colorimetry

Thesis contains: 33 pages, 25 figures, 10 tables, 20 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited: in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Davor Valinger, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD. Maja Benković, Assistant professor

Defence date: September 8th 2021

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1 Tablete	2
2.1.2 Acetilsalicilna kiselina	3
2.2 Mjerne metode i analize	4
2.2.1 Električna vodljivost i TDS	4
2.2.2 Spektroskopija bliskog infracrvenog zračenja (NIR spektroskopija)	5
2.2.2.1 NIR spektroskopija u farmaceutskoj industriji	5
2.2.3 Kemometrijske tehnike	8
2.2.3.1 PCA – Analiza glavnih komponenata	8
2.2.3.2 Umjetne neuronske mreže (engl. ANN)	8
2.2.4 Kolorimetrija	10
3. Materijali i metode	11
3.1 Materijali	11
3.1.1 Uzorci	11
3.1.2 Laboratorijski pribor	12
3.1.3 Uređaji i software	12
3.1.4 Pripreme uzoraka	13
3.2 Metode	14
3.2.1 Određivanje fizikalnih svojstava	14
3.2.2 NIR spektroskopija	14
3.2.3 Kemometrijske tehnike	14
3.2.3.1 PCA – Analiza glavnih komponenata	14
3.2.3.2 Umjetne neuronske mreže	15
3.2.4 Kolorimetrija	15
4. Rezultati i rasprava	15
4.1 Tablete	15
4.1.1 PCA – Analiza glavnih komponenata	15
4.1.2 Umjetne neuronske mreže	16
4.1.3 Kolorimetrija	18

4.2 Prahovi	20
4.2.1 PCA – Analiza glavnih komponenata	20
4.2.2 Umjetne neuronske mreže	21
4.2.3 Kolorimetrija	23
4.3 Tekući uzorci	24
4.3.1 Električna vodljivost i TDS	24
4.3.2 Umjetne neuronske mreže	29
5. Zaključak	31
6 Literatura	32

1. Uvod

Farmaceutska industrija od svog postanka spada među najvažnije industrije, a za cilj ima proizvodnju postojećih lijekova te razvoj novih.

Proces proizvodnje lijekova teče od aktivnih tvari do gotovog proizvoda ili poluproizvoda. U svakom dijelu procesa postoje propisani protokoli koji će osiguravati kvalitetu, ponovljivost, sigurnost i efikasnost lijeka, medicinskog proizvoda i/ili kombiniranog medicinskog proizvoda. Također, veliki utjecaj u radu farmaceutskih industrija imaju regulatorne agencije (poput Agencije za lijekove i hranu, FDA; Europske agencije za lijekove, EMEA i drugih) koji strogo kontroliraju sve dijelove procesa kako bi se maksimalno minimalizirali potencijalni rizici javnom zdravstvu.

Standardni pristupi za osiguravanje kvalitete gotovog proizvoda najčešće uključuju uzimanje reprezentativnog uzorka aktivne tvari / poluproizvoda / gotovog proizvoda te na temelju rezultata dobivenih dugotrajnim analizama u laboratorijima kontrole kvalitete, diskontinuirano od procesa proizvodnje, odlučivanje o prihvatljivosti sirovine ili proizvoda. Takve procedure osiguravaju visoku kvalitetu proizvoda, ali i visoke troškove proizvodnje, što uključuje vrijeme trajanja analizi, ponavljanje proizvodnje, bacanje velikih količina gotovih proizvoda i drugo. Kako bi se to spriječilo, u procese proizvodnje sve više se uključuju brze tehnike, koje nisu vremenski zahtjevne, koje su nedestruktivne ili zahtijevaju manje količine uzoraka te ujedno omogućavaju kontrolu kvalitete sirovine ili proizvoda u realnom vremenu. Najčešće taj pristup uključuje primjenu spektroskopije bliskog infracrvenog zračenja (NIR) u kombinaciji sa statističkim metodama analize podataka (Menezes i sur., 2009). Stoga je u ovom radu ispitana mogućnost praćenja kvalitete proizvoda koji sadrže acetilsalicilnu kiselinu kao aktivnu tvar primjenom blisko-infracrvene spektroskopije uz primjenu kemometrijskih metoda – analiza glavnih komponenti (PCA) i umjetne neuronske mreže (ANN). Korišteno je 9 uzoraka tableta kupljenih u gradskoj ljekarni od 4 različita proizvođača dostupna na hrvatskom tržištu. Uzeti su početni uzorci s različitom koncentracijom aktivne tvari (acetilsalicilne kiseline) koji su pripremljeni u tri forme uzoraka – netretirani uzorci, mljeveni uzorci (praškasti) te tekući uzorci. Korištenjem metoda blisko-infracrvene spektroskopije i umjetnih neuronskih mreža praćena je mogućnost prepoznavanja koncentracije aktivne tvari u uzorku te mogućnost prepoznavanja o kojem od 9 korištenih uzoraka je riječ. Dodatno je praćena promjena električne vodljivosti i TDS-a u ovisnosti o koncentraciji aktivne tvari u tekućim uzorcima.

2. Teorijski dio

2.1 Tablete

Pod čvrste farmaceutske oblike spadaju prahovi, pilule, lijekovi u škrobnim kapsulama, kapsule i tablete.

Tablete su najjednostavniji i najzastupljeniji oblik farmaceutskog doziranja te sadrže puno prednosti pred ostalim dozirnim oblicima. Na tržište dolaze u raznim oblicima, različitih boja, obložene ili neobložene te različitih masa i veličina ovisno o namijenjenom načinu uzimanja.

Osnovne tražene karakteristike tableta su:

- Trebaju biti elegantni proizvodi s vlastitim identitetom, dok s druge strane ne smiju imati defekte (puknute, otkrhnute, promjenjene boje ili kontaminirane tablete)
- Trebaju moći izdržati procese izrade, pakiranja, slanja i izdavanja pacijentu/kupcu.
- Trebaju biti stabilne kako bi ostale fizički nepromijenjenih karakteristika.
- Trebaju moći otpuštati aktivnu tvar u tijelu na predviđen i ponovljiv način.
- Moraju biti kemijski stabilne kako tokom stajanja ne bi došlo do promjene aktivne tvari.

Prednosti tableta nad ostalim dozirnim oblicima je prvenstveno što su čvrsti dozirni oblik koji pruža najmanju varijabilnost sadržaja te najveću dozirnu preciznost. Troškovi izrade su vrlo niski, zajedno sa pakiranjem u kojem se isporučuju. Uz to su vrlo kompaktne i lagane te se odlikuju mikrobiološkom i kemijskom stabilnošću. Sa strane kupca, prednosti su jednostavna primjena (gutanjem), a neprijatni okusi i mirisi mogu biti korigirani oblaganjem.

No, tablete kao dozirni oblici imaju i neke mane. Prvenstveno, teško su primjenjivi u slučajevima kada su pacijenti djeca ili čovjek bez svijesti. Ovisno o sastavnicama mogu prouzročiti probleme u proizvodnji što može rezultirati slabom čvrstoćom ili ako se radi o sastojcima osjetljivim na kisik i/ili sastojcima sa vrlo neugodnim okusom zahtjevaju inkapsulaciju ili oblaganje. Također, veliki problem može prouzročiti nadražujuće djelovanje pojedinih dijelova sluznice. (Bhowmik i sur., 2014.)

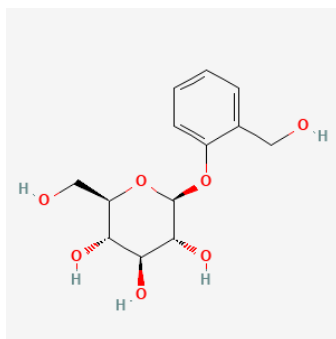
Svi sastojci tableta dijele se u dvije osnovne skupine – aktivne tvari i pomoćne tvari.

Aktivne tvari su kompleksne kemijske tvari proizvedene/dobivene različitim jediničnim operacijama pod unaprijedim određenim validiranim uvjetima. Mogu biti dobiveni kemijskom sintezom (acetilsalicilna kiselina), fermentacijom (penicilin), ekstrakcijom iz nekih prirodnih izvora (heparin) ili kombinacijom navedenih procesa (Menezes i sur., 2009). Aktivne tvari su najmanje zastupljene u sastavu tableta, od svega nekoliko mg/g te nisu dostatne za formiranje tablete.

Zbog toga se u tablete dodaju razne pomoćne tvari do željenog oblika, mase i volumena. U pomoćne tvari spadaju sredstva za dopunjavanje (punila), vezivna sredstva (adhezivi), sredstva za raspadanje (dezintegratori), sredstva za klizenje, boje, korigensi okusa, adsorbensi te ovlaživači i hidrofilizatori.

2.1.2 Acetilsalicilna kiselina

Hipokrat – otac medicine – u 5.st.pr.Kr je navodno propisao koru vrbe za smanjenje porođajnih bolova i groznice. Vrba spada u porodicu *Salicaceae*, rod *Salix* L. , a postoje tri vrste *Salix alba* L., *Salix pentandra* L. i *Salix purpurea* L. U kori vrbe nađena je velika količina salicilata, a njezin aktivni ekstrakt naziva se salicin. Salicin je po svom kemijskom sastavu arilni β -D-glukozid odnosno konjugat β -D-glukoze sa salicilnim alkoholom.



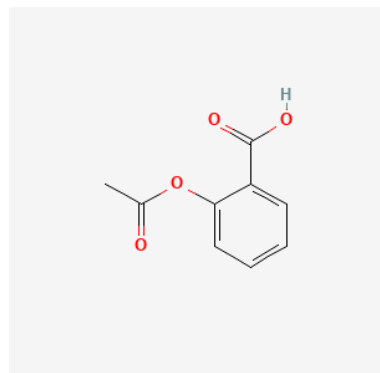
Slika 1. Kemijska struktura salicina

1828. Johann Buchner je po prvi puta izolirao pročišćeni salicin iz kore vrbe, kojeg su zatim francuski kemičari preveli u salicilnu kiselinu. No, kao oralni pripravak imala je vrlo nadražujući učinak na gastrointestinalnu sluznicu.

Acetilsalicilna kiselina (ASA, aspirin, 2-acetoksibenzojeva kiselina) je naknadno otkriven i sintetiziran oblik umjetnog salicilata. Prvi je acetilsalicilnu kiselinu sintetizirao Charles Gerhardt, dok ju je Felix Hoffman iz Bayera prvi primjenio na sebi i ocu. Hoffman je zatim usavršio proces sinteze acetilsalicilne kiseline te je 1899. puštena u komercijalnu proizvodnju.

1900. Godine ASA se, pod zaštićenim imenom Aspirin, po prvi put pojavljuje na tržištu u obliku tablete te je i dan danas jedan od najčešće korištenih analgetika. Koristi se i za olakšavanje glavobolje, mišićne boli i boli u zglobovima. Također učinkovito djeluje kod groznice, upala i oteklina te se primijenjuje za liječenje reumatskog artritisa, reumatske groznice i blažih upala.

Zbog svoje sposobnosti da inhibira proizvodnju krvnih trombocitskih ugrušaka koristi se kao antikoagulat za liječenje blažih moždanih i srčanih udara (Varga i sur., 2018).



Slika 2. Kemijska struktura acetilsalicine kiseline (ASA)

2.2 Mjerne metode i analize

2.2.1 Električna vodljivost i TDS

Pojam električna vodljivost označava sposobnost tvari (najčešće vodene otopine) da provodi struju. Za provođenje struje zaslužni su ioni, njihova koncentracija, valencija i pokretljivost. Električna vodljivost ovisna je o temperaturi pri čemu raste za 2% pri promjeni temperature za 1 °C. Za standardnu vrijednost uzima se električna vodljivost mjerena pri temperaturi od 25 °C, ako je moguće (Walton, 1989).

Koncentracija ukupnih otopljenih čvrstih tvari (engl. TDS) je teško mjerljiva veličina, izuzev u strogo kontroliranom laboratoriju pod kontroliranim i strogo određenim uvjetima. Međutim, taj pojam se može usko povezati uz električnu vodljivost te se izračunati na lakši način.

Izmjerena vrijednost električne vodljivosti pomnoži se unaprijed određenim faktorom korelacije, koji se označava slovom K, a njegova vrijednost je u rasponu od 0,5 do 0,75. Pri tom 0,5 faktor korelacija odgovara za destiliranu vodu, dok za morsku vodu taj faktor iznosi 0,7.

Linearna formula koja prikazuje ovisnost električne vodljivosti i koncentracije ukupnih otopljenih čvrstih tvari je:

$$TDS = KEC_{25}$$

U gore navedenoj formuli TDS je u mjernoj jedinici mg/L, a električna vodljivost (EC_{25}) u $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Walton, 1989).

2.2.2 Spektroskopija bliskog infracrvenog zračenja (NIR spektroskopija)

Otkriće bliskog infracrvenog zračenja pripisuje se Williamu Herchelu 1800. godine, iako je mjesto u industrijskoj praksi dobio tek tijekom 1960.-ih godina. U zadnjih 25 godina spektroskopija bliskog infracrvenog zračenja (engl. Near Infrared Spectroscopy, NIRS) ili NIR-spektroskopija, kao analitička metoda, zauzima sve zastupljenije mjesto u prehrambenoj, poljoprivrednoj, ali i u farmaceutskoj, tekstilnoj i kemijskoj industriji (Blanco i sur., 1998). Blisko infracrveno zračenje u elektromagnetskom spektru proteže se između valnih duljina od 780 nm do 2500 nm, odnosno od 12 820 do 4000 cm^{-1} . Promjene u spektru nastat će zbog pobuđivanja vibracijskih prijelaza nastalih apsorpcijom zračenja, a vrpce u nastalim spektrima odgovarat će vibracijama tijekom kojih dolazi do promjene dipolnog momenta. Veze koje imaju visok dipolni moment, a to su C–H, O–H, N–H i S–H pokazivat će najjaču apsorpciju, odnosno vrpce u spektru biti će najintenzivnije. S druge strane, molekule poput H_2 , O_2 i N_2 , kod kojih ne dolazi do promjene dipolnog momenta, neće apsorbirati blisko infracrveno zračenje. Vrpce u NIR području slabijeg su intenziteta (10–10000 puta) i šire od vrpce osnovnih vibracija u srednjem infracrvenom području (engl. mid infrared, MIR) koje se proteže od 4000 do 400 cm^{-1} . Princip rada je vrlo jednostavan. Ispitivani uzorak pobuđuje se izvorom svjetlosti. Kao izvor svjetlosti koriste se volfram-halogene žarulje koje imaju mogućnost konstantnog emitiranja spektra u rangu od 320 nm do 2500 nm. Ispitivani uzorak će apsorbirati NIR zračenje te ga propustiti ili reflektirati u ovisnosti o fizikalnim i kemijskim karakteristikama što rezultira jedinstvenim spektrom uzorka. Nastavno na tu činjenicu može se koristiti u kvantitativnim i kvalitativnim analizama (Prajapati i sur, 2016).

2.2.2.1 NIR spektroskopija u farmaceutskoj industriji

Zbog mogućnosti rada sa velikim rasponom valnih duljina, NIR spektroskopija u farmaceutskoj industriji ima široku primjenu u analizama aktivnih i pomoćnih tvari u tabletama i gotovim proizvodima. Glavni razlog široke primjene sušto je brza i nedestruktivna metoda analize. NIR spektroskopija koristi se je u farmaceutskoj industriji i prije nego što je PAT (engl. Process analytical technology) uveden 2000.-tih godina, ali je njena uporaba tada bila jako limitirana. NIR spektroskopi su najprije imali limitiranu upotrebu i bili su korišteni u multinacionalnim farmaceutskim kompanijama za identifikaciju polaznih materijala zbog uštede na vremenu i laboratorijskim testiranjima, a istodobno je pružala pouzdanu kontrolu ispravnosti polaznih

materijala. Nakon što je PAT (engl. Process analytical technology) uveden 2000.-tih godina NIR spektroskopiji dobivaju sve veću primjenu.

Pozitivne strane NIR spektroskopske metode su prvenstveno fleksibilnost i svestranost metode te ne uništavanje početnog analiziranog uzorka.. Zbog širokog raspona valnih duljina svoju primjenu nalazi i kod tekućih i čvrstih uzoraka (Blanco i sur, 1998).

Zbog mogućnosti NIR zračenja da prodiđe do 2.4 mm u čvrste uzorke što isključuje uništavanje analiziranog uzorka zbog potrebe za razrjeđivanjem Također, to minimalizira utjecaj ljudske pogreške kod pripreme uzorka, a samim time i utjecaj na rezultate analize (Prajapati i sur, 2016). Direktna analiza uzoraka moguća je u ovoj metodi zbog niske molarne apsorptivnosti, zbog čega se duljina zračenja mjeri u milimetrima, rjeđe centimetrima. Ovo je velika prednost u odnosu na IR-spektroskopiju gdje su tekući uzorci zahtijevali dodatnu složenu pripremu.

Glavni problem NIR-spektroskopije je što jedna vrpca može biti posljedica više različitih kombinacija osnovnih vrpca i viših tonova, te njihovog preklapanja što u pojedinim slučajevima otežava identifikaciju pojedinih vrpca, za razliku od IR spektra. Sukladno tome može doći do problema sa razrijeđenim uzorcima, budući da su vrpce u spektru vode vrlo intenzivne.

a) Kvalitativna analiza

Kvalitativna analiza uključuje identifikaciju tvari, odnosno potvrdu kemijske strukture, kao i fizičkih parametara poput polimorfa i veličine čestice u uzorku. U farmaceutskoj industriji kvalitativnu analizu potrebno je provoditi u svakoj fazi procesa, odnosno od polaznih sirovina do gotovog proizvoda i smatra se parametrom za kontrolu kvalitete proizvoda. Analiza se bazira na uspoređivanju postojećih spektralnih podataka sa spektralnim podacima analiziranog uzorka uz pomoć kemometrike.

Svi polazni materijali (sirovine) koje se koriste u proizvodnom procesu jasno i jednoznačno su definirani strogim zahtjevima kvalitete u farmakopejama i GMP-om (engl. good manufacturing practice). Budući da je NIR-spektroskopija vrlo osjetljiva na promjene u kemijskom i fizičkom sastavu sirovina može se primijeniti kao pouzdana metoda za identifikaciju aktivnih i pomoćnih tvari koje se koriste za proizvodnju gotovog proizvoda. Uz to, može se koristiti za provjeru homogenosti uzorka. Strogo definirani parametar u specifikacijama gotovih proizvoda je ujednačenost sadržaja. Nakon pouzdane identifikacije aktivnih i pomoćnih tvari, iste se važu i miješaju. Tvari se miješaju dok se ne dobije dobro homogenizirana smjesa koja onda može ići dalje u proizvodni proces.

b) Kvantitativna analiza

U sklopu kvantitativne analize u farmaceutskoj industriji, parametri koji se najčešće provjeravaju NIR-spektroskopijom su sadržaj vode i vlage te udio aktivnih i pomoćnih tvari. Uz to, prate se i fizikalna svojstva poput tvrdoće tableta, udjela kristalnih oblika djelatne tvari, raspodjele veličine čestica te parametara procesne tehnologije.

Sadržaj vode smatra se kritičnim parametrom zbog njegovog utjecaja na stabilnost gotovog proizvoda. Prisutnost vode u gotovim uzorcima može se lako detektirati jer molekule vode imaju dvije karakteristične najintenzivnije vrpce u NIR spektru koje se nalaze na valnim duljinama od 1450 nm i 1940 nm.

NIR spektroskopske metode našle su svoju primjenu u određivanju sadržaja i ujednačenosti sadržaja jedne ili više djelatnih tvari u krutim i tekućim gotovim oblicima s visokim i niskim postotnim udjelom u bilo kojoj matrici, kako u laboratoriju, tako i prilikom proizvodnje u realnom vremenu. Iako je NIR spektroskopija metoda sa niskom osjetljivošću, dokazano je da se može koristiti u kvantitativnoj analizi aktivnih tvari koje se u tabletama najčešće nalaze u vrlo niskim koncentracijama. Kvantitativne NIR analize djelatnih tvari mogu se određivati refleksijom i transmisijom zračenja, no pri niskim koncentracijama u tabletama pogodnije je određivanje transmisijom zračenja. Razlog tomu je što zračenje prolazi kroz cijeli uzorak pa homogenost ne utječe u tolikoj mjeri kao što je to slučaj kod refleksije.

Također, tablete koje sadrže dvije djelatne tvari, raspoređene u dva sloja, moguće je snimati bez potrebe okretanja tablete. Zahvaljujući tome analize nisu ograničene isključivo na laboratorijsku primjenu.

Farmaceutska industrija jedna je od najstrože reguliranih industrija sa vrlo uskim zahtjevima kvalitete. Prije puštanja na tržište na svakoj seriji gotovog proizvoda provode se laboratorijske analize na nasumično odabranim uzorcima, koji su dostatni činiti reprezentativan uzorak gotovog proizvoda. Taj proces je dugotrajan, a potencijalne nastale greške u proizvodnji mogu rezultirati velikim novčanim gubicima. Konstantnim praćenjem kritičnih parametara i sadržaja osiguravala bi se prijevremena analiza i kontrola kvalitete gotovog proizvoda. Praćenje kritičnih parametara u realnom vremenu s instrumentima koji se nalaze u blizini proizvodne linije ili pak omogućavaju analizu ne micanjem uzoraka s proizvodne linije, uvelike bi doprinijelo smanjenju troškova i utjecaja ljudskih pogrešaka na kvalitetu gotovog proizvoda (Blanco i sur., 1998).

2.2.3 Kemometrijske tehnike

Kemometrija se definira kao "kemijska disciplina koja koristi matematičke i statističke metode da oblikuje ili odabere optimalan mjeriteljski postupak ili eksperiment i omogući dobivanje maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka" (Mathias, 2007).

Najčešća primjena kemometrije je analiza skupova podataka te prepoznavanje matematičkih modela, a prema području primjene može se podijeliti u četiri osnovne skupine.

Prva skupina primjene je postupak koji omogućuje obradu valjanih podataka. Drugo područje primjene odnosi se na mogućnost odabira vrijednih informacija iz velikog skupa valjanih informacija. Treću skupinu čine metode pogodne za analizu spektroskopskih podataka te metoda usporedbe. U četvrtu skupinu spadaju metode umjetne inteligencije (Wold i Sjöström, 1998).

2.2.3.1 PCA – Analiza glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata (PCA, engl. Principal components analysis) jedna je od najčešće korištenih statističkih metoda u analizi podataka s više varijable. Svrha ovog načina obrade podataka je od velikog skupa podataka izuzeti manji, ali reprezentativan dio ukoliko među varijablama postoji korelacijska veza. Drugim riječima, analizira se korelacija unutar jednog skupa varijabli i reducira se dimenzionalnost prostora.

Naime, nastoji se pojednostavniti interpretacija velikog i nepreglednog skupa podataka nastojeći izvući bitne informacije te ih predstaviti kao set novih ortogonalnih informacija koje nazivamo glavne komponente (Abdi i Williams, 2010). Najveću varijancu u podacima opisuje prva glavna komponenta s oznakom PC1, dok preostalu varijancu predstavljaju ostale glavne komponente (PC2, PC3, PC4,..). Vizualizacija dobivenih podataka provodi se pomoću faktorskih bodova, engl. Score plots. Njihovo daljnje grupiranje omogućit će činjenica da ukoliko su spektri slični, vrijednosti faktorskih bodova nalazit će se blizu, a što su spektri različiti vrijednosti faktorskih bodova bit će udaljenije (Jednačak, 2013).

2.2.3.2 Umjetne neuronske mreže (engl. ANN)

Umjetne neuronske mreže novi su korišteni sustav analize podataka, a rade na principu korištenja velikog broja mjernih podataka za učenje, te se na osnovu stečenog znanja dobivaju rezultati, koji se ne temelje na prethodno definiranim pravilima.

Ideja umjetnih neuronskih mreža temelji se na živčanom sustavu čovjeka. Signali u živčanom sustavu prenose se neuronima, počevši od dendrita preko aksona pa sve do nožica, do sljedećeg neurona. Ljudski mozak na temelju povezanosti svih neurona i njihovom paralelnom radu, može efikasno, brzo i paralelno odrađivati više problematika istovremeno.

Umjetne neuronske mreže se na sličan način služe umjetnom inteligencijom za rješavanje problema. Građene su od umjetnih neurona, a koriste se strukturom mozga kako bi razvile statistiku za analizu mjernih podataka. Osnovna svrha umjetnih neuronskih mreža je nastojanje stimuliranja ljudske sposobnosti učenja.

Neuroni u umjetnim neuronskim mrežama raspodijeljeni su u ulazni, skriveni te izlazni slojevi. Funkcija ulaznog sloja je primanje podataka koji se šalju u skrivene slojeve. Skriveni slojevi obrađuju prikupljene podatke te ih šalju u izlazne slojeve. Neuroni izlaznog sloja zatim šalju podatke unazad kroz mrežu kako bi se prilagodila vrijednosna težina neurona u odnosu na željene izlazne podatke, odnosno željeni izlaz. Proces se ponavlja dok god se ne dobije izlaz najbliži željenom izlazu, a opisani proces se naziva učenjem.

Tri su faze rada umjetnih neuronskih mreža: faza učenja, faza testiranja te na kraju faza validacije. Na početku samog rada potrebno je pripremiti ulazne vrijednosti, izlazne vrijednosti te pravila učenja i kriterij za ocjenjivanje mreže. Također je potrebno odrediti potreban broj skrivenih slojeva za provedbu zadatka te rasporediti neurone u pojedine slojeve. Kada je to pripremljeno, sljedeća faza je učenje i treniranje mreže u svrhu pronalaska veza između podataka te predviđanja izlaznih varijabli na temelju ulaznih varijabli.

Učenje je, kao što smo već rekli, proces kreiranja odgovarajuće mreže u kojem se prilagođavaju vrijednosti težina neurona kako bi iz danih ulaznih veličina dobili željene izlazne veličine. Težinu neurona možemo vizualizirati kao debljinu linije između dva neurona u istom ili različitim slojevima. Što je linija deblja neuroni će komunicirati brže, bolje i kvalitetnije. Proces učenja i treniranja mreže ponavlja se onoliko puta koliko je potrebno kako bi dobili izlazne veličine najbliže željenima, odnosno kako bi pogreška bila što manja. Ne postoji jedinstveno pravilo koliko puta treba ponoviti taj proces.

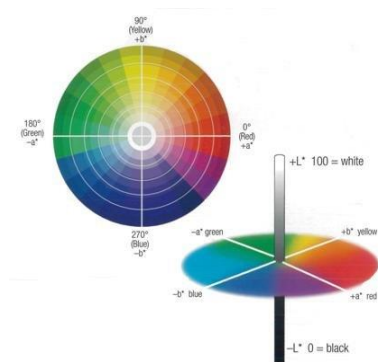
Sljedeća faza procesa je testiranje naučenog znanja. U toj fazi procesa neuronska mreža se koristi na vrijednostima težina dobivenih kroz proces učenja. Faza testiranja se provodi na novim ulaznim vrijednostima od kojih će mreža tada predvidjeti pripadajuće izlazne vrijednosti. Mreža se ocjenjuje na osnovu izračuna pogreške ili nekog drugog mjerila točnosti i to na način da se dobivene izlazne vrijednosti mreže uspoređuju sa stvarnim izlaznim vrijednostima.

Uspješnost i korisnost umjetne neuronske mreže temelji se na izračunatoj grešci na uzorku za validaciju (faza validacije). (Dumančić, 2014.)

2.2.4 Kolorimetrija

Kolorimetrija je mjerna metoda u kojoj se primjenjuje CIELab sustav, a kolorimetrom se mjere tzv. Hunterovi parametri: H, C, L, a i b vrijednosti. CIELab predstavlja trodimenzionalni prostor boja u kojem se svaka boja može jednoznačno prikazati točkom u sustavu. Kratica Lab označava tri komponente ovog modela koje prikazuje Slika 3.

U CIELab sustavu boje se opisuju pomoću dvije kromatske osi te jedne akromatske, pri čemu su kromatske osi a^* koja prikazuje odnos između crvene i zelene boje te b^* koja prikazuje odnos između plave i žute boje. Treća os je vertikalna akromatska L^* os koja označava svjetlinu boje. Proteže se od 0 do 100, pri čemu je 0 vrijednost za crnu, a 100 vrijednost za bijelu.



Slika 3. CIELab sustav boja

Vrijednost L^* (engl. lightness) predstavlja svjetlinu boje i daje skalu od crne do bijele boje, pri čemu je $L=0$ apsolutno crno, a $L=100$ predstavlja apsolutno bijelo. Dakle, više svjetlosnih jedinica, odnosno viša L vrijednost predstavlja svijetlije obojenje.

Vrijednosti a^* i b^* predstavljaju odnose među komponentama različitih boja, pri čemu vrijednost a^* predstavlja odnos između crvene i zelene komponente, a vrijednost b^* između žute i plave komponente.

Negativna a^* vrijednost označava zelenu boju, a pozitivna a^* vrijednost označava crvenu boju. Isto tako, negativna b^* vrijednost predstavlja plavu boju, a pozitivna b^* vrijednost žutu boju.

Preko a^* i b^* vrijednosti se zatim može izračunati vrijednost C^* (engl. chroma), formulom:

$$C = (a^2 + b^2)^{\frac{1}{2}}$$

Vrijednost C* predstavlja zasićenost, odnosno intenzitet boje. Visoku zasićenost imaju jarke i čiste boje i one su dosta udaljene od ishodišta koje je okomito s osi L* te je vrijednost C* viša. Nižu zasićenost imaju uzorci s većim udjelom sive boje, te su one bliže središtu.

Vrijednost H* (engl. Hue angle) predstavlja osjet izazvan različitim dijelovima spektra uz jednaku svjetloću tj. to je ton boje. Izražava se kao omjer crvene, zelene, žute i plave boje i računa prema formuli:

$$H = \arctan\left(\frac{1}{2}\right)$$

Ako dvije boje nisu posebno udaljene u bojenom krugu, onda će se doživjeti jedna od tih dviju boja, a što su više udaljene jedna drugoj manje mijenjaju ton pa su i manje zasićene.

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci

Za eksperimentalni dio rada korišteni su lijekovi kupljeni u gradskoj ljekarni, koji sadrže aktivnu tvar acetilsalicilnu kiselinu u različitim koncentracijama (dozama). Sveukupno je korišteno 9 lijekova od 4 različita proizvođača koji se mogu naći u slobodnoj prodaji na hrvatskom tržištu.

Korištena su 4 lijeka sa različitim koncentracijama acetilsalicilne kiseline proizvođača A : 75 mg, 100 mg, 100 mg PRO i 300 mg, pri čemu lijekovi 100 mg i 100 mg PRO sadrže istu koncentraciju acetilsalicilne kiseline (100 mg), ali je različit sastav ostalih tvari u lijeku.

Tri su lijeka korištena od proizvođača B sa različitim koncentracijama acetilsalicilne kiseline: 100 mg, 500 mg i šumeći oblik tablete sa 400 mg acetilsalicilne kiseline obogaćen C vitaminom u koncentraciji od 240 mg.

Jedan lijek korišten je od proizvođača C s 100 mg acetilsalicilne kiseline kao aktivne tvari.

Zadnji lijek koji je korišten sadržava 100 mg acetilsalicilne kiselina, proizvođača D.

Neovisno o formi uzoraka (tablete, prahovi, tekući uzorak) u tablici 2 prikazano je kako će se uzorci označavati za lakše snalaženje.

Tablica 1. Oznake 9 korištenih uzoraka za lakše snalaženje kroz rad

Uzorak	Oznaka uzorka kroz daljnji tekst
Uzorak proizvođača A sa 75 mg acetilsalicilne kiseline	A75
Uzorak proizvođača A sa 100 mg acetilsalicilne kiseline	A100
Uzorak proizvođača A sa 100 mg Pro acetilsalicilne kiseline	A100pro
Uzorak proizvođača A sa 300 mg acetilsalicilne kiseline	A300
Uzorak proizvođača B sa 100 mg acetilsalicilne kiseline	AS100
Uzorak proizvođača B sa 500 mg acetilsalicilne kiseline	AS500
Šumeći uzorak proizvođača B sa 400 mg acetilsalicilne kiseline	S400
Uzorak proizvođača C sa 100 mg acetilsalicilne kiseline	ASK100
Uzorak proizvođača D sa 100 mg acetilsalicilne kiseline	C100

3.1.2 Laboratorijski pribor

- Staklene čaše volumena: 200, 400, 600, 800, 1500 mL
- Pipetman 100-1000 µL(LLG Labware, Njemačka)
- Stakleni lijevak
- Menzure volumena: 1000 mL, 2000 mL
- Celulozni filter papir (LLG Labware, Njemačka)
- Plastične kivete volumena 15 mL
- Plastične kivete volumena 3 mL za spektroskopiju
- Tarionik i tučak

3.1.3 Uređaji i software

- Konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- NIR-128-1.7-USB/6.25/50µm skenirajući monokromator (Control Development, SAD) s pripadajućim softwareom Spec32 (Control Development, SAD)

- Statistica 13.0 (StatSoft, SAD)
- Magnetska mješalica s grijačem (Stuart SB 162-3, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- PCE-CSM 3 kolorimetar (Engleska)

3.1.4 Pripreme uzoraka

Svaki od 9 lijekova korišteni su u 3 forme: tablete (čvrsti uzorak), praškasti uzorak i tekući uzorak. U prvoj fazi analize korištene su tablete koje su izvađene iz blistera. Tablete prije korištenja nisu bile tretirane ni na jedan način. Pripremljeno je sveukupno 3 tablete od svakog lijeka za analizu. Zatim su tablete uz pomoć tarionika i tučka samljevene do praha finih čestica bez vidljivih većih zaostataka tableta.

Za pripremu treće forme uzorka korištena je jedna samljevena tabletu otopljena u laboratorijskoj čaši sa 0.5 L vode. Za maksimalno otapanje tablete u vodi korištena je magnetska miješalica. Za svaku otopinu zatim je pripremljeno 11 različitih koncentracija u plastičnim kivetama od 3 mL, počevši od prve kivete sa najvećom koncentracijom aktivne tvari do zadnje kivete koja nije sadržavala aktivnu tvar.

Koncentracije acetilsalicilne kiseline kao aktivne tvari u svakom razrjeđenju za 9 različitih vrsta tableta prikazane su u Tablici 2. Ukupno je pripremljeno 99 tekućih uzoraka.

Tablica 2. Koncentracija acetilsalicilne kiseline u pripremljenim tekućim uzorcima

Broj uzorka		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Oznaka uzorka kroz rad											
Koncentracija acetilsalicilne kiseline (aktivne tvari) u uzorku (mg/mL)	A75	0,15	0,135	0,12	0,105	0,09	0,075	0,06	0,045	0,03	0,015	0
	A100	0,2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0
	A100pro	0,2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0
	A300	0,6	0,54	0,48	0,42	0,36	0,3	0,24	0,18	0,12	0,06	0
	AS100	0,2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0
	AS500	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
	S400	0,8	0,72	0,64	0,56	0,48	0,4	0,32	0,24	0,16	0,08	0
	ASK100	0,2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0
	C100	0,2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0

3.2 Metode

3.2.1 Određivanje fizikalnih svojstava

Pomoću konduktometra (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska) svakom tekućem uzorku u kivetu izmjerena je električna vodljivost i udio otopljenih čvrstih tvari (TDS) dva puta te je iz dobivenih rezultata izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.2 NIR spektroskopija

Sve tri forme pripremljenih uzoraka snimljene su u području valnih duljina 904 do 1699 nm pomoću NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m skenirajućeg monokromatora (Control Development, SAD) s instaliranim pripadajućim softwareom Spec32 (Control Development, SAD).

Od svakog lijeka, snimljene su 3 tablete. Svaka tableta snimljena je 5 puta sa svake strane. Svaki praškasti i tekući uzorak snimljen je 5 puta.

Tablete i prahovi snimani su sondom, dok su tekući uzorci prethodno homogenizirani, a potom snimani u kvarcnim kivetama od 3 mL, na postolju s poklopcem kako bi se spriječio utjecaj vanjskog izvora svjetlosti.

Neobrađeni blisko-infracrvenog spektri pohranjeni su kao .xls datoteke u softwareu Microsoft Office Excel te kasnije korišteni za obradu podataka PCA metodom.

3.2.3 Kemometrijske tehnike

3.2.3.1 PCA – Analiza glavnih komponenata

U svrhu obrade podataka NIR spektroskopije korištena je kemometrijska metoda analize glavnih komponenti (PCA). Analiza glavnih komponenti koristi se kako bi se izdvojile specifične informacije iz velike baze podataka i radi lakšeg uočavanja sličnosti i razlike među podacima na temelju njihovog međusobnog razdvajanja i grupiranja. Najznačajnije informacije, koje proizlaze iz vrijednosti apsorbancija (u raspona valnih duljina 904-1699 nm) pri zadanim volumnim udjelima pretvorene su u skup novih ortogonalnih varijabli koje zovemo glavne komponente ili faktori (Abdi i Williams, 2010). Za analizu podataka NIR spektra PCA metodom korišten je software Statistica 13.0 (StatSoft, USA).

3.2.3.2 Umjetne neuronske mreže

Umjetne neuronske mreže korištene su za kako bi se na temelju podataka iz NIR spektra predvidjele vrijednosti aktivne komponenta u tabletama, ali i kako bi se predvidjeli proizvođači određenih lijekova acetilsalicilne kiseline. Koristeći software Statistica v.13 (StatSoft, USA) razvijene su mreže s 4 – 13 neurona u skrivenom sloju. Kao ulazne varijable korišteno je prvih deset faktora dobivenih analizom glavnih komponenti koji su bili odgovorni za 99,9% varijabilnosti u podacima. Kao izlazne varijable postavljene su: naziv lijeka ovisno o proizvođaču te količina aktivne tvari u tabletama. Učenje umjetnih neuronskih mreža provedeno je podjelom podataka u skupove za učenje, test i validaciju u omjeru 60:20:20. Najbolje umjetne neuronske mreže odabrane su na temelju najviše R^2 vrijednosti i najmanje pogreške.

3.2.4 Kolorimetrija

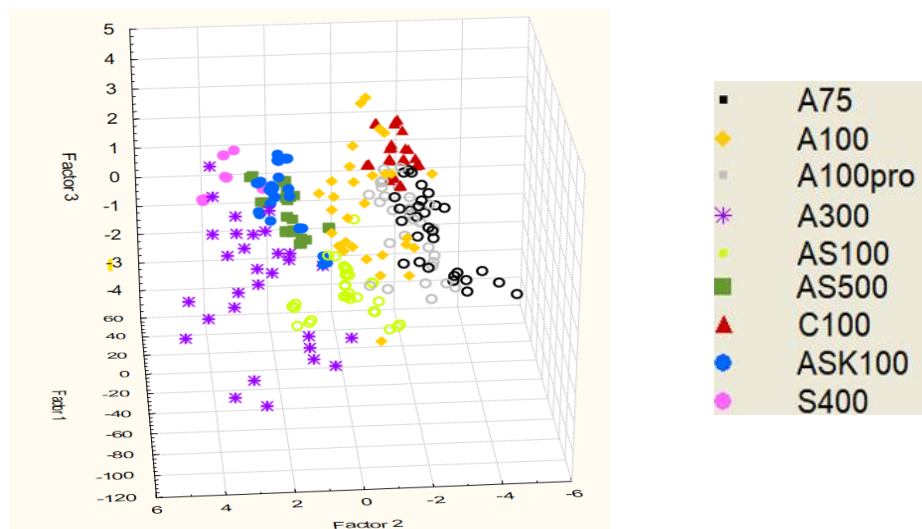
Budući da se kroz cijeli rad radila usporedba uzoraka s obzirom na koncentraciju aktivne tvari u uzorku i proizvođača, dodatno su uzorci uspoređivani metodom kolorimetrije, kako bi se mogle vidjeti eventualne razlike u odnosu na proizvođača / koncentraciju aktivne tvari s obzirom na njihovu boju. Za uspoređivanje boje uzoraka, tablete i prahovi snimani su kolorimetrom PCE-CSM 3 (Engleska). Za svaki uzorak rezultati su prikazani kao L^* , a^* , b^* , C i h. Prije snimanja uzoraka kolorimetar je kalibriran na bijelom postolju za kalibraciju. Svaka tableta snimljena je 5 puta te je iz dobivenih vrijednosti izračunata srednja vrijednost parametara L^* , a^* , b^* , C i h, koji su prikazani u ovom radu. Svaki prah stavljen je u posudicu za uzorke gdje je snimljen jednom, a dobiveni parametri L^* , a^* , b^* , C i h korišteni su u ovom radu i prikazani u tablici rezultata.

4. Rezultati i rasprava

4.1 Tablete

4.1.1 PCA – Analiza glavnih komponenata

Na temelju podataka dobivenih iz spektara tableta snimljenih na cijelom blisko-infracrvenom spektru (904 – 1699 nm) napravljena je analiza glavnih komponenata, kako bi se vidjelo može li se pomoću ove kemometrijske metode dobiti značajno razdvajanje ovisno o proizvođaču tableta i koncentraciji aktivne tvari u pojedinoj tableti. Rezultat provedene analize prikazan je na slici 4.



Slika 4. Prikaz prva tri faktora analize glavnih komponente za svih 9 vrsta tableta

Budući da je svrha PCA kemometrijske metode postići dobro grupiranje kako bi se lakše prepoznale i interpretirale, kako sličnosti tako i razlike u uzorcima, iz slike 4. Možemo vidjeti da to u ovom slučaju nije postignuto.

Možemo vidjeti na slici da su se pojedini uzorci izdvojili, ali i dalje vidimo velika poklapanja grupiranih uzoraka.

Kako se iz prva 3 faktora na temelju slika dobivenih analizom glavnih komponenti ne može dobiti dobar uvid u raspodjelu podataka, podaci analize su iskorišteni kao ulazne varijable za analizu pomoću umjetnih neuronskih mreža.

4.1.2 Umjetne neuronske mreže

Cilj ovog dijela rada je bio vidjeti može li se kemometrijski model umjetnih neuronskih mreža koristiti za precizno predviđanje dvaju izlaznih varijabli u odnosu na direktno izmjerene podatke. Kao ulazne varijable korišteno je prvih deset faktora dobivenih PCA (analizom glavnih komponenti) koji su se pokazali odgovornima za 99,9% varijabilnosti u podacima, a korištene su za predviđanje vrijednosti dvaju izlaznih varijabli – koncentraciju aktivne tvari i mogućnost prepoznavanja pojedine vrste tableta.

U tablici 3. prikazani su dobiveni rezultati učenja, testa i validacije modela umjetne neuronske mreže korištene za analizirane tablete.

Tablica 3. Karakteristike odabrane umjetne neuronske mreže (ANN) razvijene za predviđanje koncentracije aktivne tvari i prepoznavanje uzorka tableta od 9 korištenih uzoraka

Karakteristika mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
10-11-2	0,996983	0,000611	0,993896	0,001180	0,991762	0,001680	Logistic	Tanh

Iz tablice je vidljivo da su vrijednosti koeficijenta determinacije za učenje, test i validaciju iznad 0,99 što odabranu umjetnu neuronsku mrežu čini vrlo preciznom u predviđanju koncentracije aktivne tvari i prepoznavanja uzorka tableta od 9 korištenih uzoraka. Također drugi bitan faktor je da su pogreške učenja, testa i validacije vrlo male. Odabrana umjetna neuronska mreža sastoji se od 10 ulaza i 11 neurona u skrivenom sloju. Također, u tablici 4. Možemo vidjeti rezultate predviđanja pojedinačno za dvije izlazne varijable na temelju odabrane neuronske mreže.

Tablica 4. Rezultati predviđanja dviju izlaznih varijabli na temelju odabranog modela umjetne neuronske mreže iz tablice 3.

Parametar	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
Koncentracija aktivne tvari	0,998312	0,997050	0,995670
Vrsta uzorka	0,995654	0,990742	0,987855

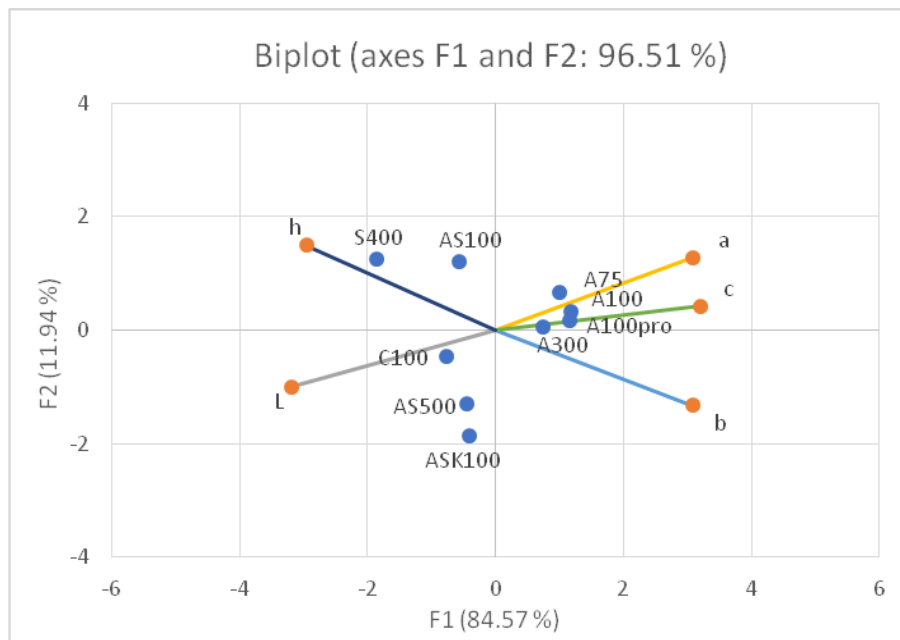
Iz dobivenih koeficijenata determinacije za oba predviđana parametra zasebno, možemo potvrditi uspješnost odabrane umjetne neuronske mreže. Umjetna neuronska mreža pokazala se uspješnijom za predviđanje koncentracije aktivne tvari sa koeficijentima determinacije za učenje 0,9983, za test 0,9971 i za validaciju 0,9957 te manje uspješnom za predviđanje o kojoj vrsti uzorka se radi sa nešto nižim koeficijentima determinacije koji su za učenje dobiveni 0,9957, za test 0,9907 te za validaciju 0,9879.

Iako su koeficijenti determinacije za predviđanje vrste uzorka nešto niži u odnosu na koeficijente determinacije dobivene za određivanje koncentracije aktivne tvari u uzorku, u oba slučaja nisu niži od 0,9879 što potvrđuje da je odabrani model umjetne neuronske mreže uspješan za uzorke u formi tableta.

4.1.3 Kolorimetrija

U sklopu rada provedena su kolorimetrijska mjerenja na svim uzorcima tableta (9 uzoraka).

Na slici 5. Koja prikazuje biplot možemo vidjeti raspodjelu uzoraka s obzirom na boju, odnosno s obzirom na dobivene izmjerene vrijednosti L^* , a^* , b^* , c^* i H^* , dok su rezultati dobiveni mjerenjem prikazani u tablici 5. Analizom dobivenih vrijednosti parametara i analizom biplota možemo doći do istih zaključaka.



Slika 5. Raspodjela uzoraka tableta prema vrijednostima L^* , a^* , b^* , c^* i H^*

Tablica 5. Prikaz vrijednosti kolorimetrijskog mjerenja (L^* , a^* , b^* , c^* i h^*) za uzorke tableta

uzorak	L^*	a^*	b^*	C^*	H^*
A75	51,05	2,226	2,66	3,502	49,536
A100	56,418	2,156	3,59	4,22	58,75
A100pro	57,172	1,96	3,762	4,254	62,544
A300	65,744	1,984	2,836	3,478	55,346
AS100	79,57	1,016	0,616	2,634	190,795
AS500	85,42	0,296	1,884	2	79,366
C100	90,238	0,292	1,126	2,108	139,09
ASK100	93,438	-0,178	2,706	2,718	94,032
S400	98,7	-0,23	-1,58	1,6	261,64

L^* vrijednost predstavlja svjetlinu boje, odnosno što je vrijednost bliže nuli to je boja tamnija / crnija, a što je bliže broju 100 to je vrijednost svjetlija / bjelija. Iz naših dobivenih rezultata možemo vidjeti da je L^* vrijednost za sve četiri vrste tableta proizvođača A (A75, A100, A100pro i A300) između 50 i 65, što ih čini najtamnijim tabletama od 9 uzetih uzoraka. L^* vrijednosti za dvije vrste tableta proizvođača B (AS100, AS500) su također približno slične i iznose 80- 85. Za tri vrste tableta L^* vrijednost prelazi 90, a to su tablete proizvođača C (ASK100) i D (C100) sa 100 mg acetilsalicilne kiseline, i najsvjetlija od svih 9 uzoraka je šumeći uzorak proizvođača B sa 400 mg acetilsalicilne kiseline. Iz tih rezultata možemo primijetiti kako se tablete, neovisno o količini aktivne tvari, istih proizvođača mogu svrstati u skupinu sa približno jednakim L^* vrijednostima, uz iznimku šumećeg oblika tablete, koji je najsvjetliji.

a^* vrijednost smješta naš uzorak na položaj na osi između zelene i crvene boje, dok ga vrijednost b^* smješta na os između plave i žute boje. Pri tome, brojčane vrijednosti a^* i b^* vrijednosti nisu ograničene, već se opisuju dodavanjem negativnog ili pozitivnog predznaka. Što je a^* vrijednost negativnija boja se više kreće prema zelenoj, dok pozitivna a^* vrijednost označava kretanje boje prema crvenoj. Za b^* vrijednost vrijedi, što je negativnija to se uzorak kreće po osi prema plavoj, dok vrijednost bez negativnog predznaka označava kretanje prema žutoj boji.

Za sve naše uzorke a^* vrijednost kreće se između -0,23 do +2,226, pri čemu najnegativniju vrijednost ima šumeći uzorak, dok najpozitivniju vrijednost imaju uzorci proizvođača A, između 1,984 i 2,26. Iz dobivenih a^* vrijednosti za sve uzorke možemo zaključiti da se nalaze unutar sive zone na a koordinati. Prema dobivenim b^* vrijednostima također možemo vidjeti da svi uzorci

imaju pozitivnu vrijednost te naginju prema žutoj boji, osim šumećeg uzorka koji ima negativnu vrijednost te naginje prema plavoj boji. No, prema dobivenim vrijednostima – između – 1,58 do 3,76 možemo reći da se svi uzorci nalaze u sivoj zoni b koordinate. Dobiveni rezultati za a^* i b^* vrijednosti možemo pripisati tome što su svi uzorci bijele boje, a odstupanje šumećeg uzorka od ostalih tableta može biti što je za razliku od ostalih uzetih vrsta, namjenjena otapanju u vodi ili što uz visoku koncentraciju acetilsalicilne kiseline kao aktivne tvari, sadrži relativno visoku koncentraciju vitamina C, u dozi od 240 mg.

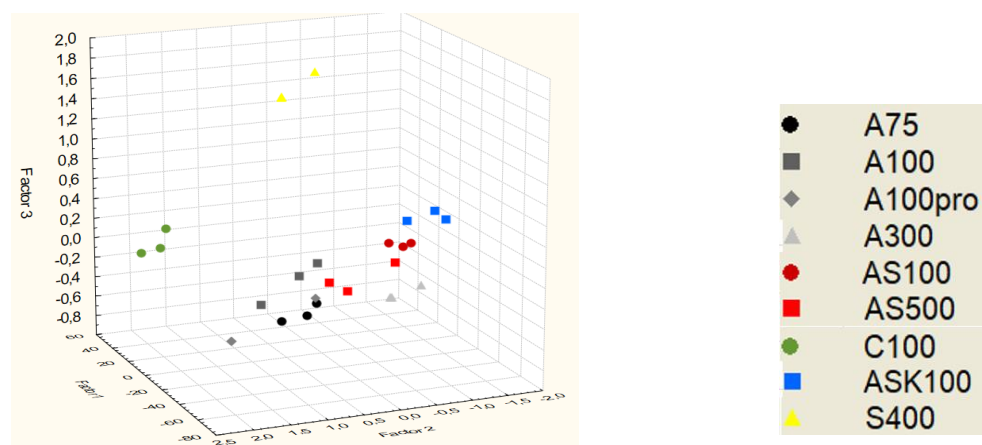
Pomoću c^* vrijednosti iskazuj se zasićenje boje, odnosno 0 za neutralnu, do 100 za sivu i iznad 10 za zasićenu boju. C^* vrijednosti svih naših uzoraka kreću se između 1,6 i 4,254 pa možemo reći da su boje svih korištenih uzoraka neutralne, odnosno gotovo potpuno nezasićene boje.

H^* vrijednosti naših uzoraka su vrlo varijabilne pri čemu iznose između 49,536 i 261,64. Prema navedenoj literaturi, crvena boja opisana je kutom od 0° , a žuta boja kutom od 90° pa prema dobivenim podacima vidimo da nam se većina uzoraka svrstava u raspon od crvene do žute boje. Također, zelena boja opisana je kutom od 180° , dok je kut od 270° plava boja, gdje nalazimo manjinu korištenih uzoraka.

4.2 Prahovi

4.2.1 PCA – Analiza glavnih komponentata

Na temelju podataka dobivenih iz snimljenih spektara prahova tableta snimljenih na cijelom blisko-infracrvenom spektru napravljena je analiza glavnih komponentata, kako bi se vidjelo može li se pomoću ove kemometrijske metode dobiti značajno razdvajanje ovisno o proizvođaču tableta i koncentraciji aktivne tvari u pojedinoj tableti. Rezultat provedene analize prikazan je na slici 6.



Slika 6. PCA za prva tri faktora za prahove svih 9 vrsta tableta

Budući da je svrha PCA kemometrijske metode postići dobro grupiranje kako bi se lakše prepoznale i interpretirale, kako sličnosti tako i razlike u uzorcima.

Iz slike 6. možemo vidjeti da su se pojedini uzorci grupirali i postignuto je određeno razdvajanje pojedinih uzoraka.

Kao uzorak koji se najviše odvojio od ostalih uzoraka možemo vidjeti uzorak S400. Budući da se radi o šumećem čvrstom uzorku možemo zaključiti da se odvojio zbog svoje forme, koja je drugačija nego kod ostalih čvrstih oralnih uzoraka.

Također, vidimo odlično razdvajanje zelenih krugova (uzorak C100), plavih kvadrata (ASK100) te crvenih krugova i kvadrata (AS100 i AS500). Na temelju toga vidimo da smo dobili jako dobro razdvajanje uzoraka s obzirom na proizvođača, budući da svaki od navedenih elemenata predstavlja korišten uzorak različitog proizvođača.

Tu tezu potvrđuje i vidljivo preklapanje tri korištena uzorka: A75, A100 i A100 pro, koji su uzorci istog proizvođača sa vrlo sličnim dozama acetilsalicilne kiseline od 75 mg i 100 mg. Četvrti uzorak tog proizvođača je A300 koji sadrži 300 mg acetilsalicilne kiseline, a nalazi se dosta blizu ostala tri uzorka. Njegovo izdvajanje možemo pripisati znatno većoj koncentraciji acetilsalicilne kiseline u odnosu na prethodno spomenuta tri uzorka.

Na temelju svega navedenog može se zaključiti da je najbolje razdvajanje postignuto prema proizvođaču čiji je lijek korišten, dok koncentracija aktivne tvari u uzorku ima jako mali utjecaj na razdvajanje uzoraka.

4.2.2 Umjetne neuronske mreže

Kao ulazne varijable korišteno je prvih deset faktora dobivenih PCA (analizom glavnih komponenti) koji su se pokazali odgovornima za 99,9% varijabilnosti u podacima, a korištene su za predviđanje vrijednosti dvaju izlaznih varijabli – koncentraciju aktivne tvari i mogućnost prepoznavanja pojedinih prahova tableta.

Tablica 6. Karakteristike odabrane umjetne neuronske mreže (ANN) razvijene za predviđanje koncentracije aktivne tvari i prepoznavanje uzorka praha tablete od 9 korištenih uzoraka

Karakteristika mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
----------------------	-------------------	-----------------	-----------------------	---------------------	-----------------------	---------------------	--------------------------------	-------------------------------

10-8-2	0,998085	0,000381	0,996671	0,000704	0,993018	0,001434	Tanh	Tanh
---------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------	------

U tablici 6. Prikazana je odabrana neuronska mreža korištena za analizirane praškaste uzorke tableta. Kao najbolja podjela podataka, za naše uzorke, u skupove za učenje, test i validaciju pokazao se omjer 60:20:20 sa 10 ulaza i 8 neurona smještenih u skrivenom sloju što odabranu umjetnu neuronsku mrežu čini vrlo stabilnom. Model je odabran na temelju najviših dobivenih vrijednosti koeficijenta determinacije za preciznost učenja, testiranja i validacije te najnižih vrijednosti pogrešaka.

Iz tablice je vidljivo da su vrijednosti koeficijenata determinacije za učenje, test i validaciju iznad 0,99, a pogreške ispod 0,0015 što odabranu umjetnu neuronsku mrežu karakterizira kao jako preciznu i stabilnu za predviđanje koncentracije aktivne tvari i prepoznavanje praškastog uzorka.

Tablica 7. Rezultati predviđanja dviju izlaznih varijabli na temelju odabranog modela umjetne neuronske mreže iz tablice 6.

Parametar	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
Koncentracija aktivne tvari	0,999432	0,998057	0,996153
Vrsta uzorka	0,996738	0,995285	0,989882

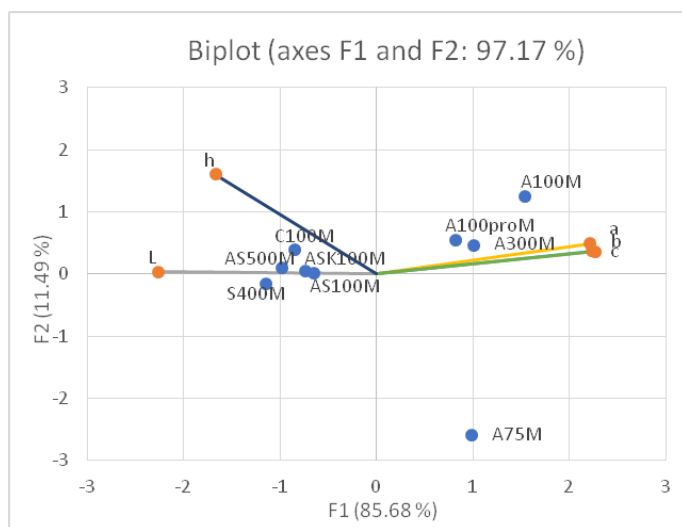
Nastavno na zaključak donesen na temelju karakteristika modela odabrane umjetne neuronske mreže, možemo vidjeti da su koeficijenti determinacije prilično visoki za svaki pojedinačni parametar.

Na temelju navedenih koeficijenata determinacije, model se pokazao uspješnijim za predviđanje koncentracije aktivne tvari uzoraka sa koeficijentima determinacije za učenje 0,9994, za test 0,9981 te za validaciju 0,9962. U odnosu na to, manje uspješnim se model pokazao za prepoznavanje vrste uzorka sa koeficijentima determinacije za učenje 0,9967, za test 0,9952 te za validaciju 0,9899. Za oba predviđana parametra koeficijenti determinacije za učenje, test i validaciju su iznad 0,9899 što ovaj model čini preciznim i dobrim za predviđanje traženih izlaznih varijabli.

4.2.3 Kolorimetrija

U sklopu rada provedena su kolorimetrijska mjerenja, kako i na uzorcima tableta, tako i na mljevenim uzorcima / prahovima dobivenih usitnjavanjem tableta s tarionikom i tučkom.

Na slici 7. koja prikazuje biplot možemo vidjeti raspodjelu uzoraka s obzirom na boju, odnosno s obzirom na dobivene izmjerene vrijednosti L^* , a^* , b^* , c^* i H^* , dok su rezultati dobiveni mjerenjem prikazani u tablici 8. Analizom dobivenih vrijednosti parametara i analizom biplota možemo doći do istih zaključaka.



Slika 7. Raspodjela uzoraka prema vrijednostima L^* , a^* , b^* , c^* i H^*

Tablica 8. Prikaz vrijednosti kolorimetrijskog mjerenja (L^* , a^* , b^* , c^* i H^*) za uzorke prahova tableta

prahovi	L^*	a^*	b^*	c^*	H^*
A75M	61,73	0,66	2,67	2,75	7,17
A100M	57,64	1,5	3,72	3,72	66,22
A100proM	58,67	0,97	2,76	2,93	70,69
A300M	58,52	1,34	2,71	3,02	63,67
AS100M	87,1	0,04	1,66	1,66	88,62
AS500M	88,27	-0,13	1,45	1,45	95,02
Car100M	89,53	-0,23	1,8	1,82	97,3
ASK100M	87,22	0,14	1,72	1,73	85,48
Sum400M	87,9	-0,08	1,09	1,09	94,23

Iz dobivenih rezultata možemo vidjeti da je L* vrijednost za sva četiri praškasta uzoraka dobivenih iz tableta proizvođača A (A75, A100, A100pro i A300) između 58,52 i 61,73, što ih čini najtamnijim uzorcima od 9 praškastih uzoraka. Za preostale proizvođače L* vrijednosti su vrlo slične i kreću se između 87,1 i 89,53. Iz prikazanih rezultata možemo primjetiti kako se tablete, neovisno o količini aktivne tvari, istih proizvođača mogu svrstati u skupinu sa približno jednakim L* vrijednostima.

Za sve praškaste / mljevene uzorke a* vrijednost kreću se između -0,23 do +1,57, a b* vrijednosti između 1,09 i 3,72, čime možemo zaključiti da sve uzorke možemo smjestiti u sivu zonu a i b koordinate.

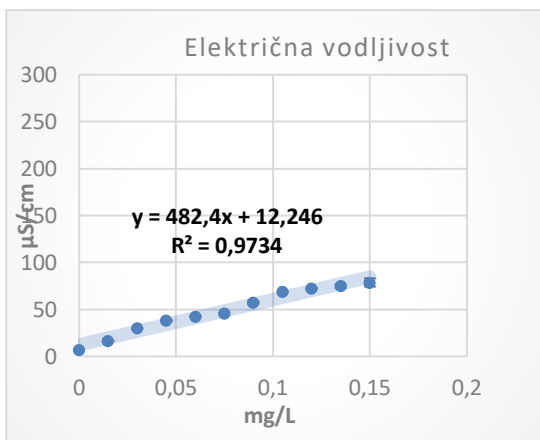
Pomoću c* vrijednosti iskazuje se zasićenje boje, a budući da ona za sve uzorke brojčano iznosi između 1,09 i 3,72 možemo reći da su boje svih korištenih uzoraka neutralne, odnosno gotovo potpuno nezasićene boje.

H* vrijednosti naših uzoraka su dosta varijabilne pri čemu iznose između 7,17 i 97,3. Prema navedenoj literaturi, crvena boja opisana je kutom od 0°, a žuta boja kutom od 90° pa prema dobivenim podacima vidimo da nam se većina uzoraka svrstava u raspon od crvene do žute boje. Također, zelena boja opisana je kutom od 180°, dok je kut od 270° plava boja, gdje nalazimo manjinu korištenih uzoraka.

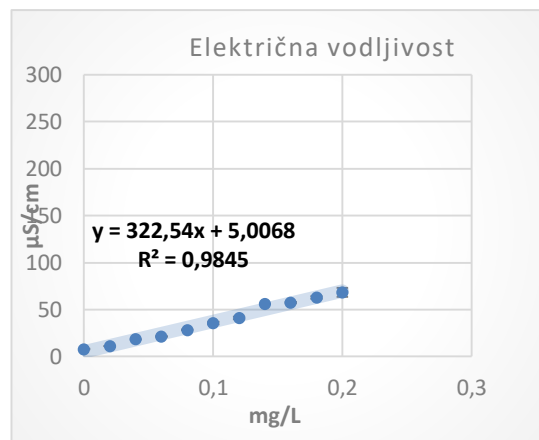
4.3 Tekući uzorci

4.3.1 Električna vodljivost i TDS

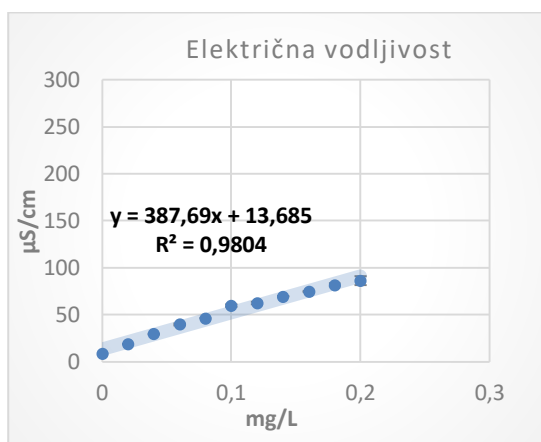
Na slikama 6-14 prikazani su rezultati mjerenja električne vodljivosti, a na slikama 15-24 koncentracije ukupnih otopljenih čvrstih tvari na tekućim uzorcima tableta. Koncentracije acetilsalicilne kiseline u pripremljenim uzorcima prikazani su u tablici 2 u poglavlju 3.1.4 Priprema uzoraka.



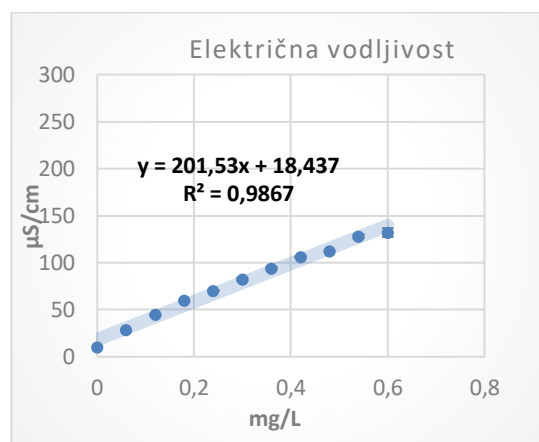
Slika 8. Električna vodljivost u uzorku A75



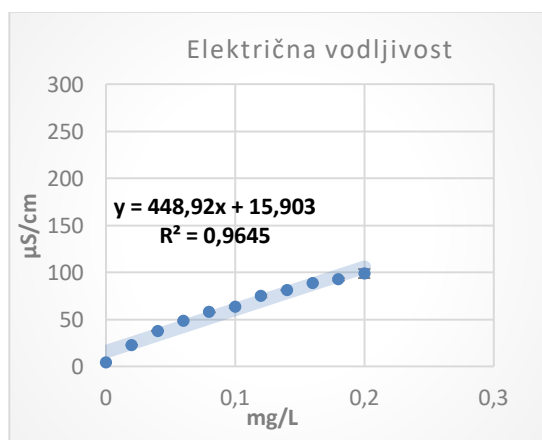
Slika 9. Električna vodljivost u uzorku A100



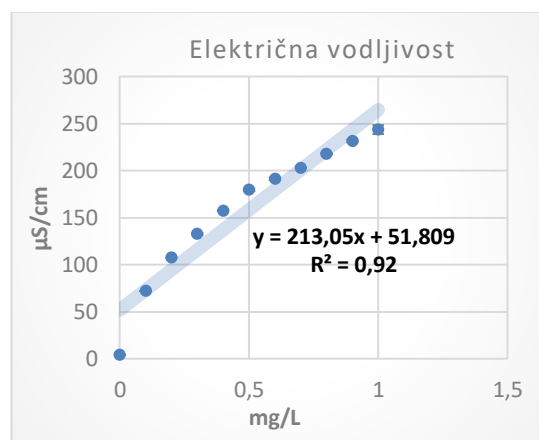
Slika 10. Električna vodljivost u uzorku A100pro



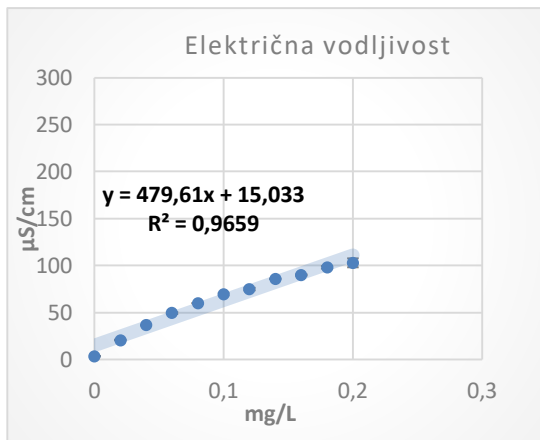
Slika 11. Električna vodljivost u uzorku A300



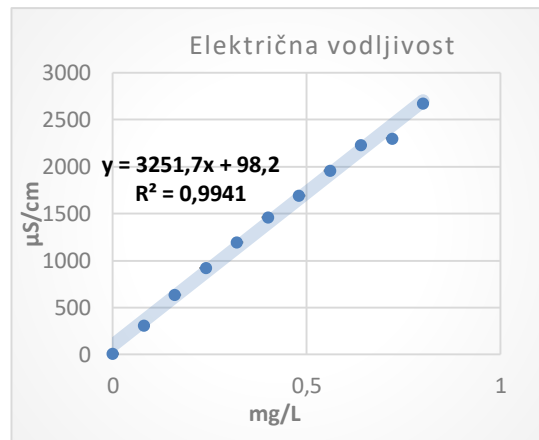
Slika 12. Električna vodljivost u uzorku AS100



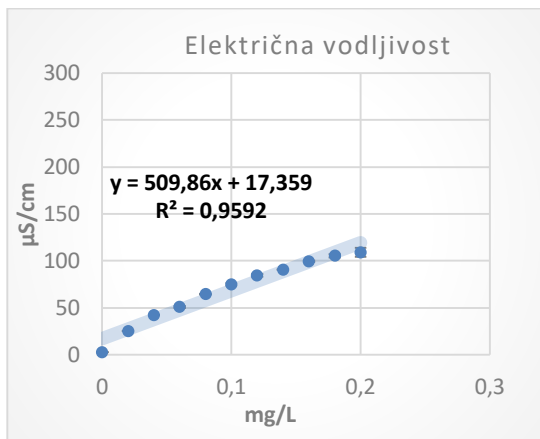
Slika 13. Električna vodljivost u uzorku AS500



Slika 14. Električna vodljivost u uzorku S400

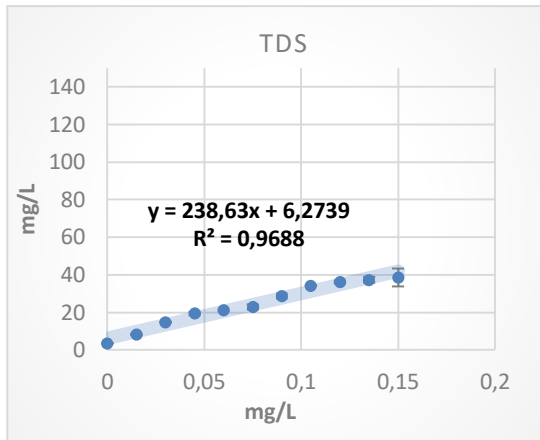


Slika 15. Električna vodljivost u uzorku ASK100

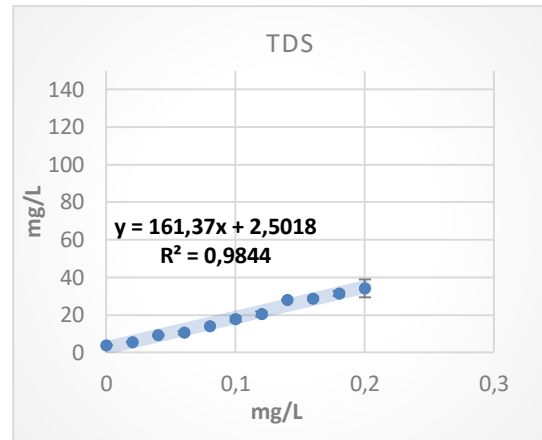


Slika 16. Električna vodljivost u uzorku C100

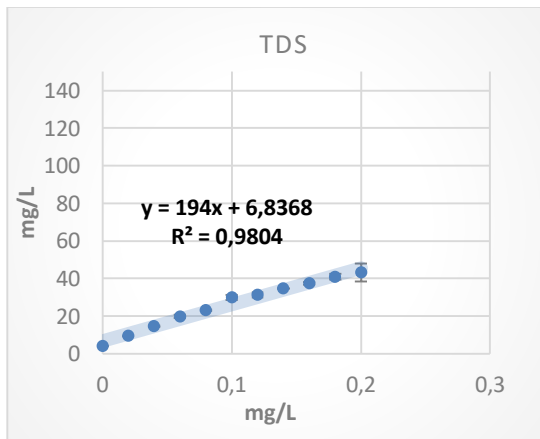
Na slikama od 8-16 prikazana je promjena električne vodljivosti u ovisnosti o promjeni koncentracije acetilsalicilne kiseline u uzorku. Vidljivo je da su električna vodljivost i koncentracija acetilsalicilne kiseline u proporcionalnom odnosu, odnosno povećanjem koncentracije acetilsalicilne kiseline raste električna vodljivost, i obrnuto. Također, vrijednost koeficijenta determinacije je za sve slučajeve visoka, pritom najveća kod S400 ($R^2=0,9941$), a najmanja kod uzorka AS500 ($R^2=0,9200$).



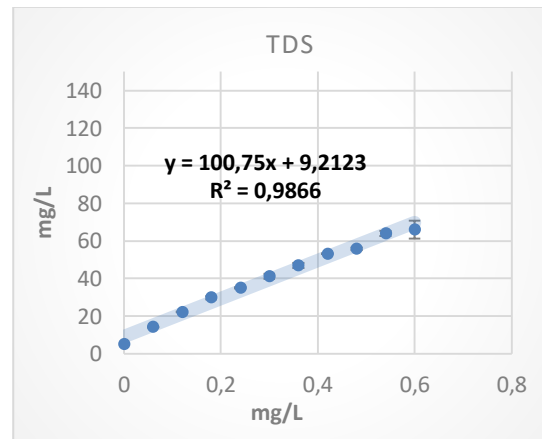
Slika 17. TDS u uzorku A75



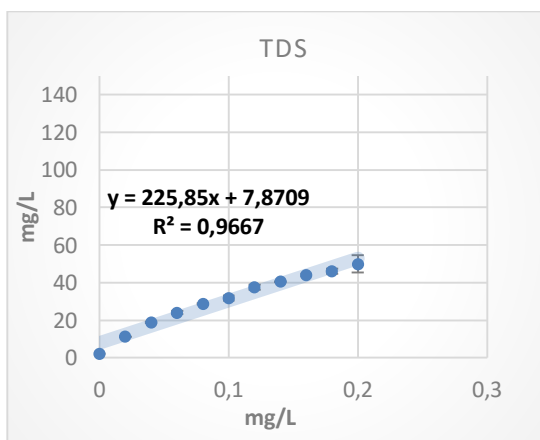
Slika 18. TDS u uzorku A100



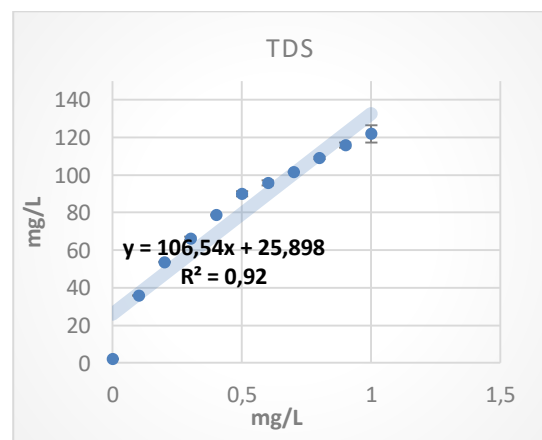
Slika 19. TDS u uzorku A100pro



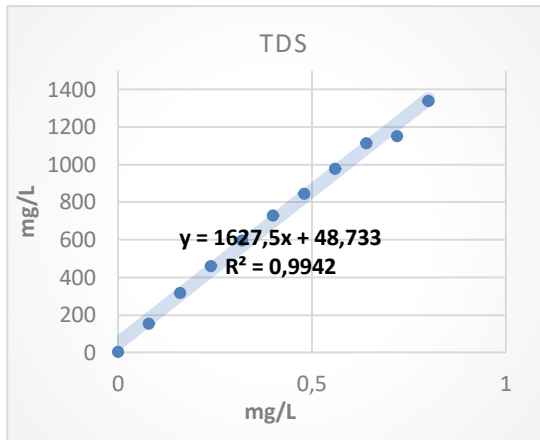
Slika 20. TDS u uzorku A300



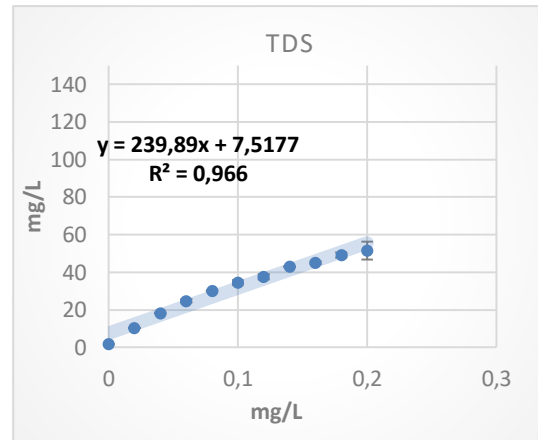
Slika 21. TDS u uzorku AS100



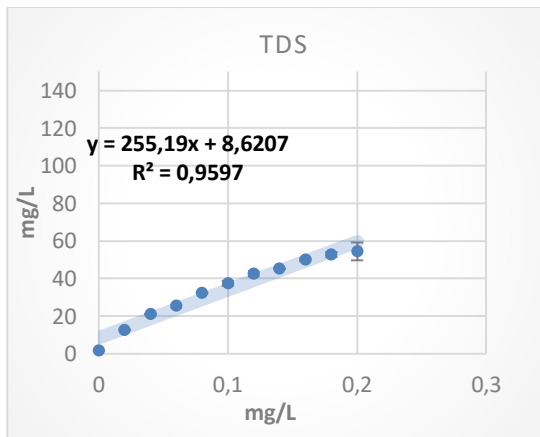
Slika 22. TDS u uzorku AS500



Slika 23. TDS u uzorku S400



Slika 24. TDS u uzorku ASK100



Slika 25. TDS u uzorku C100

Isti trend rezultata dobiva se i kod određivanja koncentracije ukupnih otopljenih čvrstih tvari. Povećanjem koncentracije acetilsalicilne kiseline u uzorku povećava se i koncentracija ukupnih otopljenih tvari. Možemo primijetiti da su rezultati pratili istu ovisnost kao i u slučaju mjerenja električne vodljivosti. Koeficijenti determinacije daju gotovo jednaku sliku o izmjerenim podacima, pa je i u ovom slučaju zavisnost vrlo visoka, što ima i smisla budući da se TDS i električna vodljivost često spominju zajedno zbog svoje velike povezanosti kada se radi o ovakvoj vrsti vodenih uzoraka. Vrijednost koeficijenta determinacije je pritom najveća kod uzorka A300 ($R^2=0,9866$), a najmanja kod uzorka AS500 ($R^2=0,92$).

4.3.2 Umjetne neuronske mreže

U tablicama 9. i 10. prikazani su rezultati učenja, testa i validacije modela umjetne neuronske mreže, korištene za predviđanja vrijednosti tri parametra u ovisnosti o uzorku tablete na temelju podataka dobivenih blisko-infracrvenom spektroskopijom. Kao ulazne varijable korišteno je prvih pet faktora dobivenih analizom glavnih komponenti koji su se pokazali odgovorni za 99,9% varijabilnosti u podacima. Cilj je bio saznati može li se ANN model uspješno koristiti za predviđanje vrijednosti promatranih parametara u odnosu na direktno mjerene podatke.

Tablica 9. Karakteristike modela odabranih umjetnih neuronskih mreža (ANN) razvijenih za predviđanje koncentracije aktivne tvari, TDS i električne vodljivosti

Uzorak	Karakteristika mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
A75	MLP 10-9-3	0,994851	0,001741	0,966406	0,010389	0,933807	0,016548	Tanh	Logistic
A100	MLP 10-10-3	0,992769	0,002514	0,992604	0,003088	0,974530	0,007889	Logistic	Tanh
A100pro	MLP 10-9-3	0,999097	0,000303	0,988675	0,006903	0,969180	0,008061	Exponential	Logistic
A300	MLP 10-9-3	0,995218	0,001498	0,964950	0,015931	0,936346	0,022218	Exponential	Exponential
AS100	MLP 10-7-3	0,982324	0,005455	0,967376	0,008243	0,957404	0,014766	Tanh	Tanh
AS500	MLP 10-9-3	0,983494	0,004524	0,983172	0,006109	0,992011	0,005314	Identity	Identity
C100	MLP 10-11-3	0,996332	0,001127	0,965338	0,012933	0,965980	0,013570	Tanh	Identity
ASK100	MLP 10-10-3	0,992617	0,002248	0,974029	0,007862	0,920444	0,019141	Exponential	Exponential
S400	MLP 10-6-3	0,997752	0,000725	0,988353	0,003236	0,980921	0,005775	Tanh	Logistic

Za svaki od devet uzoraka odabrana je najuspješnija umjetna neuronska mreža za predviđanje koncentracije aktivne tvari, električne vodljivosti i TDS-a te je prikazan u tablici 9. Za sve odabrane neuronske mreže korišten je omjer za učenje, test i validaciju 60:20:20, a broj neurona u skrivenom sloju varira od 4-13 neurona. Iz tablice 9. vidljivo je da su koeficijenti determinacije za učenje, test i validaciju, kod svih razvijenih modela, vrlo visoki i za sve uzorke veći od 0,90 što ovaj model čini vrlo preciznim.

Model se pokazao najuspješnijim za uzorak AS500 sa koeficijentom determinacije za učenje 0,9835, za test 0,9832 te za validaciju 0,9920. Također, kod tog uzorka su pogreške vrlo male pa su za učenje 0,0045, za test 0,0061, a za validaciju 0,0053. Dok se najlošijim, pokazao za uzorak ASK100 sa koeficijentom determinacije za učenje 0,9926, za test 0,9740, a za validaciju 0,9204. Dok su pogreške za učenje 0,0022, za test 0,0079 te za validaciju 0,0191.

Tablica 10. Rezultati predviđanja koncentracije aktivne tvari, električne vodljivosti i TDS-a u tekućim uzorcima tableta na temelju odabranih ANN iz tablice 9.

Uzorak	Trening (konc)	Test (konc)	Validacija (konc)	Trening uS/cm	Test uS/cm	Validacija uS/cm	Trening mg/mL	Test mg/mL	Validacija mg/mL
A75	0,994175	0,962381	0,938369	0,995215	0,967670	0,930662	0,995165	0,969167	0,932391
A100	0,991187	0,996083	0,971683	0,993269	0,989527	0,974353	0,993850	0,992203	0,977555
A100pro	0,998469	0,990954	0,962787	0,999420	0,987300	0,972583	0,999402	0,987773	0,972170
A300	0,996458	0,966558	0,937633	0,994775	0,963686	0,935183	0,994420	0,964607	0,936221
ASK100	0,992220	0,974816	0,926566	0,993140	0,973755	0,923042	0,992491	0,973516	0,911725
C100	0,995277	0,956838	0,958487	0,996825	0,969096	0,968430	0,996895	0,970079	0,971023
AS500	0,988795	0,977461	0,993557	0,980909	0,985530	0,991484	0,980779	0,986525	0,990992
AS100	0,981544	0,956279	0,957998	0,983073	0,973423	0,956362	0,982355	0,972425	0,957853
S100	0,998078	0,988451	0,982351	0,997578	0,988300	0,980468	0,997600	0,988309	0,979945

Sukladno gore navedenim zaključcima na temelju tablice 9., možemo vidjeti da su koeficijenti determinacije za test, validaciju i trening za predviđanje svakog od tri izlaznih parametara.

Pri tome vidimo da podaci iz tablice 10. potvrđuju gore izvedene zaključke te je i u slučaju predviđanja svakog od izlaznih parametara model najuspješniji za uzorak AS500 sa najvišim koeficijentima determinacije i za predviđanje koncentracije aktivne tvari, i za predviđanje vodljivosti i TDS-a. Dok je također, kao i u gornjem slučaju, model najneuspješniji kod uzorka ASK100 i kod predviđanja sva tri parametra zasebno.

5. Zaključak

1. Sirovi podaci dobiveni iz NIR spektra nisu bili dovoljni za donošenje valjanih zaključaka o promjenama u ovisnosti o koncentraciji aktivne tvari te se pristupilo dvjema kemometrijskim metodama – analizi glavnih komponenti (PCA) i umjetnim neuronskim mrežama (ANN)
2. U analizi glavnih komponenata, na osnovu prva tri faktora koji predstavljaju 99,9% vrijednosti varijance nije se uspjelo postići precizno grupiranje uzoraka te su dobiveni prikazi bili nepouzdana za donošenje zaključaka
3. Primjenom ANN modela pri čemu je ulazne varijable predstavljalo prvih deset faktora dobivenih PCA metodom dobiveni su najpouzdaniji rezultati za tablete, prahove i tekuće uzorke. Kod tableta i prahova dobiveni su precizni i pouzdani rezultati predviđanja koncentracije aktivne tvari i prepoznavanje uzorka, dok su kod tekućih uzoraka dobiveni precizni i pouzdani rezultati predviđanja koncentracije aktivne tvari, električne vodljivosti i koncentracije ukupno otopljenih čvrstih tvari u odnosu na stupanj razrjeđenja, odnosno koncentraciju aktivne tvari u razrijeđenim uzorcima
4. Kolorimetrijska metoda pokazala je slabo razdvajanje i prepoznavanje uzoraka, no nije dobiveno značajno grupiranje rezultata različitih tipova uzoraka tableta
5. Izravnim mjerenjem fizikalnih svojstava tekućih uzoraka (električna vodljivost i koncentracija ukupnih otopljenih čvrstih tvari u ovisnosti o koncentraciji aktivne tvari) dobivene su linearne ovisnosti, a vrijednosti koeficijenata determinacije bile su veće od 0,90

6 Literatura

- Abdi H., Williams L. J. (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* **2**(4): 433–459.
- Bhowmik D., Duraivel S., Rajalakshmi A., Sampath Kumar K. (2014) Tablet manufacturing process and defects of tablets, *Elixir international Journal* **70**: 24368-24374.
- Blanco M., Coello, J., Iturriaga H., MasPOCH S., de la Pezuela C. (1998) Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *The Analyst* **123**(8): 135–150.
- Dumančić S. (2014) Neuronske mreže. Diplomski rad. Osijek: Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku.
- Hills A. E. (2017) Spectroscopy in Biotechnology Research and Development. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 3 izd., Elsevier. str. 198–202.
- Jednačak T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kemija u industriji* **62**(3-4): 71-80.
- Kradjel C. (1991) An overview of Near Infrared spectroscopy: from an application's point of view. *Fresenius J Anal Chem* **339**: 65–67.
- Mathias, O. (2007) Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry, 3. izd., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. str. 2.
- Menezes J. C., Ferreira, A. P., Rodrigues L. O., Bras L. P., Alves T. P. (2009) Chemometrics Role within the PAT Context: Examples from Primary Pharmaceutical Manufacturing. *Comprehensive Chemometrics*, 4 izd., Elsevier. str. 313-355.
- Mihoci M. (2015) Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Kemija u industriji* **64**: 681-694.
- Otsuka M. (2020) Near-Infrared Spectroscopy Application to the Pharmaceutical Industry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–15.
- Pintarić D. (2013) Umjetne neuronske mreže i mogućnosti njihove primjene u obrazovanju. Diplomski rad. Osijek: Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku.
- Prajapati P., Solanki R., Modi V., Basuri T. (2016) A Brief Review on NIR Spectroscopy and its Pharmaceutical Applications. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis* **3**(3): 117-123.
- Sawyer M., Kumar V. (2003) A Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Quantitation of Aspirin, Salicylic Acid, and Caffeine in Effervescent Tablets. *Journal of Chromatographic Science* **41**(8): 393–397.

Sparks D.L. (1996) Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods. Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids. Sparks D. L., Page A. L., Helmke P.A., Loeppert R. H., Soltanpour P. N., Tabatabai M. A., Johnston C. T., Sumner M. E., ur., Soil Science Society of America, Inc., American Society of Agronomy, Inc. str. 417-435.

Ubhe T. S., Gedam P. (2020) A Brief Overview on Tablet and It's Types. *Journal of Advancement in Pharmacology* **1**(1): 21-31.

Varga I., Božić Luburić Đ., Solomun Kolanović B., Varenina I., Bilandžić N. (2018) Salicilna kiselina – lijek s različitim ljekovitim svojstvima. *VETERINARSKA STANICA* **49**(6): 413-422.

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

Weatherall I. L., Coombs B. D. (1992) Skin Color Measurements in Terms of CIELAB Color Space Values. *J Invest Dermatol.* **99**: 468-473.

Wold S., Sjöström M. (1998) Chemometric, present and future success, *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems* **44**: 3-14.