

Primjena NIR spektroskopije u određivanju aktivnih tvari u tabletiranim dodacima prehrani

Pavić, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:780888>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2019.

Anamarija Pavić

1175/BPI

**PRIMJENA NIR
SPEKTROSKOPIJE U
ODREĐIVANJU AKTIVNIH
TVARI U TABLETIRANIM
DODACIMA PREHRANI**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maje Benković, uz pomoć doc. dr. sc. Davora Valingera iz Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Benković na velikoj pomoći, uloženom vremenu i trudu te prenesenom znanju. Također bih se zahvalila doc. dr. sc. Davoru Valingeru na izrazitoj susretljivosti i pomoći prilikom provedbe eksperimentalnog dijela.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Kabinet za osnove inženjerstva
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIMJENA NIR SPEKTROSKOPIJE U ODREĐIVANJU AKTIVNIH TVARI U TABLETIRANIM DODACIMA PREHRANI

Anamarija Pavić, 1175/BPI

Sažetak: Vitamin C (askorbinska kiselina) je u vodi topljivi vitamin važan za održavanje bioloških funkcija u tijelu. Ljudi ga ne mogu sami sintetizirati pa ga je potrebno unositi kao dodatak prehrani. Najrašireniji oblik oralnih dodataka prehrani jest tableta zbog svoje lake primjene i brze apsorpcije. Cilj ovog rada bio je procijeniti sposobnost primjene blisko infracrvene spektroskopije (NIR), kemometrije i umjetnih neuronskih mreža (ANN) za predviđanje ukupnih aktivnih tvari u tabletiranim dodacima prehrani (vitamin C). Uzorci su pripremljeni s različitim koncentracijama laktoze i vitamina C. U radu su se izravnim metodama pratile promjene električne vodljivosti, ukupno otopljenih čvrstih tvari i pH u ovisnosti o koncentraciji laktoze i vitamina C u uzorcima otopina i tabletama. Koncentracija vitamina C određena je spektrofotometrijski pomoću dikromata i permanganata. Osim izravnog mjerenja, korištena je i blisko infracrvena spektroskopija kako bi se utvrdile sličnosti i razlike u uzorcima. Za obradu podataka dobivenih NIR spektroskopijom korištena je analiza glavnih komponenata (PCA analiza) koja je pokazala dobro razdvajanje na temelju koncentracije laktoze i vitamina C. Kako bi se ustanovila povezanost između podataka i koncentracije kreirani su PLS regresijski modeli koji su ustanovili linearnu ovisnost između apsorpcije i koncentracije vitamina C. Primjena ANN također je pokazala visoku pouzdanost i mogućnost primjene za predviđanje točne koncentracije vitamina C u tabletama.

Ključne riječi: vitamin C, kemometrija, blisko-infracrvena spektroskopija, umjetne neuronske mreže, tabletiranje

Rad sadrži: 45 stranica, 20 slika, 8 tablica, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Maja Benković

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Davor Valinger
2. Doc.dr.sc. Maja Benković
3. Izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević
4. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković (zamjena)

Datum obrane: 30. listopada 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Section for fundamental engineering
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

APPLICATION OF NIR SPECTROSCOPY FOR DETERMINATION OF ACTIVE SUBSTANCES IN TABLETED FOOD SUPPLEMENTS

Anamarija Pavić, 1175/BPI

Abstract: Vitamin C (ascorbic acid) is a water-soluble vitamin important for maintaining biological functions in the body. People cannot synthesize vitamin C, so it needs to be intake as a dietary supplement. The most widespread form of oral nutritional supplements is the tablet because of its easy use and rapid absorption. The aim of this paper was to evaluate the applicability of near infrared spectroscopy (NIR), chemometrics and artificial neural networks (ANN) to predict the content of active substances in dietary supplements (vitamin C). Samples were prepared with different concentrations of lactose and vitamin C. In the paper, changes in electrical conductivity, total dissolved solids and pH were monitored by direct methods, depending on the concentration of lactose and vitamin C in the solutions and tablets. Vitamin C concentration was also directly determined spectrophotometrically using dichromate and permanganate. In addition to direct measurement, near-infrared spectroscopy was also used to determine the similarities and differences in the samples. For the processing of the data obtained by NIR spectroscopy, principal component analysis (PCA analysis) was used, which showed good separation based on lactose and vitamin C concentration. To establish a relationship between data and concentration, PLS regression models were developed which established linear dependence between absorbance and concentration of vitamin C. The ANN also proved to be highly precise and reliable for prediction of vitamin C concentrations in tablets.

Keywords: vitamin C, chemometrics, near infrared spectroscopy, artificial neural networks, tableting

Thesis contains: 45 pages, 20 figures, 8 tables, 35 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Maja Benković, Assistant professor*

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

Reviewers:

1. PhD. *Davor Valinger, Assistant professor*
2. PhD. *Maja Benković, Assistant professor*
3. PhD. *Kristina Radošević, Associate professor*
4. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković, Full professor (substitute)*

Thesis defended: 30 October 2019

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ASKORBINSKA KISELINA (VITAMIN C)	2
2.1.1. Postupci dobivanja vitamina C	3
2.1.2. Uloga vitamina C u organizmu	3
2.1.3. Izvori vitamina C	5
2.2. TABLETE	5
2.2.1. Pomoćne tvari u izradi tableta.....	6
2.2.2. Tabletiranje	7
2.2.3. Parametri kakvoće tableta	10
2.3. METODE ZA DETEKCIJU AKTIVNIH TVARI TABLETA	11
2.3.1. NIR spektroskopija	11
2.3.2. Kemometrija	13
2.3.3. Umjetne neuronske mreže (ANN – artificial neural networks).....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Kemikalije.....	15
3.1.2. Laboratorijski pribor	15
3.1.3. Uređaji i software.....	15
3.2. METODE	16
3.2.1. Proizvodnja tableta.....	16
3.2.2. Priprema uzoraka	17
3.2.3. Analiza komprimata.....	19
3.2.4. Analiza podataka i modeliranje	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA.....	24
4.1.1. Debljina, promjer i masa.....	24
4.1.2. Električna vodljivost, TDS i pH vrijednost.....	25
4.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE VITAMINA C.....	28
4.3. PCA ANALIZA	29
4.4. PLS MODELI	31
4.5. UMJETNE NEURONSKE MREŽE.....	36
5. ZAKLJUČAK.....	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Užurbani način života i nepravilna prehrana u posljednjih nekoliko godina dovele su do globalnog pada imuniteta ljudske populacije. Jedan od vitamina važnih za održavanje imuniteta zasigurno je vitamin C (askorbinska kiselina). Iako većina sisavaca proizvodi vitamin C iz glukoze u jetri, ljudi ga ne mogu sami sintetizirati, stoga se često koristi u obliku dodataka prehrani. Dosadašnja istraživanja ustvrdila su da vitamin C igra važnu ulogu u prevenciji i liječenju bolesti poput raka, kardiovaskularnih bolesti i prehlade upravo zbog svog antioksidacijskog djelovanja.

Vitamin C moguće je unositi hranom ili dodacima prehrani koji se nalaze u praškastom obliku ili u obliku tableta. Tablete su danas najzastupljeniji oblik oralnih dodataka prehrani zbog svoje lake primjene i brze apsorpcije. Mnogobrojni su postupci i uređaji za izradu tableta, ovisno o željenom obliku i svojstvima. Izuzetno je važno pratiti parametre kakvoće tableta kako bi ona zadržala funkcionalnost tijekom proizvodnje, primjene i skladištenja.

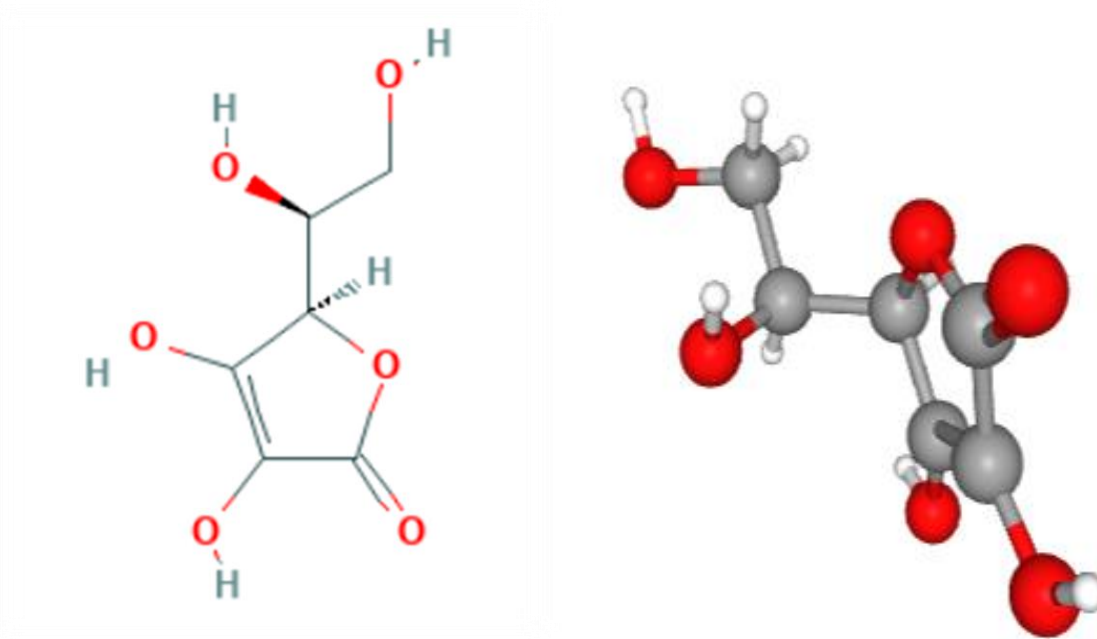
Do danas su razvijene mnogobrojne metode za predviđanje svojstava i ukupnih aktivnih tvari u tabletiranim dodacima prehrani, a na taj način se mogu detektirati i lažni lijekovi. Međutim, te metode su skupe, vremenski dugotrajne te, uz današnji trend zaštite okoliša, ekološki neprihvatljive. Stoga je posljednjih godina sve više primjenjivana neinvazivna metoda NIR spektroskopije koja daje točne i brze rezultate analize sastava pojedinih komponenti. Snimanjem NIR spektara dobiva se velika količina podataka koje je potrebno obraditi koristeći matematičke modele i kemometriju.

U radu su praćene fizikalne promjene (električna vodljivost, TDS, pH) u ovisnosti o koncentraciji vitamina C i punila u tabletama te je procijenjena prikladnost blisko infracrvene spektroskopije (engl. near infrared spectroscopy, NIR) kao brze i nedestruktivne metode za praćenje koncentracije aktivne tvari (vitamina C) u tabletama. Snimljeni NIR spektri podvrgnuti su analizi glavnih komponenata (engl. Principal Components Analysis, PCA) te su primjenom parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata (engl. partial least squares, PLS) i umjetnih neuronskih mreža (engl. artificial neural network, ANN) razvijeni modeli za predviđanje ukupnih aktivnih tvari u tabletiranim dodacima prehrani (vitamin C).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ASKORBINSKA KISELINA (VITAMIN C)

L-askorbinska kiselina (vitamin C) je L-enantiomer askorbinske kiseline i konjugirane kiseline L-askorbata. Enolni izomer je preferiran u odnosu na keto-izomer zbog mogućnosti da tvori vodikove veze u petočlanom prstenu. Prirodni je vitamin topljiv u vodi te snažno antioksidacijsko sredstvo koje djeluje u borbi protiv bakterijskih infekcija neutralizirajući slobodne radikale prije nego što oštete molekulu DNA i tako potaknu pojavu karcinoma (Anonymous 4, 2017). Čovjek ne može sam proizvesti niti skladištiti vitamin C, već ga uzima kao dodatak prehrani u obliku dodataka prehrani ili kroz hranu. Molekulska formula askorbinske kiseline je $C_6H_8O_6$ (IUPAC naziv 1,4-lakton 2-keto-L-gulonska kiselina), a molarna masa $176,12 \text{ g mol}^{-1}$. Struktura je prikazana na slici 1.



Slika 1. 2D (lijevo) i 3D (desno) struktura L-askorbinske kiseline (Anonymous 1, 2018)

2.1.1. Postupci dobivanja vitamina C

Velik broj živih bića u stanju je sintetizirati vlastiti vitamin C, međutim ljudske stanice ne mogu provesti ključni posljednji korak biosinteze vitamina C, pretvorbu L-gulono- γ -laktone u askorbinsku kiselinu, koju katalizira enzim gulonolakton oksidaza budući da je taj enzim, iako prisutan u ljudi, zapravo neaktivan zbog nakupljanja nekoliko mutacija koje su ga pretvorile u nefunkcionalni pseudogen (Nishikimi i Yagi, 1991). Trenutno se većina komercijalno proizvedene L-askorbinske kiseline sintetizira Reichstein postupkom koristeći D-glukozu kao polazni materijal. Reichstein proces uključuje šest kemijskih koraka i jedan stupanj fermentacije za oksidaciju D-sorbitola u L-sorbozu, a ukupni prinos proizvoda je oko 50% (Pappenberger i Hohmann, 2014).

U novije vrijeme, askorbinska kiselina proizvodi se rekombinantnom DNA tehnologijom. Trenutno postoji šest procesa fermentacije bakterija za proizvodnju 2-keto-L-gulonske kiseline, izravnog prekursora L-askorbinske kiseline (Pappenberger i Hohmann, 2014). Najznačajniji putevi su oksidacija D-sorbitola ili L-sorboze u 2-keto-L-gulonsku kiselinu (2-KLG) preko intermedijarnog L-sorbozona (sorbitolski put) i oksidacija D-glukoze u 2-keto-L-gulonat preko D-glukonske kiseline, 2-keto-D-glukonske kiseline i 2,5 diketo-D-glukonske kiseline (put 2-keto-D-glukonske kiseline). Transformaciju provodi nekoliko sojeva rodova *Pseudomonas* i *Acetobacter*. Neki znanstvenici opisali su metodu za efikasnu proizvodnju L-askorbinske kiseline u algama. Metoda uključuje početni rast *Chlorella pyrenoidosa* u fermentoru s kontinuiranim dovodom izvora ugljika što rezultira proizvodnjom 1,45 g L⁻¹ L-askorbinske kiseline (Survase i sur., 2006).

2.1.2. Uloga vitamina C u organizmu

Organizmu je vitamin C neophodan za sintezu kolagena (vitalna uloga u zacjeljivanju rana), L-karnitina i određenih neurotransmitera, povećava imunitet potičući aktivnost bijelih krvnih zrnaca i povećavajući razinu interferona, odgovor antitijela i lučenje hormona timusa. Također, vitamin C pomaže apsorpciju željeza, a samim time i formiranje crvenih krvnih stanica, pretvara folnu kiselinu u njen aktivni oblik, djeluje kao antihistaminik te na taj način može pomoći u olakšavanju simptoma alergija. Koristi se za sprječavanje bolesti poput skorbuta te također smanjuje rizik od karcinoma (u želucu ili dvanaesniku sprječava formiranje štetnih prooksidansa u želučanom soku) i kardiovaskularnih bolesti smanjujući oksidaciju LDL („lošeg“) kolesterola (Yasaei, 2019).

U raznim pokusima provedenim na sisavcima utvrđena su njegova neuroprotektivna, antikonvulzivna i antidepresivna svojstva čak i u milimolarnim koncentracijama. Mozak je posebno osjetljiv na oksidativna oštećenja zbog brojnih mitohondrija te velike potrebe za kisikom. Neka istraživanja pokazala su nedostatak askorbata kod bolesnika s neuropsihičkim bolestima te veliki potencijal vitamina C u liječenju depresije. Istraživanja se još provode s pacijentima koji boluju od Alzheimerove ili Parkinsonove bolesti te epileptičnih poremećaja. Vitamin C štiti organizam od oksidativnog stresa tako što predstavlja glavno citosolno sredstvo za smanjivanje molekulske mase u područjima mozga bogatih neuronima, poput hipokampusa i neokorteksa. Također smanjuje stvaranje proteinskih agregata koji su uključeni u patogenezu različitih neurodegenerativnih bolesti (Bonnet, 2019).

Ljudskom tijelu treba mala količina vitamina C za biološke funkcije, a nedostatak ili višak štetno utječe na ljudsko tijelo. Preporučene dnevne doze vitamina C prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Preporučene dnevne doze vitamina C (Anonymous 2, 2018)

STAROST	MUŠKARCI	ŽENE	TRUDNOĆA	DOJENJE
0-6 mjeseci	40 mg	40 mg		
7-12 mjeseci	50 mg	50 mg		
1-3 godine	15 mg	15 mg		
4-8 godina	25 mg	25 mg		
9-13 godina	45 mg	45 mg		
14-18 godina	75 mg	65 mg	80 mg	115 mg
19+ godina	90 mg	75 mg	85 mg	120 mg
pušači	pušačima je potrebno 35 mg/dan više vitamina C od nepušača			

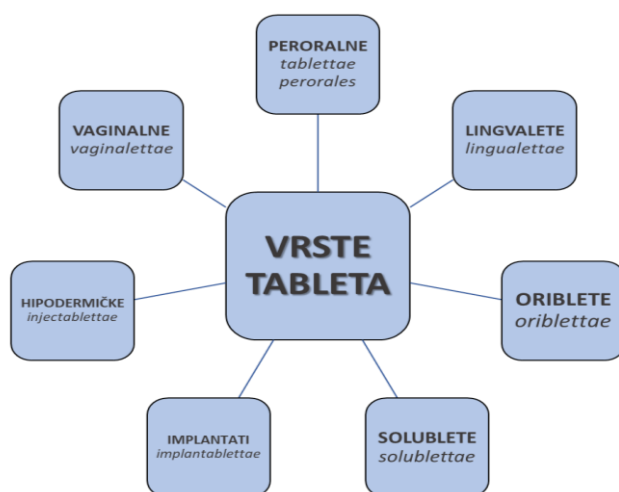
Nedostatak vitamina C na organizam djeluje u obliku umora, krvarenja desni, lakog zadobivanja modrica, depresije, krvarenja iz nosa, anemije, skorbuta. Simptomi trovanja vitaminom C uključuju glavobolju, pojačano mokrenje, grčeve u donjem dijelu trbuha, proljev, povraćanje, vrtoglavicu, drhtavicu (Anonymous 4, 2017). Neki lijekovi, poput aspirina, tetraciklinskih antibiotika ili oralne kontracepcije, također mogu uzrokovati nedostatak vitamina C. Visoka razina vitamina C (mmol) održava se u stanicama i tkivima, a najviša je u leukocitima (bijelim krvnim stanicama), očima, nadbubrežnoj žlijezdi, hipofizi i mozgu. Relativno niske razine vitamina C (μmol) nalaze se u izvanstaničnim tekućinama poput plazme, crvenih krvnih zrnaca i sline (Anonymous 2, 2018).

2.1.3. Izvori vitamina C

Namirnice bogate vitaminom C su citrusno voće (naranča, limun), krumpir, kelj, brokula, jagode, ananas, rajčica. Dodaci prehrani obično sadrže vitamin C u obliku askorbinske kiseline koja ima jednaku bioraspoloživost kao što je prirodna askorbinska kiselina u hrani. Ostali oblici vitamina C uključuju natrijev askorbat, kalcijev askorbat, askorbinska kiselina s bioflavonoidima i kombinirane proizvode poput Ester-C® koji sadrži kalcijev askorbat, dehidroaskorbat, kalcijev treonat, ksilonat i liksonat (Anonymous 2, 2018).

2.2. TABLETE

Tablete su dozirani komprimirani pripravci u obliku okruglih, elipsoidnih, valjkastih i četvrtastih pločica, ravnih ili ispupčenih površina, oštih ili zaobljenih bridova (Senjković, 1994) koji se sastoje od jednog ili više aktivnih farmaceutskih sastojaka (API) i neaktivnih sastojaka (pomoćne tvari). Tablete se danas primjenjuju kao najčešći oblik oralne primjene lijekova upravo zbog svojih višestrukih prednosti kao što su točnost doziranja, fizička i mikrobiološka stabilnost, dugotrajnost te kemijska stabilnost. Tableta može biti sastavljena od i) samo djelatne tvari, ii) samo pomoćne tvari, iii) djelatne tvari i pomoćne tvari. Tableta izrađena od samo djelatne tvari nije primjenjiva jer su obično potrebne miligramske količine djelatne tvari, zbog čega je nemoguća izrada i primjena tablete. Tablete sastavljene od samo pomoćne tvari su takozvane placebo tablete specificirane za klinička istraživanja. Najpoželjnija je tableta sastavljena od djelatne tvari (*remedium*), koja je nositelj terapijskog djelovanja, i pomoćnih tvari (*excipientia*), koje su nositelji fizičkih osobina te omogućavaju postizanje željenih svojstva tablete (Gretić, 2015). Na slici 2 prikazana je podjela tableta u sedam skupina prema načinu primjene.



Slika 2. Podjela tableta prema primjeni (Senjković, 1994)

2.2.1. Pomoćne tvari u izradi tableta

Pomoćne tvari su neutralna sredstva koja se dodaju u lijekovite supstancije prilikom komprimiranja kako bi pridonijela određenim fizičkim karakteristikama tableta (Senjković, 1994). Pomoću njih je moguće oblikovati tabletu i dodati joj željena fizička svojstva poput postojanosti, bioraspoloživosti i prihvatljivosti za bolesnika. Pomoćne tvari mogu činiti više od 90 % ukupne mase tableta te je važno da su kompatibilne s djelatnom tvari, mikrobiološki ispravne, stabilne, probavljive te fiziološki i kemijski neutralne (Gretić, 2015). Pomoćne tvari mogu biti (Senjković, 1994):

Sredstva za dopunjavanje – povećavaju masu tablete koja sadrži malu količinu lijekovite supstancije jakog djelovanja. Neka od sredstava koja se koriste su laktoza, saharoza, šećerni alkoholi (sorbitol, manitol), škrobni polisaharidi (kukuruzni, pšenični, krumpirov, rižin), celuloza, natrijev klorid te dikalcij-fosfat dihidrat.

Vezivna sredstva – povezuju lijekovite supstancije i sredstva za dopunjavanje u veće aglomerate te na taj način poboljšavaju kompresibilnost. Biraju se ovisno o vrsti lijekovite supstancije, a najčešće se koriste makromolekule prirodnog, polusintetskog ili sintetskog podrijetla u obliku vodenih ili alkoholnih otopina (šećeri, škrobni lijepak, želatina, celuloza akacija, tragant, polivinilpirolidon, itd.).

Dezintegratori – olakšavanju raspadanje tableta u vodi tako što povećavaju kapilarnost i pospješuju adsorpciju vode što dovodi do bubrenja te na taj način povećavaju brzinu otapanja tableta. Najčešće primjenjivana sredstva su modificirani škrob, natrij-karboksimetil celuloza, sintetički polimeri poput umreženog polivinilpirolidona te kopolimera umrežene metakrilne kiseline i divinil benzena (Quodbach i sur., 2013).

Sredstva za klizenje – hidrofobne tvari koje poboljšavaju protjecanje granulata tijekom tabletiranja, te također služe kao lubrikanti smanjujući trenje između granulata i dodirnih površina uređaja za tabletiranje i kao antikohezivi. Najdjelotvornija sredstva netopiva u vodi su magnezij-stearat, stearinska kiselina, talk, hidratantna biljna ulja te topivi natrijev klorid, natrijev benzoat, natrijev acetat, boratna kiselina.

Boje – mogu biti prirodne i sintetske te topive i netopive, pigmenti i boje-lakovi. Dodaju se radi estetike te olakšavaju nadzor tijekom proizvodnje.

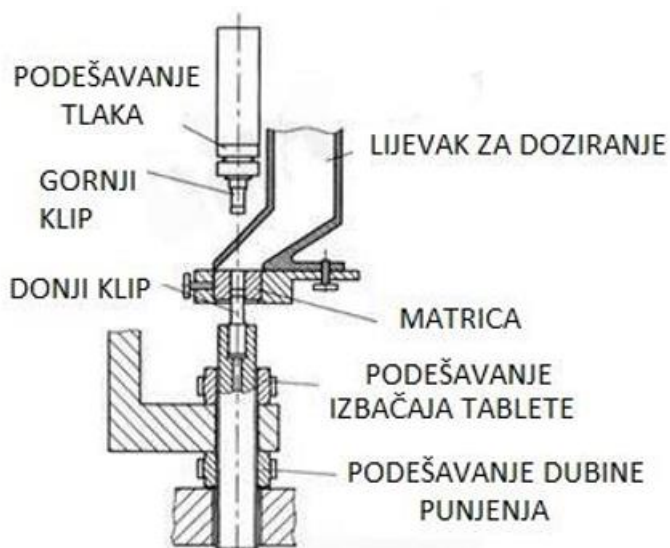
Korigensi okusa – dodaju se u tablete kako bi neutralizirali slatki okus nekih pomoćnih sastojaka te zamaskirali neželjeni okus tablete (saharin, ciklambat, heksaminska kiselina, eterična ulja).

Adsorbensi – vežu tekuće ljekovite sastojke tableta na sebe, a najčešće primjenjivani su škrob, silicijev dioksid, magnezijev karbonat, magnezijev oksid te ostali.

Ovlaživači – glicerol i sorbitol dodaju se previše suhim smjesama za tabletiranje, a hidrofilizatori olakšavaju prodiranje vode u pore što olakšava raspadanje tablete (silicijev dioksid).

2.2.2. Tabletiranje

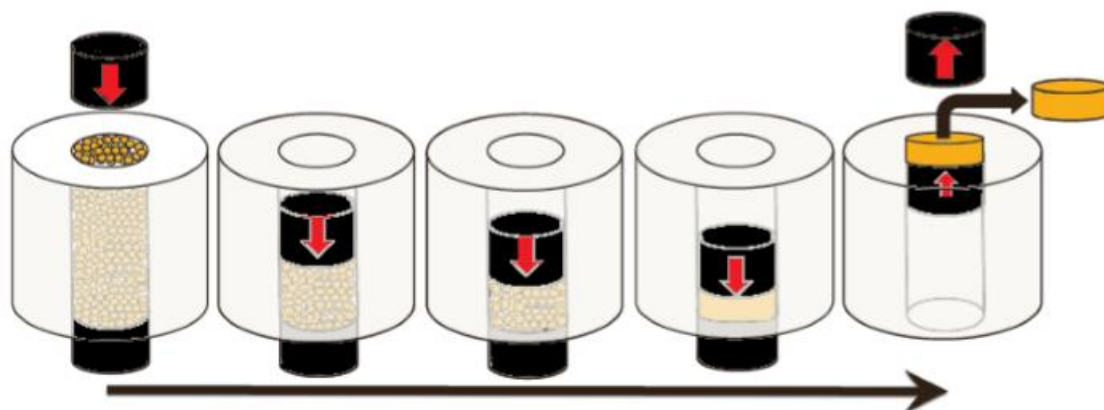
Tabletiranje (komprimiranje) je postupak aglomeracije usitnjenih krutina ljekovitih sastojaka tablete i pomoćnih tvari primjenom tlaka (Senjković, 1994). Tablete se izrađuju pomoću uređaja za tabletiranje – tabletirke u kojoj ukupni tlak djeluje na sastojke određeno vrijeme te se jednolično razdjeljuje po površini dajući joj oblik i potrebnu čvrstoću. Ukupni tlak sastoji se od primarnog (jednolično razdjeljuje mješavinu za punjenje matrice), sekundarnog (oblikuje punjenje i istiskuje zrak) i tercijarnog tlaka (daje oblik i potrebnu tvrdoću tablete) (Gretić, 2015). Sve tabletirke imaju matricu i dva klipa, gornji i donji, kao što je prikazano na slici 3. Matrica je čelični disk sa cilindričnim otvorom čiji promjer odgovara promjeru proizvedene tablete. Dodirna površina klipa može biti ravna, udubljena, ispupčena, sa ugraviranim natpisom i sa ispupčenim prorezom koji tabletu dijeli na dva ili četiri dijela.



Slika 3. Shematski prikazana ekscentrična tabletirka (Gretić, 2015)

Postoje dva tipa tabletirki: ekscentrične i rotacijske. Kod ekscentričnih matrica miruje, a lijevak za punjenje smjese se pokreće pri čemu smjesu komprimira samo gornji žig. U rotacijskima se disk s velikim brojem matrica pokreće, dok lijevak miruje. Smjesu komprimiraju dva nepokretna žiga pri čemu se tlak ravnomjerno prenosi preko gornjeg i donjeg klipa te se tako dobivaju čvršće tablete. Sam postupak sastoji se od nekoliko koraka (slika 4):

- i. granulat iz lijevka istječe u matricu u kojoj se nalazi žig koji će dati željenu masu tablete
- ii. lijevak se premješta te se gornji žig spušta u matricu i zbija smjesu između žigova
- iii. gornji žig se povlači, a donji podiže izbacujući tabletu na vrh matrice te ju izbacuje u spremnik
- iv. donji žig se spušta te je tabletirka spremna za prvu fazu tabletiranja



Slika 4. Tijek izrade tableta (Mahmoodi, 2012)

Postoje dva načina izrade tableta: suhi postupak u koji se ubrajaju i) direktno komprimiranje, ii) kontinuirano direktno komprimiranje i iii) suha granulacija; te vlažni postupak u koji se ubrajaju i) vlažna granulacija, ii) kontinuirana vlažna granulacija i iii) granulacija vrtloženjem. Direktno komprimiranje najbrža je i najčešće primjenjivana metoda proizvodnje tableta. Nedostatak ove metode je da ulazni materijal mora biti nepromjenjivih svojstava inače dolazi do lijepljenja mješavine praha za žigove što rezultira velikim gubitcima. Takav način koristi se za izradu tableta koje sadrže ljekovite supstancije osjetljive na vlagu i visoke temperature.

Kontinuirano direktno komprimiranje uključuje regulaciju masenog protoka čime se smanjuje mogućnost lijepljenja za žigove. Suha granulacija započinje tako da se sastojci tablete komprimiraju pod visokim tlakom te se dobije kompaktna smjesa praškastog materijala u obliku velike tablete (2 cm). Briketi se melju i prosijavaju da bi se dobili granulati koji su čvršći i manje porozni od onih dobivenih vlažnim postupcima. Briketiranje se ponavlja kako bi se dobile granule odgovarajućih osobina. Kod briketiranja nepotrebno je dodavanje otopine veziva i sušenje granulata. Provodi se u uređajima u kojima se prašak zbija između dva valjka, a nakon postupka pločasti čvrsti kompakti se drobe, prosijavaju i tabletiraju. Uz to, suhi postupci su ekonomičniji te se njima sprječava gubitak aktivnosti djelatne tvari osjetljive na vlagu i toplinu (Chattoraj i sur., 2018).

Vlažnim granuliranjem sprječava se neujednačenost doziranja, raslojavanje tableta i kalanje površine tableta te se smanjuje količina zraka jer su čestice praška prostorno zbijene dodatkom otopine veziva. Postupak vlažnog granuliranja sastoji se od miješanja praškastih sastojaka, pripreme otopine veziva, ovlaživanja prašaka, gnječenja, protiskivanja ovlažene smjese kroz sitne otvore, sušenja dobivenog granulata i njegove regranulacije. Veliki broj faza, nedostatak je ovakvog načina proizvodnje tableta, ali prednost je što vlažni granulirani materijali imaju manju sklonost lijepljenju. Postupak kontinuirane vlažne granulacije zasada je u testnoj fazi, a glavna prednost bit će skraćeno vrijeme u odnosu na šaržnu vlažnu granulaciju (Chattoraj i sur., 2018).

Granulacija vrtloženjem ubrzani je oblik vlažne granulacije te se postupkom fluidizacije istovremeno zbiva više tehnoloških operacija poput miješanja, vlaženja, aglomeracije i sušenja. Prednost ovakve vrste granuliranja je mogućnost pravilne raspodjele djelatne tvari i smanjeni gubitak sastojaka. Miješanjem se praškasti sastojci pravilno razdjeljuju, vlaženjem dolazi do aglomeracije i povećanja čestica do željene veličine. Pri sušenju u vrtložnom sloju svaka čestica prima toplinu, a osušeni je produkt homogen zbog istodobnog miješanja. Prskanjem otopine veziva, čestice se gomilaju u agregate te zbijaju u granule. Lagane granule dolaze u doticaj s fino raspršenim vezivom, a one povećane mase padaju na dno gdje se nalazi fino sito te se vezivo za granuliranje uvodi kroz sapnice (Gretić, 2015).

Uz navedena dva osnovna načina proizvodnje tableta, postoje i alternativne metode formulacije kao što su vruća granulacija i sušenje raspršivanjem. Međutim, one su još u razvoju, a pretpostavlja se da će ovim formulacijama biti moguće identificiranje razine lijepljenja uzorka (Chattoraji sur., 2018).

2.2.3. Parametri kakvoće tableta

Pravovremena karakterizacija i praćenje svojstava tableta poput promjera, debljine, mase i čvrstoće preduvjet su za kvalitetan lijek. Također je potrebno pratiti ujednačenost ljevovite supstancije te razgradnju, otapanje i otpuštanje lijeka nakon primjene (Gretić, 2015). Svaka utvrđena nepravilnost, ne samo da utječe na funkcionalnost lijeka, već će odgoditi njegovo odobrenje i izlazak na tržište, a u slučaju naknadnih nepravilnosti, proizvod je moguće povući s tržišta, što je veliki ekonomski gubitak. Navedena fizikalno-mehanička svojstva tableta analiziraju se i prate klasičnim farmakopejskim i nefarmakopejskim metodama. Danas su dostupne nove tehnike neinvazivne karakterizacije fizikalno-mehaničkih svojstava tableta, a neke od njih su: bliska infracrvena spektroskopija, Ramanska spektroskopija, rendgenska mikrotomografija, nuklearno magnetska rezonanca (NMR), lasersko inducirana raspadljiva spektroskopija te razne akustične i termičke tehnike (Vivek i sur., 2017).

Promjer i debljina tableta

Svaka tableta mora biti jednoličnog oblika, veličine i boje, glatke površine i neoštećenih rubova. Promjer tablete ovisan je o njevoj masi. Debljina tablete varira ovisno o gustoći granulata i primijenjenom tlaku pri komprimiranju (Gretić, 2015).

Čvrstoća

Čvrstoća tablete bitna je kako bi tableta zadržala formu tijekom proizvodnje, pakiranja, transporta i primjene. Uređaji za određivanje tvrdoće rade na principu mjerenja sile u trenutku loma tablete. Dijametrijsko ispitivanje tvrdoće tableta provodi se postavljanjem tablete okomito na njenu zaobljenu stranu (okrugle tablete) ili duž najduže duljine (ovalne tablete) na platformi. Tableta se zatim drobi pomoću cilindrične sonde koja se kreće konstantnom brzinom (Vivek i sur., 2017).

Rastrošljivost

Rastrošljivost se ispituje podvrgavanjem tablete ravnomjernoj rotaciji u bubnju kroz određeno vrijeme pri čemu nastaje trenje među tabletama te između stjenke samog uređaja i tableta, što rezultira lomljenjem tableta u određenoj ravnini, a rezultati se izražavaju kao postotak gubitka mase tablete (Gretić, 2015).

Raspadljivost

Raspadljivost tablete na osnovne sastojke ispituje se u uređajima sastavljenima od staklenih cijevi sa sitima od nehrđajućeg čelika, plastičnih diskova za umetanje u cijevi, posude za uronjavanje u cijevi i mehanizma za pokretanje stalka s cijevima (Senjković, 1994).

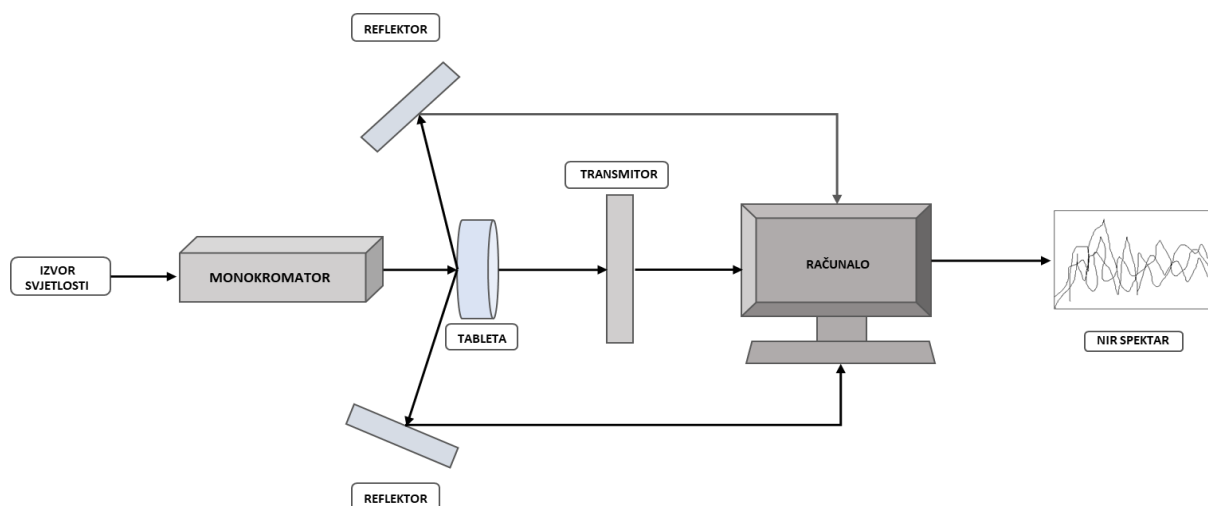
Oslobađanje ljekovite supstancije

Otapanje čvrstih čestica u molekularno disperzno stanje bez raspadanja ljekovite supstancije te njihove apsorpcije u tijelo ispituje se u zatvorenim i otvorenim sustavima miješanjem u tekućini za ispitivanje simulirajući fiziološke uvjete (pH, temperaturu, broj okretaja). Pogodnim analitičkim postupkom pojedinačno se određuje sadržaj djelatne tvari u 10 slučajno odabranih tableta (Gretić, 2015).

2.3. METODE ZA DETEKCIJU AKTIVNIH TVARI TABLETA

2.3.1. NIR spektroskopija

Kako bi se osigurao razvoj proizvoda i kontrola kvalitete, blisko infracrvena (NIR) spektroskopija postala je prihvaćena metoda za kvalitativne i kvantitativne analize aktivnih tvari (Vivek i sur., 2017). Analize NIR spektara mogu se provesti pomoću matematičkih modela i multivarijatne analize (kemometrija). NIR spektroskopija temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja na valnim duljinama u rasponu od 780 do 2500 nm (Anonymous 3, 2018). Kvalitativne i kvantitativne informacije koje nastaju posljedica su interakcije elektromagnetskih valova u blizini infracrvenog spektra sa sastavnicama uzorka. NIR analizatori sastoje se od izvora zračenja, monokromatora, reflektora, detektora, transmitora i računala. Rade na principu prolaska izvora svjetlosti kroz monokromator koji propušta samo svjetlost odabrane valne duljine te ona djeluje uzajamno s uzorkom. Detektor mjeri propusnost (količina svjetlosti koja prolazi kroz uzorak) i apsorbanciju (količina svjetlosti koju apsorbira uzorak). Svjetlost koja prolazi kroz uzorak detektira se i pretvara pomoću transmitora u informacije koje se očitavaju na računalu te se rezultati ispisuju u obliku NIR spektara (slika 5).



Slika 5. Osnovni princip rada NIR spektrometra (Vivek i sur., 2017)

NIR spektri sastoje se od velikog broja podataka te ih je potrebno sustavno obraditi razvojem modela potpomognutim kemometrijom, odnosno potrebno je razviti kalibracijske modele koji koriste velike skupove podataka i validaciju razvijenih modela kako bi se spektri pouzdano koristili za kvalitativno i kvantitativno ispitivanje materijala (Vivek i sur., 2017). NIR je neinvazivna brza metoda, koja ne zahtijeva gotovo nikakvu pripremu uzorka. Također omogućuje istovremeno mjerenje i određivanje fizikalnih i kemijskih parametara i može se primijeniti za širok raspon uzoraka. Uz to, NIR spada među najbrže analitičke tehnike gdje skeniranje tableta na NIR instrumentu traje do nekoliko sekundi (Vivek i sur., 2017). Rukovanje NIR instrumentima zahtjeva minimalni trening i nadzor.

Uz ove prednosti, NIR je suočen s nekoliko izazova poput niske osjetljivosti, velikog odaziva šuma i dugotrajne obrade podataka nakon skeniranja. NIR spektri pokazuju fizička i kemijska svojstva cjelokupnog uzorka, a ne pojedinačnih komponentata. Nadalje, sve moguće varijable moraju se uzeti u obzir kako bi se razvio čvrst kalibracijski model. Svaka promjena u sustavu ili pojava nepoznate varijable utječe na pouzdanost modela (Vivek i sur., 2017).

Razvojem tehnologije, napredovala je i NIR metoda analize. Tako su konvencionalni NIR spektri s jednom točkom zamijenjeni NIR snimanjem prilikom čega se stvara trodimenzionalni skup podataka gdje su prostorne informacije i spektralni podaci analiziranog uzorka prikazani na tri osi (Vivek i sur., 2017). Podaci se pojavljuju u obliku kemijske karte koja prikazuje površinu uzorka te se može upotrijebiti u otkrivanju fizičkih i funkcionalnih svojstava uzorka, npr. koncentracija lijeka ili postojanje nečistoća i vlage. NIR slike pogodnije su od NIR spektara jer nije potrebna kalibracija u kvantitativnoj analizi, određuju fizičku i kemijsku homogenost uzorka te omogućuju prikupljanje podataka iz više uzoraka paralelno.

NIR je danas široko rasprostranjena tehnika u analizi fizikalnih, kemijskih i funkcionalnih svojstava tableta kao što su razlikovanje tableta različitih koncentracija aktivnih tvari, predviđanje jačine loma tableta pri različitim silama i predviđanje brzine otapanja karbamazepina u tabletama (Vivek i sur., 2017). Također koriste se za procjenu homogenosti sastava tableta i otkrivanje oštećenja tableta.

2.3.2. Kemometrija

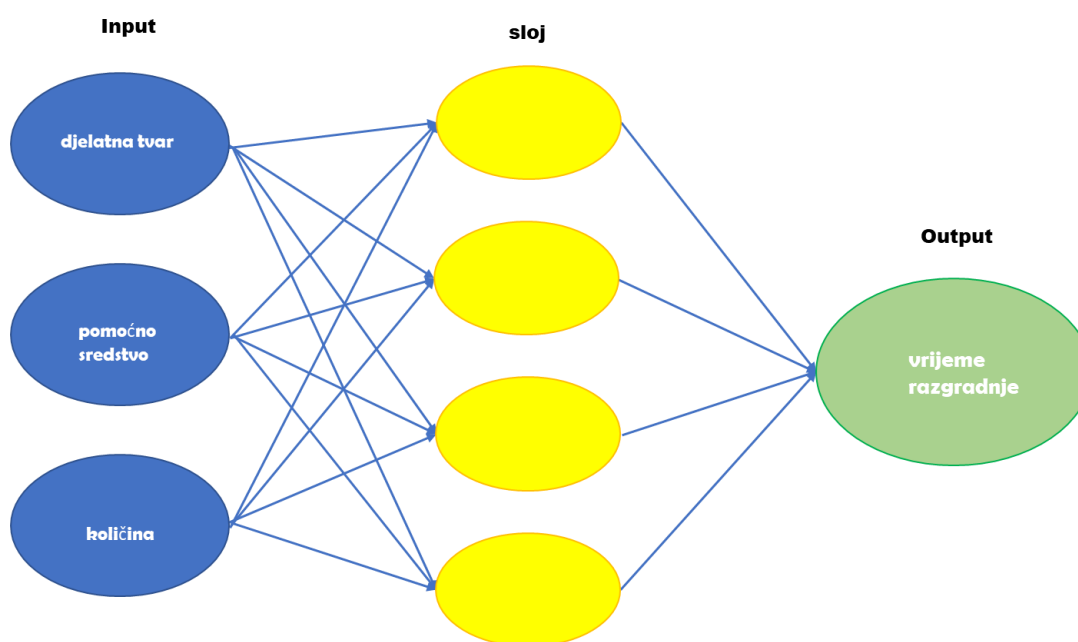
Kemometrija je kombinacija matematičkih, statističkih i drugih logičkih pristupa koja se koristi za učinkovito upravljanje i tumačenje izvedenih podataka (Haswell, 1992). Kemometrija koristi različite multivarijatne tehnike, kao što su regresija glavnih komponenti (PCR) i parcijalni najmanji kvadrati (PLS), kako bi se izgradili modeli s korištenjem referentnih kemijskih podataka dobivenih drugim analitičkim tehnikama. Međutim, u slučaju visoke nelinearnosti, navedene tehnike dovode do značajnih pogrešaka.

PCA (Principal component analysis) je kemometrijska metoda multivarijantnog modeliranja i analize tabličnih podataka koji sadrže međusobno zavisne varijable. PCA izabire najvažnije podatke te ih uzima kao nove varijable (glavne komponente) prikazujući na grafu sličnosti i razlike među uzorcima u obliku točkica (Bendelja i sur., 2018). Vizualizacija podataka pomoću različitih sustava za ucrtavanje moguća je kada je izmjereno više od tri varijable (Kamal-Eldin, 1997). PCA kvantificira interakcije varijabli izračunavanjem matrice korelacija za cijelu bazu podataka. Matrica korelacija se faktorizira u dvije matrice pomoću matematičkog alata za vlastitu analizu (Prusac, 2019). Na taj način dobivaju se međusobno neovisne osi (glavne komponente) koje opisuju skup podataka. To su linearne kombinacije izvornih varijabli koje proizlaze iz prirodnih asocijacija među varijablama (Jurina i sur., 2018).

Djelomična regresija najmanjih kvadrata (PLS regresijski model - Partial least squares regression) je metoda modeliranja koja se temelji na višestrukoj regresiji i analizi glavne komponente za upotrebu u kemometriji (Bendelja i sur., 2018). Upotrebljava se za predviđanje skupa zavisnih varijabli (X) iz skupa nezavisnih varijabli (prediktori, Y) (Jurina i sur., 2018). Na temelju izračunatog koeficijenta determinacije procijenjena je ispravnost PLS regresije (R^2) za kalibraciju i validaciju modela i srednja vrijednost korijena kvadratne vrijednosti pogreške (RMSE) (Bendelja i sur., 2018).

2.3.3. Umjetne neuronske mreže (ANN – artificial neural networks)

Umjetne neuronske mreže su samoprilagodljivi i masivno paralelni sustavi strojnog učenja sastavljeni od slojeva procesnih elemenata (neurona), a koriste se za rješavanje problema prepoznavanja uzoraka izgradnjom nelinearnih modela koji se koriste za predviđanje obrazaca koji nisu od prije poznati (Han i sur., 2018). Struktura i funkcija ANN nadahnuti su organizacijom i funkcijom ljudskog mozga (Zheng, 2011). Podgrupa elementa obrade naziva se sloj u mreži. Prvi sloj čine ulazni podaci (*input*), a posljednji sloj čine izlazni podaci (*output*) između kojih mogu postojati dodatni (skriveni) slojevi (slika 6).



Slika 6. Struktura neuronske mreže (Han i sur., 2018)

Neuronska mreža može se trenirati za izvršavanje određenih funkcija. Sve umjetne neuronske mreže podijeljene su u dvije kategorije, ovisno o načinu na koji uče: i) učenje pod nadzorom i ii) učenje bez nadzora. U nadzornom učenju mreža je obučena tako da dobiva *input*-e i *output*-e prilagođavajući težinu veze na način da se njen *output* podudara sa stvarnim *outputom* u iterativnom procesu dok se ne postigne željeni rezultat. Učenje bez nadzora osigurano je samo s *input*-ima, bez poznatih odgovora (Amato i sur., 2013). Mreža mora razviti vlastitu reprezentaciju ulaznih podražaja grupiranjem ulaznih podataka i pronalaženjem obilježja svojstvenih problema. U farmaceutskoj industriji, ANN se danas često koriste za predviđanje loma i raspada tableta (Akseli i sur., 2016).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- vitamin C (dm-drogerie markt GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- laktoza (dm-drogerie markt GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- škrob (Fisher Scientific U.K. Limited, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- destilirana voda
- kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$) (Fisher Scientific U.K. Limited, Loughborough, UK)
- sumporna kiselina (H_2SO_4) (CARLO ERBA Reagents S.A.S, Barcelona, Španjolska)
- kalijev permanganat ($KMnO_4$) (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Laboratorijski pribor

- staklene čaše volumena: 100, 200, 1500 mL
- staklene pipete volumena: 1, 5, 10 mL
- stakleni lijevak
- stakleni štapić
- odmjerne tikvice volumena: 25, 50, 100, 200 mL
- menzura volumena 1000 mL
- plastične kivete volumena 3 mL za spektroskopiju
- staklene epruvete
- špatula
- eksikator

3.1.3. Uređaji i software

- NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm Control Development inc., South Bend, Indiana, SAD) s pripadajućim softwareom Spec32 (Control Development inc., South Bend, Indiana, SAD)
- magnetna mješalica (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- vorteks (BiosanVortex V1 Puls, Riga, Latvija)
- analitička vaga (Sartorius TE214-SOCE, Göttingen, Njemačka)
- tabletirka - laboratorijska izvedba

- pH-metar (Jenco 601A, Schaumburg, SAD)
- konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Küssnacht, Švicarska)
- pomično mjerilo
- spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)
- Statistica v.10.0 (StatSoft, Tulsa, SAD)
- The Unscrambler® X 10.4 (CAMO software, Oslo, Norveška)

3.2. METODE

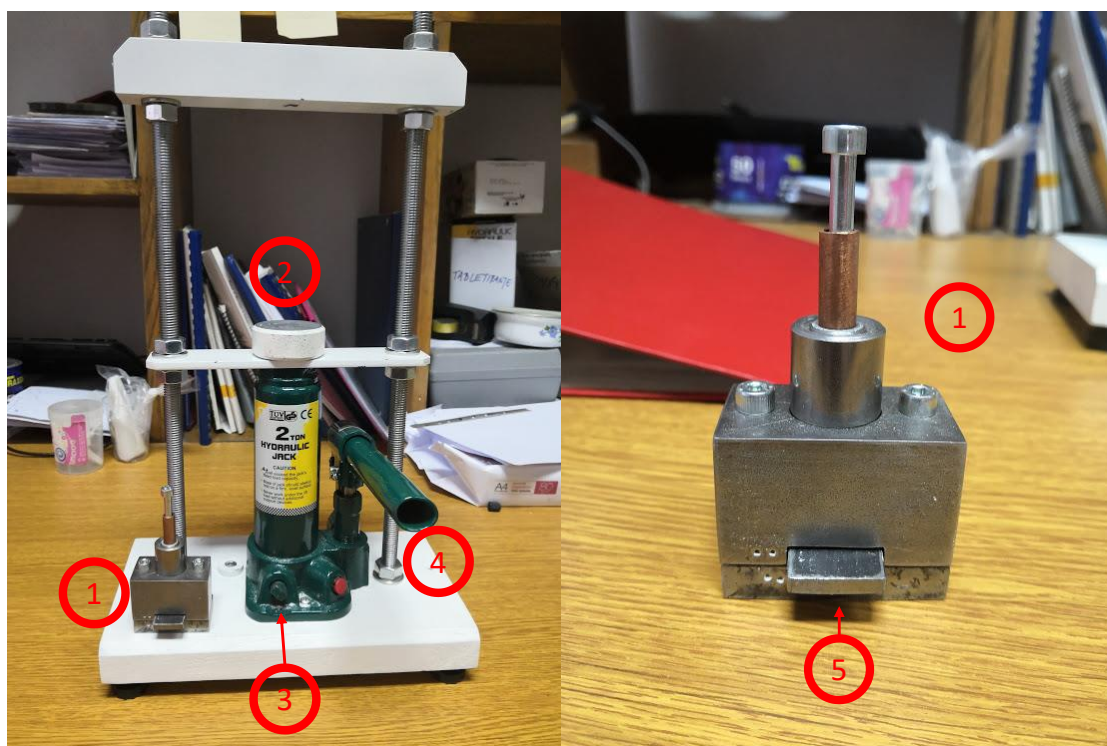
3.2.1. Proizvodnja tableta

Proizvodnja tableta provodi se pomoću ručne tabletirke domaće izrade. Tablete se izrađuju prema prethodno provedenom pokusu optimiranja, kojim je dobiveno da je optimalan sastav i količina punila koja se koristi u proizvodnji tableta vitamina C: promjer tablete 8 mm i ukupna masa tablete 0,4 g (podaci nisu prikazani u ovom radu). Količina aktivne tvari za suho komprimiranje ograničena je na 30 % ukupne mase tablete. Prilikom formulacije tableta izračun se provodi s obzirom na aktivnu tvar, dok se količina pomoćne tvari prilagođava ovisno o izračunatoj masi aktivne tvari. Oznake i sastav proizvedenih tableta prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Sastav tableta

OZNAKA TABLETE	Preporučeni dnevni unos [%]	VITAMIN C [g]	LAKTOZA [g]	ŠKROB [g]
1	150,0	0,120	0,26	0,02
2	137,5	0,110	0,27	0,02
3	120,0	0,100	0,28	0,02
4	112,5	0,090	0,29	0,02
5	100,0	0,080	0,30	0,02
6	87,5	0,070	0,31	0,02
7	75,0	0,060	0,32	0,02
8	62,5	0,050	0,33	0,02
9	50,0	0,040	0,34	0,02
10	37,5	0,030	0,35	0,02
11	25,0	0,020	0,36	0,02
12	12,5	0,010	0,37	0,02
13	0,0	0	0,38	0,02

Najprije je potrebno na analitičkoj vagi (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka) izvagati sve potrebne praškaste sastojke (vitamin C, laktoza, škrob). Odvagana i dobro homogenizirana praškasta mješavina (0,4 g) ubaci se u tabletirku kućne izrade (slika 7) koja se sastoji od: kalupa (1) promjera 8 mm i postavi na bazu uređaja za tabletiranje (2). Ventil za regulaciju tlaka na hidrauličkom cilindru tijekom tabletiranja mora biti zatvoren (3). Tabletiranje se provodi pomoću poluge (4) koja se ručno pomiče sve dok se ne ostvari komprimiranje smjese tj. dok se ne postigne zadana sila pritiska hidrauličkog cilindra od 2 tone. Nakon završetka komprimiranja otvara se ventil na hidrauličkom cilindru (3) čime se omogućuje sniženje tlaka u cilindru i otpuštanje tablete iz kalupa. Za uklanjanje tablete iz kalupa potrebno je izvući podložnu pločicu (5) iz ležišta kalupa. Svaka tableta proizvodi se 6 puta.



Slika 7. Tabletirka: 1) kalup, 2) baza, 3) ventil za regulaciju tlaka, 4) poluga, 5) pločica za otpuštanje tableta (vlastita fotografija)

3.2.2. Priprema uzoraka

Priprema vodenih otopina laktoze za kalibraciju

Različite mase laktoze (dm-drogerie markt GmbH, Karlsruhe, Njemačka) prikazane u tablici 3 izvagane su na analitičkoj vagi (Sartorius TE214-S0CE, Göttingen, Njemačka) i otopljene u 900 mL destilirane vode te je otopina podvrgnuta miješanju na magnetnoj mješalici (Heidolph

Instruments, Schwabach, Njemačka) pri 250 rpm. Tako pripremljenim uzorcima mjerena su pH, vodljivost i TDS.

Priprema vodenih otopina vitamina C za kalibraciju

Različite koncentracije vitamina C (dm-drogerie markt GmbH, Karlsruhe, Njemačka) prikazane u tablici 3 također su izvagane i otopljene u 900 mL destilirane vode te je otopina podvrgnuta miješanju na magnetnoj mješalici (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka) pri 250 rpm. Tako pripremljenim uzorcima mjerena su pH, vodljivost i TDS na istom principu kao i kod laktoze.

Tablica 3. Prikaz odvaga vitamina C i laktoze korištenih u otopinama za kalibraciju

oznaka tablete	masa vitamina C u prahu [g]	masa laktoze [g]
1	0,120	0,26
2	0,110	0,27
3	0,100	0,28
4	0,090	0,29
5	0,080	0,30
6	0,070	0,31
7	0,060	0,32
8	0,050	0,33
9	0,040	0,34
10	0,030	0,35
11	0,020	0,36
12	0,010	0,37
13	0,000	0,38

Priprema otopina tableta za analizu

Uzorci za analize pripremaju se otapanjem 1 tablete u 900 mL destilirane vode u staklenoj čaši volumena 1,5 L. Tako pripremljena otopina ostavi se 2 minute na magnetnoj mješalici (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka) pri 250 rpm da se homogenizira te se svježa otopina koristi za daljnje analize.

3.2.3. Analiza komprimata

Masa, promjer, debljina

Nakon komprimiranja, tabletama se određuju debljina i promjer pomoću pomične mjerke te masa pomoću analitičke vage (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka).

NIR spektroskopija

Kontinuirani NIR spektri kalibracijskih otopina laktoze i vitamina C, te pripremljenih otopina tableta snimaju se u rasponu valnih duljina $\lambda = 904 - 1699$ nm primjenom NIR spektrometra (NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm Control Development inc., South Bend, Indiana, SAD) povezanog s računalom. Promjena apsorbancije pri valnim duljinama od $\lambda = 904 - 1699$ nm analizira se primjenom programskog paketa Control Development Spec 32 (Control Development inc., South Bend, Indiana, SAD). Prilikom mjerenja koristi se kvarcna kiveta od 3 mL i nastavak za tekuće uzorke. Svaka se otopina snima u tri paralele.

pH vrijednost

pH vrijednost otopina određuje pomoću pH-metra (Jenco 601A, Schaumburg, SAD) direktnim uranjanjem pH sonde u svježe pripremljene otopine. Prije mjerenja potrebno je izbaždariti pH metar standardnim otopinama pH=4 i pH=7. Provode se tri paralelna mjerenja.

TDS i vodljivost

Električna vodljivost i udio otopljenih čvrstih tvari (TDS) određuju se pomoću konduktometra (SevenCompact, MettlerToledo, Küsnacht, Švicarska) uranjanjem sonde u svježe pripremljenu otopinu. Svaki uzorak se mjerio u tri paralele.

Spektrofotometrijsko određivanje vitamina C pomoću kalijevog dikromata ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) u kiselom mediju

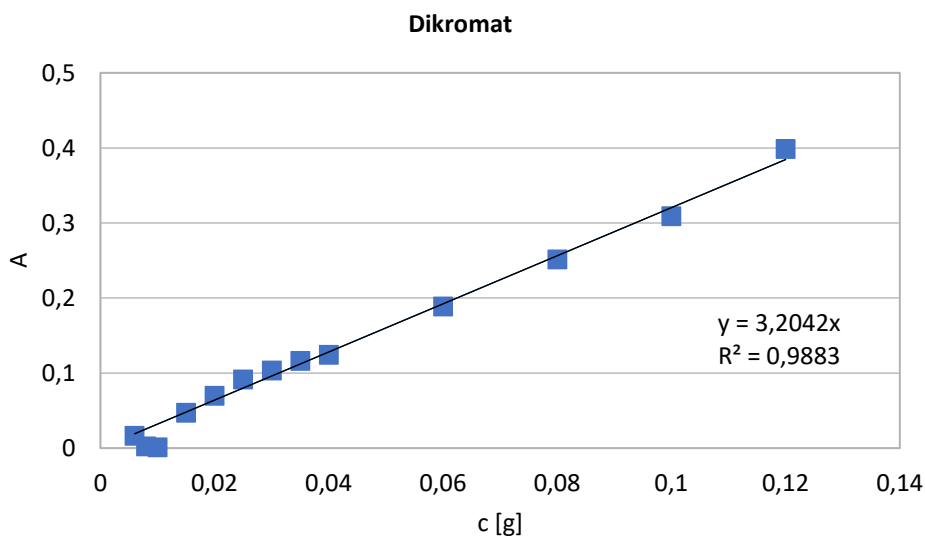
Metoda se temelji na reakciji vitamina C sa kalijevim dikromatom u kiselom mediju pri čemu dolazi do smanjenja absorbance pri 350 nm zbog promjene boje otopine kalijevog dikromata. Standardne otopine vitamina C pripremaju se u koncentracijama 0,002 do 0,040 g L⁻¹, otapanjem odgovarajuće količine vitamina C u destiliranoj vodi. Otopina $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (500 ppm) priprema se otapanjem 0,05 g kristalnog kalijevog dikromata u 0,1 M otopini H_2SO_4 u

odmjerneju tikvici do ukupnog volumena 100 mL. U staklenu epruvetu otpipetira se 10 mL otopine askorbinske kiseline i 10 mL otopine $K_2Cr_2O_7$. Mješavina se vorteksira i odmah nakon miješanja izmjeri se apsorbancija otopine pri 325 nm na spektrofotometru (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska). Slijepa proba priprema se miješanjem 10 mL destilirane vode sa 10 mL otopine $K_2Cr_2O_7$ i očitavanjem apsorbancije pri 350 nm.

Vitamin C reagira sa $K_2Cr_2O_7$ pri čemu dolazi do smanjenja A_{350} s obzirom na koncentraciju vitamina C. Smanjenje A_{350} (ΔA) definirano je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta A = A_{sp} - A_{uzorak} \quad [1]$$

Gdje je ΔA promjena apsorbancije pri 350 nm, A_{sp} je apsorbancija slijepe probe, a A_{uzorak} je izmjerena apsorbancija uzorka nakon reakcije sa vitaminom C. Baždarni dijagram crta se kao ovisnost koncentracije vitamina C (x-os) i ΔA pri 350 nm (y-os) prikazano na slici 8.



Slika 8. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji vitamina C određeno spektrofotometrijskom metodom pomoću kalijevog dikromata

Dobivena je jednadžba baždarnog pravca koja glasi:

$$y = 3,2042 x \quad [2]$$

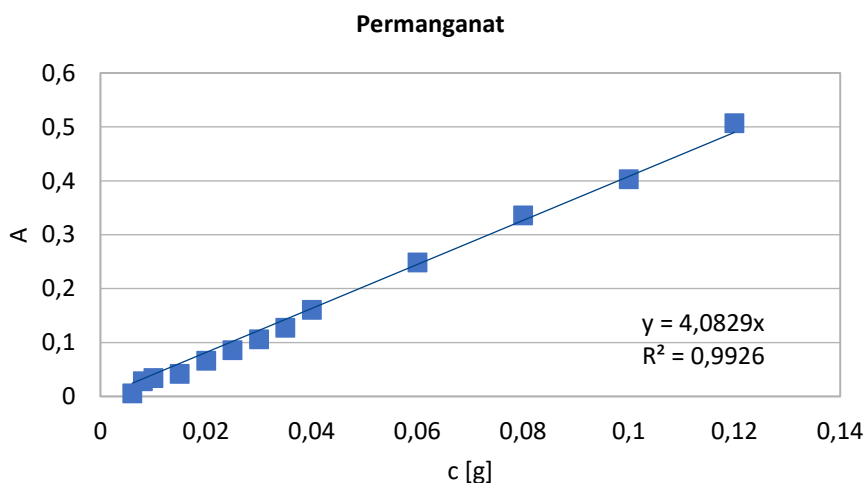
Spektrofotometrijsko određivanje vitamina C pomoću kalijevog permanganata (KMnO₄) u kiselom mediju

Metoda se temelji na reakciji vitamina C sa kalijevim permanganatom u kiselom mediju pri čemu dolazi do smanjenja absorbance pri 525 nm zbog promjene boje otopine kalijevog permanganata.



Standardne otopine vitamina C pripremaju se u koncentracijama 0,001 do 0,020 g L⁻¹, otapanjem odgovarajuće količine vitamina C (dm-drogerie markt GmbH, Karlsruhe, Njemačka) u destiliranoj vodi. Otopina KMnO₄ (100 ppm) priprema se otapanjem 0,01 g kristalnog kalijevog permanganata (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u 0,1 M otopini H₂SO₄ (CARLO ERBA Reagents S.A.S, Barcelona, Španjolska) u odmjerne tikvici do ukupnog volumena 100 mL. U staklenu epruvetu otpipetira se 10 mL otopine askorbinske kiseline i 10 mL otopine KMnO₄. Mješavina se vorteksira (BiosanVortex V1 Pus, Latvija) i odmah nakon miješanja izmjeri se apsorbancija otopine pri 525 nm na spektrofotometru (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska). Slijepa proba priprema se miješanjem 10 mL destilirane vode sa 10 mL otopine KMnO₄ i očitavanjem absorbancije pri 525 nm.

Vitamin C reagira sa KMnO₄ pri čemu dolazi do smanjenja A₅₂₅ s obzirom na koncentraciju vitamina C. Smanjenje A₅₂₅ (ΔA) definirano je također prema jednadžbi [1] gdje je ΔA promjena absorbancije pri 525 nm, A_{sp} je absorbancija slijepe probe, a A_{uzorak} je izmjerena absorbancija uzorka nakon reakcije sa vitaminom C. Baždarni dijagram crta se kao ovisnost koncentracije vitamina C (x-os) i ΔA pri 525 nm (y-os) prikazano na slici 9.



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji vitamina C određeno spektrofotometrijskom metodom pomoću kalijevg permanganata

Dobivena je jednadžba baždarnog pravca koja glasi:

$$y = 4,0829 x \quad [4]$$

3.2.4. Analiza podataka i modeliranje

NIR – spektroskopija

Za snimanje uzoraka korišten je NIR-128-1.7USB/6.25/50 μm skenirajući monokromator (Control Development, South Bend, Indiana, SAD) s instaliranim pripadajućim softwareom Spec32 (Control Development, South Bend, Indiana, SAD) u rasponu valnih duljina od 904 do 1699 nm Svaki uzorak je prethodno dobro homogeniziran na vorteksu (BiosanVortex V1 Puls, Riga, Latvija) te je sniman u plastičnoj kiveti od 3 mL. Pripremljene kivete postavljane su na postolje s poklopcem u svrhu sprječavanja utjecaja vanjskog izvora svjetla. Svaki uzorak snimljen je 3 puta. Podaci su pohranjeni kao .xls datoteke u softwareu Microsoft Office Excel te su kasnije korišteni za obradu podataka PCA metodom.

Analiza glavnih komponenata (PCA)

Analiza glavnih komponenti (PCA) korištena je za identificiranje uzoraka i naglašavanje sličnosti i razlika u podacima pojedinog skupa eksperimenata. Cilj PCA je izvući važne informacije iz podatkovne tablice i izraziti tu informaciju kao skup novih ortogonalnih varijabli koje nazivamo glavnim komponentama ili čimbenicima. Sirovi spektri korišteni su za provođenje analize glavnih komponenti (PCA) pomoću softvera Unscrambler® X 10.4 (software CAMO, Norveška). Da bi se predvidjela ukupna količina aktivnih tvari u vitaminu C na temelju NIR spektara, primijenjena je parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS). PLS predviđanje postiže se ekstrakcijom skupa ortogonalnih faktora koji se nazivaju latentne varijable koje imaju najbolju prediktivnu snagu prediktora.

PLS modeli

Modeli parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) razvijeni su iz rezultata analize glavnih komponenti (PCA) NIR spektara vodenih otopina vitamina C, laktoze i proizvedenih tableta. PLS regresijsko modeliranje provedeno je na sirovim NIR spektrima korištenjem softvera Unscrambler® X 10.4, software (CAMO software, Norway).

Prikladnost PLS modela za predviđanje fizikalnih i kemijskih karakteristika otopina vitamina C, laktoze i pripremljenih tableta procijenjena je temeljem vrijednosti koeficijenta determinacije, standardne pogreške i srednje kvadratne pogreške (Root Mean Square Error – RMSE). Kao ulazni parametri koristili su se rezultati pH, TDS, vodljivosti i NIR spektara te je pomoću njih predviđena koncentracija laktoze i vitamina C u otopinama tableta.

Umjetne neuronske mreže

Na temelju NIR spektara, razvijene su i umjetne neuronske mreže (ANN) za predviđanje sastava tableta. Razvijene su višeslojne perceptronske mreže u softwreu Statistica v.10.0 (StatSoft, Tulsa, USA) koje su sadržavale 4-11 neurona u skrivenom sloju. Na temelju PLS analize odabrano je prvih 10 najprikladnijih PCA faktora i korišteni su kao ulazne varijable za ANN. Razvoj umjetne neuronske mreže (ANN) proveden je s odvajanjem podataka u trening, test i validaciju u 4 različita omjera (60:20:20, 50:30:20, 70:20:10 i 70:15:15) od kojih se omjer 70:20:10 pokazao kao najprikladniji. Optimalne neuronske mreže odabrane su na temelju linearnog koeficijenta korelacije (R^2) i vrijednosti srednje kvadratne pogreške (RMSE). Vrijednosti R^2 trebale su biti što je moguće bliže 1. Dakle, dobar model bi imao R^2 vrijednosti iznad 0,90. Vrijednosti između 0,70 i 0,90 ukazuju na to da se modeli mogu smatrati prilično preciznima, a vrijednosti ispod 0,70 ukazuju na to da se model može koristiti za kvalitativno razlikovanje bez mogućnosti korištenja u kvantitativnom predviđanju. Pomoću ANN predviđena je koncentracija laktoze i vitamina C u otopinama temeljem mjerenja pH, TDS, vodljivosti i faktora PCA analize.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA

4.1.1. Debljina, promjer i masa

Mješavine laktoze, škroba i vitamina C podvrgnute su procesu tabletiranja. Sve su mješavine tabletirane pomoću ručne tabletirke domaće izrade kako bi se dobile tablete promjera 8 mm i ukupne mase 0,4 g. Gotove tablete podvrgnute su standardnim ispitivanjima fizikalnih svojstava kako bi se ustvrdila njihova ujednačenost i odstupanja koja bi mogla utjecati na funkcionalnost tablete. Ispitivanje je provedeno na uzorku od 13 tableta različitog sastava (tablica 3) u tri paralele te su debljina, promjer i masa izražene kao srednje vrijednost svih mjerenja uz pripadne standardne devijacije. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Fizikalna svojstva tableta. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=3$) \pm standardna devijacija.

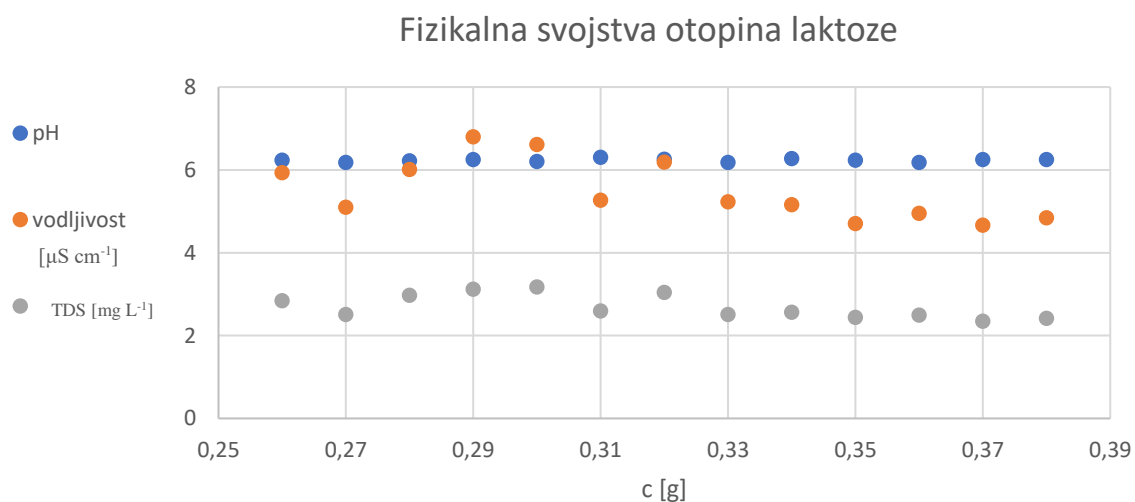
TABLETA	DEBLJINA [cm]	PROMJER [cm]	MASA [g]
1	$0,584 \pm 0,0073$	$0,802 \pm 0,0035$	$0,384 \pm 0,0026$
2	$0,606 \pm 0,0073$	$0,809 \pm 0,0035$	$0,383 \pm 0,0026$
3	$0,600 \pm 0,0073$	$0,808 \pm 0,0035$	$0,382 \pm 0,0026$
4	$0,600 \pm 0,0073$	$0,800 \pm 0,0035$	$0,385 \pm 0,0026$
5	$0,599 \pm 0,0073$	$0,805 \pm 0,0035$	$0,386 \pm 0,0026$
6	$0,605 \pm 0,0073$	$0,807 \pm 0,0035$	$0,387 \pm 0,0026$
7	$0,610 \pm 0,0073$	$0,808 \pm 0,0035$	$0,386 \pm 0,0026$
8	$0,604 \pm 0,0073$	$0,801 \pm 0,0035$	$0,388 \pm 0,0026$
9	$0,605 \pm 0,0073$	$0,803 \pm 0,0035$	$0,390 \pm 0,0026$
10	$0,591 \pm 0,0073$	$0,800 \pm 0,0035$	$0,385 \pm 0,0026$
11	$0,602 \pm 0,0073$	$0,801 \pm 0,0035$	$0,390 \pm 0,0026$
12	$0,611 \pm 0,0073$	$0,807 \pm 0,0035$	$0,386 \pm 0,0026$
13	$0,600 \pm 0,0073$	$0,801 \pm 0,0035$	$0,389 \pm 0,0026$

Iz rezultata prikazanih u tablici 4 vidljivo je da srednje vrijednosti promjera tableta ne variraju značajno te se kreću u rasponu od 0,800 – 0,809 cm. Promjer tablete definiran je kalupom tabletirke. Debljina tablete varira u rasponu od 0,584 – 0,611 cm. Veća odstupanja u debljini tablete pripisuju se jačini komprimiranja i primijenjenom tlaku. Kao najznačajniji kriterij

odabrano je odstupanje u masi tableta zbog činjenice da će masa tablete značajno utjecati na doziranje djelatne tvari. Najveća odstupanja uočena su upravo kod mase tableta koje se kreću u rasponu od 0,382 – 0,390 g. Ni u jednom slučaju nije postignuta željena masa od 0,4 g zbog lijepljenja praha za žig prilikom čega se gubi dio mješavine. Na temelju vrijednosti promjera, debljine i mase tableta pojedinih mješavina, izračunate su standardne devijacije uz pomoć kojih je odabrana najbolje izrađena tableta na tabletirki kućne izvedbe. Debljina tablete, bez obzira na masu tablete, može varirati zbog razlika u gustoći granulata i uporabljenog tlaka pri komprimiranju. Iz tablice 4 je vidljivo da su najbliže zadanim kriterijima debljine bile tablete T3, T4 i T13, dok su zadanom promjeru najbliže bile tablete T4, T10 i T13. Promjer tablete uvjetovan je njihovom masom. Najmanji gubitci mase tableta bili su kod T9, T11 i T13. Prema literaturnim podacima, odstupanje od zadanog promjera, debljine i mase tablete nastaje zbog lijepljenja i zaostajanja dijela praha na žigu ili stjenkama kalupa tabletirke, što je bilo slučaj i u ovom istraživanju (Senjković, 1994).

4.1.2. Električna vodljivost, TDS i pH vrijednost

Na slici 10 prikazani su rezultati mjerenja električne vodljivosti, koncentracije ukupnih otopljenih čvrstih tvari (TDS) i pH vrijednost provedeni na uzorcima s otopljenom laktozom.

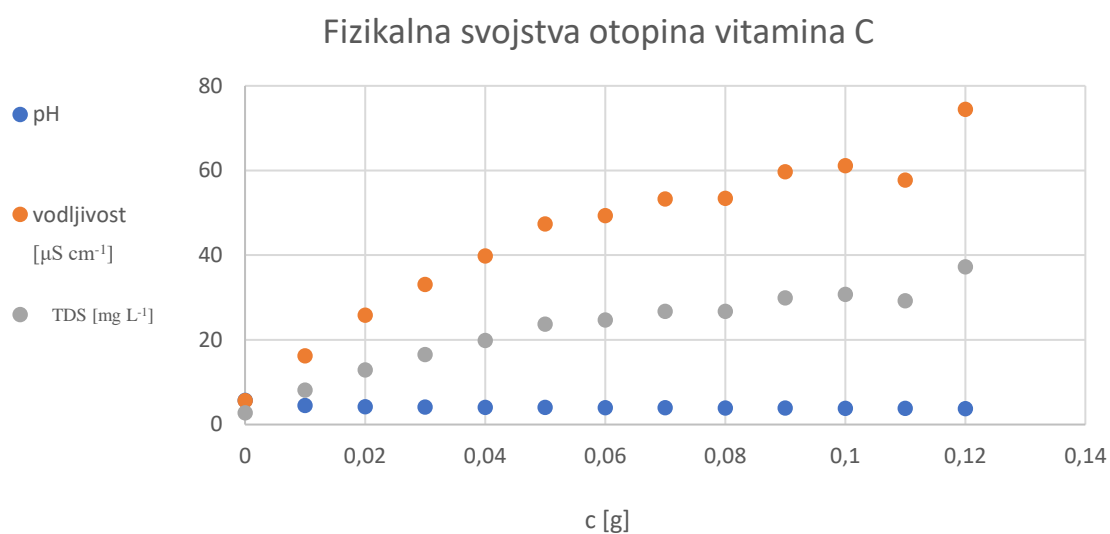


Slika 10. Fizikalna svojstva otopina laktoze

Iz slike 10 je vidljivo da u otopinama laktoze nema značajnog trenda rasta/pada TDS-a i vodljivosti jer je laktoza reducirajući disaharid koji u vodenim otopinama postoji u dva izomerna oblika (alfa i beta) koji su pri sobnoj temperaturi u ravnotežnom odnosu (Zlatic, 2007).

2017). Srednja vrijednost vodljivosti iznosila je $5,50 \pm 0,726 \mu\text{S cm}^{-1}$, a TDS $2,70 \pm 0,294 \text{ mg L}^{-1}$. Manja odstupanja moguće je pripisati točnosti mjernog uređaja te brzini mjerenja. Mjerenje električne vodljivosti omogućuje praćenje količine otopljenih tvari koje doprinose promjeni vodljivosti otopine. U vodenim otopinama su ukupne otopljene tvari većinom prisutne kao ioni te se i one mogu mjeriti preko električne vodljivosti (Rusydi, 2018). Postoji međusobna zavisnost između TDS-a i vodljivosti, a prikazani grafovi to i potvrđuju. Prema literaturnim podacima, vodene otopine šećera ne sadrže dovoljno velik broj iona koji bi doveo do povećanja vrijednosti TDS-a ili vodljivosti. Navedeno je pokazano u istraživanjima Ronga i suradnika (2009) na maltodekstrinu i Juansah i Julanti (2016) na vodenim otopinama glukoze. pH je ustaljen te je srednje vrijednosti $6,24 \pm 0,038$ što potvrđuju literaturni podaci (Vinko, 2011) i neovisan je o koncentraciji laktoze u otopini jer ne dolazi do disocijacije.

Askorbinska kiselina ima pH 1,0-2,5 te u vodenim otopinama podliježe brznoj oksidaciji (Sheraz, 2015). Rezultati mjerenja fizikalnih svojstava otopina vitamina C prikazani su na slici 11.



Slika 11. Fizikalna svojstva otopina vitamina C

pH destilirane vode je neutralan, stoga dodatkom vitamina C u vodu, pH otopine pada kako se povećava koncentracija vitamina C (od $5,70 \pm 0,530$ do $3,71 \pm 0,530$). Najmanja vrijednost električne vodljivosti iznosila je $16,25 \pm 19,535 \mu\text{S cm}^{-1}$, a TDS-a $8,12 \pm 9,817 \text{ mg L}^{-1}$ za otopinu s 0,01 g dodanog vitamina C. Najveća električna vodljivost iznosila je $74,45 \pm 19,535 \mu\text{S cm}^{-1}$, a TDS-a $37,25 \pm 9,817 \text{ mg L}^{-1}$ za otopinu s 0,12 g dodanog vitamina C. Vidljiv je

trend rasta vodljivosti i TDS-a jer se u otopini sada nalazi veći broj otopljenih čestica. pH vrijednost, TDS i vodljivost otopina pripremljenih od gotovih tableta prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Fizikalna svojstva otopina tableta

TABLETA	pH	VODLJIVOST [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	TDS [mg L^{-1}]
1	$3,70 \pm 0,582$	$71,58 \pm 20,651$	$35,80 \pm 10,323$
2	$3,75 \pm 0,582$	$68,10 \pm 20,651$	$34,08 \pm 10,323$
3	$3,74 \pm 0,582$	$63,83 \pm 20,651$	$31,90 \pm 10,323$
4	$3,76 \pm 0,582$	$61,30 \pm 20,651$	$30,63 \pm 10,323$
5	$3,88 \pm 0,582$	$58,60 \pm 20,651$	$29,32 \pm 10,323$
6	$3,88 \pm 0,582$	$51,32 \pm 20,651$	$25,55 \pm 10,323$
7	$3,94 \pm 0,582$	$42,75 \pm 20,651$	$21,37 \pm 10,323$
8	$3,93 \pm 0,582$	$44,08 \pm 20,651$	$22,07 \pm 10,323$
9	$4,03 \pm 0,582$	$37,72 \pm 20,651$	$18,90 \pm 10,323$
10	$4,06 \pm 0,582$	$34,33 \pm 20,651$	$17,18 \pm 10,323$
11	$4,24 \pm 0,582$	$26,97 \pm 20,651$	$13,50 \pm 10,323$
12	$4,34 \pm 0,582$	$17,74 \pm 20,651$	$8,87 \pm 10,323$
13	$5,92 \pm 0,582$	$2,66 \pm 20,651$	$1,33 \pm 10,323$

Kod rezultata mjerenja fizikalnih svojstava tableta, vidljiv je porast pH smanjenjem mase vitamina C u tableti (od $3,70 \pm 0,582$ do $5,92 \pm 0,582$), a vodljivost i TDS se smanjuju. Najmanja vrijednost električne vodljivosti iznosila je $17,74 \pm 20,651 \mu\text{S cm}^{-1}$, a TDS-a $8,87 \pm 10,323 \text{ mg L}^{-1}$ za otopinu s 0,01 g dodanog vitamina C. Najveća električna vodljivost iznosila je $71,58 \pm 20,651 \mu\text{S cm}^{-1}$, a TDS-a $35,80 \pm 10,323 \text{ mg L}^{-1}$ za otopinu s 0,12 g dodanog vitamina C. Vrijednosti vodljivost i TDS-a otopina vitamina C i otopina tableta, prema rezultatima sličnih su vrijednosti iz čega se može zaključiti da oni ovise isključivo o prisutnom vitaminu C, budući da otopina laktoze nije pokazala trend rasta, odnosno pada vodljivosti i TDS-a.

4.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE VITAMINA C

U tablici 6 prikazane su dobivene koncentracije vitamina C određene spektrofotometrijski permanganatom i dikromatom. Rezultati su prikazani na 1000 mL otopine.

Tablica 6. Kemijska svojstva otopina tableta: koncentracija vitamina C određena spektrofotometrijski permanganatom i dikromatom. Rezultati su prikazani na 1000 mL otopine.

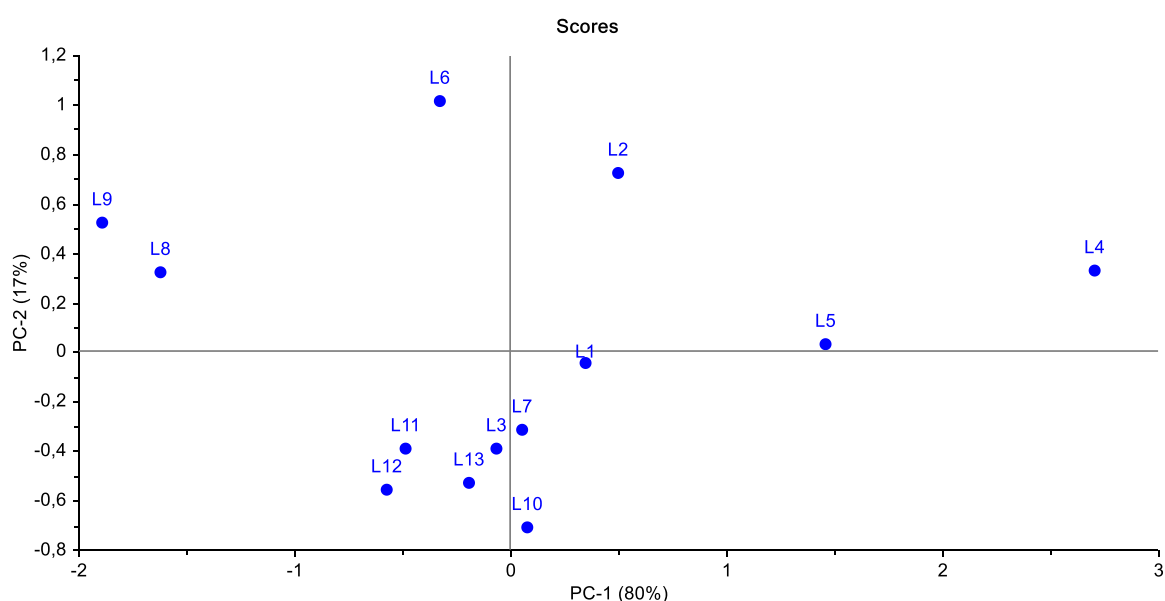
TABLETA	TEORIJSKI [g]	PERMANGANAT [g]	DIKROMAT [g]
1	0,12	0,187 ± 0,0520	0,166 ± 0,0392
2	0,11	0,170 ± 0,0520	0,141 ± 0,0392
3	0,10	0,133 ± 0,0520	0,128 ± 0,0392
4	0,09	0,149 ± 0,0520	0,116 ± 0,0392
5	0,08	0,123 ± 0,0520	0,114 ± 0,0392
6	0,07	0,128 ± 0,0520	0,100 ± 0,0392
7	0,06	0,121 ± 0,0520	0,125 ± 0,0392
8	0,05	0,099 ± 0,0520	0,091 ± 0,0392
9	0,04	0,086 ± 0,0520	0,130 ± 0,0392
10	0,03	0,073 ± 0,0520	0,062 ± 0,0392
11	0,02	0,045 ± 0,0520	0,061 ± 0,0392
12	0,01	0,031 ± 0,0520	0,043 ± 0,0392
13	0,00	0,020 ± 0,0520	0,041 ± 0,0392

Dobivena nazivna koncentracija vitamina C odstupa od deklarirane vrijednosti što ukazuje na nepreciznost metode. Odstupanje za metodu s permanganatom iznosi $\pm 0,0520$, a za metodu s dikromatom standardna devijacija je $\pm 0,0392$ iz čega se zaključuje da je metoda s dikromatom, između dvije kemijske metode, točnija. Moguća odstupanja su radi nestabilnosti dikromata i permanganata (Rees, 1987) na sobnoj temperaturi i svjetlu, također točnost metode jako ovisi o brzini rada zbog nestabilnosti vitamina C (Austria, 1997). Slično istraživanje provedeno je u radu Fadhel (2012) iz kojeg je vidljivo da se dobiveni podaci poklapaju s literaturnim. Zaključno je da su metode točne pri detekciji visokih koncentracija vitamina C u otopinama i tabletama, ali kod malih razlika u koncentraciji (0,01 g) metode su se pokazale kao neprecizne.

4.3. PCA ANALIZA

PCA analiza najčešća je kemometrijska metoda za identificiranje uzoraka te izvlačenja najpovoljnijih rezultata iz snimljenih spektara kako bi se pronašle sličnosti i razlike u podacima. PCA analiza rađena je za otopine laktoze, vitamina C i otopine tableta. Na slikama 12-14 prikazani su prosječni podaci mjerenja radi preglednosti. Uzorcima otopina laktoze uz oznaku uzorka (vidljivu iz tablice 2 u poglavlju Materijali i metode) dodano je slovo L, uzorcima otopina vitamina C slovo C, a tableta slovo T, radi bolje preglednosti podataka. NIR spektri korišteni su kao ulazni podaci za PCA analizu.

Slika 12 prikazuje PCA analizu otopina laktoze.

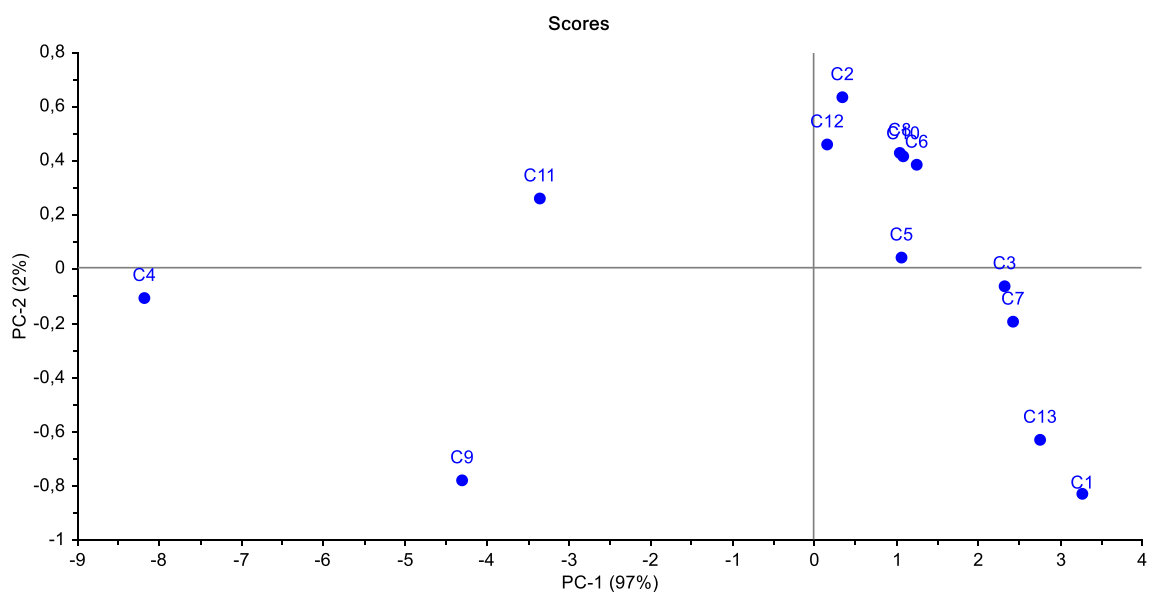


Slika 12. PCA analiza otopina laktoze

Uzorci s nižom masom laktoze (L1, L2, L4, L5) grupirani su u drugom kvadrantu ukazujući na njihovu međusobnu sličnost. Uzorci s malo višom masom laktoze (L6, L8, L9) grupirani su u prvom kvadrantu. Uzorci s najvišom masom laktoze (L11, L12, L13) grupirani su u trećem kvadrantu. Temeljem dobivenog može se zaključiti da se pomoću NIR spektroskopije i kemometrijske analize spektralnih podataka mogu razlikovati različite koncentracije laktoze u uzorcima što je vidljivo zbog dijagonalno raspoređenih uzoraka najniže i najviše koncentracije laktoze (L1 i L13), ali ta detekcija nije moguća za izrazito male promjene u masama laktoze dodane u otopine (primjerice uzorci L11, L12 i L13 koji se međusobno razlikuju samo u 0,01 g dodane laktoze, i svi su smješteni zajedno u trećem kvadrantu), ali su zato grupiranjem koncentracija laktoze po kvadrantima vidljive razlike između visokih i niskih koncentracija.

Očekivalo se da uzorak L3 bude smješten u drugi kvadrant gdje su uzorci s manjom koncentracijom laktoze, a uzorak L7 u prvi kvadrant, međutim, moguće su pogreške pri mjerenju ili rukovanju uzorcima.

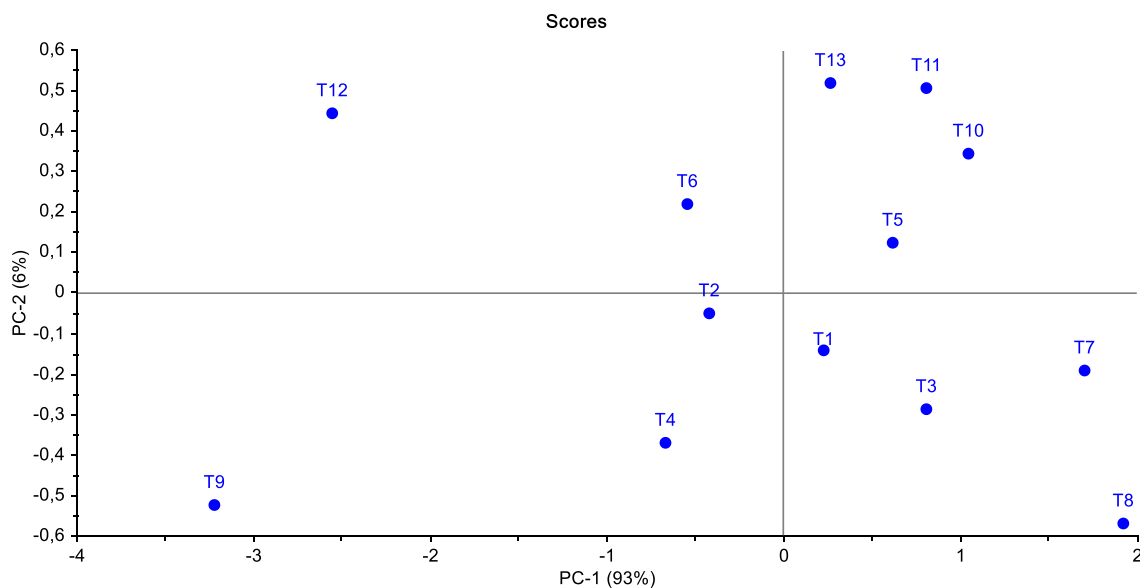
Slika 13 prikazuje PCA analizu otopina vitamina C.



Slika 13. PCA analiza otopina vitamina C

Uzorci otopina vitamina C koji su sadržavali veću masu otopljenog vitamina C (C1, C2, C3) grupirani su u desnim kvadrantima, dok su uzorci niže koncentracije vitamina C u otopini grupirani u lijevim kvadrantima što ukazuje na mogućnost razlikovanja uzoraka i koncentracija vitamina C u otopinama. Najveća sličnost je između uzoraka C6, C8 i C10 budući da su koncentrirani gotovo u jednoj točki u drugom kvadrantu. Uzorci različitih koncentracija su raspršeni po kvadrantima što je posljedica nestabilnosti vitamina C u otopinama (Austria, 1997) te točnosti mjerenja.

Uzorci PCA analize otopina tableta prikazani su na slici 14.

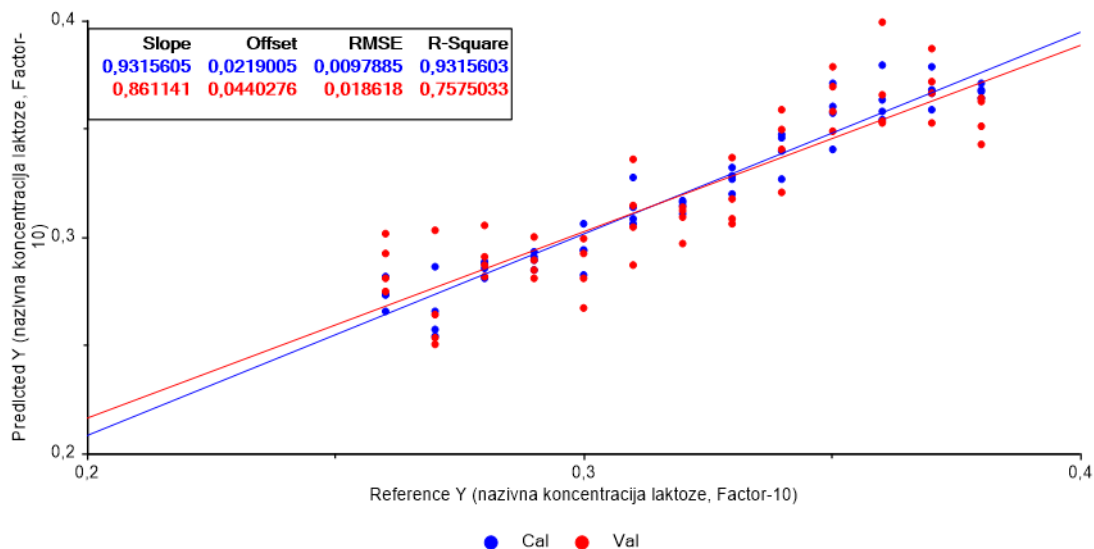


Slika 14. PCA analiza otopina tableta

Uzorci tableta koji su sadržavali nisku koncentraciju laktoze i visoku koncentraciju vitamina C grupirani su oko središta kvadranta (T1, T2, T3). Uzorci s visokom koncentracijom laktoze i niskom koncentracijom vitamina C (T10, T11, T13) grupirani su u drugom kvadrantu. Uzorci T1 i T12 dijagonalno su raspoređeni po kvadrantima što dokazuje da se međusobno jako razlikuju. Iz tih podataka moguće je zaključiti da PCA analiza dobro pokazuje razlike između visokih i niskih koncentracija laktoze i vitamina C u otopinama tableta.

4.4. PLS MODELI

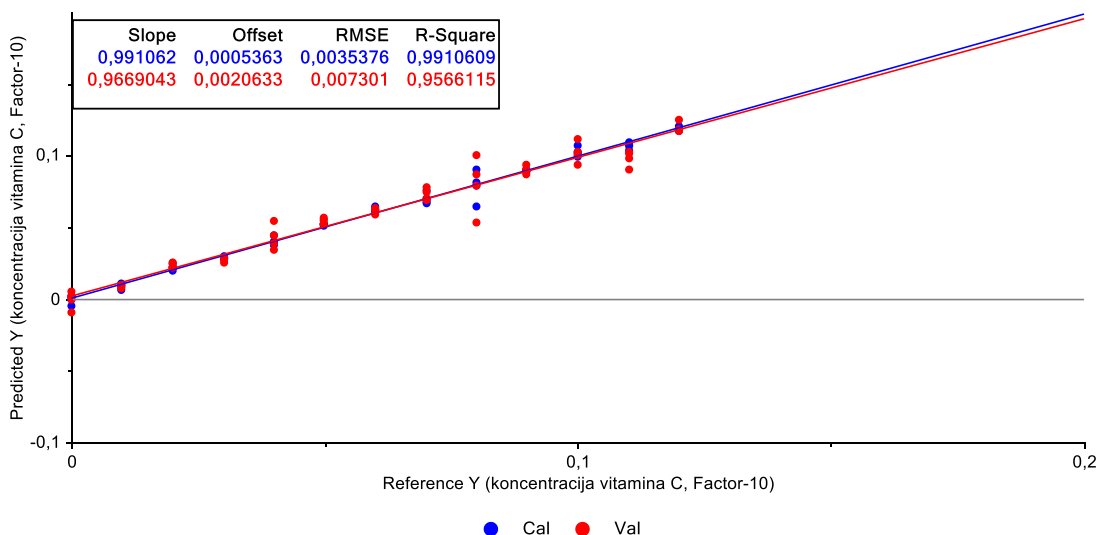
PLS modeli upotrebljavaju se za predviđanje fizikalnih i kemijskih karakteristika otopina vitamina C, laktoze i pripremljenih tableta. PLS modeli kreirani su za otopine laktoze i vitamina C te su se kao ulazni parametri (nezavisne varijable) koristili rezultati pH, TDS, vodljivosti i NIR spektara za predviđanje koncentracije laktoze i vitamina C (zavisne varijable). Vjerodostojnost PLS modela procijenjena je temeljem vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) i srednje kvadratne pogreške (RMSE) što je prikazano u sklopu slika.



Slika 15. PLS model za otopine laktoze

PLS model za otopine laktoze (slika 15) pokazuje dobru linearnu vezu između ovisnih i predviđajućih varijabli. R^2 za kalibraciju je visok i iznosi 0,9316, a za validaciju je nešto niži (0,7575), iz čega se može zaključiti da se model sa visokom točnošću može koristiti za kalibraciju, a sa nižom za predikciju koncentracije laktoze. Isto su pokazale i vrijednosti pogreške (RMSE): vrijednost RMSE za model kalibracije je manji (0,0098) od modela za validaciju (0,0186).

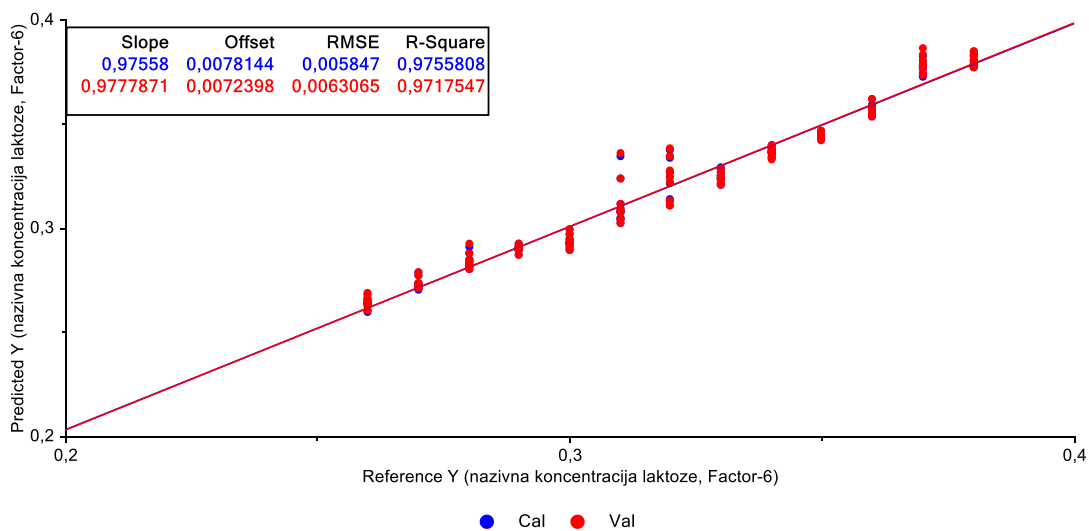
PLS model za otopine vitamina C prikazan je na slici 16.



Slika 16. PLS graf za otopine vitamina C

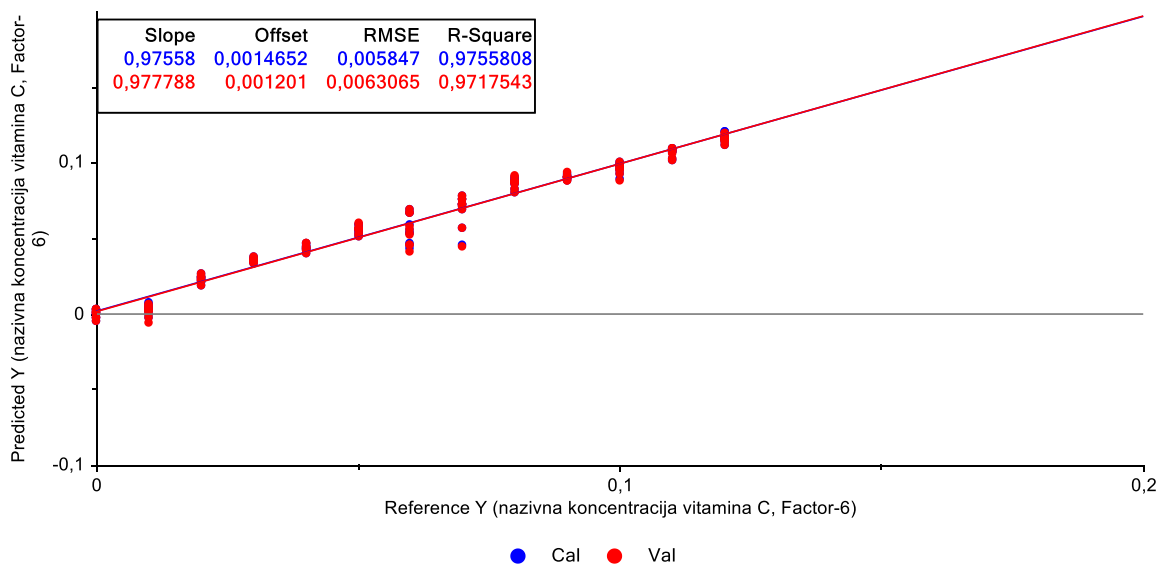
PLS model za otopine vitamina C (slika 16) pokazuje izvrsnu linearnu vezu između ovisnih i predviđajućih varijabli. R^2 za kalibraciju iznosi 0,9911, a za validaciju 0,9566, što znači da se model može sa visokom pouzdanošću koristiti za predikciju koncentracije. RMSE za model kalibracije iznosi 0,0035, a za model za validacije 0,0073. Iz navedenog se može zaključiti da se model može koristiti za kalibraciju te isto tako i za predikciju stvarne koncentracije vitamina C s visokom točnošću.

PLS modeli razvijeni su i za otopine tableta, na način da se predviđanje odnosilo na nazivnu koncentraciju laktoze (slika 17), nazivnu koncentraciju vitamina C (slika 18) te koncentraciju vitamina C određenu permanganatom (slika 19) i dikromatom (slika 20).



Slika 17. PLS model razvijen za predikciju nazivne koncentracije laktoze u otopinama tableta

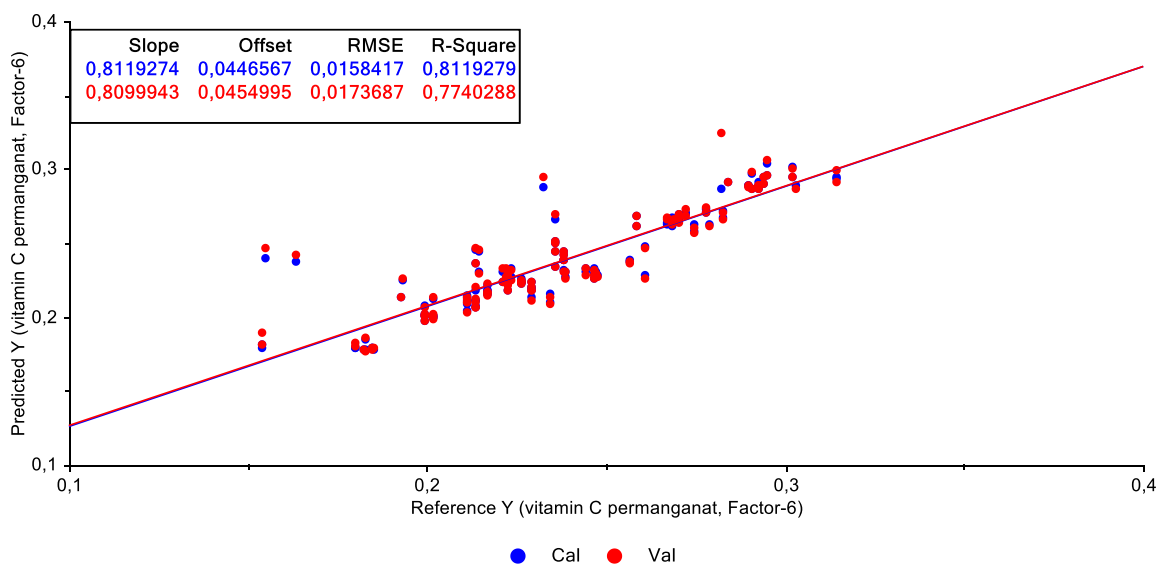
U slučaju predviđanja nazivnih koncentracija laktoze u proizvedenim tabletama (slika 17), R^2 za kalibraciju iznosi 0,9756, a za validaciju 0,9717. RMSE za model kalibracije je 0,0058, a za validaciju 0,0063. Navedeni rezultati pokazuju linearnu ovisnost između ovisnih (NIR spektri) i neovisnih (koncentracija) varijabli te dokazuju da se nazivna koncentracija laktoze u tabletama može odrediti s velikom preciznošću.



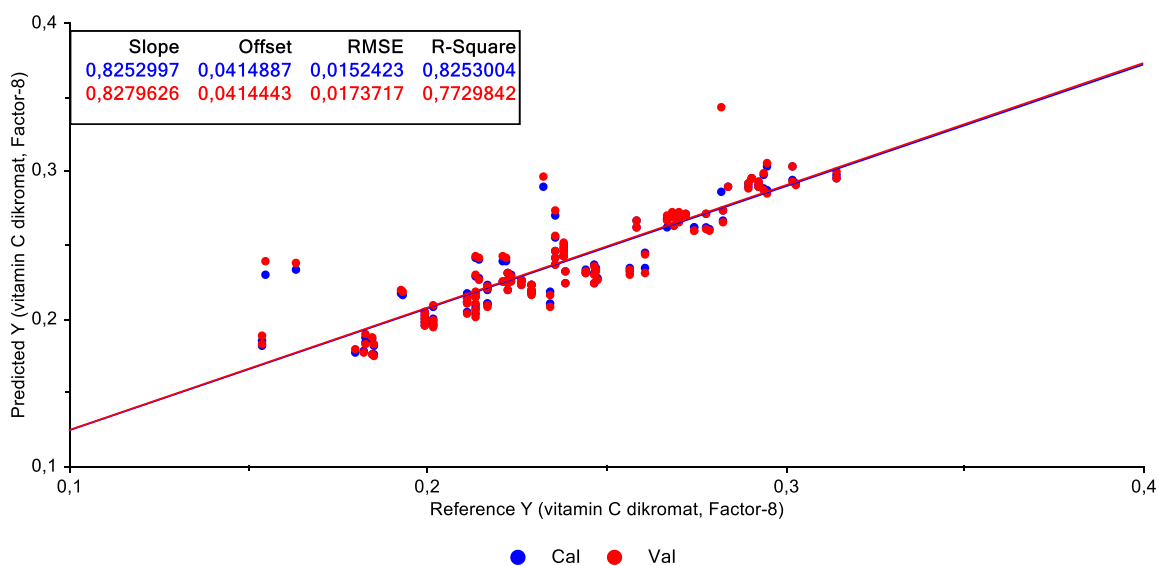
Slika 18. PLS model razvijen za predikciju nazivne koncentracije vitamina C u otopinama tableta

Nazivna koncentracija vitamina C u otopinama tableta također se može predvidjeti s visokom točnošću što dokazuju podaci R^2 i RMSE na slici 18: R^2 za kalibraciju iznosio je 0,9756, a za validaciju 0,9717, dok su RMSE vrijednosti iznosile 0,0058 za kalibraciju i 0,0063 za validaciju. Kao što je bio slučaj i sa nazivnom koncentracijom laktoze u otopinama tableta, ovi rezultati također upućuju na uspješnu primjenu modela parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) u predviđanju koncentracije vitamina C u otopinama tableta.

Prikladnost PLS modela ispitana je i za predviđanje koncentracije vitamina C određene spektrofotometrijski u otopinama tableta, a rezultati su prikazani na slici 19 (kalijev permanganat) i slici 20 (kalijev dikromat).



Slika 19. PLS modeli razvijeni za predikciju koncentracija vitamina C u tabletama određene spektrofotometrijski kalijevim permanganatom



Slika 20. PLS modeli razvijeni za predikciju koncentracija vitamina C u tabletama određene spektrofotometrijski kalijevim dikromatom

Usporedbom PLS modela za predviđanje koncentracije vitamina C određenih permanganatom i dikromatom (slike 19 i 20) pomoću izmjerenih fizikalnih karakteristika (pH, TDS, vodljivost i NIR spektri) vidi se raspršenost u podacima što ukazuje na nepreciznost kemijskih metoda određivanja vitamina C u uzorku. R^2 u slučaju permanganata iznosi 0,8119 za kalibraciju i 0,7740 za validaciju, a u slučaju dikromata 0,8253 za kalibraciju i 0,7729 za validaciju. Iz toga se može zaključiti da su metode pogodne za kalibraciju, no manje precizne za predikciju koncentracije. RMSE za model kalibracije kod permanganata iznosi 0,0158, a kod dikromata 0,0152, dok za model validacije RMSE kod permanganata iznosi 0,0173, a kod dikromata također 0,0173. Ovi podaci potvrđuju da su primjenjene kemijske metode podjednako točne (malo preciznija je metoda s dikromatom na što ukazuje veći R^2 , odnosno manji RMSE).

Primjenu modela parcijalnih najmanjih kvadrata u svojem su radu prethodno opisali Bendelja i suradnici (2019), koji su utvrdili da se PLS modeli uspješno mogu koristiti za predviđanje utjecaja veličine čestica mljevenog osušenog bilja iz porodice *Lamiaceae* na učinkovitost procesa ekstrakcije bioaktivnih tvari upotrebom vode kao otapala. Nadalje, uspješnost primjene PLS modela za predviđanje koncentracije bioaktivnih tvari u vodenim ekstraktima bilja temeljem kombinirane UV-VIS i NIR kontinuirane spektroskopije prikazana je i u radu Jurine i suradnika (2018) te u radu Šain (2019).

PLS modeli dobiveni temeljem NIR spektara i fizikalnih karakteristika mogu se koristiti za predikciju stvarne koncentracije laktoze i vitamina C u otopinama i tabletama. Prednost je što je metoda brza u odnosu na kemijske metode, precizna te je moguće utvrditi minimalne razlike u koncentracijama.

4.5. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Uzorci otopina laktoze, vitamina C i tableta, koji su se koristili za ispitivanje električne vodljivosti, TDS-a i pH, snimani su NIR instrumentom. Kao ulazne varijable za ANN korišteni su podaci prvih 10 faktora PCA analize kako bi se ispitalo može li se NIR uspješno koristiti kao metoda za predviđanje koncentracije laktoze i vitamina C u otopinama i tabletama u usporedbi s direktno mjerenim metodama. Optimalne neuronske mreže odabrane su na temelju linearnog koeficijenta korelacije (R^2) i vrijednosti pogrešaka za učenje, test i validaciju. Odabrane su po tri neuronske mreže koje su imale najviše koeficijente determinacije za učenje, testiranje i validaciju s najmanjim pogreškama za laktozu, vitamin C i tablete (tablica 7).

Tablica 7. Karakteristike razvijenih umjetnih neuronskih mreža (ANN). Zeleno označene mreže pokazale su se najpogodnijima za predviđanje koncentracije laktoze u kalibracijskim otopinama, vitamina C u kalibracijskim otopinama te vitamina C u otopinama tableta.

NAZIV MREŽE	PRECIZNOST UČENJA	POGREŠKA UČENJA	PRECIZNOST TESTIRANJA	POGREŠKA TESTIRANJA	PRECIZNOST VALIDACIJE	POGREŠKA VALIDACIJE	SKRIVENA AKTIVACIJSKA FUNKCIJA	IZLAZNA AKTIVACIJSKA FUNKCIJA
OTOPINE LAKTOZE – 70:20:10								
MLP 13-9-1	0,9963	0,0004	0,9965	0,0042	0,6150	0,0212	Exponential	Exponential
MLP 13-5-1	0,9997	0,00003	0,9930	0,0006	0,8376	0,0101	Exponential	Exponential
MLP 13-6-1	0,9988	0,0001	0,9830	0,0020	0,7705	0,0137	Exponential	Logistic
OTOPINE VITAMINA C – 70:20:10								
MLP 13-6-1	0,9994	0,00006	0,9982	0,0002	0,9933	0,0007	Tanh	Identity
MLP 13-6-1	0,9995	0,00005	0,9993	0,00009	0,9976	0,0003	Tanh	Exponential
MLP 13-7-1	0,9989	0,0001	0,9983	0,0004	0,9977	0,0008	Logistic	Identity
OTOPINE TABLETA – 70:20:10								
MLP 13-10-4	0,9576	0,0086	0,9338	0,0168	0,9283	0,0206	Logistic	Exponential
MLP 13-5-4	0,9567	0,0088	0,9483	0,0140	0,9424	0,0184	Logistic	Tanh
MLP 13-12-4	0,9682	0,0065	0,9432	0,0157	0,9115	0,0262	Tanh	Tanh

Iz tablice 7 vidljivo je da su podaci bili raspodijeljeni za učenje, testiranje i validaciju prema omjeru 70:20:10. Struktura mreže prikazana je kao input – broj neurona u skrivenom sloju – output. Broj neurona u skrivenom sloju bio je postavljen na raspon od 4 do 11.

Ciljna vrijednost mreže za otopinu laktoze je koncentracija laktoze. Model se pokazao preciznim za učenje i testiranje s R^2 koji su iznosili između 0,9830 i 0,9997, i poprilično malim pogreškama (najmanja 0,00003), a nešto manja preciznost dobivena je kod testa za validaciju (R^2 između 0,6150 i 0,8376) gdje su i pogreške veće (najveća 0,0212). Najbolja neuronska mreža izabrana je na temelju najboljih rezultata R^2 vrijednosti i najmanje pogreške (mreža MLP 13-5-1 u tablici 7 označena zelenom bojom). Mreža se sastojale od 13 ulaznih varijabli, 5 neurona u skrivenom sloju i 1 outputa, a R^2 vrijednosti iznosile su 0,9997 za učenje, 0,9930 za testiranje i 0,8376 za validaciju, dok su pogreške izrazito male te su iznosile 0,00003 za učenje, 0,0006 za testiranje i 0,0101 za validaciju.

Ciljna vrijednost mreže za otopinu vitamina C je koncentracija vitamina C. Razvijena ANN se pokazala preciznom za učenje, testiranje i validaciju, te su R^2 vrijednosti bile između 0,9933 i 0,9995, a pogreške između 0,00005 i 0,0008, što dokazuje visoku preciznost metode. Najbolja neuronska mreža izabrana je na temelju najboljih rezultata R^2 vrijednosti i najmanje pogreške (mreža MLP 13-6-1 u tablici 7 označena zelenom bojom). Mreža se sastojale od 13 ulaznih varijabli, 6 neurona u skrivenom sloju i 1 outputa, a R^2 vrijednosti iznosile su 0,9995 za učenje, 0,9993 za testiranje i 0,9976 za validaciju, dok su pogreške izrazito male te su iznosile 0,00005 za učenje, 0,00009 za testiranje i 0,0003 za validaciju. Opet, metoda se pokazala najmanje preciznom u testu za validaciju.

Ciljne vrijednosti mreže za otopine tableta su koncentracija laktoze i koncentracija vitamina C zajedno u istoj mreži. Razvijena ANN je precizna za učenje, testiranje i validaciju te su R^2 vrijednosti bile između 0,9115 i 0,9682, a pogreške između 0,0065 i 0,0262. Najbolja neuronska mreža izabrana je na temelju najboljih rezultata R^2 vrijednosti i najmanje pogreške (mreža MLP 13-12-4 u tablici 7 označena zelenom bojom). Mreža se sastojale od 13 ulaznih varijabli, 12 neurona u skrivenom sloju i 4 outputa, a R^2 vrijednosti iznosile su 0,9682 za učenje, 0,9432 za testiranje i 0,9115 za validaciju, dok su pogreške iznosile 0,0065 za učenje, 0,0157 za testiranje i 0,0262 za validaciju.

Vrijednosti R^2 u sva tri slučaja bile su veće od $>0,9$ što ukazuje na veliki potencijal primjene ANN u predikciji koncentracija aktivnih tvari u tabletama. Slično je potvrđeno i u istraživanju Zheng i suradnika (2011).

Odabrane mreže koristile su se za daljnje analize predviđanja koncentracija laktoze i vitamina C u otopinama i tabletama (tablica 8).

Tablica 8. Rezultati predviđanja koncentracije (R^2)

NAZIV MREŽE	NAZIVNA KONCENTRACIJA LAKTOZE	<i>preciznost učenja</i>	0,9939
		<i>preciznost testiranja</i>	0,9909
		<i>preciznost validacije</i>	0,9776
	NAZIVNA KONCENTRACIJA VITAMINA C	<i>preciznost učenja</i>	0,9905
		<i>preciznost testiranja</i>	0,9818
		<i>preciznost validacije</i>	0,9636
	VITAMIN C PERMANGANAT	<i>preciznost učenja</i>	0,9429
		<i>preciznost testiranja</i>	0,9001
		<i>preciznost validacije</i>	0,8505
	VITAMIN C DIKROMAT	<i>preciznost učenja</i>	0,9456
		<i>preciznost testiranja</i>	0,9001
		<i>preciznost validacije</i>	0,8544

Uspoređujući koeficijente determinacije kod metoda određivanja koncentracije laktoze i vitamina C u otopinama i tabletama NIR spektroskopijom u odnosu na kemijske metode određivanja koncentracije vitamina C pomoću permanganata i dikromata, dokazalo se kako NIR spektroskopijom možemo vrlo precizno odrediti koncentraciju laktoze ($R^2 = 0,9909$ za testiranje i $0,9776$ za validaciju). Usporedbom dviju spektrofotometrijskih metoda, nema velike razlike u R^2 za metodu s dikromatom u odnosu na metodu s permanganatom ($R^2 = 0,9429$ za učenje kod permanganata i $R^2 = 0,9456$ za učenje kod dikromata). Vrijednosti $R^2 > 0,9$ dokazuju njihovu točnost u determinaciji koncentracije vitamina C (Grudpan, 1999), međutim usporedbom navedenih kemijskih metoda s NIR spektroskopijom, NIR se pokazala kao

preciznija metoda (R^2 iznosi 0,9818 za testiranje, 0,9905 za učenje i 0,9636 za validaciju) pomoću koje se vrlo točno mogu predvidjeti ukupne aktivne tvari u tabletiranim dodacima prehrani (vitamin C). Prednost NIR-a, kemometrije i primjene ANN u ovom istraživanju stoga je očita: smanjenje upotrebe kemikalija, nije potrebna prethodna priprema uzorka te je NIR metoda nedestruktivna, brza i jednostavna, dok se kemometrijskom obradom podataka dobivaju modeli koji sa izrazito visokom točnosti mogu predvidjeti koncentracije vitamina C u tabletama.

5. ZAKLJUČAK

1. U otopinama vitamina C korištenim za kalibraciju utvrđen je pad pH vrijednosti porastom koncentracije vitamina C u otopinama te rast električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari. Isto nije utvrđeno za kalibracijske otopine laktoze.
2. PCA analiza pokazala se kao dobra metoda za identificiranje uzoraka različitih koncentracija laktoze i vitamina C u pripremljenim kalibracijskim otopinama te otopinama proizvedenih tableta.
3. Modeli parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) s visokom točnošću ($R^2 > 0,9$) mogu se koristiti za predviđanje fizikalnih i kemijskih karakteristika otopina vitamina C, laktoze i sastava pripremljenih tableta.
4. Umjetne neuronske mreže (ANN) uspješno se mogu koristiti za predviđanje koncentracija vitamina C kao aktivne tvari te laktoze kao pomoćne tvari u tabletiranim dodacima prehrani.
5. Kombinacija NIR spektroskopije, kemometrijskih metoda te umjetnih neuronskih mreža predstavlja nedestruktivan, brz i pouzdan način predviđanja koncentracije aktivnih tvari u tabletiranim dodacima prehrani.

6. LITERATURA

Akseli, I., Xie, J., Schultz, L., Ladyzhynsky, N., Bramante, T., He, X., Deanne, R., Horspool, K.R., Schwabe, R. (2016) A Practical Framework Toward Prediction of Breaking Force and Disintegration of Tablet Formulations Using Machine Learning Tools. *J. Pharm. Sci.* **106(1)**, 234-247.

Amato, F., López, A., Peña-Méndez, E. M., Vañhara, P., Hampl, A., Havel, J. (2013) Artificial neural networks in medical diagnosis. *J. Appl. Biomed.* **11(2)**, 47–58.

Anonymous 1 (2018) PubChem, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ascorbic-acid#section=Computed-Properties>>. Pristupljeno 25. rujna 2019.

Anonymous 2 (2018) National Institutes of Health, <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/>>. Pristupljeno 29. rujna 2019.

Anonymous 3 (2018) Zeiss, <<https://www.zeiss.com/spectroscopy/solutions-applications/measuring-principle/near-infrared-spectroscopy.html#quantitative-analysis>>. Pristupljeno 29. rujna 2019.

Anonymous 4 (2017) Vitamini.hr, <<https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/sve-sto-ste-zeljeli-znati-o-vitaminu-c-13072/>>. Pristupljeno 2. listopada 2019.

Austria, R., Semenzato, A., Bettero, A. (1997) Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15(6)**, 795-801.

Bendelja, I., Valinger, D., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Gajdoš Kljusurić, J., Benković, M. (2019) Influence of Particle Size on UV-VIS and NIR Spectra of Aqueous Extracts of Plants from *Lamiaceae* Family. *J. Hyg. Eng. Des.* str. 61-68.

Bonnet, U. (2019) The sour side of vitamin C might mediate neuroprotective, anticonvulsive and antidepressant-like effects. *Med. Hyp.* **131**, br.109320.

Chattoraj, S., Daugherty, P., McDermott, T., Olsofsky, A., Roth, W.J., Tobyn, M. (2018) Sticking and picking in pharmaceutical tablet compression: An IQ Consortium Review. *J. Pharm. Sci.* **107(9)**, 2267-2282.

Fadhel, D.H. (2012) Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid in Aqueous Solutions. *Al-Nahrain J. Sci.* **15(3)**, 88-94.

Gretić, M. (2015) Utjecaj sastava mješavina na svojstva gotovih tableta. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Grudpan, K., Kamfoo, K., Jakmune, J. (1999) Flow injection spectrophotometric or conductometric determination of ascorbic acid in a vitamin C tablet using permanganate or ammonia. *Talanta* **49(5)**, 1023–1026.

Han, R., Yang, Y., Li, X., Ouyang, D. (2018) Predicting oral disintegrating tablet formulations by neural network techniques. *Asian J. Pharm. Sci.* **13(4)**, 336-342.

Haswell, S.J. (1992) Practical guide to chemometrics, 10. izd., Marcel Dekker INC., New York, str. 1-3.

Juansah, J., Yulianti, W. (2016) Studies on Electrical behavior of Glucose using Impedance Spectroscopy. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **31(1)**, br.012039.

Jurina, T., Cvetković, A., Gajdoš Kljusurić, J., Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Valinger, D. (2018) Modelling and optimization of physical characteristics based on UV-VIS/NIR spectra of aqueous extracts of lavender, mint and Melissa. *Book of Abstracts: 2nd TSD Conference*, **2(2)**, 51-59.

Kamal-Eldin, A., Andersson, R. (1997) A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74(4)**, 375-380.

Mahmoodi, F. (2012) Compression mechanics of powders and granular materials probed by force distributions and a micromechanically based compaction equation. *Uppsala University*, str.17.

Nishikimi, M. i Yagi, K. (1991) Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *American J. Clin. Nutr.* **54(6)**, 1203–1208.

Pappenberger G. and Hohmann H.P. (2014) Industrial Production of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) and D-Isoascorbic Acid. *Biochem. Eng. Biotechnol.* **143**, 143-188.

Prusac, M. (2019) Obogaćivanje prirodnih sokova jabuke i naranče proteinima izoliranim iz industrijske konoplje. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

Quodbach, J., Moussavi, A., Tammer, R., Frahm, J., Kleinebudde, P. (2013) Tablet Disintegration Studied by High-Resolution Real-Time Magnetic Resonance Imaging. *Wiley Online Library* **103(1)**, 249-255.

Rees, T. (1987) The Stability of Potassium Permanganate Solutions. *J. Chem. Educ.* **64 (12)**, str. 1058.

Rong, Y. , Sillick, M. and Gregson, C. (2009), Determination of Dextrose Equivalent Value and Number Average Molecular Weight of Maltodextrin by Osmometry. *J. Food Sci.* **74(1)** C33-C40. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00993.x

Rusydi, A.F. (2018) Correlation between conductivity and total dissolved solid in various type of water: A review. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **118(1)**, br.012019.

Senjković, R. (1994) Osnove oblikovanja lijekova, Školska knjiga, Zagreb, str. 147-176.

Sheraz, M.A., Khan, M.F., Ahmed, S., Kazi, S.A., Ahmad, I. (2015) Stability and Stabilization of Ascorbic Acid: A Review. *Househ. Pers. Care Today* **10(3)**, 22-25.

Survase, S.A., Bajaj, I.B., Singhal, R.S. (2006) Production of Vitamins. *Food Technol. Biotechnol.* **44(3)**, 381–396.

Šain, A. (2019) Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Vinko, I., Božanić, R., Golem, Ž., Kesner-Koren, I., Mahnet, S. (2011) Promjena udjela laktoze nakon fermentacije mlijeka različitim mikrobnim kulturama. *Mljekarstvo* **61 (2)**, 161-167.

Vivek, D., Renu, B.Y., Richa A., Sachdev, Y. (2017) Formulation design and optimization of novel fast dissolving tablet of chlorpheniramine maleate by using lyophilization techniques. *Bull. Fac. Pharm.* **55(1)**, 31-39.

Yasaei, M., Khakbiz, M., Zamanian, A., Ghasemi, E. (2019) Synthesis and characterization of Zn/Al-LDH@SiO₂ nanohybrid: Intercalation and release behavior of vitamin C. *Mat. Sci. Eng. C* **103**, 1-9.

Zheng, H., Jiang, L., Lou, H., Hu, Y., Kong, X., & Lu, H. (2011) Application of Artificial Neural Network (ANN) and Partial Least-Squares Regression (PLSR) to Predict the Changes of Anthocyanins, Ascorbic Acid, Total Phenols, Flavonoids, and Antioxidant Activity during Storage of Red Bayberry Juice Based on Fractal Analysis and Red, Green, and Blue (RGB) Intensity Values. *J. Agric. Food Chem.* **59 (2)**, 592–600.

Zlatic, M. (2017) Laktoza intolerancija, *Hrv. č. jav. zdr.* **13(49)**, 84-89.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta