

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Бојана Ђ. Свркота Конрад

**ПРИМЕНА ХЕМОМЕТРИЈСКИХ АЛАТА ЗА
КАРАКТЕРИЗАЦИЈУ ИНТЕРАКЦИОНОГ
ПОТЕНЦИЈАЛА ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ
МЕШОВИТИХ РЕЖИМА, РЕВЕРЗНИХ ФАЗА,
СЛАБЕ КАТЈОНСКЕ ИЗМЕНЕ И ХИДРОФИЛНИХ
ИНТЕРАКЦИЈА**

Докторска дисертација

Београд, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Bojana Đ. Svrkota Konrad

**APPLICATION OF CHEMOMETRIC TOOLS TO
CHARACTERISE THE INTERACTION POTENTIAL OF
MIXED-MODE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH
REVERSED-PHASE, WEAK CATION EXCHANGE,
AND HYDROPHILIC INTERACTIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

МЕНТОР

др Биљана Оташевић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Ана Протић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

др Игор Опсеница, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Јована Крмар, научни сарадник
TNG Creative, Београд, Србија

др Невена Ђајић, научни сарадник
Alchemy Cloud, Inc., Нови Сад, Србија

др Дарија Јовчић, виши научни сарадник
Институт за физику, Институт од националног значаја за Републику Србију

Датум одбране: _____

Оцена докторске дисертације: _____

ПРИМЕНА ХЕМОМЕТРИЈСКИХ АЛАТА ЗА КАРАКТЕРИЗАЦИЈУ ИНТЕРАКЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ МЕШОВИТИХ РЕЖИМА, РЕВЕРЗНИХ ФАЗА, СЛАБЕ КАТЈОНСКЕ ИЗМЕНЕ И ХИДРОФИЛНИХ ИНТЕРАКЦИЈА

САЖЕТАК

Предметно истраживање обухвата испитивање ретенционих механизма бимодалних система течне хроматографије мешовитих режима код којих су заступљене следеће комбинације интеракционих режима: реверзно фазног и слабе катјонске измене (*RP/WCX*) и реверзно фазног и хидрофилне интеракционе хроматографије (*RP/HILIC*), применом математичко – статистичког приступа.

У одабраним бимодалним системима (*RP/WCX* и *RP/HILIC*) праћено је ретенционо понашање активних фармацеутских супстанци различитих физичко-хемијских особина односно различитих поларности и способности јонизације. Експериментални рад је спроведен плански, према одабраном дизајну експеримената, ради истовремене и економичне процене вишеструких факторских утицаја. Добијени резултати су употребљени за изградњу регресионих математичких модела, мешовитих модела квантификовања односа структуре и ретенционог понашања (енг. *Quantitative Structure-Retention Relationship, QSRR*). *QSRR* модели су изграђени применом алгоритама машинског учења, градијентно појачаних стабала одлучивања, чиме су вредности ретенционих фактора испитаних молекула доведени у зависност са вредностима експерименталних параметара и нумерички представљених геометријски оптимизованих молекулских структура (молекулских дескриптора). Уз помоћ *QSRR* модела препознати су фактори који статистички значајно утичу на ретенционо понашање молекула (молекулски дескриптори и експериментални параметри), на основу којих је вршена процена присутних ретенционих механизма.

У *RP/WCX* бимодалном систему препознато је испољавање хидрофобних и електростатичких интеракција, водоничних веза као и ван дер Валсових и диполних интеракција. Затим је *RP/WCX* систем успешно примењен за развој хроматографских метода за сепарацију анализата сличних и различитих физичко-хемијских особина, укључујући и позитивно наелектрисане контрајоне соли диклофенака. Додатно, ретенционо понашање молекула у *RP/HILIC* систему доведено је у везу са присуством поларних, неполарних и јонских интеракција, као и водоничних веза.

Кључне речи: течна хроматографија мешовитих режима, *RP/WCX* бимодална хроматографија, *RP/HILIC* бимодална хроматографија, мешовити модели квантификовања односа структуре и ретенционог понашања – *QSRR*, сепарација контрајона диклофенака

Научна област: Фармација

Ужа научна област: Аналитика лекова

APPLICATION OF CHEMOMETRIC TOOLS TO CHARACTERISE THE INTERACTION POTENTIAL OF MIXED-MODE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH REVERSED-PHASE, WEAK CATION EXCHANGE, AND HYDROPHILIC INTERACTIONS

ABSTRACT

The following research encompasses the evaluation of the retention mechanism present in bimodal mixed-mode liquid chromatography systems with the following separation modes: reversed-phase and weak cation exchange (RP/WCX) and reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography (RP/HILIC), applying a mathematical-statistical approach.

Retention data of tested active pharmaceutical ingredients, differing in physicochemical properties (polarities and ionisation abilities), were obtained using bimodal liquid chromatography systems (RP/WCX and RP/HILIC). The experimental work was carried out according to selected experimental designs, enabling simultaneous and efficient assessment of multifactorial influences. Collected results were used for the development of regression models, i.e. mixed Quantitative Structure-Retention Relationship (QSRR) models using a machine learning algorithm, gradient boosted trees (GBT). Developed models related the retention data to experimental parameter (EP) values and numerically represented optimized molecular structures (molecular descriptors, MD). QSRR models highlighted factors (MD and EP) of significant influence on the molecular retention behaviour, based on which the assessment of the retention mechanism was performed.

The retention mechanism recognised in the RP/WCX bimodal system included hydrophobic and electrostatic interactions, hydrogen bonding, as well as van der Waals and dipole interactions. Furthermore, the RP/WCX system was successfully used for the development of chromatographic methods for separating analytes with similar and differing physicochemical properties, including positively charged counterions of diclofenac salts. Additionally, the retention behaviour of molecules in the RP/HILIC system was related to the presence of polar, nonpolar and ionic interactions, as well as hydrogen bondings.

Keywords: Mixed-Mode Liquid Chromatography, RP/WCX Bimodal Chromatography, RP/HILIC Bimodal Chromatography, Mixed Quantitative Structure-Retention Relationship Models QSRR, Separation of counterions of Diclofenac salts

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Drug analysis

Садржај

1.	УВОД.....	1
1.1.	Течна хроматографија мешовитих режима.....	2
1.1.1.	Врсте и особине <i>MMLC</i> стационарних фаза	4
1.1.2.	Експресија ретенционих механизма у <i>MMLC</i> системима.....	6
1.2.	Математичко моделовање ретенционог понашања анализата.....	8
1.2.1.	Модели квантитативног односа структуре и ретенционог понашања, <i>QSRR</i>	10
1.3.	Предности, ограничења и примена течне хроматографије мешовитих режима	22
2.	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	26
3.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	29
3.1.	Општи део	30
3.1.1.	Референтне стандардне супстанце, растварачи и реагенси	30
3.1.2.	Аналитичка опрема.....	31
3.1.3.	Рачунарски програми.....	32
3.1.4.	Припрема узорача	32
3.1.5.	Припрема воденог дела мобилне фазе.....	33
3.2.	Хроматографски услови примењени у току испитивања <i>RP/WCX</i> хроматографског система....	35
3.2.1.	План експеримената, <i>DoE</i> , за испитивање мултифакторског утицаја на ретенцију анализата у <i>RP/WCX</i> систему	37
3.2.2.	Изградња сета података – дефинисање улазних и излазне варијабле	38
3.2.3.	Изградња глобалног и локалних мешовитих <i>QSRR</i> модела употребом <i>GBT</i> алгоритма	39
3.3.	Експериментални услови за развој метода за испитивање лекова у <i>RP/WCX</i> систему	43
3.3.1.	Експериментални услови за испитивање смеше анализата различитих јонских врста.....	43
3.3.2.	Експериментални услови за испитивање смеше анализата исте јонске врсте	45
3.3.3.	Експериментални услови испитивања соли диклофенака и присутних контрајона.....	45
3.4.	Хроматографски услови примењени у току испитивања <i>RP/HILIC</i> хроматографског система..	48
3.4.1.	Експериментални параметри и план експеримената за испитивање мултифакторског утицаја на ретенцију анализата у <i>RP/HILIC</i> систему	50
3.4.2.	Изградња базе података – дефинисање улазних и излазне варијабле	51
3.4.3.	Изградња глобалног и локалних мешовитих <i>QSRR</i> модела применом <i>GBT</i> алгоритма	52
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	53
4.1.	Карактеризација <i>RP/WCX</i> хроматографског система употребом мешовитих <i>QSRR</i> модела.....	54
4.1.1.	Дефинисање експерименталног простора	54

4.1.2.	Развој мешовитих <i>QSRR</i> модела за процену ретенционих механизма.....	57
4.1.3.	Карактеризација ретенционих механизма путем развијених <i>QSRR</i> модела	59
4.1.4.	Утицај експерименталних параметара на ретенционо понашање молекула у <i>RP/WCX MMLC</i> систему	65
4.2.	Примена <i>RP/WCX</i> бимодалне хроматографије у аналитици лекова.....	66
4.2.1.	Примена <i>RP/WCX</i> хроматографског система за сепарацију смеше анализата различитих јонских врста.....	66
4.2.2.	Примена <i>RP/WCX</i> хроматографског система за сепарацију смеше анализата исте јонске врсте	70
4.2.3.	Примена <i>RP/WCX</i> хроматографског система за анализу соли диклофенака и присутних контрајона	74
4.3.	Карактеризација <i>RP/HILIC</i> хроматографског система применом мешовитих <i>QSRR</i> модела	83
4.3.1.	Дефинисање испитаног експерименталног простора	83
4.3.2.	Развој мешовитих <i>QSRR</i> модела за процену ретенционих механизма.....	87
4.3.3.	Карактеризација ретенционих механизма путем изграђених <i>QSRR</i> модела	90
5.	ЗАКЉУЧАК.....	95
6.	ЛИТЕРАТУРА	98
7.	ПРИЛОЗИ	110

1. УВОД

1.1. Течна хроматографија мешовитих режима

Савремени развој аналитичких техника довео је до појаве течне хроматографије мешовитих режима (енг. *Mixed-Mode Liquid Chromatography, MMLC*). *MMLC* се односи на систем течне хроматографије, у који је интегрисано више од једног доминантног механизма раздвајања анализата заступљених у једној стационарној фази, тј. колони [1,2]. Различити механизми раздвајања анализата у хроматографском систему описују се као хроматографски режими, односно модалитети [3]. У литератури су превасходно описани унимодални системи, односно системи у којима је заступљен један доминантан механизам раздвајања анализата. А, у пракси је одабир одређеног модалитета уско повезан са особинама узорка и у њему присутних анализата [4].

Најчешће разматран модалитет течне хроматографије у аналитици лекова је хроматографски систем реверзних фаза (енг. *Reverse Phase, RP*) јер је погодан за сепарацију неполарних и умерено поларних анализата. *RP* систем се успоставља стационарном фазом хидрофобног карактера и поларном или умерено поларном мобилном фазом. У оваквом систему сепарација анализата се постиже деловањем ван дер Валсових (енг. *Van der Waals*) дисперзионих сила. Мобилна фаза у *RP* течној хроматографији је смеша воде и органског растварача, од којих су најчешће у употреби ацетонитрил и метанол [5,6]. Поред наведених, у литератури је разматрана употреба и других органских растварача, много бољег токсиколошког профила, као што су етанол, ацетон, етил-лактат и други. Ово додатно доприноси распрострањености употребе *RP* модалитета, јер је састав мобилне фазе много бољег профила еколошке прихватљивости у односу на мобилну фазу која се употребљава у течној хроматографији нормалних фаза (енг. *Normal Phase, NP*) [7,8]. *NP* течна хроматографија подразумева употребу стационарне фазе поларних особина и мобилне фазе коју у потпуности чини органски растварач [4,9]. Као органски модификатори мобилне фазе у *NP* најчешће се користе *n*-хексан, хлороформ и дихлорметах, који су врло токсични [4,7,8]. Ипак, *NP* течна хроматографија је погодна за раздвајање смеше поларних или анализата нерастворних у води. Доминантан механизам раздвајања се односи на присуство поларних међумолекулских интеракција и адсорпције молекула анализата на површину стационарне фазе [4]. Доминантно присуство јонских међумолекулских интеракција обезбеђује сепарацију анализата у јонизованом облику, а то се постиже применом јоноизмењивачке хроматографије (енг. *Ion Exchange, IEX*). На површини стационарне фазе *IEX* система налазе се лиганди који имају способност јонизације у мобилној фази [5]. У зависности од врсте јонизабилних функционалних група стационарне фазе развијене су *IEX* колоне које се разликују по типу и јачини јонских интеракција које могу да се успоставе. Тако се разликују јаки и слаби катјонски и анјонски измењивачи, где су лиганди јаке или слабе киселине односно базе. У саставу мобилне фазе користе се пуфери, који обезбеђују одговарајућу јонску јачину и *pH* вредност средине, који су кључни за експресију јонских интеракција у *IEX* системима. Молекули који су позитивно наелектрисани се испитују на колонама са способношћу катјонске измене (колоне са негативно наелектрисаним киселим функционалним групама), а негативно наелектрисани молекули се испитују на колонама са способношћу анјонске измене (лиганди са позитивно наелектрисаним базним функционалним групама) [10]. За разлику од претходно поменутих режима, гел ексклузиона хроматографија (енг. *Size Exclusion Chromatography, SEC*) се заснива на изостанку међумолекулских интеракционих сила, а смеша се раздваја искључиво на основу присутних разлика у димензијама и облику честица анализата [5]. Колоне су типично изграђене од инертних материјала, природних или синтетичких полимера, који у себи имају

поре различитих димензија. Аналити који су мањих димензија од пора се дуже задржавају у односу на молекуле већих димензија [11]. *SEC* је због свог карактеристичног механизма сепарације погодна за хроматографску анализу макромолекула, као што су протеини, протеински комплекси као и њихови агрегати [12].

Модификацијом карактеристика претходно поменутих режима течне хроматографије високих перформанси (енг. *High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*), развијени су модалитети којима се постиже проширење спектра физичко-хемијских особина анализата, који могу да се испитују применом *HPLC*. Управљање особинама описаних хроматографских режима је првенствено била усмерена ка променама особина мобилне фазе. Модификацијом мобилне фазе у *RP* систему је развијена неводена реверзно фазна хроматографија (енг. *Non-Aqueous Reversed Phase Chromatography, NARP*), где је неполарна стационарна фаза коришћена у комбинацији са мобилном фазом састављеном од смеше органских растварача. Такође, модификација *RP* хроматографије може да се изведе и додавањем јон-пар реагенса (енг. *Ion-Pair Chromatography, IPC*) мобилној фази који ступају у интеракције са узорцима супротног наелектрисања. *IPC* је због тога корисна за сепарацију киселина и база које се тешко анализирају употребом *RP-HPLC* [4,6]. Модификацијом мобилне фазе *NP* система, развијена је хидрофилна интеракциона хроматографија (енг. *Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC*) код које је стационарна фаза поларна, а мобилна фаза је смеша поларног органског растварача и воде. Корисна је за аналитику веома поларних узорака и слабо-јонизабилних анализата, који се готово не задржавају на *RP-HPLC* колони [4,13]. Осим тога, *HILIC* може значајно да допринесе ефикасности сепарације и симетрији пикова, што се приписује сузбијању дифузионог коефицијента слабих база, због смањеног удела воденог дела мобилне фазе [13]. Сажети приказ особина унимодалних система наведен је у табели 1.

Табела 1 Кратак приказ унимодалних сепарационих режима [4]

Хроматографски режим	Особине лигананда колоне	Особине мобилне фазе	Особине узорка
Реверзно-фазни, <i>RP-HPLC</i>	Неполарни	Смеша воде и органског растварача	У води растворани, умерено поларни аналити
Нормално-фазни, <i>NP-HPLC</i>	Поларни	Смеша органских растварача	У води нерастворани молекули
Неводени реверзно-фазни, <i>NARP</i>	Неполарни	Смеша органских растварача	Хидрофобни, у води нерастворани молекули
Хидрофилни интеракциони, <i>HILIC</i>	Поларни	Смеша воде и органског растварача	Веома поларани аналити
Јоноизмењивачки, <i>IEC</i>	Јоноизмењивачки	Смеша воденог раствора соли и пуфера	Јонизовани, велики биомолекули
Јон-пар, <i>IPC</i>	Неполарни	Смеша воде и органског растварача са додатим јон-пар реагенсом	Киселине и базе које се тешко анализирају употребом <i>RP-HPLC</i>
Гел-ексклузиони, <i>SEC</i>	Инертни	Водена или органска мобилна фаза	Биомолекули, синтетички полимери

Поред свих поменутих хроматографских режима, постоје ситуације када једном техником није могуће задовољити све циљеве анализе. Иако, за анализу лекова малих молекулских маса, *RP* течна хроматографија представља златни стандард, она ипак није универзална.

Поготово је изазовно када се ради о аналитици веома поларних једињења, за које се показало да је употреба *HILIC* и *MMLC* посебно значајна [14]. Такође, ако постоји потреба сепарације веома различитих анализата присутних унутар исте смеше које је потребно раздвојити једним аналитичким поступком, употреба *MMLC* може да постане техника избора. Из тог разлога, последњих година се посвећује пажња модификацији стационарних фаза, које постају извор додатних механизма сепарације, и последично развоју *MMLC* [15,16].

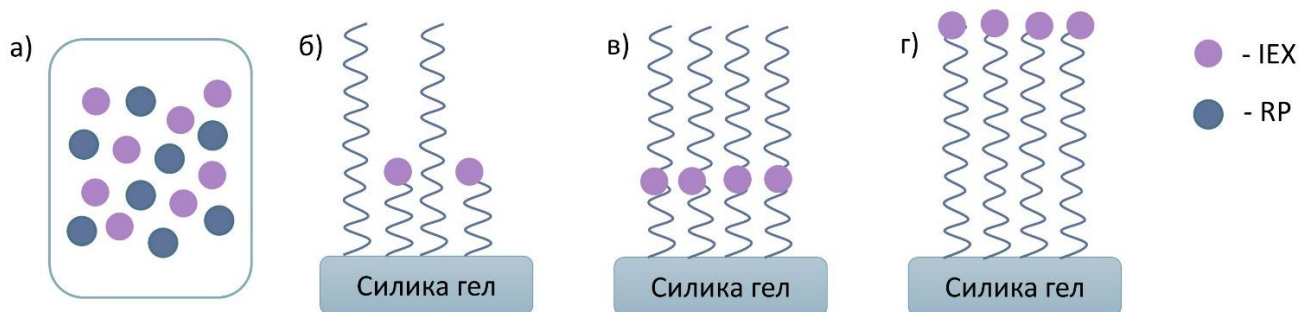
Течна хроматографија мешовитих режима није у потпуности нов приступ. Присуство вишеструких интеракција које управљају ретенцијом молекула примећено је у разним системима. Међутим, с обзиром да оне нису суштински утицале на ретенционо понашање, сматране су секундарним интеракцијама. Тако је запажено присуство хидрофобних интеракција у *IEX* или присуство електростатичких утицаја у гел ексклузионој хроматографији [17]. Карактеристичан пример присуства секундарних интеракција описан је у *RP* хроматографији. У току производње *RP* стационарних фаза на модификованој површини силика гела дешавало се да заостају слободне силанолне групе. Слободне силанолне групе су у тим случајевима извор секундарних интеракција, као што су дипол-дипол, протон-донор, протон-акцептор, п-п међумолекулске везе, као и електростатичке интеракције. Као последица њиховог присуства долазило је до појаве пикова који су асиметрични у свом силазном делу (енг. *tailing*), што је додатно реметило сепарацију и репродуктивност добијених резултата. У току производње стационарних фаза, тежило се смањењу присуства слободних силанолних група, што се постизало њиховом хемијском модификацијом [13,18,19]. Међутим, препознавањем вишеструких интеракција у једној колони као пожељне особине, почиње се са развојем хроматографије мешовитих режима, код које су оне циљано заступљене [19]. За разлику од унимодалне течне хроматографије где су додатне интеракције слабије заступљености и сматрају се секундарним, у *MMLC* оне равноправно учествују у процесу ретенције анализата [17].

1.1.1. Врсте и особине *MMLC* стационарних фаза

У зависности од броја присутних режима који могу да се успоставе, у литератури се помињу бимодалне (два ретенциона механизма) и тримодалне (три ретенциона механизма) *MMLC* колоне. У колони могу да буду заступљене различите комбинације *RP*, *IEX*, *SEC* и *HILIC* режима [14,16–18].

Симултано присуство различитих модалитета постиже се на неколико начина у току производње бимодалних колона. Најједноставнији приступ подразумева паковање колона са две врсте медијума различитих интеракционих способности, припремљених у хомогеној смеши (тип 1). Колоне означене као тип 2, паковане су јединственим материјалом са интегрисаним лигандима различите природе и способности испољавања међумолекулских интеракција. Потом је приступ развоја колона унапређен производњом колона типа 3 и 4, које су паковане јединственим материјалом са лигандима униформне структуре и дуалне природе, при чему се разликују у положају функционалних група. Код колона типа 3 поларне или јонске групе су уграђене у алкил ланац, док су у колонама типа 4 поларне или јонизоване функционалне групе на његовом крају (слика 1)[18]. Колоне типа 3 и 4 показују предност у погледу функционалности и боље поновљивости добијених резултата, јер нису зависне од процеса припреме стационарне фазе, што није случај са типовима 1 и 2 [18]. Иако

су бројне *MMLC* стационарне фазе синтетисане као што је и описано у литератури [15,20,21], ограничен је број *HPLC* колона које су комерцијално доступне.



Слика 1 Шематски приказ материјала за паковање *RP/IEX MMLC* бимодалних колона. Слика је адаптирана по узору на слику из литературе [18]

Комбинације модалитета које су најчешће заступљене у *MMLC* су такве да су присутни режими међусобно високо ортогонални, чиме се обезбеђује најбоља искористљивост вишеструких ретенционих модалитета [17]. За потребе аналитике лекова малих молекулских маса у употреби су бимодалне колоне са комбинацијом следећих режима: *RP/HILIC*, *RP/IEX* и *HILIC/IEX* [17,22,23].

RP/HILIC колоне карактерише присуство лиганата који се састоје из хидрофобног и хидрофилног дела. Хидрофобни делови су углавном изграђени из алкил угљоводоничних ланаца или ароматичних група, док поларне групе могу бити разноврсне, неутралног наелектрисања као што су диол, амидна, цијано или јонске и цвтерјонске групе [20,22]. Сматра се да се увођењем хидрофилних група у *RP* стационарне фазе добија *HILIC* режим [17]. Класичан пример *RP/HILIC* стационарне фазе односи се на присуство лиганата изграђених из алкил ланца и диолне терминалне групе [24]. Оваква комбинација механизма погодна је за анализу једињења различитих варијација хидрофобности, као и симултану анализу поларних и неполарних анализата, при чему се превазилазе ограничења карактеристична за *RP* и *HILIC* режими [14,21]. У раду *Liu and Pohl* [24] показано је како оваква колона може да замени *NP* или *HILIC* колоне приликом процене дистрибуције поларних група молекула, као и да замени *RP* колону у процени дистрибуције неполарних група у анализитима. У наведеној студији се показало да *RP/HILIC* стационарна фаза пружа већу флексибилност приликом анализе смеша. Такође, може да подржи шири спектар анализата у погледу њихових физичко-хемијских особина у поређењу са конвенционалним *NP* колонама [24].

Лиганди *RP/IEX* бимодалних колона, слично лигандима *RP/HILIC* колона, су дуалне природе. Састоје се од хидрофобног дела који је најчешће алкил ланац (*C8* или *C18*) и од јонске функционалне групе која може бити позиционирана или на бочном низу или на крају хидрофобног ланца. У зависности од врсте јонске групе разликују се катјонски (енг. *Cation Exchange, CEX*) и анјонски измењивачи (енг. *Anion Exchange, AEX*) који по природи и начину дисоцијације могу бити јаки или слаби [22]. Тако се разликују јаки катјонски измењивачи (енг. *strong cation exchange, SCX*), слаби катјонски измењивачи (енг. *weak cation exchange, WCX*), јаки анјонски измењивачи (енг. *strong anion exchange, SAX*) и слаби анјонски измењивачи (енг. *weak anion exchange, WAX*) [20]. *RP/IEX* је често у употреби код изазовних сепарација, као што је анализа смеша које се састоје од поларних и наелектрисаних једињења. *RP/IEX* колоне имају могућност експресије и *HILIC* режима, међутим и тада

наелектрисање стационарне фазе може да допринесе јединственој селективности, карактеристичној за *MMLC* колоне [14].

HILIC/IEH симултано заступљени механизми су првобитно описани у раду *Hodges et al.* [25]. Стационарне фазе садрже лиганде који у свом саставу имају и наелектрисане (анјонске, катјонске или цвтерјонске) и хидрофилне функционалне групе [20]. Комбинација ових *MMLC* механизма погодна је за испитивање смеша поларних и наелектрисаних једињења [20,21]. Ова комбинација ретенционих механизма може да буде од значаја приликом сепарације пептида, као што је описано у радовима *Mant et al.* [26,27] где је показана боља ефикасност сепарације испитаних анализата [17,26,27].

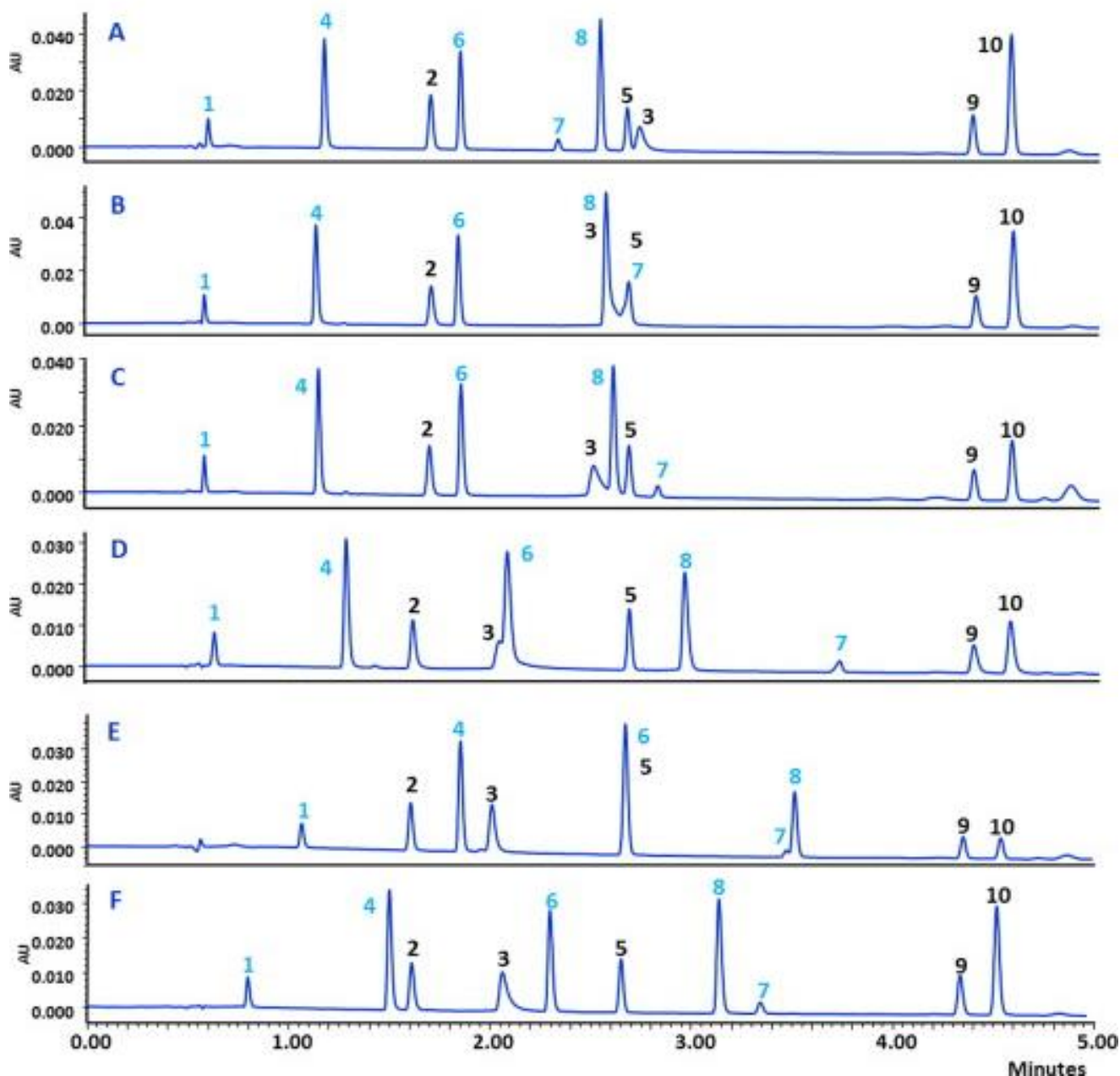
Како су бимодалне стационарне фазе показале предности у анализама узорака различитих особина, приступило се и развоју тримодалних колона. Тримодалне стационарне фазе карактерише присуство три врсте ретенционих механизма, при чему је најчешће заступљена комбинација *RP/HILIC/IEH* механизма. Због вишеструких механизма раздвајања углавном се користе код сложених узорака сачињених од анализата веома различитих физичко-хемијских својстава. Како би овакве стационарне фазе могле да се развију, неопходно је познавање комплексности хемијских особина материјала од којих су изграђене [22]. Комерцијално доступне тримодалне колоне се добијају различитим производним поступцима. Могу бити произведене мешањем две врсте различитих честица модификованог силика гела, једне које на својој површини имају заступљене *CEX* и *C18* лиганде и друге које на својој површини садрже *C18* и *AEX* лиганде. Такође, могу бити и цвтерјонске, које се разликују у положају јонских група различите врсте наелектрисања, које су раздвојене ланцима лиганада. Поред наведеног, тримодалне колоне могу бити произведене од високо порозних честица силика гела, чија је унутрашњост модификована силил лигандима двоструког интеракционог потенцијала, док је спољашњост честица прекривена у потпуности сулфованим нано-полимером који експримира трећу врсту интеракција [18].

1.1.2. Експресија ретенционих механизма у *MMLC* системима

Поред овако разноврсног избора стационарних фаза, чији лиганди су основа испољавања међумолекулских интеракција, важно је истаћи да њихова хемијска структура није једини фактор који утиче на ретенционо понашање анализата и њихово међусобно раздвајање. Састав употребљене мобилне фазе је од пресудног значаја за испољавање потенцијално присутних индивидуалних ретенционих механизма [13]. Иако је основна карактеристика *MMLC* система равноправна заступљеност вишеструких интеракционих механизма, приликом практичне употребе доминантно се испољава само један од заступљених режима, што је условљено саставом мобилне фазе. С тим у вези, применом изократског програма елуирања само један од вишеструких ретенционих механизма учествује у ретенционом процесу [13,18,22]. Међутим, применом градијентног програма елуирања могуће је активирати све потенцијалне међумолекулске интеракције, што је истакнута предност *MMLC* стационарних фаза [16,19].

Особине мобилне фазе које је важно разматрати у току развоја *MMLC* метода су: врста и удео органског растварача, *pH* вредност, врста и концентрација пуфера воденог дела мобилне фазе [15,16]. Мобилна фаза утиче на сепарацију анализата путем солватације молекула, компетитивним понашањем на адсорптивним местима на стационарној фази, али и потенцијалним истискивањем анализата са активних места на стационарној фази [17]. Самим

тим мобилна фаза утиче на селективност и редослед елуирања анализата. Утицај мобилне фазе на селективност је једна од важних карактеристика *MMLC*, јер је у унимодалним системима могућност промене селективности без промене стационарне фазе ограничена [15,28]. Изражена промена селективности под утицајем мобилне фазе приказана је у раду *Nováková et al.* [28], где је праћено ретенционо понашање 10 анализата на колони *CSH C18* (енг. *Charged Surface Hybrid, CSH*) са мобилном фазом која садржи различите уделе мравље или сирћетне киселине и амонијум-ацетата (слика 2).



Слика 2 Приказ промене селективности на *CSH C18* колони коришћењем *ACN* мобилне фазе и следећих адитива А) 0.1% *HCOOH*, В) 0.01% *HCOOH*, С) 0.1% *CH₃COOH*, Д) 0.01% *CH₃COOH*, Е) 50 mM *CH₃COONH₄* pH 3.0, F) 1 mM *CH₃COONH₄* pH 3.0. Слика је преузета из рада *Nováková et al.* [28], © 2012, уз дозволу издавача *Elsevier*.

Редослед елуирања анализата се може одредити фактором селективности (α). α је мера раздвојености анализата и израчунава се према једначини 1:

$$\alpha = k_2 / k_1, \quad (1)$$

где је k_2 ретенциони фактор анализата који се касније елуира у односу на аналит са ретенционим фактором k_1 . Адекватна раздвојеност двају пикова сматра се да је постигнута уколико је вредност фактора селективности $\alpha \gg 1$.

Ретенциони фактор (k) је уско повезан са ретенционим временом анализата, t_R (временски интервал између наношења узорка на колону и појаве максимума пика анализата), и изражава се једначином 2:

$$k = (t_R - t_0) / t_0, \quad (2)$$

где је t_0 , време потребно за појаву пика мобилне фазе на хроматограму. Ретенциони фактор представља меру задржавања анализата на колони и користи се ради добијања универзалнијег податка о ретенционом понашању неког анализата. То се постиже узимањем у обзир ретенционог времена пика мобилне фазе, које је зависно од уређаја и употребљене колоне [4,29]. Пожељне вредности ретенционог фактора су у опсегу од $1 \leq k \leq 10$. Ако је вредност ретенционог фактора мања од 1, сматра се да се аналит понаша неретенционо, а ако је вредност већа од 10, сматра се да је ретенционо понашање неефикасно, тј. да се аналит дуго задржава у хроматографском систему, што води сувишном трошењу времена и ресурса [4].

1.2. Математичко моделовање ретенционог понашања анализата

Вишеструки ретенциони механизми узрокују сложене обрасце ретенционог понашања анализата, чиме се умножава број експерименталних параметара од утицаја на развој хроматографских метода. Ово је један од разлога који *MMLC* систем чини изазовним за рад. Боље разумевање и могућност предвиђања ретенционог понашања анализата могу да допринесу смањеној потреби за прелиминарним експерименталним радом и тиме подстакну практичну употребу *MMLC* система. Помоћ у карактеризацији хроматографских система и разумевању сложених интеракционих механизма могу да пруже рачунарски алати [30].

Математичко моделовање ретенционог понашања молекула у одређеном хроматографском систему, подразумева прилагођавање модела експериментално добијеним ретенционим подацима. Оно се примењује у различите практичне сврхе, као што је карактеризација стационарних фаза, њихово поређење, као и развој и оптимизација аналитичких метода [31]. У зависности од употребљених података у току математичког моделовања и могућности предвиђања развијеног модела, разликују се два приступа. Први приступ се односи на семиемпиријске моделе који се користе за предвиђање ретенционих вредности претходно експериментално испитаних анализата на основу њиховог познатог ретенционог понашања у променљивим условима хроматографског система. Међутим, у случају предвиђања ретенционог понашања структурно познатих анализата без емпиријски доступних података о њиховом ретенционом понашању у познатим фиксним условима хроматографског система, користе се модели квантитативног односа структуре и ретенционог понашања (енг. *Quantitative Structure Retention Relationship, QSRR*)[32].

Семиемпиријски модели се развијају прилагођавањем математичких једначина експериментално добијеним вредностима ретенционих параметара, интерполацијом или

екстраполацијом вредности. Ови модели су најчешће у употреби при развоју и трансферу аналитичких метода. Погодни су за развој метода јер укључују удео органског растварача у мобилној фази као једну од најважнијих варијабли. Осим тога, укључују и неколико апстрактних параметара, који нису у вези са ретенцијним механизмима, али који успешно доводе у везу особине аналита и параметре мерења са ретенцијним фактором. Карактеристични семиемпиријски модели су: модел линеарне јачине растварача (енг. *Linear Solvent Strength, LSS*), квадратни модел (енг. *Quadratic Model*), модел адсорпције (енг. *Adsorption Model*), модел мешовитог режима (енг. *Mixed-Mode Model*) и *Neue-Kuss* модел [31]. Семиемпиријски модели су детаљније објашњени у раду *den Uijl et al.* [31]. Њихова предност огледа се у једноставности везе између ретенционог понашања и садржаја мобилне фазе, што их чини погодним за описивање *RP* и *HILIC* система. Међутим, често је њихово предвиђање ограничено на узак опсег вредности параметара који описују мобилну фазу.

Ретенционо моделовање је могуће спровести и употребом нешто комплекснијих математичко-статистичких алата, као што су модели односа структуре и ретенционог понашања, *QSRR*. *QSRR* модели доводе у везу хемијску структуру аналита и њихово ретенционо понашање [31]. Повезивање особина молекула са сопственим ретенцијним понашањем покушано је на неколико начина. Првобитно је примењиван партициони коефицијент у систему растварача октанол-вода, а потом и једначине линеарног односа слободне енергије (енг. *Linear Free Energy Relationship, LFER*). С обзиром да *LFER* користи ограничен број молекулских дескриптора, изградња *QSRR* модела покушана је са великим бројем рачунарски добијених молекулских дескриптора, у циљу побољшања моћи предвиђања [32,33].

За карактеризацију стационарних фаза и њихову класификацију, најраспрострањенији су *QSRR* модели засновани на *LFER* једначини приказаној следећим математичким изразом (3):

$$\log k = c + rR_2 + vV_x + s\pi_2^H + a\sum \alpha_2^H + b\sum \beta_2^H, \quad (3)$$

где је k ретенциони фактор, тј. особина аналита која се испитује, R_2 одступање моларне рефрактивности од очекиване референтне вредности, V_x је *McGowan* карактеристична запремина, π_2^H је поларизибилност молекула, док се α_2^H и β_2^H односе на укупну киселост (α) односно базност (β) водоничне везе. Даље, c је константа, док су r , v , s , a и b регресиони коефицијенти [31,34]. *LFER* моделима се сматрају Хидрофобни супстракциони модел (енг. *Hydrophobic Substraction model, HSM*) и модел линеарног односа солватационе енергије (енг. *Linear Solvation Energy Relationship, LSER*), који су детаљније описани у литератури [31,35–38]. Ови модели узимају у обзир параметре и хроматографског система и аналита. Иако омогућавају релативно лаку карактеризацију система, односно хроматографских колона, не узимају у обзир параметре мобилне фазе и њихов састав, а карактеризација аналита је мукотрпна [31]. Такође, добијање вредности регресионих коефицијената захтева експерименталне податке, што може бити временски и ресурсно захтевно, а за јонске анализе посебно изазовно. Такође, с обзиром да старост колоне утиче на вредност тако добијених регресионих коефицијената, у одређеним случајевима је и њихова тачност упитна [39].

QSRR модели који користе молекулске дескрипторе израчунате уз помоћ рачунарске хемије, сматрају се класичним *QSRR* моделима, и они ће се разматрати даље у раду [32]. За потребе

њиховог развоја, генеришу се често велике базе података, које обухватају бројне структурне параметре и ретенционе податке великог броја молекула. Међутим, иако су модели захтевнији по својој природи, они омогућавају предвиђање ретенционог понашања молекула који нису експериментално испитани на основу вредности њихових структурних параметара [31].

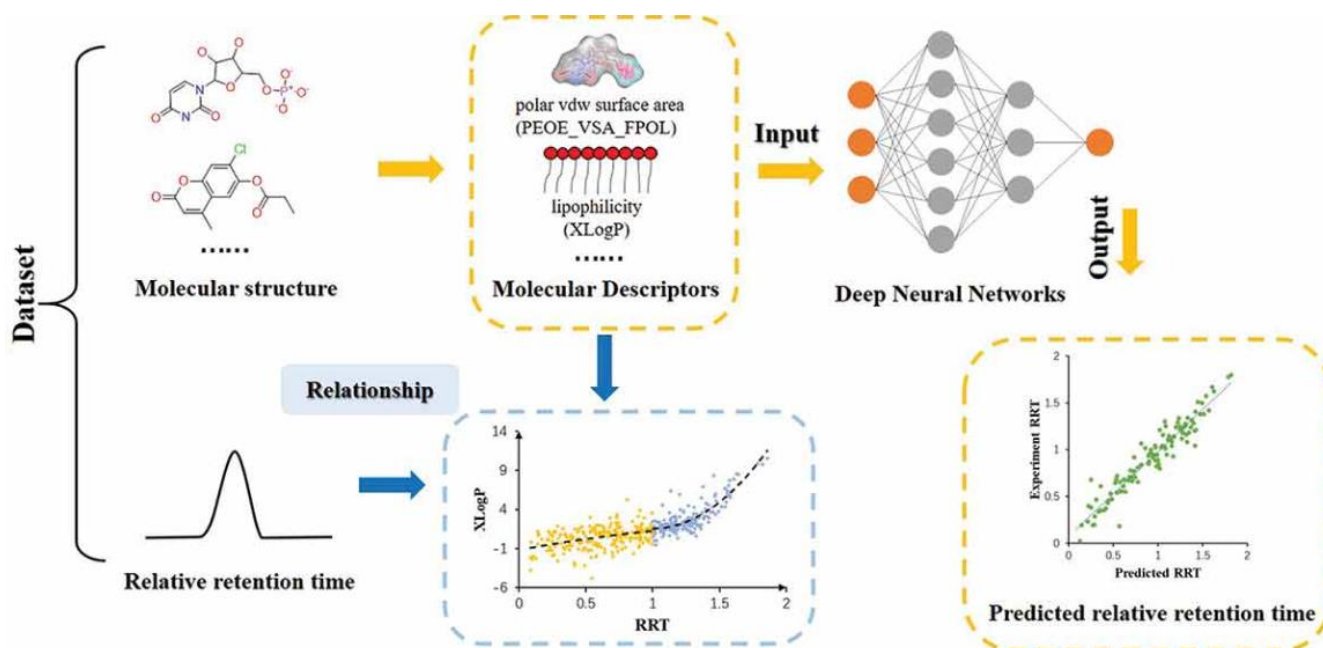
Употреба ретенционог моделовања у хроматографским системима мешовитог режима, може значајно да допринесе њиховом разумевању. Како испољавање одређеног модалитета у *MMLC* зависи од састава мобилне фазе, модели засновани на *LFER* не пружају комплетан увид у присутне ретенционе механизме. За разлику од њих, семиемпиријски модели, иако узимају у обзир састав мобилне фазе, често су сувише једноставни за описивање комплексних ретенционих механизма. Због наведеног, погодна је употреба класичних *QSRR* алата, који математички вођеним принципима и рационализацијом експерименталног рада омогућавају стицање дубљег увида у комплексне процесе који се одвијају у *MMLC* системима, што је детаљније објашњено у наредном делу 1.2.1.

1.2.1. Модели квантитативног односа структуре и ретенционог понашања, *QSRR*

Развој *QSRR* датира од 1977. године публикацијом два истраживања на ову тему [40,41]. Након тога *QSRR* моделовање доживљава експанзију, јер се експериментални подаци добијају употребом хроматографије, што је релативно једноставан начин добијања великог броја експерименталних података. Такође, тако добијени подаци су прецизни, а изградња базе података је релативно брза и укључује информације о бројним структурно различитим аналитима [42].

QSRR модели доводе у везу ретенционо понашање аналита у изабраном хроматографском систему и вредности које описују физичко-хемијску структуру молекула. Величине које описују физичко-хемијску структуру молекула означавају се као молекулски дескриптори (енг. *Molecular Descriptors, MD*), и они су детаљније описани у оквиру поглавља 1.2.1.3. Тако се за изградњу *QSRR* модела користе две врсте података. Једна, која описује ретенционо понашање молекула, и друга која нумерички изражава њихове структурне особине [43]. Ретенциони параметри који се најчешће прате су логаритмоване вредности ретенционог фактора ($\log k$), екстраполирана вредност ретенционог фактора која теоретски представља ретенциони фактор у чисто воденим условима мобилне фазе ($\log k_w$) и у неким случајевима ретенционо време (t_R) [42,43].

Изградња *QSRR* модела се састоји од неколико корака, а то су прикупљање вредности ретенционих карактеристика одабраних аналита, израчунавање *MD* на основу геометријски оптимизоване молекулске структуре, одабир фактора за процес моделовања, изградња регресионог модела на основу прикупљене базе података и валидација генерисаних модела [44]. Шематски приказ развоја *QSRR* модела представљен је на слици 3.



Слика 3 Шематски приказ процеса изградње QSRR модела, слика преузета и преведена из рада He et al. [45] (лиценца CC-BY 4.0)

QSRR модели имају предиктиван карактер. Они математички повезују структурне особине експериментално испитаних молекула са њиховим ретенционим параметарима. Представљањем структурних особина молекула који није експериментално испитан развијеном QSRR моделу, обезбеђује се процена његовог ретенционог понашања [42,43]. Поред процене ретенционог понашања молекула, QSRR се такође користи и за предвиђање физичко-хемијских особина непознатих анализата, описивање сепарационих механизма који су заступљени у датом хроматографском систему, за евалуацију физичко-хемијских особина како анализата тако и стационарне фазе, истицање најутицајнијих молекулских дескриптора, као и предвиђање биолошке активности молекула [43,46].

1.2.1.1. Мешовити QSRR модели

Иако је QSRR моделе могуће употребити за предвиђање ретенционог понашања молекула, који нису разматрани у току развоја модела, ипак су предиктивне димензије ограничене само за јединствену комбинацију вредности експерименталних услова (тип колоне, хроматографске параметре и састав мобилне фазе). Интегрисање експерименталних параметара (енг. *Experimental Parameters, EP*) у QSRR моделе пратећи дизајн експеримената (енг. *Design of Experiments, DoE*) може допринети значајном проширењу њихове предиктивне моћи, јер омогућава стицање увида у ретенциони процес у оквиру читавог испитаног експерименталног простора. Овако изграђени QSRR модели називају се мешовитим QSRR моделима [32,47]. Њиховом применом могуће је, осим за познате услове и познате анализите, стећи увид у ретенционо понашање нових анализата, у тачкама експерименталног простора које нису испитане, а који су обухваћене испитаним вредностима експерименталних параметара [30,48]. Описивање експерименталног простора постиже се употребом DoE, који је погодан математичко-статистички алат који омогућава симултану процену мултифакторских утицаја, уз редуковање неопходног експерименталног рада (детаљније описан у делу 1.2.1.2 Увода) [49,50].

Извођење мешовитог *QSRR* моделовања, може да резултира већом предиктивном способношћу модела, што се приписује повећаном нивоу објашњиве варијансе, јер је више фактора од утицаја узето у разматрање [51]. Овако изграђени *QSRR* модели могу да послуже за разумевање присутних ретенционих механизма и као помоћ у ефикаснијем развоју хроматографских метода. Добијањем грубих предвиђања о ретенционом понашању молекула, смањује се потреба за иницијалним и прелиминарним испитивањима [30]. Успешна изградња мешовитих *QSRR* модела приказана је у неколицини радова [30,33,48,52,53].

1.2.1.2. Дизајн експеримената, *DoE*

Дизајн експеримената, *DoE*, представља планирано извођење експеримената на основу којих је могућа симултана математичка процена мултифакторских утицаја на посматрани одговор система. Матричним планирањем експеримената, на основу претходно утврђених правила ортогоналности и ротабилности, добијају се информације у циљаним тачкама експерименталног простора. Из прикупљених података могуће је извести једноставне математичке функције које апроксимативно описују вишедимензионални експериментални простор [49,50]. Због тога предности оваквог мултиваријантног приступа у односу на традиционалан приступ појединачне евалуације факторских ефеката (енг. *One Factor at a Time, OFAT*), огледају се у повећаном квалитету информација, стицању глобалног знања о експерименталном простору, редуковању експерименталног рада и стицању увида у присуство мултифакторских интеракција и апсолутни оптимум резултата [54]. Због тога се сматра да је *DoE* ефикасан, јефтин и систематичан приступ који се може користити за дефинисање експерименталних услова чији утицај је од статистичког значаја на понашање одговора система, као и за дефинисање вредности експерименталних параметара при којима се добијају оптимални одговори система [55,56].

Дизајнирање експеримената се спроводи тако што се прво дефинишу вредности опсега фактора чији утицај се испитује, а потом се формира матрица експеримената који се изводе. *DoE* мора бити адекватно конструисан, тако да се изведе што мањи број експеримената, а да су задржане добре статистичке карактеристике, односно ротабилност и ортогоналност модела. Адекватним одабиром плана експеримената, повећава се вероватноћа проналажења, процене и контроле било ког извора варијабилности, па је могуће утицати на побољшање перформанси методе [49,57].

Употребом *DoE* експериментално се добијају резултати на основу којих се формирају математички модели, односно математичке функције које описују зависност одговора система од вредности експерименталних фактора. Овако добијене математичке функције описују понашање праћених одговора система (зависно променљивих варијабли) [57].

Генерисани математички модели подлежу статистичкој обради, помоћу које се процењује који фактори имају статистички значајне ефекте на одговоре система и које вреди детаљније испитивати и тумачити. На овај начин се рационализује употреба ресурса за даља испитивања [57]. Такође, статистичком обрадом добија се увид у адекватност регресионог модела за описивање испитаног експерименталног простора. Статистички алат који се најчешће користи за процену грешке математичког модела је тест анализе варијансе (*ANOVA*). *ANOVA* се заснива на поређењу варијација које су последица промене комбиновања факторских нивоа са варијацијама грешке мерења одговора. Додатно, поред *ANOVA* теста, за процену модела, примењује се и процена статистичке значајности регресије модела и значајности вредности *lack of fit* применом *F*-теста [54,58]. Такође, ради

се и процена укупне грешке која је последица неадекватне регресије и варијације резидуала, а грешка пореклом од резидуала је сума чисте (експерименталне) грешке и вредности *lack of fit* [58]. Процена варијације резидуала врши се визуелно на основу графички представљених вредности резидуала (енг. *residual plots*), чије вредности би требале да прате Гаусову криву нормалне расподеле, док се процена описа варијабилности података врши применом коефицијента детерминације R^2 , као и вредностима прилагођеног (енг. *adjusted, adj. R^2*) и предиктивног (енг. *predicted R^2, pred. R^2*) коефицијента детерминације [54,59].

Приликом одабира параметара који ће се испитивати задатим *DoE* треба узети у обзир да није могуће све потенцијално утицајне параметре испитивати *DoE* приступом [60]. Експериментални дизајни у којима се испитује мањи број фактора и мањи број факторских нивоа дају адекватније информације јер су једноставнији за интерпретацију, за разлику од дизајна где се испитује велики број фактора и факторских нивоа. Стога је испитивање експерименталног домена подељено на фазе, фазу скрининга и фазу оптимизације. Према томе разликују се и две врсте дизајна, скрининг и оптимизациони дизајни [57]. Такође, врста одабраног *DoE* зависи и од броја фактора који се тестира, које информације треба да се добију из касније постављеног математичког модела и која комплексност математичких односа испитаних фактора и одговора може да се испрати. За одабир најзначајнијих фактора из великог сета потенцијално утицајних фактора користе се скрининг дизајни, који немају као задатак да предвиђају међуфакторске интеракције. За то су задужени оптимизациони дизајни, тј. дизајни површине одговора, који се користе приликом детаљнијег описа експерименталног простора и комплексности односа утицајних фактора и одговора система [55].

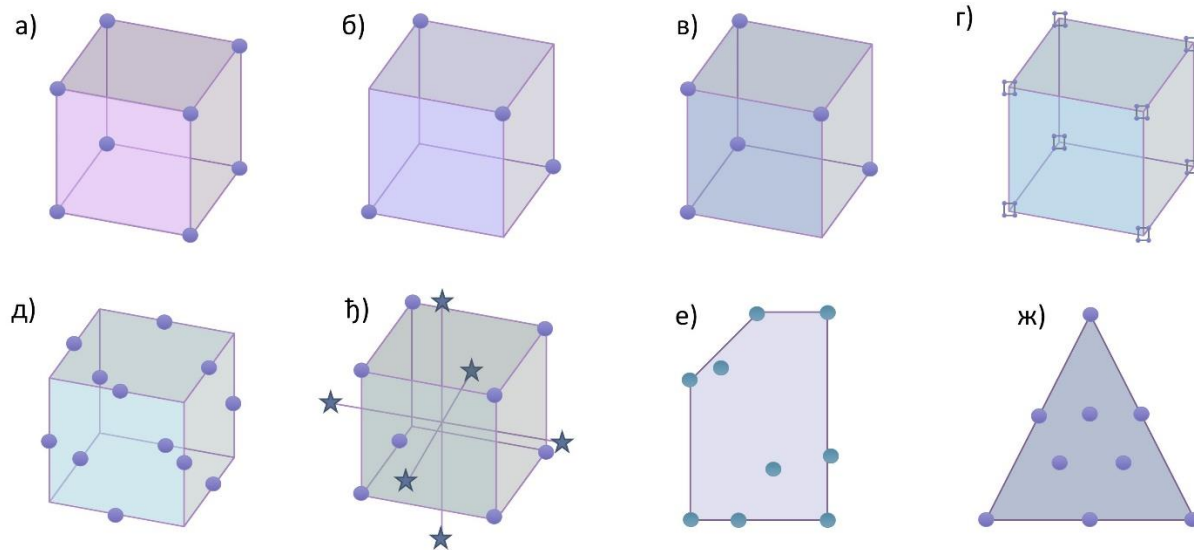
1.2.1.2.1. Скрининг дизајни

Скрининг дизајни користе се у фази одабира експерименталних параметара, из којих се као информација од интереса добија статистичка значајности испитиваних фактора, не и детаљнија процена утицаја на понашање система. Због наведеног, параметри се испитују на два нивоа вредности, дефинисани као -1 (ниска вредност фактора) и +1 ниво (висока вредност фактора), што је довољно за генерисање линеарне математичке функције. Међутим, треба узети у обзир да је одабир факторских вредности (-1 и +1 нивоа) критичан корак приликом извођења скрининг дизајна. Превише узак опсег неће указати на значајност факторског утицаја и може довести до погрешног закључка [61]. Општи облик генерисане линеарне математичке функције може да се представи следећом једначином, ако су нпр. испитана три фактора, на два нивоа вредност (једначина 4):

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \sum b_{ijk} x_i x_j x_k + \varepsilon \quad (4)$$

У приложеној једначини, y означава вредност предвиђеног одговора система (зависну варијаблу), b_0 одсечак на y оси, x_i , x_j , x_k вредности испитиваних фактора, b_i ефекат сваког фактора понаособ, b_{ij} ефекат двофакторских интеракција, а b_{ijk} вредност трофакторских интеракција, док ε указује на грешку која је последица извођења експеримената [54,57]. Важно је напоменути да апсолутне вредности коефицијената у једначини пружају увид у величину факторског ефекта, док предзнак коефицијената указује на тренд утицаја ефекта [54].

Врсте факторских дизајна који се најчешће користе у фази скрининга су Плакет-Бурманов дизајн (енг. *Plackett-Burman design*), пун факторски (енг. *Full Factorial Design, FFD*) и фракциони факторски дизајн (енг. *Fractional Factorial Design, FrFD*) (слика 4, а-в).



Слика 4 Шематски приказ распореда експерименталних тачака у дефинисаном експерименталном простору скрининг и оптимизационих дизајна: а) пун факторски дизајн, б) фракциони факторски дизајн, в) Плакет-Бурманов дизајн, г) Тагучи дизајн, д) Вокс-Бенкенов дизајн, е) централни композициони дизајн, е) D-оптимални дизајн и ж) дизајн смеше. Слика је адаптирана по узору на слике из литературе [61,62]

1.2.1.2.2. Дизајни површине одговора

Дизајни површине одговора (енг. *Response Surface Design, RSD*) су значајни приликом описивања експерименталног простора, процене међуфакторских интеракција на посматране одговоре система као и на њихово понашање у дефинисаном експерименталном простору. Циљ дизајна површине одговора је разумевање процеса који се истражује, као и проналажење комбинације вредности експерименталних параметара која ће дати најбољи могући одговор.

Дизајни површине одговора испитују вредности испитаних фактора на бар три факторска нивоа (-1, 0, +1) и могу бити симетрични, када се сваки фактор испитује на истом броју нивоа, и асиметрични, када постоје разлике у броју нивоа различитих фактора. Симетрични експериментални дизајни су: пун факторски дизајн, Бокс-Бенкенов дизајн (енг. *Box-Behnken Design, BBD*), централни композициони дизајн (енг. *Central Composite Design, CCD*) сферни и ка центру оријентисани, док се у асиметричне дизајне убрајају Доехлертова матрица (енг. *Doehlert matrix*) и D-оптимални дизајн (енг. *D-optimal design*). У току оптимизације, могу да се користе и посебне врсте експерименталних дизајна, као што су дизајни смеше (енг. *mixture design*), где, за разлику од претходно наведених дизајна, испитани фактори (независне варијабле) нису међусобно независни, већ је од p фактора, $p-1$ независно, а преостали један је зависан од вредности осталих $p-1$ фактора (слика 4).

У оптимизационим *DoE*, фактори се испитују на бар три нивоа јер експериментални простор мора бити описан функцијом која има оптимум (минимум или максимум), па математичка функција која се добија представља полином другог или трећег степена. Полиноми вишег

реда се не користе јер су веома сложени, а њихово тумачење је због тога отежано. Због тога су математичке функције које описују експериментални простор у дизајнима површине одговора углавном квадратне једначине (једначина 5).

Општи облик математичког модела површине одговора:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{12}x_1x_2+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2, \quad (5)$$

где је y предвиђена вредност одговора система, x_i вредност одабраних независних параметара, а b ефекат независно променљивог члана функције [55]. Овакве математичке функције уколико се приказују графички представљају средњу површину одговора (енг. *Mean Response Surface, MRS*). Површина одговора може да буде различитог облика, као и део експерименталног простора у ком се очекују оптимални резултати, па тако оптимални регион може да буде максимум, плато, максимум ван испитаног експерименталног простора, минимум и седална површина [58].

Оптимизациони дизајни омогућавају и симултано праћење више одговора система, а за дефинисање оптималних факторских услова, примењује се методологија мултикритеријумског одлучивања (енг. *Multicriteria Decision Making, MCDM*). Применом *MCDM* могућа је идентификација глобалног оптимума на основу компромиса између појединачних оптималних вредности (који могу бити у међусобном сукобу) [63]. Алати који су у употреби за спровођење *MCDM* су: средње вредности функција пожељних одговора, преклапање површина одговора или претраживање тачака координатног система [64].

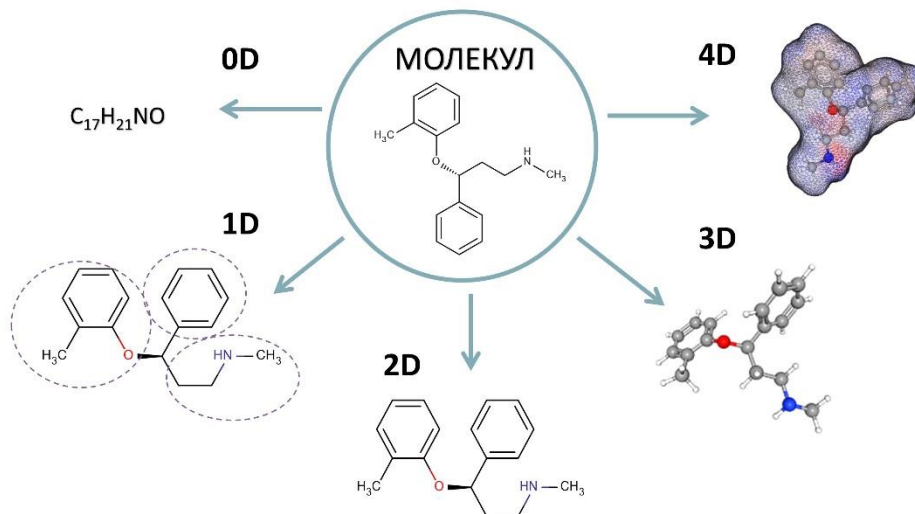
Најважнији алат *MCDM* који се примењује у оптимизацији аналитичких метода и доприноси ефикасном, економичном и објективном проналаску оптималног региона је Дерингерова функција пожељних одговора. Дерингерова функција пожељних одговора се конструише уз помоћ појединачних функција пожељних одговора. Приликом формирања укупне функције пожељних одговора узимају се у обзир функције пожељних појединачних одговора (d_i), преведене у скалу вредности од $d_i = 0$ (у потпуности непожељна вредност појединачног одговора) до $d_i = 1$ (у потпуности пожељна вредност појединачног одговора). На основу тога, применом геометријске средине свих појединачних функција пожељних одговора, пондерисане тежинама појединачних одговора добија се вредност укупне функције пожељних одговора [54,58]. Такође, вредност укупне функције пожељних одговора може да буде $D = 0$ (све вредности одговора система се сматрају непожељним) до $D = 1$ (сви одговори система испуњавају дефинисану циљну вредност). Вредност D ближа 1 означава близину глобалног оптимума, што значи да се сви одговори система приближавају својој одговарајућој циљној вредности [65,66].

1.2.1.3. Молекулски дескриптори

Молекулски дескриптори, *MD*, су нумеричка презентација молекулских структурних или физичко-хемијских особина [32,67]. Постоје два начина добијања молекулских дескриптора, експерименталним или теоријским путем, применом математичке трансформације [32,42,43]. Експериментални дескриптори се најчешће употребљавају за конструисање *LFER* модела, док се теоријски дескриптори користе у класичним *QSRR* моделима, који су разматрани у даљем тексту [32]. Експериментално добијени дескриптори односе на солватохромне параметре, чији је број ограничен на број испитаних анализата. Насупрот њима, структурни теоријски дескриптори се добијају математичком

трансформацијом и зависе само од структуре анализата, те их је могуће много брже добити у великом броју [42].

Теоријски дескриптори настају као последица математичке или логичке трансформације хемијске структуре одабраног молекула [32]. У зависности од презентације молекулске структуре на основу које се врши израчунавање дескриптора и последично врста информације која се добија из њих, теоријски дескриптори се сврставају у пет група, што је илустровано на слици 5 [67].



Слика 5 Графички приказ примера молекула који се користе за израчунавање молекулских дескриптора различитих димензионалности (0D – 4D). Слика је адаптирана по узору на слику из литературе [70]

MD који описују молекул скаларном вредности дефинишу се као *MD* нулте димензије (0D) и сматрају се конституционим дескрипторима. Они указују на основне особине једињења, као што су молекулска тежина, тип и врста атома присутних у саставу молекула. Уколико *MD* пружа информацију о линеарном приказу молекулске структуре, то су једнодимензиони (1D) дескриптори. Они често сигнализирају присуство одређених структурних фрагмената и помажу у спецификацији структурних карактеристика [67,68]. Иако су погодни за рачунање, често су исте нумеричке вредности за различите молекулске структуре, те нису пожељни за распознавање различитих структура. Из тог разлога се користе у комбинацији са дескрипторима веће информативне моћи [69]. Коришћењем планарне молекулске структуре за добијање вредности *MD*, добијају се *MD* који се сврставају у дводимензионе дескрипторе (2D). Значај 2D дескриптора огледа се у пружању информација о међусобној повезаности атома унутар молекула, као и њиховог редоследа [67,68]. Често су то дескриптори из групе тополошких индекса, профила молекула и 2D аутокореелационих дескриптора [69]. Информације о геометријској структури молекула пружају тродимензионални (3D) дескриптори [67,68]. Они се добијају на основу просторно оптимизоване молекулске структуре, те пружају информације о просторној повезаности атома, структурним аспектима молекула, стерним ефектима и хиралним центрима, као и броју хиралних центара [32,67,68]. Примери 3D дескриптора су 3D аутокореелациони дескриптори, квантно-хемијски дескриптори и дескриптори односа површине и запремине молекула. Међутим, ови дескриптори, иако су високоинформативни и могу да указују на интеракционе способности молекула, често су захтевни за рачунање. Такође, не постоји гаранција да се у реалном окружењу молекул налази у рачунарски предвиђеном геометријском облику [69]. Уколико се 3D структури дода и променљива компонента, често

временска, производе се четвородимензиони дескриптори (4D). 4D су најсложенији, јер поред просторне конфигурације атома, разматра се и њихова промена у току времена или неког другог променљивог услова. Њихово израчунавање обухвата методе за процену функционалних особина и динамичких интеракција [67,68].

Савремени алати који се употребљавају за израчунавање MD, пружају информације о вредности неколико хиљада MD, међутим нису сви довољно информативни за грађење одређеног QSRR модела. Велики број MD не значи нужно и бољи модел. Напротив, често превелики број доприноси или лажној тачности модела или представља шум у подацима, који омета грађење истог. Имајући у виду да перформансе QSRR модела у највећој мери зависе од броја и врста употребљених MD, препознавање најинформативнијих дескриптора је од суштинске важности. Адекватан одабир MD доприноси тачности модела и рационализацији времена њихове изградње [68,71]. Неколико статистичких метода се користе за одабир MD и то подразумева одређивање њихове међусобне корелације (r), процену стандардне девијације (енг. *Standard Deviation, SD*) вредности MD, али и употребу сложенијих алгоритама, као што су алгоритми машинског учења (енг. *Machine Learning Algorithms, MLA*) [67].

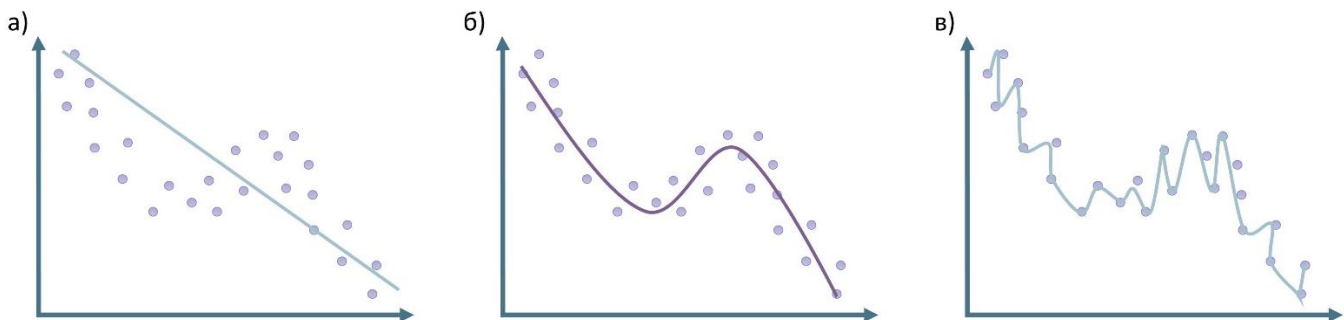
У току одабира MD за изградњу QSRR модела врши се процена вредности коефицијента корелације r , односно међусобне колинеарности дескриптора. Сматра се да дескриптори високе вредности међусобне корелације носе исту информацију, те се њихова заједничка употреба сматра сувишном. Обично је дефинисана гранична вредност коефицијента корелације r , испод које се сматра да су два MD довољно међусобно различита. Уопштено прихваћена гранична вредност за искључење MD је $|r| > 0,9$, међутим ово није универзално дефинисана вредност и подложна је корекцији у зависности од формиране базе података [44,67]. Додатно, приликом одабира MD процењује се и вредност SD, којом се указује на константне или скоро константне вредности датог дескриптора. Ови MD не указују на разлике међу испитаним структурама. У пракси се одбацују дескриптори чије су вредности SD једнаке нули или су близу нули, са најчешће дефинисаном граничном вредношћу у опсегу 0-0,1 [67].

Алгоритми који се користе за одабир информативних MD су најчешће генетски алгоритам (енг. *Genetic Algorithm, GA*), степена линеарна регресија (енг. *Stepwise Linear Regression, SLR*), вишеструка линеарна регресија (енг. *Multiple Linear Regression, MLR*) и регресија најмањих делимичних квадрата (енг. *Partial Least Square, PLS*). Методе одабира MD спроводе се према карактеристикама података и природе алгоритма за изградњу QSRR модела [68]. Такође, употреба комбинације наведених метода може значајно да допринесе бољој селекцији MD и последично изградњи модела бољих предиктивних способности [72].

1.2.1.4. Регресионе технике које се користе за изградњу QSRR модела

Базе података на основу којих се успостављају QSRR модели састоји се од великог броја варијабли (MD и EP, када је у питању мешовито моделовање) које је неопходно математички корелирати са ретенционим одговором. С обзиром да сваки дескриптор представља једну варијаблу, ради се о мултиваријантној анализи података [32]. Статистички алати који имају способност изградње регресионих модела и најчешће се користе за QSRR моделовање су линеарни регресиони модели, MLR и PLS [44]. Међутим, примећено је да овако једноставни модели немају способност адекватне апроксимације истовремених ефеката фактора у комплексним системима. Са друге стране, алгоритми машинског учења, MLA, који припадају

области вештачке интелигенције, имају способност искуственог препознавања правилности и образаца из похрањених података, те се сматрају погоднијим за овакву врсту моделовања. *MLA*, за разлику од линеарних регресионих модела, имају способност препознавања и прилагођавања нелинеарним обрасцима понашања [32,44,73]. Такође, често имају и нижу грешку приликом предвиђања резултата, што треба прихватити са резервом. Претерано тренирање *MLA* (енг. *overfitting*) може довести до модела који ће превише бити прилагођен подацима на основу којих је модел изграђен, што последично води неадекватном предвиђању модела примењеног на новим подацима (слика 6) [32,73]. Упркос томе, присуство комплексних и нелинеарних образаца понашања анализата у *MMLC* системима, ипак доводи до тога да би примена *MLA* била боља техника избора у односу на једноставније линеарне регресионе моделе.



Слика 6 Графички приказ предвиђања у односу на стварне вредности података код а) недовољно тренираног модела б) адекватно тренираног модела и в) претренираног модела. Слика је адаптирана по узору на слику из интернет извора [74]

1.2.1.4.1. Алгоритми машинског учења у служби успостављања *QSRR* модела

Алгоритми машинског учења се сврставају у област вештачке интелигенције (информатичка научна област која се бави симулацијом људске интелигенције) са способношћу анализе података самосталним прилагођавањем похрањеним подацима, без експлицитно уведеног кода и математичке релације [75].

MLA се разликују по начину учења, односно тренирања модела. Уколико се алгоритам тренира на подацима са познатим исходима, сматра се да је његово учење надгледано, док уколико се од алгоритма очекује самостално извођење закључака из похрањених података, без дефинисаних очекивања, учење алгоритма је ненадгледано [76]. Алгоритми који се тренирају надгледаним учењем укључују регресиону анализу, k најближих суседа (енг. *k-Nearest Neighbor, k-NN*), Бајесово учење вероватноће, машине потпорних вектора (енг. *Supporting Vector Machine, SVM*), случајне шуме (енг. *Random Forests, RF*) и вештачке неуронске мреже (енг. *Artificial Neural Networks, ANN*). Алгоритми који се тренирају употребом ненадгледаног учења су анализа главних компоненти (енг. *Principal Component Analysis, PCA*), кластер анализа и друге мање релевантне технике у изградњи *QSRR* модела [69]. *MLA* алгоритми који су се показали одговарајућим за *QSRR* моделовање су *PCA*, хијерархијске кластер анализа, стабла одлучивања (енг. *Decision Trees, DT*), *ANN* и регресија потпорним векторима (енг. *Supporting Vector Regression, SVR*) [43,77].

Употреба алгоритама машинског учења показује предност приликом изградње модела за описивање комплексних система као што је *MMLC*, јер је примећено да једноставни регресиони модели, не могу адекватно да процене симултане ефекте вишеструких фактора због немогућности прилагођавања сложеним ретенционим обрасцима [32,44,73].

У студијама које су разматрале вишеструке *MLA* алгоритме за изградњу *QSRR* модела установљено је да алгоритми засновани на стаблима одлучивања могу да покажу предност у односу на друге употребљене алгоритме. Тако су *Fine et al.* [78] за потребе *QSRR* моделовања разматрали *RF*, *SVR*, *PLS*, где су се *RF* показали као најбољи. Осим тога, *Mazraedoost et al.* [79] су разматрали градијентно појачана стабла одлучивања (енг. *Gradient Boosted Trees, GBT*), *Ridge* регресију, *PLS* и *RF*, од којих се *GBT* издвојио као најпожељнији алгоритам. Такође, *Krmar et al.* [53] су показали да се поред већине линеарних и нелинеарних алгоритама (линеарна регресија, *Ridge* регресија, *Lasso* регресија, *ANN*, *SVR*, *RF*, *GBT* и *k-NN*), које су користили за изградњу *QSRR* модела, *GBT* издвојио као најбољи.

Иако се на основу наведених студија не може закључити универзално најбољи *MLA*, *GBT* је показао одређене предности приликом изградње *QSRR* модела, те је из тог разлога разматран као одговарајући алгоритам у даљем раду.

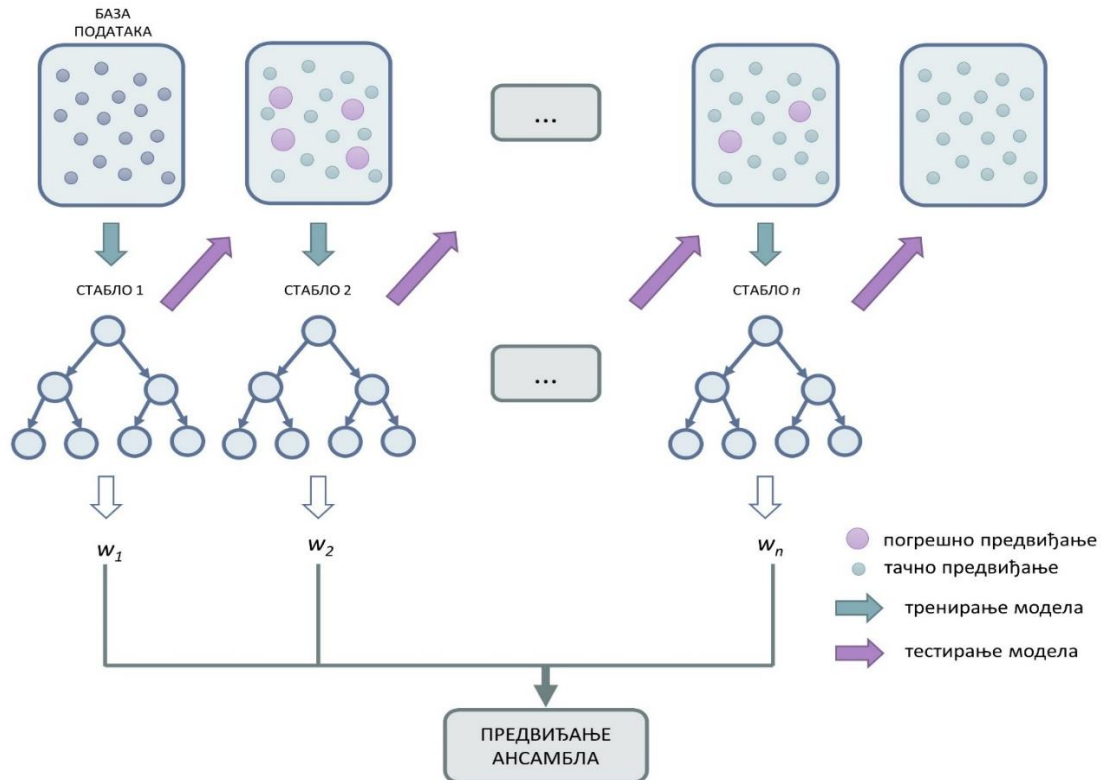
1.2.1.4.2. Градијентно појачана стабала одлучивања

Градијентно појачана стабла одлучивања, *GBT*, је алгоритам машинског учења који је сачињен од вишеструких сетова (ансамбала) стабала одлучивања уз примену појачавања (енг. *boosting*), тј. прилагођавања методом градијентног спуста. Атрактивност *GBT* алгоритма је последица присуства обједињених пожељних карактеристика и стабала одлучивања и технике појачавања [80].

Стабла одлучивања моделују зависну променљиву применом рекурзивне бинарне поделе улазних варијабли, раздвајајући простор вредности излазне варијабле на хомогене регионе са нормално распоређеним грешкама предвиђања. Она могу да се изграђују на подацима различитих типова и размера, при чему су неосетљиви на присуство екстремних (енг. *outliers*) и недостајућих вредности. Такође, *GBT* има способност обраде великог броја улазних варијабли и међу њима могућност препознавања и издвајања релевантних, чиме превазилазе критичан корак у *QSRR* моделовању, одабир улазних варијабли. Међутим, и поред бројних предности, на резултат модела може значајно утицати редослед похрањених случајева, али се ипак њихова тачност и робусност могу повећати појачавањем [80].

Појачавање је метода прилагођавања која комбинује једноставније моделе ради постизања бољих предиктивних перформанси. Оно секвенцијално прилагођава модел циљном одговору, смањујући функцију губитка додавањем новог стабла. Уколико се као метода прилагођавања користи метода градијентног спуста добија се *GBT*. Стога је коначни *GBT* модел линеарна комбинација многих стабала, од којих свако представља један члан у регресионом моделу [80]. Стабла на које се примењује појачавање се прилагођавају скупу података на основу којих су тренирани, додељујући им ажуриране тежине (важност похрањеног случаја), а стабла се у ансамбл додају постепено [81]. Веће тежине се додају случајевима који су претходно погрешно класификовани. Поред тога, *GBT* има способност класификовања улазних варијабли према њиховој значајности утицаја на одговор система, што је од велике важности за *QSRR* моделовање. На тај начин се повећава тачност и ефикасност модела, јер се издвајају најинформативније карактеристике [67]. Стога, *GBT*

може смањити и пристрасност (енг. *bias*) и варијансу, али и грешку модела, што није уобичајена карактеристика *MLA*[67,81]. Приказ изградње модела илустрован је на слици 7.



Слика 7 Илустровани шематски приказ функционисања *GBT* алгоритма машинског учења. Слика је адаптирана по узору на литературу [82]

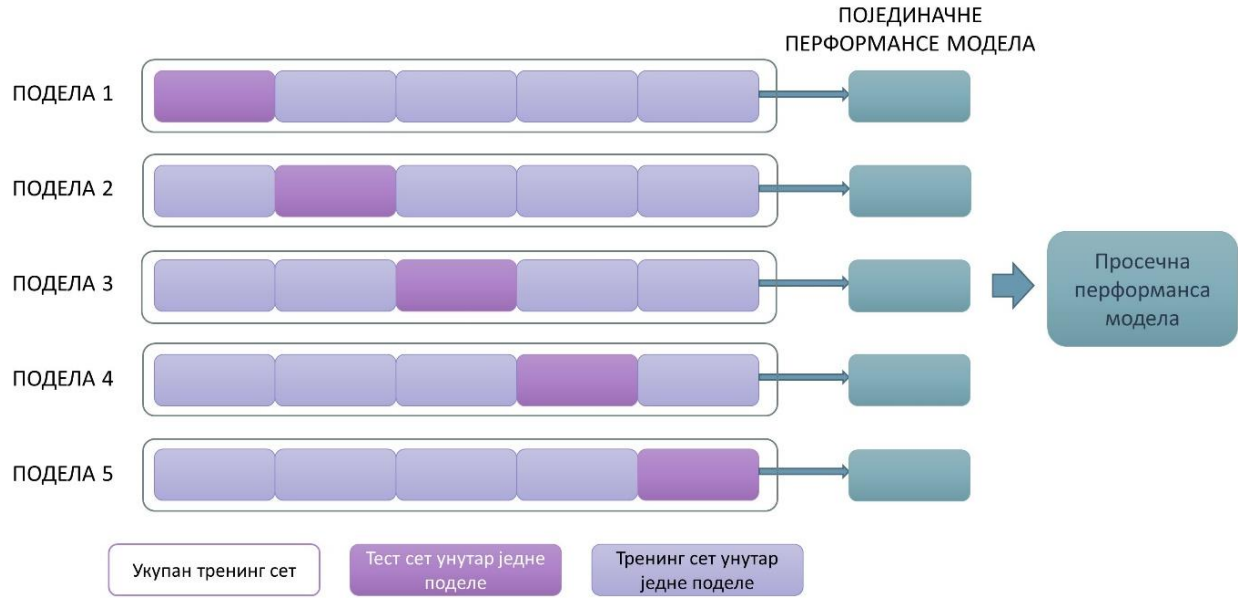
Добијање адекватног модела употребом *GBT* алгоритма је под утицајем вредности хиперпараметара, односно подесивих варијабли које контролишу понашање *GBT* модела. Карактеристични хиперпараметри *GBT* модела који су подложни оптимизацији су број стабала (енг. *Number of Trees*), дубина дрвећа (енг. *Tree Depth*), стопа учења (енг. *Learning Rate*) и други. Подешавањем и оптимизацијом вредности хиперпараметара модела утиче се на смањење пристрасност и варијансе модела, што последично води ка смањењу грешке модела. Због бројности хиперпараметара *GBT* алгоритма, изградња *GBT* модела може да буде захтевна, што представља један од главних недостатака поменутог алгоритма [83].

1.2.1.5. Валидација *MLA* модела

Процена поузданости *QSRR* модела, изграђених применом *MLA*, врши се процесом валидације. У зависности од употребљеног дела базе података приликом моделовања и приликом потврде предиктивних способности, разликују се интерна и екстерна валидација.

Интерна валидација подразумева потврду квалитета модела на делу сета података употребљених у процесу моделовања, док се за екстерну валидацију употребљавају подаци непознати моделу. Приступ интерне валидације се заснивају на вишеструкој (енг. *n-fold*), изостави једног (енг. *leave-one-out, LOO*) или изостави много (енг. *leave-many-out, LMO*) унакрсној валидацији (енг. *cross validation, CV*). Вишеструка унакрсна валидација (енг. *n-fold*

CV) подразумева развој n модела, генерисаних на различитим деловима претходно подељене базе података на приближно n једнаких делова, сваки пут изостављајући други n -ти део базе података. Овако генерисани модел даје упросечене резултате претходно развијених n модела. Уколико је n једнак броју случајева у прикупљеној бази података, говори се о изостави једног унакрсној валидацији, *LOO-CV*. Изостави много унакрсна валидација, *LMO-CV*, односи се на насумично одабран сет случајева, који се изостављају приликом изградње модела, а поступак се зарад добијања поузданијих резултата понавља неколико пута (слика 8). У поређењу са интерном, екстерна валидација пружа значајнију потврду исправности модела имитирањем стварне ситуације и потврђује његову функционалност у реалном окружењу [50].



Слика 8 Графички приказ употребе делова базе података у унакрсној валидацији математичких модела. Слика адаптирана по узору на интернет извор [84]

Валидационе метрике које су у употреби за процену квалитета *QSRR* модела су: вредности корена средње квадратне грешке (енг. *Root Mean Square Error, RMSE*), њене процентуално изражене вредности (енг. *Percent of Root Mean Square Error, %RMSE*) као и коефицијент детерминације (енг. *Coefficient of Determination, Q²*). Дефинисани параметри метрике изражавају се за изграђен модел примењен и на тренинг и тест сет података. Њихове сличне вредности указују на модел са добром способношћу предвиђања. Међутим вредности за тест сет се узимају у обзир приликом процене квалитета и предиктивне способности развијеног модела [85]. Вредности *RMSE*, *%RMSE* и *Q²* израчунавају се према следећим математичким изразима (једначине 6-8):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}, \quad (6)$$

$$\%RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i})^2}{n}} \times 100, \quad (7)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}, \quad (8)$$

Где је n број случајева, y_i експерименталне вредности ретенционог одговора, $\hat{y}_i$ моделом предвиђене вредности одговора, а $\bar{y}$ је просечна вредност експерименталних вредности одговора [50,85].

На основу приказаних параметара процењују се перформансе модела [50]. У одређеним ситуацијама грешка предвиђања развијеног *QSRR* модела, не може да пружи довољно прецизне информације [48]. Један од начина да се смањи грешка модела је да се молекули класификују према својој сличности и да се развијају такозвани локални модели [44,72,86,87]. Модели који обухватају широк спектар нефилтрираних података, често означени као глобални, могу да се сусрећу са неважним информацијама и високим степеном шума у подацима (енг. *noise*). Одабир релевантних података у складу са жељеним молекулским особинама често резултира редукцијом шума и нижом генерисаном грешком [72]. Међутим, иако локални модели имају нижу грешку, имају смањену способност генерализације, односно смањену способност препознавања универзалних образаца понашања [68]. Дакле, обе врсте модела имају своје предности и сврху примене.

1.3. Предности, ограничења и примена течне хроматографије мешовитих режима

MMLC је последњих година у интересној сфери аналитичара због запажених бројних предности технике. *MMLC* има могућност боље контроле ретенције анализата различитих физичко-хемијских особина због истовременог присуства вишеструких интеракција, те је јединственом анализом могуће раздвојити анализате широког распона поларности (поларне, неполарне, јонизоване и нејонизоване анализате). Раздвајању оваквих смеша погодује могућност утицаја на селективност, односно промена редоследа елуирања под утицајем састава мобилне фазе, што је разматрано у делу 1.1.2 Увода [15,16,19]. Такође, *MMLC* због својих карактеристика служи као алтернатива унимодалној хроматографији или може да се примењује као њој комплементарна метода [20]. Осим као замена унимодалним режимима, може да се користи и као замена *2D* хроматографским сепарационим техникама (*2D-LC*). Када се примењује степенасти елуциони програм мобилне фазе у *MMLC*, обезбеђује се додатна димензија аналитичких метода, јер се у сваком елуционом кораку испољава другачија комбинација интеракција између анализата и стационарне фазе. Такође *MMLC* је у поређењу са *2D* хроматографијом једноставнија за употребу, јер може да се користи на класичном *HPLC* уређају [18]. Висок потенцијал примене *MMLC* у *2D-LC* анализи показали су *Kazarian et al.* [88], где су успешно применили комбинацију *RP/IEC* и *HILIC* колона за свеобухватну анализу јона (органских и неорганских анијона и катјона), активних фармацеутских супстанци (енг. *Active Pharmaceutical Ingredient, API*) и ексципијенаса, раздвојивши укупно 23 различита анализата. Метода је успешно примењена на сируп за кашаљ *Robitussin®*.

Иако је употреба *MMLC* највише заступљена у аналитици пептида и протеина, због способности ступања у различите врсте интеракција са различитим деловима биомолекула, нашла је одговарајуће место и у аналитици лекова. *MMLC* је успешно примењена у аналитици фармацеутских супстанци малих молекулских маса, активних и помоћних, испитивању њихових контрајона, као и у испитивању целокупног састава фармацеутске формулације [15,18,19].

Примена *MMLC* за испитивање *API* приказана је у неколико радова. *Grybinik et al.* [1] су у свом раду успешно испитали 16 *API*, употребом различитих *MMLC* система добијених употребом

Acclaim mixed-mode колона, (*RP/WCX*, *RP/WAX*, *RP/HILIC*). Поред тога, *MMLC* системи су успешно употребљени за профилисање нечистоћа разноврсних *API*, као што су L-метионин [89], вигabatрин [90] и топирамат [91]. Такође, *Lemasson et al.* [92] су употребили бимодалне и тримодалне *MMLC* колоне за профилисање нечистоћа неколико различитих *API*.

MMLC се у анализи лекова посебно истакла у испитивању фармацеутски значајних контрајона. *API* се често синтетишу у облику соли због боље биорасположивости, чија је заступљеност процењена у 43% случајева за комерцијално доступне лекове [93,94]. Испитивање активних супстанци у облику соли изискује и испитивање њихових контрајона. Њихова контрола се врши приликом идентификације и контроле активне супстанце у току синтезе, ради потврде генерисаног облика соли и искључења могућности формирања других облика соли [95]. Испитивање контрајона захтева примене комплексних метода, поготово уколико су јони сличних физичко-хемијских карактеристика. Раздвајање јона различитих наелектрисања захтева употребу различитих аналитичких техника, а неретко и примену *2D-LC* [96]. Јонска хроматографија са кондуктивним детектором је често техника избора, међутим употреба различитих колоне и мобилних фаза за катјоне и анјоне, чини је ресурсно захтевном [97]. За разлику од наведеног, *MMLC* пружа напреднију могућност испитивања контрајона, јер вишеструки механизми обезбеђују селективност међу њима и омогућава испитивање позитивних и негативних јона јединственом методом [14,15,18]. Тако су *Zhang et al.* [97] успешно раздвојили 25 различитих контрајона, најчешће присутних у *API*, употребом колоне са интегрисаним *RP/CEX/AEX* механизмима. Такође, успешну сепарацију контрајона употребом *MMLC* показали су *Streuli et al.* [95] раздвојивши укупно 14 контрајона учестало присутних у пептидима и *API*. Додатно, *Li et al.* [98] су приказали могућност квантификације неорганских јона из олигонуклеотидних лекова употребом *AEX/CEX/HILIC* ретенционих механизма.

MMLC је нашла своје место и у профилисању нечистоћа фармацеутских производа. Поред деградационих нечистоћа које структурно наликују активној фармацеутској супстанци, у смеси се могу наћи и нечистоће које потичу из производног процеса формулације или полазних сировина, а које могу значајно да се разликују у погледу физичко-хемијских особина у односу на активну супстанцу [18]. Тако су *Samara et al.* [99] развили методу применом приступа аналитичког квалитета заснованог на дизајну (енг. *Analytical Quality by Design*, *AQbD*) за испитивање хидрохлортиазида, дилтиазема и пропранолола из *3D* штампане формулације употребом *RP/WCX* бимодалне *Acclaim mixed-mode WCX-1* колоне.

Бројни ексципијенси који се користе у формулацијама лекова су веома поларне или јонизоване супстанце како би својом растворљивостју обезбедиле ослобађање и последично апсорпцију *API* у погодним партијама дигестивног тракта. Високо поларне супстанце у *RP-HPLC* методама имају тенденцију неретенционог понашања на стационарној фази, пратећи пик мобилне фазе, што отежава њихово испитивање. Да би се омогућило одговарајуће ретенционо понашање оваквих ексципијенаса, пожељно је да хроматографска колона поседује поларне групе које ће интераговати са њима. *MMLC* у том случају може да служи као алтернатива *RP-HPLC* [18]. Тако је за потребе испитивања поливинилпиролидона, често коришћеног ексципијенса у фармацеутским препаратима, употребљена комбинација *SEC/IEX* сепарационих механизма, у раду *Mahgoub et al.* [100].

Свеобухватну примену *MMLC* у анализи различитих *API* (хидрофилних и хидрофобних), контрајона и присутних ексципијенаса, употребом тримодалне хроматографске колоне *Acclaim Trinity P1*, показали су *Kazarian et al.* [101]. Развијене су две методе које су потом успешно примењене на готове лекове, прашкове за инхалацију, *Flixotide* и *Spiriva*.

Претходно описана доступна литература углавном указује на примену *MMLC* у аналитици лекова, међутим истраживање сепарационих механизма у *MMLC* системима је слабије заступљено. Недостатак суштинског разумевања присутних механизма ретенције и хроматографског понашања анализата у *MMLC* систему при различитим експерименталним условима је често разлог изостанка њене практичне примене [17]. Сprovedена је неколицина студија које су за циљ имале појашњење *MMLC* ретенционих механизма, међутим сваки систем је скуп засебних карактеристика, те изведени закључци нису универзални за различите комбинације интеракција.

Доступно је неколико научних истраживања која се баве испитивањем *MMLC* ретенционих механизма применом *OFAT* приступа. Међутим, због једноставности присутна, није доступан свеобухватан увид у заступљене ретенционе процесе [1,16,102]. *Stevenson et al.* [103] су *OFAT* приступом описали ретенционе механизме *Scherzo SM-18* колоне. *Aral and Dağ* [102] су на сличан начин спровели опсежно испитивање ретенционог понашања различитих група анализата (поларних и неполарних) и описали ретенционе механизме присутне у *RP/HILIC* бимодалној *Acclaim mixed-mode HILIC-1* колони. *OFAT* приступом у комбинацији са семиемпиријским моделима (*LSER*) *Lemasson et al.* [16] су описали ретенционе механизме присутне у *Acclaim mixed-mode WCX-1* колони. Употреба семиемпиријских модела је обезбедила дубљи увид у разумевање ретенционих процеса. Тако су употребом семиемпиријских модела *Bernardi et al.* [104] спровели истраживање механизма присутних у *CEX/RP* систему. *Obradović et al.* [105] су истраживали *Acclaim mixed-mode HILIC-1* колону уз помоћ семиемпиријских модела и класичног *QSRR* моделовања. Одређено разумевање присутних интеракција у *MMLC* системима, испољених под утицајем експерименталних параметара, обезбеђено је и у току развоја аналитичких метода применом *DoE*, што је приказано у радовима *Samara et al.* [99] и *Badea et al.* [106]. *Samara et al.* [99] су указали на утицај експерименталних параметара на ретенцију одабраних анализата на *Acclaim mixed-mode WCX-1* колони, док су *Badea et al.* [106] указали на утицај експерименталних параметара на сепарацију антихипертензивних лекова употребом *Hypersil Duet C18/SCX* колоне. *Frerichs et al.* [107] су спровели испитивање ретенционих механизма *RP/AEX MMLC* система на молекуларном нивоу применом калкулација молекуларне динамике.

И поред наведених доступних литературних података, *MMLC* системи се ипак сматрају недовољно истраженим, што практичну употребу чини изазовнијом. Сложено ретенционо понашање анализата под утицајем интеракционе варијабилности система је узрок њеног ограниченог разумевања. Поред тога, бројност експерименталних фактора од утицаја, углавном мобилне фазе, последично доприноси потребном повећаном обиму експерименталног рада и утрошку ресурса за развој и имплементацију *MMLC* метода [2,20,108]. Имплементација мешовитих *QSRR* модела у току испитивања *MMLC* система значајно може да допринесе не само њиховом разумевању, већ и практичној распрострањености. Они пружају могућност увида у ретенционо понашање анализата који нису унапред експериментално испитани у сету експерименталних услова који нису унапред дефинисани. У досадашњим истраживањима усмереним на проучавање *MMLC* ретенционих механизма, мешовити *QSRR* модели нису примењивани.

MMLC системи код којих су заступљене комбинације *RP/WCX* и *RP/HILIC* механизма, могу у великој мери да покрију потребе аналитике лекова малих молекулских маса. Овакав одабир бимодалних система је последица учесталих физичко-хемијских карактеристика *API* у погледу поларности и способности јонизације у аналитичким *pH* условима. Учесталост

функционалних група базних карактеристика у молекулима лековитих супстанци је разлог одабира катјонског измењивача [109]. Осим тога, слаб катјонски измењивач има предност над јаким због повећане могућности манипулације експресијом интеракција [110]. *HILIC* режим је често у употреби у аналитици молекула веома поларних карактеристика, међутим не обједињује анализу умерено и високо поларних анализата. Употреба *HILIC* у комбинацији са *RP* режимом би могла да допринесе њиховој обједињеној анализи [86].

Сходно свему наведеном, развој мешовитих *QSRR* модела омогућио би разумевање ретенционих процеса одабраних *MMLC* система (*RP/WCX* и *RP/HILIC*) на молекуларном нивоу, уједно обезбеђујући предвиђање ретенционих карактеристика како познатих, тако и моделима непознатих анализата, у читавом дефинисаном експерименталном простору. На овај начин би се такође обезбедила боља практична искористљивост аналитичког потенцијала течне хроматографије мешовитих режима у аналитици лекова малих молекулских маса, уз ефикаснији и рационалнији развој *MMLC* метода.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ предметног истраживања је стицање увида у присутне ретенционе механизме у *MMLC* системима погодних за анализу лекова малих молекулских маса различитих физичко-хемијских карактеристика. Истраживање је усмерено на *MMLC* системе који обухватају комбинације хидрофилних, хидрофобних и интеракција слабе катјонске измене, односно на бимодалне *RP/WCX* и *RP/HILIC* системе. Ови системи имају пожељне способности интераговања са лековима малих молекулских маса због њихове базне и умерено поларне природе. Дубље разумевање ових система треба да обезбеди рационалнији развој *MMLC* метода и приближи употребу *MMLC* система аналитичарима.

Циљеви истраживања обухваћени докторском дисертацијом су:

- 1) Испитивање међумолекулских интеракција присутних у *RP/WCX* бимодалном хроматографском систему развојем мешовитих *QSRR* модела са способношћу предвиђања ретенционог понашања лекова малих молекулских маса:
 - Дефинисање експерименталних фактора од утицаја на ретенционо понашање молекула у зависности од њихових јонизационих способности и поларности у *RP/WCX* хроматографском систему;
 - Развој и валидација глобалног и локалних мешовитих *QSRR* модела употребом *MLA-GBT* и процена способности предвиђања ретенционог понашања анализата у *RP/WCX* хроматографском систему;
 - Процена присутних ретенционих механизма у *RP/WCX* хроматографском систему на основу високо позиционираних фактора од утицаја (молекулских особина и експерименталних фактора) у мешовитим *QSRR* моделима.
- 2) Испитивање потенцијала примене *RP/WCX* хроматографског система у аналитичкој смеси лекова малих молекулских маса:
 - Развој *RP/WCX* хроматографске методе за сепарацију анализата заступљених у различитим јонским врстама (катјонских и анијонских облика молекула лекова) применом *DoE*;
 - Развој *RP/WCX* хроматографске методе за сепарацију молекула лекова исте јонске врсте (смеша катјона), сродних фармаколошких карактеристика применом *DoE*;
 - Развој *RP/WCX* хроматографских метода за сепарацију позитивно наелектрисаних неорганских контрајона (K^+ и Na^+) присутних у солима диклофенака применом *DoE*, употребом различитих растварача у мобилној фази, уз праћење еколошке прихватљивости развијених метода.
- 3) Испитивање међумолекулских интеракција *RP/HILIC* хроматографског система развојем мешовитих *QSRR* модела, са способношћу предвиђања ретенционог понашања лекова малих молекулских маса:
 - Дефинисање експерименталних фактора од утицаја на ретенционо понашање молекула у зависности од њихових јонизационих способности и поларности у *RP/HILIC* бимодалном хроматографском систему;

- Развој и валидација глобалног и локалних мешовитих *QSRR* модела, употребом *MLA-GBT* и процена предвиђања ретенционог понашања анализата у *RP/HILIC* хроматографском систему;
- Процена присутних ретенционих механизма у *RP/HILIC* хроматографском систему на основу високо позиционираних фактора од утицаја (молекулских особина и експерименталних фактора) у мешовитим *QSRR* моделима.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Општи део

3.1.1. Референтне стандардне супстанце, растварачи и реагенси

Стандардне супстанце

Есциталопрам-оксалат (*Janssen Pharmaceutica NV*, Берсе, Белгија)
Рисперидон (*Janssen Pharmaceutica NV*, Берсе, Белгија)
Донепезил-хидрохлорид (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Бисопролол-фумарат (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Нафазолин-хидрохлорид (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Триметоприм (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Арипипразол (*Orchid Chemicals & Pharmaceuticals Ltd*, Ченај, Индија)
Атомоксетин (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Доксazosин-месилат (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Лофексидин-хидрохлорид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Фенотерол-хидробромид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Тетрахидразолин-хидрохлорид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Лидокаин-хидрохлорид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Пропранолол-хидрохлорид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Резорцинол (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Бетаметазон (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Преднизолон (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Хидрокортизон (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Триамцинолон-ацетонид (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Флуоцинолон-ацетонид (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Секнидазол (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Парацетамол (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Кофеин (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Фенобарбитал (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Химекромон (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Хлорамфеникол (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Напроксен-натријум (*Krka*, Ново Место, Словенија)
Ибупрофен (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Кеторолак-трoметамин (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Диклофенак-калијум (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
Кетопрофен (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Ацеклофенак (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Етодолак (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Бензоева киселина (*Tokyo Chemical Industry*, Токио, Јапан)
Диклофенак-калијум (*Krka*, Ново Место, Словенија)
Диклофенак-натријум (*Krka*, Ново Место, Словенија)
N-ацетилцистеин (*Krka*, Ново Место, Словенија)
Ацетилсалицилна киселина (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Фуросемид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Фенилефрин-хидрохлорид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
Гликлазид (*Krka*, Ново Место, Словенија)
Прокаин-хидрохлорид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)

Псеудоефедрин-хидрихлорид (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
 Салбутамол-сулфат (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Салицилна киселина (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Моклобемид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Трамадол-хидрохлорид (*Krka*, Ново Место, Словенија)
 Аминофилин (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Бромазепам (*Hemofarm AD*, Вршац, Србија)
 Диазепам (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Етофилин (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Лоразепам (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Ципротерон-ацетат (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Дипрофилин (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Оксазепам (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Мегестрол-ацетат (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Карбамазепин (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Метилпреднизолон (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Пентоксифилин (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Теофилин (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)

Растварачи

Ацетонитрил *HPLC* чистоће (*ACN; Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Ацетон (*ACE; Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Дејонизована вода

Реагенси

Амонијум-хидроксид (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Амонијум-ацетат (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)
 Глацијална сирћетна киселина (*Sigma Aldrich Chemie, GmbH*, Тауфкирхен, Немачка)

3.1.2. Аналитичка опрема

Millipore Simplicity 185 систем за пречишћавање воде (*Billerica*, Масачусетс, САД);
pH-метар са комбинованом *pH* електродом *RHM 220 (Radiometer)*, Копенхаген, Данска);
 Мембрански филтри величине пора од 0,22 µm, (*Kinesis Inc.*; Чикаго, САД);
 Систем за филтрирање мобилне фазе (*Whatman 47 mm Glass/mesh*)
 Аналитичка вага (*Sartorius Werke GmbH*, Гетинген, Немачка)
 Ултразвучно купатило (*Fungalab*, Барселона, Шпанија)
 (U)*HPLC* систем *Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific)*, Волтам, МА, САД):

- *Dionex Ultimate 3000* течни хроматограф
- Детектор фотодиода (енг. *Photo Diode Array – PDA*)
- Детектор наелектрисања у аеросолу *CORONA* (енг. *Charged Aerosol Detector - CAD*)
- Програм за обраду података *Chromeleon 7.0 Chromatography Data System*

HPLC систем *Vanquish Core (Thermo Fisher Scientific)*, Волтам, МА, САД):

- *Vanquish Core* течни хроматограф
- Детектор фотодиода, *PDA*
- Програм за обраду података *Chromeleon 7.3 Chromatography Data System*

Колона *Acclaim Mixed-Mode WCX-1*, 2,1 x 150 mm, 3 μ m величина честица стационарне фазе (*Thermo Fisher Scientific*, Волтам, МА, САД)

Претколона *Acclaim Mixed-Mode HILIC-1*, 4,6 x 10 mm, 5 μ m величина честица стационарне фазе (*Thermo Fisher Scientific*, Волтам, МА, САД)

Колона *Acclaim Mixed-Mode HILIC-1*, 4,6 x 150 mm, 5 μ m величина честица стационарне фазе (*Thermo Fisher Scientific*, Волтам, МА, САД)

3.1.3. Рачунарски програми

Chromeleon 7.3 Chromatography Data System (*Thermo Fisher Scientific*, Волтам, МА, САД)

Chromeleon 7.0 Chromatography Data System (*Thermo Fisher Scientific*, Волтам, МА, САД)

Design-Expert 7.0.0. (*Stat-Ease, Inc.*, Минеаполис, САД)

Marvin Sketch 6.1.6 (*Chem Axon Ltd.*, Будимпешта, Мађарска)

ChemDraw 8.0 (*Cambridge Soft Corporation*, Кембриџ, САД)

Chem3D Ultra 8.0 (*Cambridge Soft Corporation*, Кембриџ, САД).

AlvaDesc software 2.0.6 (*Alvascience Srl*, Леко, Италија)

PaDel-Descriptor 2.21 (*National University of Singapore*, Сингапур), екстензија за *RapidMiner Studio 9.10.0.0* [111]

RapidMiner Studio 9.10.0.0 (*RapidMiner*, Бостон, МА, САД)

Microsoft Office Excel 2016 (*Microsoft Corporation*, Редмонд, ВА, САД)

AGREE калкулатор (*University of Vigo*, Виго, Шпанија)

3.1.4. Припрема узорака

Припрема основних раствора:

Основни раствори су припремани одмеравањем 5 mg стандардне супстанце на аналитичкој ваги која је квантитативно пренесена у одмерни суд запремине 5 mL и растворена у смеси ацетонитрила и воде у односу 50/50 (% *v/v*). Раствори су држани у ултразвучном купатилу у трајању од 5 минута, са циљем поспешивања растварања стандардне супстанце. Овако су добијени основни раствори стандардних супстанци у концентрацијама од 1 mg/mL. Основни раствор сваке стандардне супстанце је припреман појединачно.

Припрема радних раствора стандардних супстанци:

Радни раствори стандардних супстанци су припремани одмеравањем 0,5 mL основног раствора стандардне супстанце, квантитативно пренето у одмерни суд од 5 mL, који је потом допуњен смешом ацетонитрила и воде у односу 50/50 (% *v/v*). Раствори су држани у ултразвучном купатилу у трајању од 5 минута, са циљем хомогенизације припремљеног раствора. Концентрације радних раствора стандардних супстанци су износиле 100 μ g/mL. Радни раствор сваке стандардне супстанце припреман је појединачно.

Припрема радног раствора за испитивање смеше анализата различитих јонских врста:

Радни раствор коришћен у испитивању смеше молекула различитих јонских врста припреман је у одмерном суду од 5 mL. У одмерни суд од 5 mL одмерено је и квантитативно пренето по 0,5 mL основног раствора сваке стандардне супстанце (ибупрофена, ацецлофенака, есциталопрама, арипипразола и атомоксетина). Одмерни суд од 5 mL је потом допуњен смешом ацетонитрила и воде у односу 50/50 (% *v/v*). Раствор је држан у ултразвучном купатилу у трајању од 5 минута, са циљем хомогенизације припремљеног

раствора. Концентрација сваке стандардне супстанце у радном раствору је износила 100 µg/mL.

Припрема радног раствора за испитивање смеше анализата исте јонске врсте:

Радни раствор коришћен у испитивању смеше молекула истих јонизационих облика (смеша адренергика) припреман је у одмерном суду од 5 mL. У одмерни суд од 5 mL одмерено је и квантитативно пренето по 0,5 mL основног раствора сваке стандардне супстанце (биспролол, фенотерол, доксazosин, тетрахидразолин, лофексидин). Одмерни суд од 5 mL је потом допуњен смешом ацетонитрила и воде у односу 50/50 (% v/v). Раствор је држан у ултразвучном купатилу 5 минута, са циљем хомогенизације припремљеног раствора. Концентрација сваке стандардне супстанце у радном раствору је износила 100 µg/mL.

Припрема раствора за испитивање соли диклофенака:

Основни раствори коришћени у испитивању контрајона соли диклофенака припремани су појединачно у концентрацији од 1 mg/mL растварањем стандардних супстанци одмерених на аналитичкој ваги (10,740 mg диклофенак-натријума и 11,286 mg диклофенак-калијума). Одмерена маса стандардне супстанце је квантитативно пренета у одмерни суд запремине 10 mL. Стандардна супстанца је растворена врстом растварача која је коришћена као мобилна фаза у HPLC анализи. За развој методе у којој је коришћен ацетонитрил, стандардна супстанца је растворена у смеси ацетонитрила и дејонизоване воде у односу 40/60 (% v/v). За развој методе у којој је коришћен ацетон у саставу мобилне фазе, супстанца је растворена у смеси ацетона и дејонизоване воде у односу 50/50 (% v/v). Сваки основни раствор стандардне супстанце припреман је појединачно.

Радни раствори коришћени у испитивању контрајона соли диклофенака припремани су растварањем 0,5 mL основних раствора стандардних супстанци које су квантитативно пренете у одмерне судове од 5 mL, који су потом допуњени смешом растварача који одговара употребљеној мобилној фази. За развој методе у којој је коришћен ацетонитрил у саставу мобилне фазе, одмерни судови су допуњени смешом ацетонитрила и дејонизоване воде у односу 40/60 (% v/v). За развој методе у којој је коришћен ацетон у саставу мобилне фазе, одмерни судови су допуњени смешом ацетона и дејонизоване воде у односу 50/50 (% v/v). Раствори су држани у ултразвучном купатилу у трајању од 5 минута, са циљем хомогенизације припремљених раствора. Концентрације радних раствора су износиле 100 µg/mL. Концентрације јона у радним стандардним растворима у односу на концентрацију диклофенака су износиле 12,86 µg/mL калијума и 7,40 µg/mL натријума. Сваки радни раствор стандардне супстанце припреман је појединачно.

3.1.5. Припрема воденог дела мобилне фазе

Водени део мобилне фазе припреман је као раствор одговарајућег односа одмерене масе амонијум-ацетата и запремине концентроване сирћетне киселине. У зависности од pH вредности и концентрације соли, употребљене су маса амонијум-ацетата и запремина концентроване сирћетне киселине наведених у табелама 2-4. Одмерена маса амонијум-ацетата, на аналитичкој ваги, квантитативно је пренесена и растворена дејонизованом водом у суду одговарајуће запремине (дефинисане у табелама 2-4). Потом је у одмерни суд додата дефинисана запремина глацијалне сирћетне киселине (99,5 %, v/v), након чега је одмерни суд допуњен до ознаке дејонизованом водом. Припремљеном раствору је потом измерена pH вредност, pH-метром, а фино подешавање pH вредности спроведено је

употребом концентроване сирћетне киселине или концентрованог амонијум-хидроксида. Водени део мобилне фазе (пуфер амонијум-ацетата и сирћетне киселине) је филтриран употребом вакуумског система за филтрирање, кроз најлонски филтер величине промера пора 0,22 μm .

Табела 2 Састав ацетатно-амонијачног пуфера коришћеног у саставу мобилне фазе за испитивање *RP/WCX* система и развоју метода за молекуле истих и различитих јонизационих облика

<i>C</i> [mM]	<i>pH</i>	3,8	4,7	5,6
	Састав у 1000 mL воде			
20	CH ₃ COONH ₄ [g]	0,1542	0,7176	1,3469
	CH ₃ COOH [μ L]	1036,9	608,9	145,3
30	CH ₃ COONH ₄ [g]	0,2312	1,0792	2,0203
	CH ₃ COOH [μ L]	7,9	920,6	226,5
40	CH ₃ COONH ₄ [g]	0,3083	1,4353	2,6979
	CH ₃ COOH [μ L]	2071,3	1217,8	288,5

Табела 3 Састав ацетатно-амонијачног пуфера коришћеног у саставу мобилне фазе за испитивање контрајона у солима диклофенака

<i>C</i> [mM]	<i>pH</i>	4,6	5	5,4
	Састав у 250 mL воде			
30	CH ₃ COONH ₄ [g]	0,23703	0,37612	0,47040
	CH ₃ COOH [μ L]	255,05	150,8	80,4
50	CH ₃ COONH ₄ [g]	0,39403	0,62670	0,78395
	CH ₃ COOH [μ L]	425,1	252,0	134,1
70	CH ₃ COONH ₄ [g]	0,55162	0,87762	1,09752
	CH ₃ COOH [μ L]	595,1	351,8	187,7

Табела 4 Састав ацетатно-амонијачног пуфера коришћеног у саставу мобилне фазе за испитивање *RP/HILIC* система

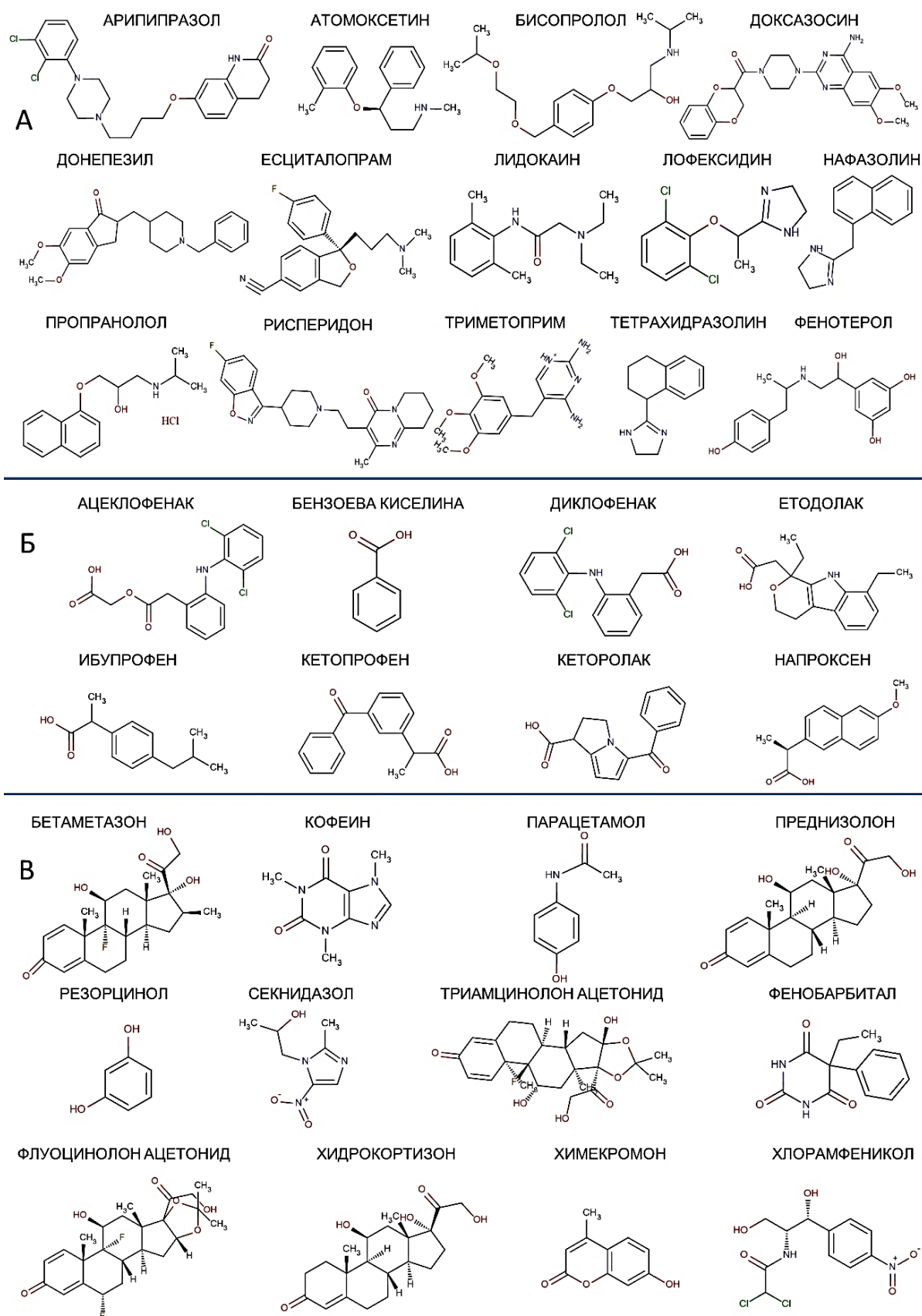
<i>C</i> [mM]	<i>pH</i>	3.78	4.17	4.75	5.33	5.72
	Састав у 500 mL воде					
20,00	CH ₃ COONH ₄ [g]			0,38451		
	CH ₃ COOH [μ L]			288,0		
26,08	CH ₃ COONH ₄ [g]		0,2053		0,7646	
	CH ₃ COOH [μ L]		596,83		187,55	
35,00	CH ₃ COONH ₄ [g]	0,13104		0,8864		1,2456
	CH ₃ COOH [μ L]	911,0		509,22		99,5
43,92	CH ₃ COONH ₄ [g]		0,353		1,3323	
	CH ₃ COOH [μ L]		1005,0		267,9	
50,00	CH ₃ COONH ₄ [g]			0,96353		
	CH ₃ COOH [μ L]			720,0		

3.2. Хроматографски услови примењени у току испитивања *RP/WCX* хроматографског система

Процена разноврсног интеракционог потенцијала *Acclaim Mixed-Mode WCX-1* колоне вршила се праћењем ретенционих карактеристика 34 молекула лекова малих молекулских маса различитог јонизационог потенцијала и поларности.

Сет испитаних анализа обухвата следеће молекуле: есциталограм-оксалат, рисперидон, донепезил-хидрохлорид, биспролол-фумарат, нафазолин-хидрохлорид, триметоприм, арипипразол, атомоксетин, доксazosин-месилат, лофексидин-хидрохлорид, фенотерол-хидрохлорид, тетрахидразолин-хидрохлорид, лидокаин-хидрохлорид, пропранолол-хидрохлорид, резорцинол, бетаметазон, преднизолон, хидрокортизон, триамцинолон ацетонид, флуцинолон ацетонид, секнидазол, парацетамол, кофеин, фенобарбитал, химекромон, хлорамфеникол, напроксен-натријум, ибупрофен, кеторолак-триметамин, диклофенак-калијум, кетопрофен, ацеклофенак, етодолак, бензоева киселина. Молекулске структуре приказане су на слици 9.

Експерименти су спроведени на *Dionex Ultimate 3000 HPLC* систему употребом *Acclaim Mixed-Mode WCX-1* (3 μm , 2,1 x 150 mm) колоне. Примењена је мобилна фаза састављена од смеше ацетонитрила и ацетатно-амонијачног пуфера, дефинисаног односа према плану експеримената који је наведен у табели 6 (детаљније описан у делу 3.2.1 овог поглавља). Проток мобилне фазе је био подешен на 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, уз изократско елуирање. Температура колоне је варирана у опсегу 30 – 38 $^{\circ}\text{C}$, према дефинисаном плану експеримената (табела 6). Инјектовано је 10 μL узорка, који је термостатиран на 20 $^{\circ}\text{C}$. Аналити су детектовани *PDA* детектором на таласним дужинама 221 nm, 242 nm и 247 nm. Резултати су праћени употребом софтверског система *Chromeleon® 7.0 Chromatography Data System*.



Слика 9 Шематски приказ геометријских структура молекула анализата коришћених за испитивање *RP/WCX* система присутних у облику А) катјона, Б) анијона, и В) неутралних молекула

3.2.1. План експеримената, *DoE*, за испитивање мултифакторског утицаја на ретенцију анализата у *RP/WCX* систему

План експеримената за испитивање експерименталних параметара конструисан је употребом софтвера *Design Expert 7.0.0*. Одабрани експериментални параметри испитани су према Централном композиционом дизајну – оријентисаном ка центру (енг. *Face-centered Central Composite Design, FC-CCD*).

Узимајући у обзир конструкцију *FC-CCD*, која се састоји од факторског дизајна (2^l), звезда дизајна ($2l$) и централне тачке C_p , са једнаким вредностима фактора у звезда и факторском дизајну, број експеримената који је у употреби у *FC-CCD* се рачуна према следећој једначини бр. 9:

$$N = 2^l + 2l + C_p, \quad (9)$$

где l представља број независних експерименталних варијабли, а C_p број понављања у централној тачци [58,112].

На основу прелиминарних испитивања, дефинисани су експериментални параметри који су од статистички значајног утицаја за ретенционо понашање анализата у *RP/WCX* хроматографском систему. Удео органског растварача (ACN , %, v/v), концентрација пуфера воденог дела мобилне фазе (C , mM), pH вредност воденог дела мобилне фазе и температура колоне (T , °C) су у зависности од врсте анализата укључени у испитивање утицаја на ретенционо понашање анализата путем експерименталног дизајна. За позитивно наелектрисане јоне у дефинисаном оптимизационом дизајну испитан је утицај ACN (%, v/v), pH , C (mM) и T (°C), за јоне негативног наелектрисања испитан је утицај удела ACN (%, v/v), pH и T (°C), док је за молекуле неутралног облика испитан утицај ACN (%, v/v) и T (°C). Распон вредности експерименталних фактора укључених у испитивање приказан је у табели 5.

Табела 5 Вредности факторских нивоа коришћених у централном композиционом дизајну - оријентисаном ка центру за испитивање *RP/WCX* система

Експериментални фактори	-1 ниво	0 ниво	+1 ниво
Садржај ацетонитрила [%, v/v], x_1	30	40	50
pH пуфера, x_2	3,8	4,7	5,6
Концентрација пуфера [mM], x_3	20	30	40
Температура колоне [°C], x_4	30	34	38

Дефинисани експериментални параметри су испитани пратећи генерисан план експеримената, који је приказан у табели 6. Број експеримената потребних за спровођење *FC-CCD*, зависи од броја испитаних фактора и рачуна се према једначини 9. Тако за испитивање различитих група анализата изведен је следећи број експеримената:

- за сваки аналит у катјонском облику $l = 4$ (ACN , pH , C , T) и спроведено је $N = 25$ експеримената (табела 6а),
- за сваки аналити анјонског облика $l = 3$ (ACN , pH , T) и спроведено је $N = 15$ експеримената (табела 6б)
- за сваки молекул неутралног облика $l = 2$ (ACN , T) и спроведено је $N = 9$ експеримената (табела 6в).

Табела 6 Централни композициони дизајн - ка центру оријентисан а) све приказане комбинације фактора су испитане за катјоне б) за анјоне су испитане комбинације подвучених вредности, в) и за неутралне молекуле испитане су комбинације фактора чије вредности су подебљане. У табели су приказане кодиране и стварне вредности експерименталних фактора коришћених у дизајну експеримената.

	x_1	x_2	x_3	x_4	ACN [%, v/v]	pH	C [mM]	T [°C]
Пун факторски дизајн	<u>-1</u>	<u>-1</u>	-1	<u>-1</u>	<u>30</u>	<u>3,8</u>	20	<u>30</u>
	<u>-1</u>	<u>-1</u>	-1	<u>1</u>	<u>30</u>	<u>3,8</u>	20	<u>38</u>
	-1	-1	1	-1	30	3,8	40	30
	-1	-1	1	1	30	3,8	40	38
	-1	1	-1	-1	30	5,6	20	30
	-1	1	-1	1	30	5,6	20	38
	<u>-1</u>	<u>1</u>	1	<u>-1</u>	<u>30</u>	<u>5,6</u>	40	<u>30</u>
	<u>-1</u>	<u>1</u>	1	<u>1</u>	<u>30</u>	<u>5,6</u>	40	<u>38</u>
	<u>1</u>	<u>-1</u>	-1	<u>-1</u>	<u>50</u>	<u>3,8</u>	20	<u>30</u>
	<u>1</u>	<u>-1</u>	-1	<u>1</u>	<u>50</u>	<u>3,8</u>	20	<u>38</u>
	1	-1	1	-1	50	3,8	40	30
	1	-1	1	1	50	3,8	40	38
	1	1	1	-1	50	5,6	40	30
	1	1	1	1	50	5,6	40	38
	<u>1</u>	<u>1</u>	-1	<u>-1</u>	<u>50</u>	<u>5,6</u>	20	<u>30</u>
	<u>1</u>	<u>1</u>	-1	<u>1</u>	<u>50</u>	<u>5,6</u>	20	<u>38</u>
Звезда дизајн	<u>-1</u>	<u>0</u>	0	<u>0</u>	<u>30</u>	<u>4,7</u>	30	<u>34</u>
	<u>1</u>	<u>0</u>	0	<u>0</u>	<u>50</u>	<u>4,7</u>	30	<u>34</u>
	<u>0</u>	<u>-1</u>	0	<u>0</u>	<u>40</u>	<u>3,8</u>	30	<u>34</u>
	<u>0</u>	<u>1</u>	0	<u>0</u>	<u>40</u>	<u>5,6</u>	30	<u>34</u>
	0	0	1	0	40	4,7	40	34
	0	0	-1	0	40	4,7	20	34
	<u>0</u>	<u>0</u>	0	<u>-1</u>	<u>40</u>	<u>4,7</u>	30	<u>30</u>
	<u>0</u>	<u>0</u>	0	<u>1</u>	<u>40</u>	<u>4,7</u>	30	<u>38</u>
Централна тачка	<u>0</u>	<u>0</u>	0	<u>0</u>	<u>40</u>	<u>4,7</u>	30	<u>34</u>

3.2.2. Изградња сета података – дефинисање улазних и излазне варијабле

Приликом изградње сета података дефинисане су улазне и излазне вредности променљивих варијабли за испитане анализе. Улазне варијабле представљају експериментални параметри (ACN [%, v/v], pH , C [mM], T [°C]) и софтверски израчунати молекулски дескриптори. Док је као излазна варијабла одабрана математичка трансформација ретенционог фактора ($k^{1/3}$).

Вредности експерименталних фактора у дефинисаном сету података уврштени су према плану експеримената описаном у поглављу 3.2.1. Експерименталног дела.

Вредности молекулских дескриптора су софтверски израчунате на основу софтверски генерисане молекулске тродимензионалне структуре анализата. Молекули у дводимензионом простору (2D) су креирани уз помоћ *ChemDraw 8.0* софтвера, а потом су добијене тродимензионалне молекулске структуре (3D) у највероватнијем просторном положају молекула на основу интрамолекулских сила и атомских односа, оптимизацијом у *Chem3D Ultra 8.0* софтверу. Током оптимизације 3D структуре, молекули су подвргнути молекуларно-механичкој оптимизацији након чега је примењена полуемпиријска метода, *MOPAC*, теорија *PM3*. Применом *Marvin Sketch 6.1.6* софтвера на 3D оптимизоване молекулске структуре, рачуната су јонизациона стања молекула, удели представљених јонских облика под дефинисаним pH условима и *pKa* вредности молекула. Вредности молекулских дескриптора су израчунате употребом *AlvaDesc* софтвера, на основу претходно описаних оптимизованих 3D молекулских структура. Вредности молекулских дескриптора су израчунате за сваки од присутних јонских облика молекула (процењених *Marvin Sketch 6.1.6* софтвером) у дефинисаним pH условима. Вредности MD које су употребљене у сету података подвргнутог моделовању, рачунате су узимајући у обзир удео заступљених молекуларних облика одређеног анализата (јонизованог или нејонизованог). Број иницијално израчунатих MD је редукован пратећи следећа статистичка правила, чиме се обезбедило смањење великог скупа разматраних карактеристика: (1) MD који су међусобно у високој корелацији су искључени из сета података задржавањем само једног и елиминисањем других ($r \geq |0,85|$ за глобални модел [113], $r \geq |0,9|$ за локалне моделе [85]), (2) MD са ниском стандардном девијацијом ($SD < 0,0001$ [85]) нису узети у обзир, због њиховог незнатног доприноса међусобном разликовању молекула током развоја модела.

Вредности излазне варијабле (k) подвргнуте су математичкој трансформацији. Она се примењује на основу процењене асиметричности расподеле вредности података (енг. *skewness*). Математичка трансформација вредности излазне варијабле се примењује у циљу стабилизације варијансе дистрибуције и приближавању дистрибуције података Гаусовој криви нормалне расподеле [114]. На основу добијених резултата, образложених у делу 4.1.2 Резултата и дискусије, примењена је математичка трансформација кубног кореновања на вредности ретенционих фактора, $k^{1/3}$.

3.2.3. Изградња глобалног и локалних мешовитих QSRR модела употребом GBT алгоритма

Изградња мешовитих QSRR модела је спроведена применом GBT алгоритма, за успостављање регресионе везе између вредности независних фактора (MD и EP) и вредности ретенционог фактора на које је примењена математичка трансформација ($k^{1/3}$).

Приликом испитивања интеракционог потенцијала мултимодалног система развијена су четири мешовита QSRR модела:

- глобални модел (енг. *Global GBT*, *G-GBT_{RP/WCX}*), изграђен на основу комплетно генерисаног сета података,
- локални модел за катјоне (енг. *Local Cation GBT*, *LC-GBT_{RP/WCX}*), изграђе коришћењем подскупа података који обухвата само катјоне,
- локални модел за анјоне (енг. *Local Anion GBT*, *LA-GBT_{RP/WCX}*), изграђен коришћењем подскупа података који обухвата само анјоне,
- локални модел за неутралне молекуле (енг. *Local Neutral GBT*, *LN-GBT_{RP/WCX}*), изграђен коришћењем подскупа података који обухвата само неутралне молекуле.

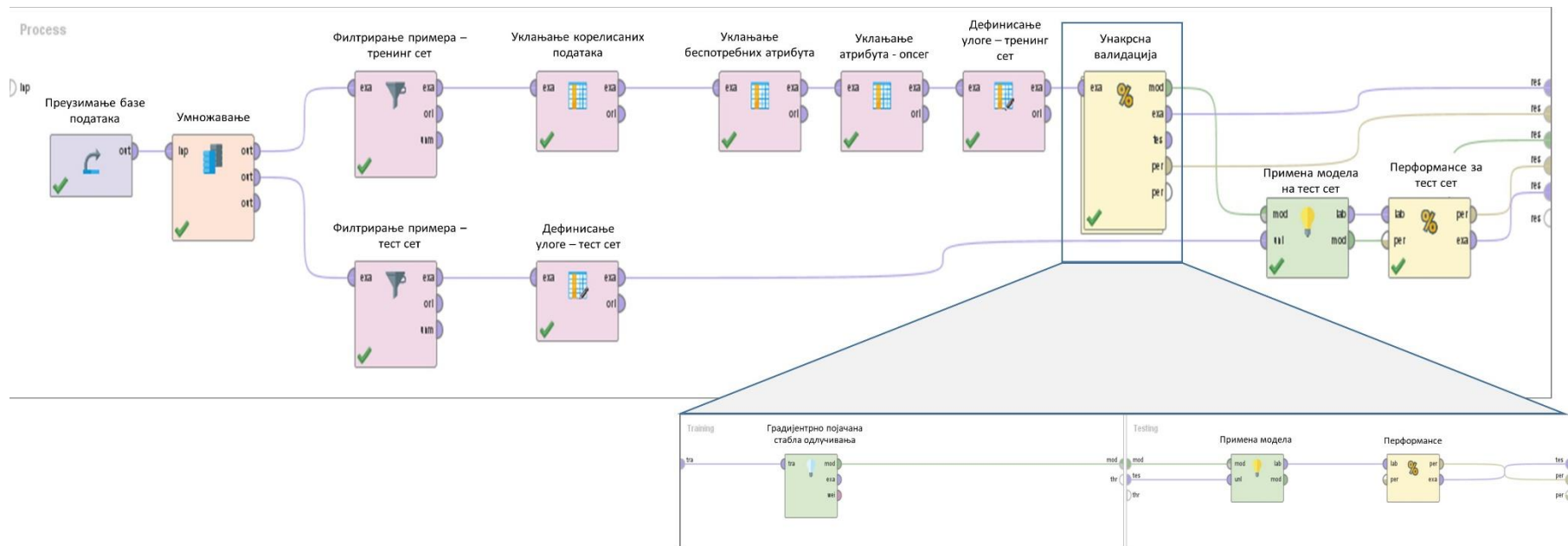
Локални модели су генерисани на основу података молекула који су показали сличност у способности јонизације (пре него структурну сличност). Наиме, препознати су слични трендови утицаја експерименталних параметара на њихово ретенционо понашање, а самим тим и сличност ретенционих образаца понашања анализата.

За развој глобалног модела, $G\text{-}GBT_{RP/WCX}$, формирана је база података која обухвата укупно 578 експеримената. Број експеримената произилази из броја испитаних молекула (14 молекула у облику катјона, 12 молекула у неутралном облику и 8 у облику анјона) који је помножен бројем потребних експеримената за сваки аналит према $FC\text{-}CCD$ (описано у делу 3.2.1. овог поглавља). Потом је база података подељена на тренинг и тест сет, тако да је 80% података коришћено за тренирање и интерну валидацију модела, а преосталих 20% за тестирање, односно екстерну валидацију модела [72,115]. Тако су подаци за 28 анализата (12 молекула у облику катјона, 10 молекула у неутралном облику и 6 молекула у облику анјона), односно 480 експеримената, коришћени за развој глобалног модела. За интерну валидацију употребљен је приступ десетоструке унакрсне валидације, (енг. *10-fold cross validation*), што подразумева поделу тренинг сета података на 10 једнаких делова, и приликом тренирања 10 модела, сваки пут се изоставља други сегмент поделе података. После оваквог тренирања индивидуална предвиђања модела су упросечена [72]. Преостали део података за 6 супстанци (2 молекула у облику катјона, 2 молекула у неутралном облику и 2 у облику анјона), укупно 98 експеримената, коришћени су за тестирање, односно екстерну валидацију модела. Екстерна валидација је спроведена тако што је развијени модел примењени на вредности тест сета података, који је био сачињен од ретенционих података за следеће супстанце: биспролол-фумарат, нафазолин-хидрохлорид, напроксен-натријум, кетопрофен, флуоцинолон-ацетонид и секнидазол. Вредности из тест сета података нису биле у употреби приликом развоја и тренирања модела, па је на тај начин симулирана реална примена развијених модела [72].

За развој локалних модела су коришћени подскупови експеримената из претходно описане базе података, који се односе само на одабране групе анализата (молекули у облику катјона, анјона или неутрални молекули). Односно, за изградњу и интерну валидацију $LC\text{-}GBT_{RP/WCX}$ модела коришћен је сет података за 12 молекула катјона, укупно 300 експеримената, а за његову екстерну валидацију тест сет који обухвата вредности за 2 молекула, укупно 50 експеримената. За изградњу и интерну валидацију локалног $LA\text{-}GBT_{RP/WCX}$ модела коришћен је сет података за 6 молекула анјона, укупно 90 експеримената и тест сет вредности за 2 молекула анјона, укупно 30 експеримената. За изградњу и интерну валидацију $LN\text{-}GBT_{RP/WCX}$ модела коришћен је сет података за 10 молекула у неутралном облику, укупно 90 експеримената и тест сет за 2 неутрална молекула, укупно 18 експеримената. У свим моделима спроведена је интерна валидацију приступом десетоструке унакрсне валидације. Одабране тест супстанце за екстерну валидацију су биле исте као и у току развоја $G\text{-}GBT_{RP/WCX}$ модела.

Евалуација перформанси модела извршена је помоћу: корена средње квадратне грешке процене, $RMSEE$ (енг. *RMSE of Estimation*), корена средње квадратне грешке предвиђања, $RMSEP$ (енг. *RMSE of Prediction*), њихових процентуално изражених вредности, $\%RMSEE$ (енг. *%RMSE of Estimation*) и $\%RMSEP$ (енг. *%RMSE of Prediction*) и коефицијентима детерминације – унакрсне валидације (Q^2_{cv}) и екстерне валидације (Q^2_{ext}). Њихове вредности су рачунате према математичким формулама 6-8, наведених у делу 1.2.1.5 Увода.

Процес изградње мешовитих *QSRR* модела спроведен је *RapidMiner Studio 9.10.0.0* софтвером. Шематски приказ оператора употребљених у току изградње модела у *RapidMiner* софтверу приказани су на слици 10.

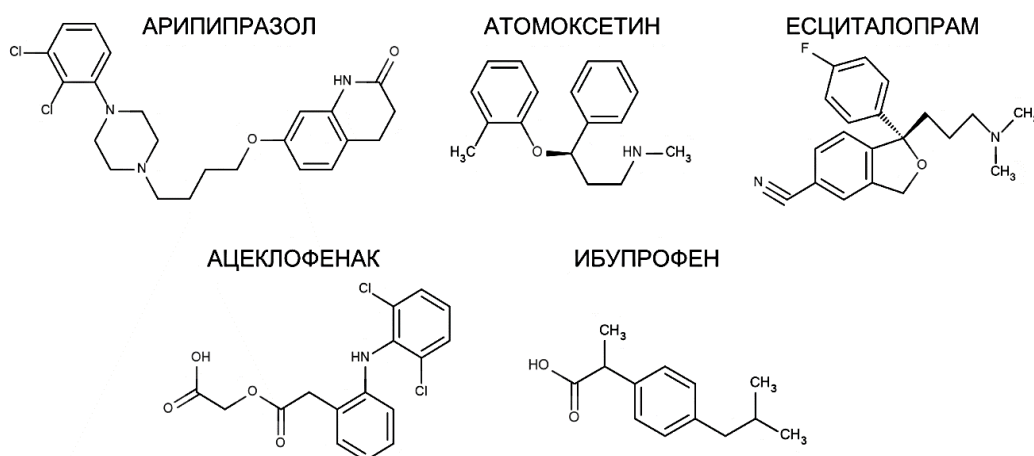


Слика 10 Шематски приказ оператора за изградњу QSRR модела у RapidMiner Studio 9.10.0.0 софтверу

3.3. Експериментални услови за развој метода за испитивање лекова у *RP/WCX* систему

3.3.1. Експериментални услови за испитивање смеше анализата различитих јонских врста

За истовремено хроматографско испитивање сета молекула супротног јонизационог потенцијала коришћена је смеша киселих (ибупрофен и ацеклофенак) и базних анализата (есциталопрам, арипипразол и атомоксетин). Структуре анализата приказане су на слици 11. Узорак је припреман на начин описан у поглављу 3.1.4. Експерименталног дела.



Слика 11 Приказ геометријских структура анализата: ацеклофенака, ибупрофена, арипипразола, атомоксетина и есциталопрама

Експерименти су извођени на *Dionex Ultimate 3000 HPLC* систему. Употребљена је колона *Acclaim Mixed-Mode WCX-1* (3 μm , 2,1 x 150 mm). Инјектована је запремина од 10 μL узорка. Аналикти су детектовани употребом *UV/Vis DAD Ultimate 3000* детектора на таласним дужинама 221 nm, 242 nm и 247 nm. Резултати су забележени употребом *Chromeleon® 7.0 Chromatography Data System* софтвера. Употребљена је мобилна фаза дефинисаног односа ацетонитрила и ацетатно-амонијачног пуфера. Удели и састав мобилне фазе дефинисани су употребљеним експерименталним дизајном (табела 8). Проток мобилне фазе је износио 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, пратећи изократско елуирање. Температура колоне је подешавана према дефинисаном експерименталном дизајну (табела 8).

Експериментални фактори од значаја су испитани према оптимизационом дизајну *FC-CCD*. Испитани фактори и вредности факторских нивоа приказани су у табели 7.

Табела 7 Вредности факторских нивоа коришћених у Централном композиционом дизајну - оријентисаном ка центру у току оптимизације методе за сепарацију анализата истог и различитог јонизационог потенцијала

Експериментални фактори	-1 ниво	0 ниво	+1 ниво
Садржај ацетонитрила [% v/v], x_1	30	40	50
<i>pH</i> пуфера, x_2	3,8	4,7	5,6
Концентрација пуфера [mM], x_3	20	30	40
Температура колоне [°C], x_4	30	34	38

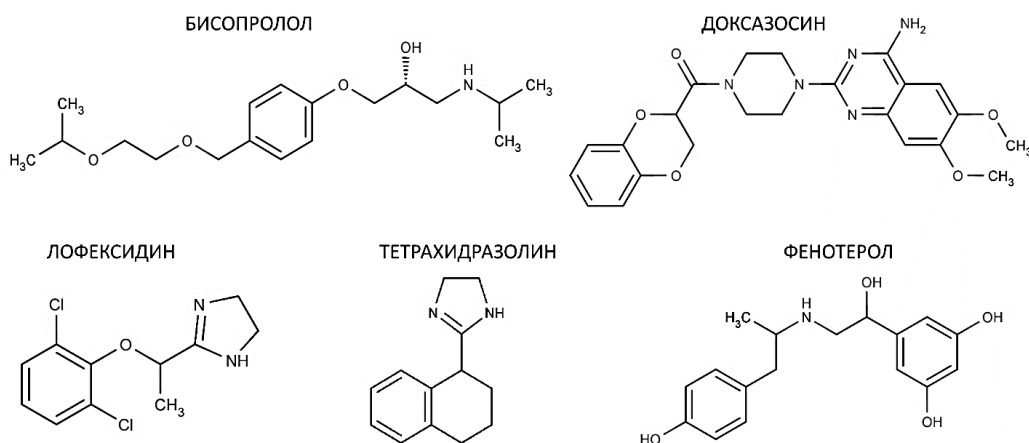
План експеримената за испитивање утицаја експерименталних услова на ретенционо понашање анализата конструисан је употребом софтвера *Design Expert 7.0.0* и приказан је у табели 8. Употребом *Design Expert 7.0.0* добијени су и математички модели који описују понашање одговора у читавом експерименталном простору. Њихова статистичка значајност процењена је применом *ANOVA* теста, на основу вредности *lack of fit*, коефицијента детерминације (R^2), прилагођеног коефицијента детерминације (*adj. R²*) и предиктивног коефицијента детерминације (*pred. R²*). Вредности експерименталних фактора које су оптималне за раздвајање одабраних анализата су одређене употребом *MCDM* и Дерингерове функције пожељних одговора, на основу дефинисаних циљних вредности одговора система.

Табела 8 Централни композициони дизајн - оријентисан ка центру примењеног у оптимизацији метода за сепарацију анализата истог и различитог јонизационог потенцијала

	x_1	x_2	x_3	x_4	$ACN [\%, v/v]$	pH	$C [mM]$	$T [^{\circ}C]$
Пун факторски дизајн 2 ⁴	-1	-1	-1	-1	30	3,8	20	30
	-1	-1	-1	1	30	3,8	20	38
	-1	-1	1	-1	30	3,8	40	30
	-1	-1	1	1	30	3,8	40	38
	-1	1	-1	-1	30	5,6	20	30
	-1	1	-1	1	30	5,6	20	38
	-1	1	1	-1	30	5,6	40	30
	-1	1	1	1	30	5,6	40	38
	1	-1	-1	-1	50	3,8	20	30
	1	-1	-1	1	50	3,8	20	38
	1	-1	1	-1	50	3,8	40	30
	1	-1	1	1	50	3,8	40	38
	1	1	1	-1	50	5,6	40	30
	1	1	1	1	50	5,6	40	38
	1	1	-1	-1	50	5,6	20	30
	1	1	-1	1	50	5,6	20	38
Звезда дизајн	-1	0	0	0	30	4,7	30	34
	1	0	0	0	50	4,7	30	34
	0	-1	0	0	40	3,8	30	34
	0	1	0	0	40	5,6	30	34
	0	0	1	0	40	4,7	40	34
	0	0	-1	0	40	4,7	20	34
	0	0	0	-1	40	4,7	30	30
	0	0	0	1	40	4,7	30	38
Централна тачка	0	0	0	0	40	4,7	30	34

3.3.2. Експериментални услови за испитивање смеше анализата исте јонске врсте

За испитивање хроматографског понашања молекула истог јонског облика коришћена је смеша следећих адренергичких лекова: бисопролол, фенотерол, доксазосин, тетрахидразолин и лофексидин. Графички приказ геометријских структура испитаних анализата приказан је на слици 12. Сви анализи у смеши показују базне особине и могућност формирања позитивно наелектрисаних јона у одабраном опсегу pH вредности. Основни и радни раствори припремани су на начин описан у делу 3.1.4. Експерименталног дела.



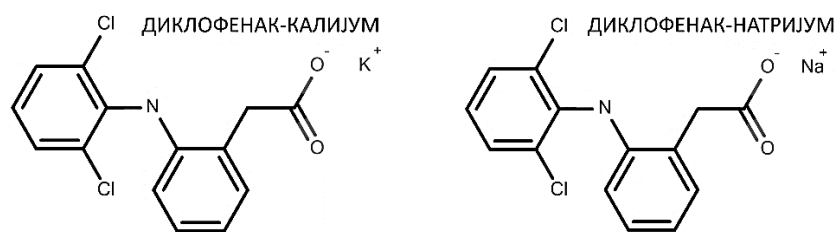
Слика 12 Графички приказ геометријских структура испитиваних анализата: бисопролола, доксазосина, лофексидина, тетрахидразолина и фенотерола

Хроматографски услови употребљени за оптимизациони дизајн истоветни су са условима описаним у делу 3.3.1 овог поглавља. План експеримената добијен је применом *Design Expert 7.0.0* софтвера, и одговара плану експеримената који је приказан у табелама 7 и 8.

Употребом *Design Expert 7.0.0* конструисани су и математички модели који описују понашање одговора у читавом експерименталном простору. Њихова статистичка значајност процењена је применом *ANOVA* теста, на основу вредности *lack of fit* и проценом R^2 , *adj. R^2* и *pred. R^2*. Вредности експерименталних фактора које су оптималне за раздвајање одабраних анализата су одређене употребом *MCDM* и Дерингерове функције пожељних одговора, на основу дефинисаних циљних вредности одговора система.

3.3.3. Експериментални услови испитивања соли диклофенака и присутних контрајона

За испитивање соли диклофенака и његових контрајона коришћени су раствори диклофенак-натријума и диклофенак-калијума припреманих на начин описан у делу 3.1.4. Експерименталног дела. Графички приказ 2D структура соли диклофенака приказане су на слици 13.



Слика 13 Графички приказ 2D структура диклофенак-калијума и диклофенак-натријума

Експерименти су извођени на *Dionex Ultimate 3000 HPLC* систему. Употребљена је колона *Acclaim Mixed-Mode WCX-1* (3 μm , 2,1 x 150 mm). Запремина инјектованог узорка износила је 10 μL . Проток мобилне фазе је био подешен на 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ са изократским елуирањем. Температура колоне је подешена на 35 $^{\circ}\text{C}$.

Аналити су детектовани употребом *CAD Veo* детектора. За испитивање контрајона, K^+ и Na^+ , код којих изостаје присуство хромофора и последично могућност употребе *UV/Vis* детектора, употребљен је *CAD* уз помоћу кога су успешно премошћени поменути недостаци. *CAD* се сматра одговарајућом алтернативом често коришћеним детекторима за анализу контрајона, због свог принципа рада. Наелектрисане честице аеросола формирају у струји азота која носи наелектрисање као последицу коронског пражњења, и сигнал углавном зависи од масе анализата, површине честица и густине. Због тога је могуће детектовати супстанце којима недостају хромофоре, флуорофоре и редокс-активне групе. Зато је *CAD* значајна алтернатива *UV/Vis*, флуоресцентним и електрохемијским детекторима [116,117]. Стога, *CAD* детектор може бити добар избор у анализи контрајона [97,118]. Пошто се принцип рада *CAD* детектора заснива на испаравању мобилне фазе и преносу наелектрисања на чврсте честице, може се користити искључиво за полу- или неиспарљиве анализите са лако испарљивим мобилним фазама и њиховим адитивима [116–118]. Параметри детектора су подешени на основу испитивања појединачних фактора, употребом *OFAT* приступа. На овај начин су испитане вредности следећих параметара: константа филтра (енг. *Filter Constant, FC*), вредности степене фукнције (енг. *Power Function Value, PFV*) и температура испаравања узорка (енг. *Evaporation Temperature, ET*). Испитане су следеће вредности параметара за подешавање *CAD Veo* детектора: *FC* (1,0 s, 5,0 s и 10,0 s), *PFV* (0,8, 1,0 и 1,2) и *ET* (35 $^{\circ}\text{C}$ и 50 $^{\circ}\text{C}$). На основу спроведених експеримената утврђено је да су следеће вредности *CAD* параметара погодовале детекцији анализата: *FC* од 5,0 s, *PVF* од 0,8 и *ET* на вредности од 35 $^{\circ}\text{C}$, те су оне употребљене у току испитивања анализата и оптимизације методе. Вредности параметара детектора за које нису испитане друге вредности, дефинисане су константне следеће вредности: фреквенција прикупљања података (енг. *Data Collection Frequency*) од 10 Hz и вредност притиска гаса на улазу (енг. *Gas Inlet Pressure*) 60 psi. Резултати су забележени употребом *Chromeleon® 7.0 Chromatography Data System* софтвера.

Раздвајање контрајона соли диклофенака испитано је у различитим условима састава мобилне фазе. Један сет експерименталних услова подразумевао је употребу мобилне фазе од ацетонитрила и ацетатно-амонијачног пуфера, док је други сет експерименталних услова подразумевао употребу мобилне фазе од ацетона и ацетатно-амонијачног пуфера. За обе комбинације мобилне фазе испитане су различите вредности састава ацетатно-амонијачног пуфера. Применом оптимизационог дизајна *FFD 3²* испитани су вредности фактора мобилне фазе, тј. *pH* вредност воденог дела мобилне фазе и концентрација амонијум-ацетатног пуфера, што је и приказано у табели 9.

Табела 9 Састав мобилне фазе употребљене за испитивање соли диклофенака и његових контрајона

Експериментални фактори	Састав мобилне фазе 1 ацетатно-амонијачни пуфер/ <i>ACN</i> = 60/40 (% <i>, v/v</i>)			Састав мобилне фазе 2 Ацетатно-амонијачни пуфер/ <i>ACE</i> = 50/50 (% <i>, v/v</i>)		
	-1 ниво	0 ниво	+1 ниво	-1 ниво	0 ниво	+1 ниво
<i>pH</i> ацетатно-амонијачног пуфера, x_1	4,6	5,0	5,4	4,6	5,0	5,4
Концентрација ацетатно-амонијачног пуфера [mM], x_2	30,0	50,0	70,0	30,0	50,0	70,0

Испитивање факторског утицаја и оптимизација метода спроведени су употребом пуног факторског дизајна 3^2 , а план експеримената за испитивање различитих експерименталних услова конструисан је употребом софтвера *Design Expert 7.0.0.* и приказан у табели 10. Употребом *Design Expert 7.0.0* конструисани су и математички модели који описују понашање одговора у читавом експерименталном простору. Њихова статистичка значајност порцењена је применом *ANOVA* теста, на основу вредности *lack of fit* и проценом R^2 , *adj. R*² и *pred. R*². За обе методе су одређене оптималне вредности експерименталних фактора за раздвајање диклофенака и његових контрајона, применом употребом *MCDM* и Дерингерове функције пожељних одговора, на основу дефинисаних циљних вредности одговора система.

Табела 10 План експеримената пуног факторског дизајна 3^2 , са дефинисаним кодираним и стварним вредностима факторских нивоа

	x_1	x_2	<i>pH</i>	<i>C</i> [mM]
Пун факторски дизајн 3^2	-1	-1	4,60	30,00
	+1	-1	5,40	30,00
	-1	+1	4,60	70,00
	+1	+1	5,40	70,00
	-1	0	4,60	50,00
	+1	0	5,40	50,00
	0	-1	5,00	30,00
	0	+1	5,00	70,00
Понављања у централној тачци	0	0	5,00	50,00

Развој и оптимизација метода су усмеравањем применом економичних приступа за развој метода, па су за процену еколошке прихватљивости примењени алати *GAPI* (енг. *Green Analytical Procedure Index*) и *AGREE* калкулатор (енг. *Analytical GREEnness Metric Approach*), док је еколошка процена прихватљивости употребљених растварача који улазе у састав мобилне фазе процењена употребом индекса еколошке прихватљивости растварача (енг. *Greenness Index, GI*) и одговарајућих спајдер дијаграма, који додатно пружају информацију о утицају ових растварача на безбедност, здравље и животну средину.

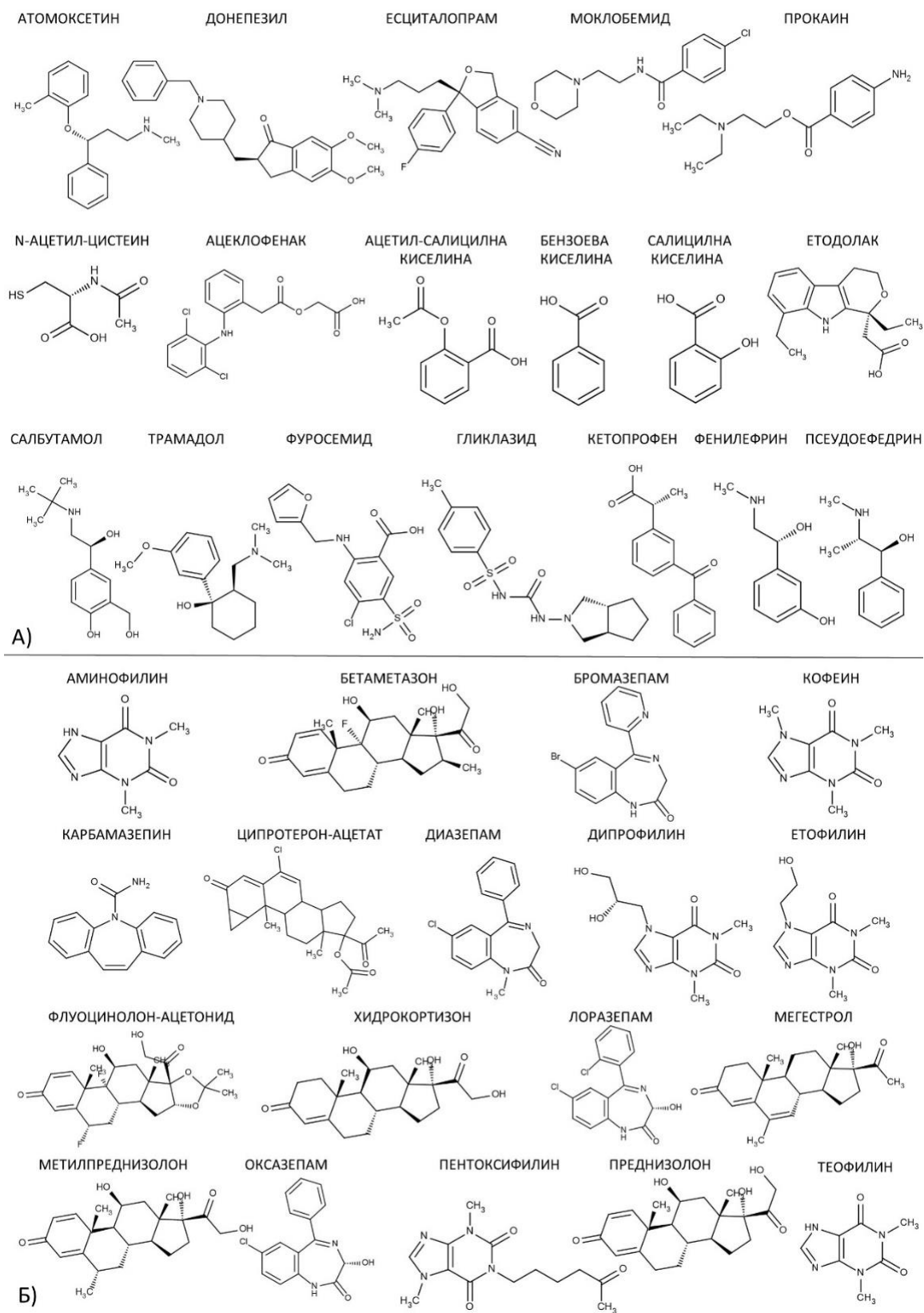
3.4. Хроматографски услови примењени у току испитивања *RP/HILIC* хроматографског система

Процена интеракционог потенцијала и ретенционих механизма *Acclaim Mixed-Mode HILIC-1* колоне вршена је праћењем ретенционих карактеристика 36 молекула лекова малих молекулских маса различитог јонизационог потенцијала и поларности.

Испитани су следећи аналити: *N*-ацетил-цистеин, ацетил-салицилна киселина, ацеклофенак, атомоксетин, бензоева киселина, донепезил-хидрохлорид, есциталопрам-оксалат, етодолак, фуросемид, фенилефрин-хидрохлорид, гликлазид, кетопрофен, прокаин-хидрохлорид, псеудоефедрин-хидрохлорид, салбутамол-сулфат, салицилна киселина, моклобемид, трамадол-хидрохлорид, аминофилин, бетаметазон, бромазепам, диазепам, етофилин, хидрокортизон, кофеин, лоразепам, преднизолон, цеипротерон-ацетат, дипрофилин, оксазепам, мегестрол-ацетат, флуоцинолон-ацетонид, карбамазепин, метилпреднизолон, пентоксифилин, теофилин. Планарне молекулске структуре приказане су на слици 14.

Експериментални рад је изведен уз помоћ *Vanquish Core HPLC* система. Употребљена је *Acclaim Mixed-Mode HILIC-1* (5 μm , 4,6 x 150 mm) колона за хроматографско испитивање аналита, са одговарајућом претколоном *Acclaim Mixed-Mode HILIC-1* (5 μm , 4,6 x 10 mm). Употребљена је мобилна фаза са брзином протока од 1 mL/min, у изократском режиму рада. Температура колоне је подешена на константну вредности од 30 °C. Састав мобилне фазе вариран је према плану експеримената који је приказан у табели 12 и образложен у делу 3.4.1 овог поглавља.

Запремина инјектованог узорка је износила 10 μL , који је термостатиран на 20 °C. Детекција аналита је спроведена *PDA* детектором на таласним дужинама 221 nm, 240 nm, 252 nm и 272 nm. Резултати су праћени употребом софтверског система *Chromeleon® 7.3 Chromatography Data System*.



Слика 14 Планарне структуре молекула употребљених у току испитивања *RP/HILIC* система А) у јонизованом облику и Б) у неутралном облику у условима мобилне фазе

3.4.1. Експериментални параметри и план експеримената за испитивање мултифакторског утицаја на ретенцију анализата у *RP/HILIC* систему

Експериментални параметри дефинисани као значајни, процењени су на основу прелиминарних испитивања хроматографског понашања анализата. Прелиминарна испитивања обухватила су процену утицаја следећих експерименталних фактора: удео органског растварача (*ACN*, %, *v/v*), концентрација пуфера воденог дела мобилне фазе (*C*, mM) и *pH* вредност воденог дела мобилне фазе (*pH*). Како се прелиминарним испитивањима испоставило да је ретенционо понашање јонских облике молекула под утицајем удела органског растварача, концентрације пуфера и *pH* вредности воденог дела мобилне фазе, ови фактори су уврштени у сферни централни композициони дизајн (енг. *Central Composite Design – Rotatable, CCD-R*), који омогућава њихово мултифакторско испитивање. Насупрот томе, ретенционо понашање молекула заступљених у неутралном облику у испитаном *pH* окружењу се показало зависно у највећој мери само од вредности удела органског растварача – *ACN* у мобилној фази, те је то и једини испитани експериментални фактор за молекуле у неутралном облику. Експериментални параметри и њихове вредности приказани су у табели 11.

Табела 11 Вредности експерименталних фактора коришћених у испитивању ретенционог понашања анализата у *RP/HILIC* систему

Експериментални фактори	- α ниво	-1 ниво	0 ниво	+1 ниво	+ α ниво
Садржај ацетонитрила [%, <i>v/v</i>], x_1	52,00	60,11	72,00	83,89	92,00
<i>pH</i> пуфера, x_2	3,78	4,17	4,75	5,33	5,72
Концентрација пуфера [mM], x_3	20,00	26,08	35,00	43,92	50,00

CCD-R, састоји се од истих делова, као и описани *FC-CCD*, односно од: факторског дизајна (2^l), звезда дизајна ($2l$) и централне тачке C_p , са разликом да звезда дизајн обухвата вредности факторских нивоа – α и + α , које су подједнако удаљени од централне тачке, као и вредности факторског дизајна [61]. Према томе, број експеримената који је у употреби у *CCD-R* се рачуна према следећој једначини 10:

$$N = 2^l + 2l + C_p, \quad (10)$$

где l представља број независних експерименталних варијабли, а C_p број понављања у централној тачци [58,112]. Према наведеном, број експеримената који се спроводи за испитивање јонских врста одговара вредности $l = 3$ односно $N = 15$, док је за сваки неутрални молекул испитан утицај удела ацетонитрила у мобилној фази (*ACN*, %, *v/v*) на 5 нивоа вредности (52,00; 60,11; 83,89; 72,00; 92,00), односно спроведено је 5 експеримената.

План експеримената за испитивање експерименталних параметара *RP/HILIC* система конструисан је употребом софтвера *Design Expert 7.0.0*, према одабраном оптимизационом дизајну *CCD-R*. Конструисан план експеримената приказан је у табели 12.

Табела 12 Приказ кодираних и стварних вредности испитаних експерименталних параметара према *CCD-R*, који је коришћен за испитивање ретенционог понашања јонизованих молекула у *RP/HILIC* систему

	<i>x</i> ₁	<i>x</i> ₂	<i>x</i> ₃	<i>ACN</i> [%, v/v]	<i>pH</i>	<i>C</i> [mM]
Пун факторски дизајн	-1	-1	-1	60,11	4,17	26,08
	+1	-1	-1	83,89	4,17	26,08
	-1	+1	-1	60,11	5,33	26,08
	+1	+1	-1	83,89	5,33	26,08
	-1	-1	+1	60,11	4,17	43,92
	+1	-1	+1	83,89	4,17	43,92
	-1	+1	+1	60,11	5,33	43,92
	+1	+1	+1	83,89	5,33	43,92
Звезда дизајн	- α	0	0	52,00	4,75	35,00
	+ α	0	0	92,00	4,75	35,00
	0	- α	0	72,00	3,78	35,00
	0	+ α	0	72,00	5,72	35,00
	0	0	- α	72,00	4,75	20,00
	0	0	+ α	72,00	4,75	50,00
	0	0	0	72,00	4,75	35,00
Централна тачка	0	0	0	72,00	4,75	35,00

3.4.2. Изградња базе података – дефинисање улазних и излазне варијабле

Сет података изграђен је дефинисањем улазних и излазне променљиве за испитиване анализе. Као улазне варијабле дефинисани су експериментални параметри (одабрани према опису у поглављу 3.4.1 Експерименталног дела) и софтверски израчунати молекулски дескриптори испитаних анализа. Као излазна варијабла одабрана је математичка трансформација ретенционог фактора ($k^{1/3}$). Ретенциони фактор је рачунат према једначини 1.

Вредности експерименталних фактора у сету података су у складу са планом експерименталног дела описаном у поглављу 3.4.1. Експерименталног дела. Вредности молекулских дескриптора који су укључени у сет података су израчунати на основу софтверски генерисане молекулске структуре анализа. 3D молекулске структуре су генерисане и оптимизоване на начин описан у поглављу 3.2.2. Експерименталног дела. Вредности молекулских дескриптора су рачунате из оптимизованог структурног молекулског приказа (3D) употребом *PaDel* екстензије инсталиране у *RapidMiner* софтвер. Вредности молекулских дескриптора су израчунати за сваки од представљених јонских облика молекула под дефинисаним *pH* условима за све молекуле. Затим су *MD* вредности за сваки аналит поново израчунате, узимајући у обзир удео заступљених облика молекула (јонизованог или нејонизованог). Број иницијално израчунатих *MD* редукован је пратећи следећа статистичка правила, чиме би се обезбедило смањење великог скупа разматраних карактеристика: (1) *MD* који су међусобно у високој корелацији су искључени из сета података задржавањем само једног и елиминисањем других ($r \geq |0,85|$ [113]), (2) *MD* са ниском стандардном девијацијом ($SD < 0.01$ [119]) нису узети у обзир, због њиховог незнатног доприноса међусобном разликовању молекула током развоја модела.

Вредности излазне варијабле (*k*) подвргнуте су математичкој трансформацији, на основу процењене асиметричности расподеле вредности података (енг. *skewness*), образложено у

поглављу 3.2.2. Експерименталног дела. На основу расподеле вредности добијених резултата, приказаних у делу 4.3.1. Резултата и дискусије, примењена је математичка трансформација кубног кореновања на вредности ретенционих фактора, $k^{1/3}$.

3.4.3. Изградња глобалног и локалних мешовитих *QSRR* модела применом *GBT* алгоритма

За изградњу мешовитих *QSRR* модела за испитивање и процену интеракционог потенцијала *RP/HILIC* система употребљен је *GBT* алгоритам. Развијена су три мешовита *QSRR* модела:

- глобални модел (енг. *Global GBT*, *G-GBT_{RP/HILIC}*), изграђен је употребом комплетно генерисане базе података,
- локални модел за јоне (енг. *Local Ion GBT*, *LI-GBT_{RP/HILIC}*), изграђен је коришћењем подскупа података који обухвата експерименте за молекуле у јонском облику,
- локални модел за неутралне молекуле (енг. *Local Neutral GBT*, *LN-GBT_{RP/HILIC}*), изграђен је коришћењем подскупа података који обухвата експерименте за неутралне молекуле.

За развој глобалног модела, *G-GBT_{RP/HILIC}*, генерисана је база података изграђена на основу испитаних 36 анализата. База података обухвата укупно 360 експеримената (број испитаних анализата помножен одговарајућим бројем експеримената *CCD-R*). Сет података је подељен тако да се око 80% експеримената користи у току тренирања и интерне валидације модела, а преосталих 20% за тестирање, односно екстерну валидацију модела [72,115]. Тако су подаци за 28 анализата (14 у јонском облику и 14 у неутралном облику), 280 експеримената, коришћени за изградњу и интерну валидацију глобалног модела. Приликом изградње модела спроведена је интерна валидација применом десетоструке унакрсне валидације модела (детаљније објашњена у делу 3.2.3 Експерименталног дела). Резултати за преосталих 8 анализата (2 молекула у облику катјона, 2 молекула у облику анјона и 4 неутрална молекула), укупно 80 експеримената, су коришћени за екстерну валидацију модела. Вредности из тест сета података нису биле у употреби приликом развоја и тренирања модела, те је на тај начин је имитирана стварна примена генерисаних модела. Тест сет података обухватио је ретенционе податке за следеће супстанце: етофилин, преднизолон, оксазепам, флуоцинолон-ацетонид, гликлазид, фенилефрин, атомоксетин.

За развој локалних модела коришћени су подскупови претходно описане базе података, употребљене за развој глобалног *QSRR* модела, који се односе само на одабрану групу анализата (молекули у јонизованом или неутралном облику). Односно за изградњу и интерну валидацију *LI-GBT_{RP/HILIC}* модела коришћен је сет података за 14 молекула присутних у јонском облику (210 експеримената), а за екстерну валидацију модела коришћен је сет вредности за преостала 4 молекула (60 експеримената). За тренирање и тестирање *LI-GBT_{RP/HILIC}* је употребљен исти број позитивно и негативно наелектрисаних молекула. За изградњу и интерну валидацију *LN-GBT_{RP/HILIC}* модела коришћен је сет података за 14 неутралних молекула (70 експеримената), а за тест сет одабране су вредности преостала 4 неутрална молекула (20 експеримената). Одабране тест супстанце су биле исте као и у *G-GBT_{RP/HILIC}* моделу.

Евалуација перформанси модела извршена је помоћу: *RMSEE*, *RMSEP*, %*RMSEE*, %*RMSEP*, Q^2_{cv} и Q^2_{ext} . Вредности су рачунате према математичким формулама 6-8, које су наведене и образложене у делу 1.2.1.5. Увода.

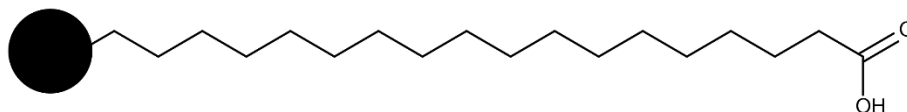
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Карактеризација *RP/WCX* хроматографског система употребом мешовитих *QSRR* модела

Применом описане методологије у делу 3.2 Експерименталног дела, извршена је карактеризација присутних комплексних интеракционих механизма присутних у *RP/WCX MMLC* систему, добијеног употребом *Acclaim Mixed-Mode WCX-1* хроматографске колоне.

4.1.1. Дефинисање експерименталног простора

RP/WCX бимодални систем, који је предмет истраживања, је обезбеђен применом стационарне фазе са интегрисаним лигандима дуалне природе. Они поседују способност ступања у хидрофобне и електростатичке међумолекулске интеракције. Предност лиганда који поседују способност слабе катјонске измене, *WCX*, у поређењу са јаким катјонским измењивачима, *SCX*, се огледа у могућности финог подешавања испољавања електростатичких интеракција изменом састава и *pH* вредности мобилне фазе [44]. *RP/WCX* комбинација модалитета од интереса је заступљена у комерцијалној *Acclaim Mixed-Mode WCX-1* колони, која је због тога предмет истраживања. Наведена стационарна фаза је модификовани силицијум-диоксид са униформном структуром лиганда, сачињених од октадецил-алкил ланца (*C18*) који на свом крају поседују карбоксилне функционалне групе (*-COOH*) (слика 15). Бимодалност колоне се приписује деловима лиганда који поседују различите интеракционе потенцијале. Односно, угљоводонични низ успоставља хидрофобне интеракције, док карбоксилне групе на крају угљоводоничног низа ступају у у електростатичке интеракције. Карбоксилне групе показују слабо кисели карактер (*pKa* вредност око 4-5) и прате равнотежни процес дисоцијације слабих киселина у воденој средини. С тим у вези, утицај *WCX* режима на ретенционо понашање у великој мери зависи од јонског облика анализата (молекула лека), који је одређен особинама мобилне фазе [37]. Имајући у виду наведено, за процену присутних ретенционих механизма одабрана су својства мобилне фазе која у највећој мери утичу на испољавање релативног доприноса појединачних међумолекулских интеракција и омогућавају модификовање њиховог испољавања у складу са аналитичким потребама. Због тога су испитани утицаји следећих експерименталних фактора: садржај органског растварача, концентрација пуфера и *pH* вредност воденог дела мобилне фазе и температура.



Слика 15 Шематски приказ молекулске структуре *RP/WCX* лиганда *Acclaim Mixed-Mode WCX-1* стационарне фазе

Иницијални одабир параметара мобилне фазе је извршен на основу препорученог радног опсега колоне према упутству за њену употребу [120]. Испитиван опсег *pH* вредности је одабран на основу *pKa* вредности лиганда стационарне фазе, чија процењена вредност износи 4,2 [121], и препорученог радног *pH* опсега колоне 3,0 – 6,5 [120]. Одабран је амонијачно-ацетатни пуфер чији капацитет (*pKa* 4,76 ± 1,00 *pH* [122]) обухвата и вредност *pKa* лиганда колоне. На тај начин се омогућава испитивање заступљености интеракционих режима у зависности од степена јонизације лиганда стационарне фазе. Како капацитет

одабраног пуфера обухвата опсег испитиваних вредности pH мобилне фазе, потребе за променом пуферских компоненти изостаје, чиме се смањује допринос аналитичкој грешци. Концентрација пуфера је испитана у опсегу 20 – 40 mM, јер је препознато да концентрације више од 50 mM могу да утичу на присутне јоноизмењивачке интеракције [1]. Такође, једна од предности *MMLC* представља рад са ниским концентрацијама пуфера воденог дела мобилне фазе, иако је могућа примена концентрације пуфера и до 100 mM [18,120]. Садржај органског растварача (*ACN*) је испитан у опсегу 30 – 50 %, v/v. Доња граница удела органског растварача је дефинисана у циљу спречавања дугог ретенционог времена испитаних анализата, док је горња граница дефинисана тако да се спречи прелазак јоноизмењивачког модалитета у *HILIC*, што је очекивано са вишим уделима органског растварача у мобилној фази [1]. Температура колоне је испитана у опсегу 30 – 38 °C, који је одабран пратећи препоручени радни опсег колоне (до 40 °C) и тако да вредности погодују дужини трајања анализа [120].

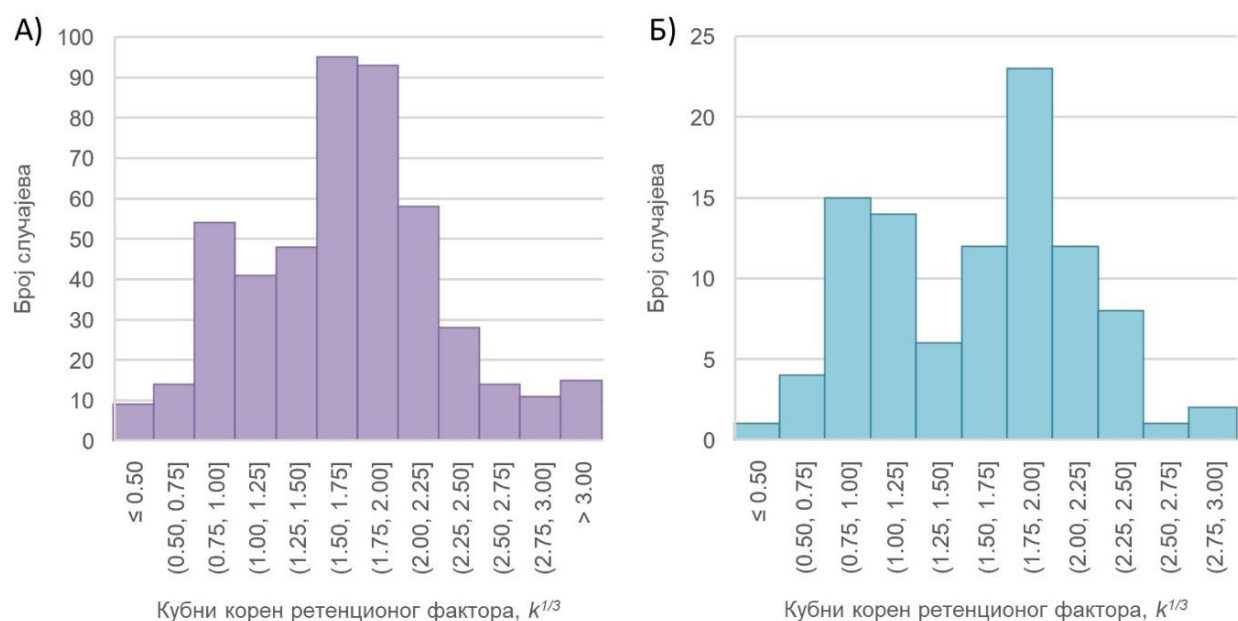
Статистичка значајност наведених експерименталних параметара на молекуле различитог јонизационог потенцијала процењена је прелиминарним експериментима. Према процењеној важности утицаја, експериментални фактори су укључени у испитивање ретенционог понашања анализата, у оптимизациони дизајн, као што је наведено у делу 3.2.1 (табела 6).

Интеракциони потенцијал *RP/WCX* бимодалног система описан је коришћењем анализата различитих физичко-хемијских својстава, јер имају способност ступања у различите врсте интеракција. Аналити који нису у јонизованом облику при дефинисаном pH опсегу и умерене су поларности ($\log P$ у опсегу од -0,55 до 1,78) коришћени су за процену *RP* модалитета. За процену електростатичких интеракција, *WCX* капацитета и истовременог учешћа *RP* и *WCX* у ретенцији анализата употребљени су позитивно и негативно јонизовани молекули умерено хидрофобног карактера ($\log P$ у опсегу од 1,63 до 4,9, табела 13). За испитане анализате процењена је и процентуална заступљеност присутних јонских облика у одабраним pH вредностима мобилне фазе, што је узето у обзир приликом израчунавања вредности молекулских дескриптора (табела 13).

Табела 13 Приказ вредности $\log P$, $\log D$ и удели јонизационих облика молекула коришћених у испитивању RP/WCX система

Молекул	Mr [g/mol]	$\log P$	$\log D$			Јонски облик [%]								
			pH 3,8	pH 4,7	pH 5,6	pH 3,8 неутралан	pH 3,8 катјон	pH 3,8 анјон	pH 4,7 неутралан	pH 4,7 катјон	pH 4,7 анјон	pH 5,6 неутралан	pH 5,6 катјон	pH 5,6 анјон
Ацеклофенак	354,2	3,88	3,37	2,61	1,74	30,61		69,38	5,26		94,74	0,69		99,31
Арипипразол	448,39	4,9	1,63	2,21	3,04	0,02	99,98		0,17	99,83		1,36	98,64	
Атомоксетин	255,35	3,81	0,57	0,57	0,61		100			100		0,01	99,99	
Бензоева киселина	122,12	1,63	1,446	0,914	0,098	65,33		34,67	19,18		80,82	2,9		97,1
Бетаметазон	392,5	1,682	1,682	1,682	1,682	100			100			100		
Биспролол	325,443	2,2	-1,04	-1,04	-0,99		100			100		0,01	99,99	
Диклофенак	296,15	4,26	4,045	3,477	2,649	61,08		38,92	16,5		83,5	2,43		97,57
Доксазосин	451,48	2,14	0,29	0,36	0,69	0,05	99,82 +0,14		0,37	99,61+0,02		2,85	97,15	
Донепезил	416	4,21	0,73	0,85	1,31		100		0,01	99,99		0,09	99,91	
Есциталопрам	324,4	3,76	0,62	0,27	0,34		100			100		0,01	99,99	
Етодолак	287,35	3,44	3,39	3,16	2,52	89,42		10,58	51,55		48,45	11,81		88,19
Фенобарбитал	232,24	1,41	1,41	1,41	1,41	100			99,96		0,04	99,71		0,29
Фенотерол	303,3529	2,42	-0,82	-0,81	-0,74		100			99,99	0,01	0,01	99,94	0,04
Флуоцинолон-ацетонид	452,5	1,6	1,6	1,6	1,6	100			100			100		
Хидрокортизон	362,5	1,28	1,28	1,28	1,28	100			100			100		
Химекромон	176,17	1,78	1,78	1,78	1,78	99,99		0,01	99,92		0,08	99,37		0,63
Хлорамфеникол	323,13	0,88	0,88	0,88	0,87	99,98		0,02	99,87		0,13	98,99		1,01
Ибупрофен	206,28	3,84	3,81	3,61	3,02	91,85		8,15	58,66		41,34	15,16		84,84
Кетопрофен	254,28	3,61	3,352	2,735	1,894	54,74		45,26	13,21		86,79	1,88		98,12
Кеторолак	255,27	2,28	2	1,36	-0,73	52,02		47,98	12,01		87,99	1,69		98,31
Кофеин	194,19	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	100			100			100		
Лидокаин	234,34	2,84	-0,53	-0,08	0,7	0,01	99,99		0,09	99,91		0,7	99,3	
Лофексидин	259,132	2,66	0,25	0,25	0,27		100			100		0,02	99,98	
Напроксен	230,26	3,99	2,84	2,36	0,25	71,07		28,93	23,62		76,38	3,75		96,25
Нафазолин	210,27	2,19	-0,22	-0,22	-0,22		100			100			99,99	0,01
Парацетамол	151,16	0,907	0,907	0,907	0,907	100			100			100		
Преднизолон	402,5	1,27	1,27	1,27	1,27	100			100			100		
Пропранолол	259,34	2,58	-0,658	-0,65	-0,6		100			100		0,01	99,99	
Резорцинол	110,11	1,366	1,366	1,366	1,366	100			100			99,98	0,02	
Рисперидон	410,5	2,63	-0,86	-0,77	-0,37		99,77+0,01+0,22		0,01	99,96+0+0,03		0,07	99,93	
Секнидазол	185,1805	-0,04	-0,07	-0,05	-0,04	94,46	5,54		99,27	0,73		99,91	0,09	
Тетрахидразолин	200,2795	2,24	-0,17	-0,17	-0,17		100			100			100	
Триамцинолон-ацетонид	394,4339	0,24	0,24	0,24	0,24	100			100			100		
Триметоприм	290,3177	1,26	-0,18	-0,15	0,06	0,04	0,39+99,56		0,35	0,39+99,26		2,7	0,38+96,92	

Број експеримената за сваки аналит зависи од димензионалности *CCD*-а примењеног за сваку групу аналита (описано у делу 3.2.1 Експерименталног дела). Као последица тога, настала је неуравнотежена заступљеност података о аналитима. Током развоја глобалног модела, неједнака заступљеност података о различитим групама молекула може да резултира моделима са системским одступањем у предвиђању, односно моделима који имају најбољу способност предвиђања за групу са највећом заступљеношћу у скупу за тренирање модела. Међутим, проблем неједнаке заступљености података захтева решавање само уколико генерисана грешка није једнако релевантна за сваку групу у сету података, ако се подаци за тест и тренинг сет разликују у дистрибуцији или ако мањинске групе нису присутне у довољном броју [123]. Пошто су грешке у овом истраживању подједнако релевантне и дистрибуције података за тестирање и тренирање модела упоредиве, јер је тест сет издвојен из централног дела укупне расподеле података (слика 16), нису примењене технике балансирања података.

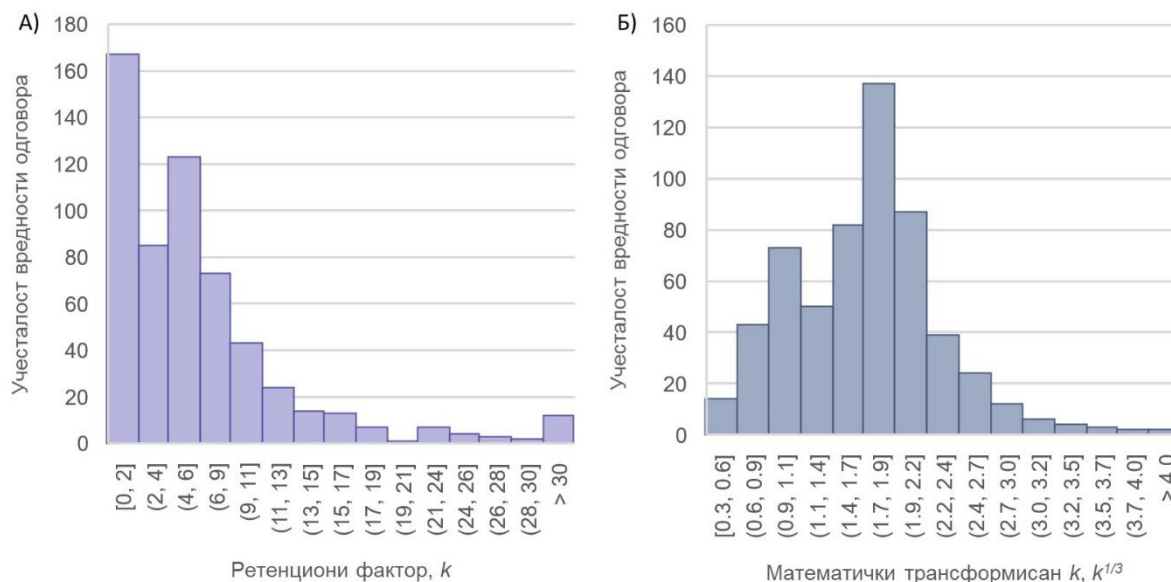


Слика 16 Дистрибуција вредности ретенционих података, одговора хроматографског система а) тренинг и б) тест сета података

4.1.2. Развој мешовитих *QSRR* модела за процену ретенционих механизма

За развој мешовитих *QSRR* модела помоћу којих је извршена карактеризација хроматографског *RP/WCX* система, употребљена је база података у којој су уврштене вредности *EP* и *MD* за све испитане аналите. Такође, вредности ретенционих фактора, које су математички трансформисане применом кубног корена ($k^{1/3}$), биле су уврштене и означене као излазна варијабла. Математичка трансформација излазне варијабле, примењена је због процењене асиметричности расподеле вредности података, приказаних на слици 17. Иако алгоритми машинског учења не захтевају расподелу вредности података која прати Гаусову криву, често Гаусова расподела доприноси бољој изградњи модела. То се

доводи у везу са тим да је већина вредности података у ужем домену вредности, што доприноси лакшем прилагођавању модела подацима [114].



Слика 17 Приказ дистрибуције података а) вредности ретенционог фактора б) вредности математички трансформисаног ретенционог фактора

Генерисана база података са вредностима MD , EP и математички трансформисаним ретенционим факторима је приказана у додатном материјалу 1, доступан у оквиру реф. [124] и који се због обимности налази у ФарФаР репозиторијуму (Репозиторијум Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду), доступно на линку <https://farfar.pharmacy.bg.ac.rs/>.

Мешовити $QSRR$ модели изграђени су применом GBT , због вишеструких предности алгорита описаних у делу 1.2.1.4.2 Увода. Хиперпараметри модела (број стабала (енг. *Number of Trees*), максимална дубина (енг. *Max Depth*), минималан број узорака (енг. *Min Row*) и стопа учења (енг. *Learning Rate*)), за које су модели показали задовољавајуће перформансе (Q^2_{CV} , Q^2_{ext} , $RMSEE$, $RMSEP$, $\%RMSEE$, $\%RMSEP$), приказани су у табели 14. Кодови генерисаних модела који се могу користити за репродукцију модела у *RapidMiner*-у приказани су у додатном материјалу 2, доступни у оквиру реф. [124], а који се због обимности налази у ФарФаР репозиторијуму, <https://farfar.pharmacy.bg.ac.rs/>.

Перформансе модела и њихова способност предвиђања потврђене су валидационим метрикама за интерну и екстерну валидацију, приказане у табели 14. Може се приметити да су локални модели ($LC-GBT_{RP/WCX}$, $LA-GBT_{RP/WCX}$, $LN-GBT_{RP/WCX}$) генерисали мању грешку предвиђања у односу на глобални модел, као што се и очекивало (део 1.2.1.5 Увода). Помоћу добијених модела издвојене су високо значајне варијабле, које указују на интеракције одговорне за ретенционо понашање анализата у RP/WCX $MMLC$ систему. Високо значајне варијабле дефинисане локалним моделима описују специфичне интеракције везане за сваку групу анализата појединачно. Међутим, из глобалних модела идентификоване су карактеристике које су релевантне у RP/WCX $MMLC$ систему у целини. Вредности метрике екстерне евалуације $QSRR$ модела указују на добар потенцијал предвиђања ретенционог понашања молекула код свих развијених модела. Стога се могу применити за предвиђање вредности ретенционих фактора (k) молекула који нису познати моделу. Ово указује на

могућност примене *QSRR* модела у току развоја *RP/WCX* аналитичних метода, у оквиру испитаног експерименталног простора.

Табела 14 Резултати валидације модела за развијене *QSRR* моделе, са употребљеним хиперпараметрима и најзначајнијих десет фактора од утицаја на ретенционо понашање у *RP/WCX* систему (*MD* и *EP*)

Модел	<i>G-GBT_{RP/WCX}</i>	<i>LC-GBT_{RP/WCX}</i>	<i>LA-GBT_{RP/WCX}</i>	<i>LN-GBT_{RP/WCX}</i>
Вредности хиперпараметара	Број дрвећа	37	35	30
	Максимална дубина	10	4	5
	Минималан број узорака	8	4	4
	Стопа учења	0,08	0,1	0,198
Високо позиционирани <i>MD</i>	<i>SHED_PL</i> <i>P_VSA_ppp_P</i> <i>qpmax</i> <i>MDEN-33</i> <i>TDB04s</i> <i>CATS2D_08_DL</i> <i>CATS2D_05_DL</i>	<i>nCb-D/Dtr10</i> <i>SpMAD_B(m)</i> <i>CATS2D_05_DL</i> <i>F10[C-N]</i> <i>SHED_PL</i> <i>Mp</i>	<i>CATS2D_06_DL</i> <i>SHED_DL</i> <i>Mor20s</i> <i>CATS3D_07_NL</i> <i>TDB05u</i> <i>ATSC2s</i> <i>TDB06u</i> <i>CATS2D_05_DD</i>	<i>F01[C-O]</i> <i>piPC06</i> <i>RDF090m</i> <i>BIC3</i> <i>CATS3D_04_DA</i> <i>Mor27s</i> <i>P_VSA_MR_7</i> <i>CATS2D_04_DA</i> <i>VE2sign_Dz(Z)</i>
	<i>ACN</i> <i>C</i> <i>pH</i>	<i>ACN</i> <i>pH</i> <i>C</i>	<i>ACN</i> <i>pH</i>	<i>ACN</i>
Високо позиционирани <i>EP</i>	<i>Q²_{cv}</i>	0,970 +/- 0,009	0,962 +/- 0,010	0,971 +/- 0,024
	<i>Q²_{ext}</i>	0,947	0,872	0,954
	<i>RMSEE</i>	0,119 +/- 0,022	0,097 +/- 0,023	0,091 +/- 0,033
	<i>RMSEP</i>	0,131	0,105	0,102
	<i>%RMSEE</i>	7,88	4,48	7,43
	<i>%RMSEP</i>	10,77	5,24	9,83

4.1.3. Карактеризација ретенционих механизма путем развијених *QSRR* модела

Мешовитим *QSRR* моделима издвојени су фактори релевантни за ретенционо понашање молекула у *RP/WCX* систему. Тумачењем утицаја експерименталних параметара од значаја и релевантних молекулских дескриптора, стиче се увид у интеракциони потенцијал *RP/WCX MMLC*. Кратко образложење и група којој припадају *MD* приказани су у табели 15.

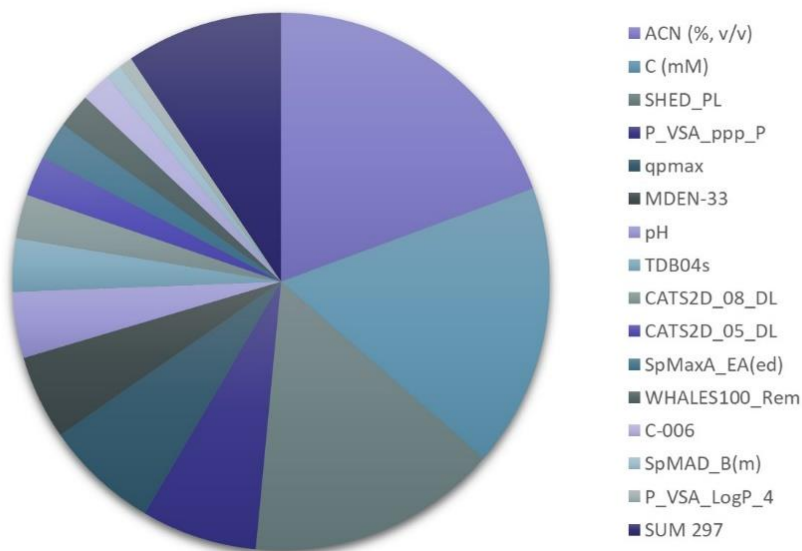
Табела 15 Образложење релевантних *MD*, као и дефинисање групе којој *MD* припада, преузето са интернет странице *AlvaDesc* софтвера [125]

Модел	<i>MD</i>	Опис дескриптора	Група дескриптора
G-GBT_{RP/WCX}	<i>SHED_PL</i>	<i>SHED</i> дескриптор позитивно наелектрисаних и липофилних фармакофорних тачака	Дескриптори фармакофора
	<i>P_VSA_ppp_P</i>	<i>P_VSA</i> -сличан дескриптор потенцијалних фармакофорних тачака; <i>P</i> означава позитивно наелектрисање	<i>P_VSA</i> -слични дескриптори
	<i>Qpmax</i>	максимално позитивно наелектрисање	Дескриптори наелектрисања
	<i>MDEN-33</i>	дескриптор молекулског растојања између свих терцијарних атома азота (енг. <i>molecular distance edge, MDE</i>)	<i>MDE</i> дескриптори
	<i>TDB04s</i>	3D дескриптор заснован на тополошком растојању – <i>lag 4</i> , пондерисан <i>I</i> -стањем (енг. <i>Topological Distance-Based, TDB</i>)	3D аутокорељациони дескриптори
	<i>CATS2D_08_DL</i>	<i>CATS2D</i> донор-липофилни дескриптор при <i>lag 08</i>	Дескриптори фармакофора
	<i>CATS2D_05_DL</i>	<i>CATS2D</i> донор-липофилни дескриптор при <i>lag 05</i>	Дескриптори фармакофора
LC-GBT_{RP/WCX}	<i>nCb-</i>	број супституисаних бензенових <i>C(sp²)</i> атома	Број функционалних група
	<i>D/Dtr10</i>	индекс прстена удаљености/обилазнице реда 10	Дескриптори прстена
	<i>SpMAD_B(m)</i>	спектрална средња апсолутна девијација <i>Burden</i> -ове матрице пондерисане масом	2D матрични дескриптори
	<i>CATS2D_05_DL</i>	<i>CATS2D</i> донор-липофилни дескриптор при <i>lag 05</i>	Дескриптори фармакофора
LA-GBT_{RP/WCX}	<i>CATS2D_06_DL</i>	<i>CATS2D</i> донор-липофилни дескриптор при <i>lag 06</i>	Дескриптори фармакофора
	<i>SHED_DL</i>	<i>SHED</i> донор-липофилни дескриптор	Дескриптори фармакофора
	<i>Mor20s</i>	сигнал 20 пондерисан <i>I</i> -стањем	3D-MoRSE дескриптори
	<i>CATS3D_07_NL</i>	<i>CATS3D</i> негативно-липофилни дескриптор, <i>BIN 07</i> (7.000–8.000 Å)	<i>CATS 3D</i> дескриптори
LN-GBT_{RP/WCX}	<i>F01[C-O]</i>	учесталост <i>C–O</i> парова на тополошком растојању 1	2D Атомски парови
	<i>piPC06</i>	број вишеструких молекулских путања реда 6	Дескриптори шетњи и путања
	<i>RDF090m</i>	функција радијалне расподеле (енг. <i>Radial Distribution Function, RDF</i>)– 090, пондерисана масом	<i>RDF</i> дескриптори
	<i>BIC3</i>	индекс информационог садржаја веза (енг. <i>Bond Information Content, BIC</i>), симетрија суседства трећег реда	Информациони индекси

4.1.3.1. Значајни молекулски дескриптори истакнути глобалним QSRR моделом

Применом GBT алгоритма за развој модела, издвајају се фактори који значајно доприносе смањењу грешке предвиђања. На овај начин GBT модел има способност указивања на параметаре који највише утичу на одговор система, односно ретенционе параметре. Издвојени MD од значаја на ретенционо понашање $G\text{-}GBT_{RP/WCX}$ моделом су приказани у табели 14, а њихово кратко образложење у табели 15.

Молекулски дескриптор из групе SHED (енг. *Shannon Entropy Descriptors*), истакао се као најутицајнији. SHED дескриптори се заснивају на топологији молекула, односно описује дистрибуцију односа парова карактеристичних атомских центара у молекулу [126]. SHED_PL нумерички описује тополошку везу између позитивних (P) и липофилних (L) центара у молекулу. Такође, од утицајнијих молекулских дескриптора препознат је и P_VSA_ppp_P, из групе дескриптора који описују ван дер Валсову површину особине P (P_VSA), односно у овом случају позитивно наелектрисану тачку фармакофоре. Ово указује на значајну улогу ван дер Валсове површине, која је зависна од присуства позитивно наелектрисаних фармакофорних центара у молекулу, у ретенционом понашању молекула [127]. MD максимално позитивно наелектрисање (енг. *Maximum Positive Charge, q_{pm}*) спада у групу дескриптора наелектрисања, узимајући у обзир количину, квантитет, позитивног наелектрисања, указујући на важност присутних електростатичких интеракција [128]. Дескриптори молекулске удаљености (енг. *Molecular Distance Edge Descriptors, MDE*) су векторски дескриптори који се заснивају на геометријској средини тополошких растојања између атома унапред одређеног типа [129], у овом случају оба атома од интереса су терцијарни атоми азота (MDEN-33). Атоми азота су често носиоци позитивног наелектрисања и центри поларности у молекулима, па тако и у структурама коришћених у изградњи модела (слика 9). Тродимензионални тополошки дескриптори базирани на удаљености (енг. *Three-Dimensional Topological Distance-Based, TDB*) су аутокореелациони дескриптори који симултано узимају у разматрање и тополошку и геометријску удаљеност. TDB on l-state weighted distance-lag 4 (TDB04s) указује на допринос молекуларног потенцијала за ступање у електростатичке интеракције и њихов геометријски и тополошки распоред. Дескриптори хемијски напредне претраге образаца (енг. *Chemically Advanced Template Search, CATS*) су 2D дескриптори који описују тополошку удаљеност између било ког пара тачака типова фармакофора. Фармакофорне тачке од интереса су донор водоничне везе (енг. *hydrogen bond donor* - D) и липофилни (енг. *lipophilic* - L) центар [128]. Утицај два CATS дескриптора евалуације тополошког односа донор-липофилни центар (CATS2D_08_DL, CATS2D_05_DL) указују на допринос водоничних веза поред хидрофобних интеракција у току процеса ретенције молекула у RP/WCX систему. Важност утицаја MD графички је приказана на слици 18.



Слика 18 Приказ значајности фактора у *RP/WCX* систему који су истакнути глобалним *QSRR* моделом

Из претходно наведеног, може се претпоставити да наелектрисање анализата, углавном позитивно, његов положај, расподела и однос према другим, углавном липофилним деловима молекула, имају важну улогу у ретенционом понашању испитиваних молекула. Такође, геометријска и тополошка својства, заједно са односом липофилног центра са центром који је донор водоничних веза, показала се посебно важном. На основу издвојених карактеристика претпоставља се да поред очекиваних електростатичких и хидрофобних интеракција, ретенционим процесом у *RP/WCX MMLC* систему доприносе и диполне и ван дер Валсове интеракције, као и водоничне везе.

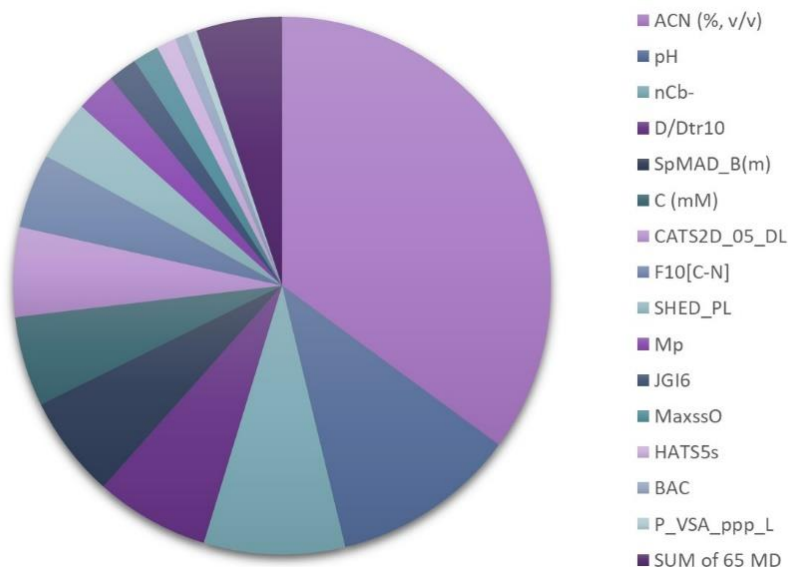
4.1.3.2. Значајни молекулски дескриптори истакнути локалним *QSRR* моделима

Прецизније описивање међумолекулских интеракција изведено је из локалних *QSRR* модела (*LA-GBT_{RP/WCX}*, *LC-GBT_{RP/WCX}*, *LN-GBT_{RP/WCX}*). Наведена су објашњења само за ограничен број веома утицајних молекулских дескриптора, имајући у виду да би додатна тумачења мање важних *MD* продужила дискусију без значајнијег доприноса разјашњавању интеракционих молекулских механизма.

Анализа *MD* истакнутих *LC-GBT_{RP/WCX}* моделом:

Од значаја за ретенционо понашање молекула у катјонском облику препознат је молекулски дескриптор који описује број супституисаних атома бензеновог прстена, односно sp^2 хибридизованог угљеника (nCb -). Значај овог дескриптора се може објаснити утицајем супституента у структурама бензеновог прстена на расподелу електронске густине у ароамтичном систему, при чему они могу бити центри носиоца наелектрисања или поларности молекула. Индекс удаљености/заобилажења прстена реда 10 (енг. *Distance/detour ring index of order 10, D/Dtr10*) су дескриптори субструктуре који указују на локално геометријско окружење у сложеним цикличним системима [129]. *SpMAD_{B(m)}* је дескриптор спектралних индекса, дефинисан као средња апсолутна девијација сопствених вредности (енг. *eigenvalues*), изведених из матрица оптерећења (енг. *burden matrix*)

пондерисаног молекулског графа, израчунатог шемом мерења атомске масе [130]. Топологија структуре липофилно-донорских фармакофорних тачака, помоћу претходно поменутог дескриптора *CATS2D_05_DL*, такође се показала као утицајна. Тежине додељене *MD*, *GBT* алгоритмом приказане су графички на слици 19.

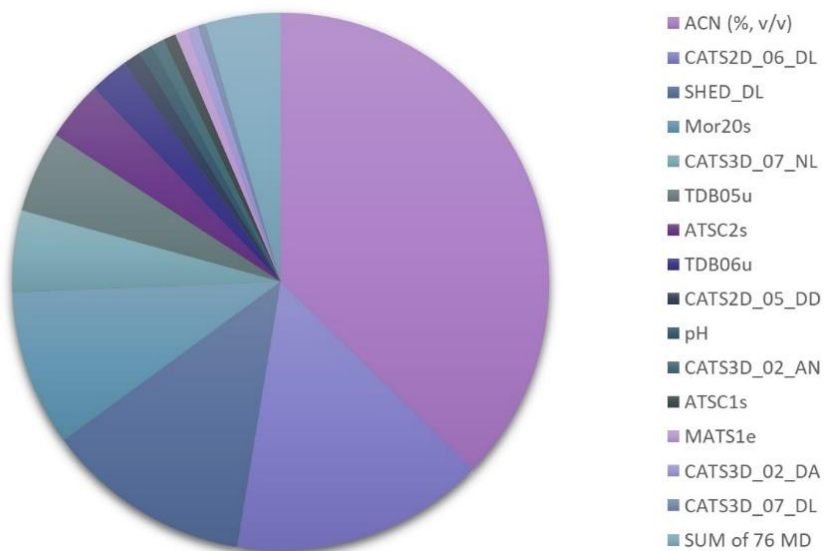


Слика 19 Приказ значајности фактора у *RP/WCX* систему који су истакнути *LC-GBT_RP/WCX QSRR* моделом

Према наведеном, ретенционо понашање катјонских молекула одређено је бројем супституисаних бензенских прстена, као водећег носиоца наелектрисања или поларног центра у испитаним молекулима, геометријским својствима прстенова, расподелом молекулске масе, као и тополошким односом липофилних и центара донора водоничних веза унутар молекула. Може се претпоставити да на ретенцију катјона највише утичу електростатичке и хидрофобне интеракције, као и могућност формирања водоничних веза.

Анализа *MD* истакнутих *LA-GBT_RP/WCX* моделом:

Идентификовано је да ретенционо понашање молекула у анјонском облику зависи од тополошког положаја и дистрибуције молекулских центара, липофилног (*L*) и донора водоничних веза (*D*), што је описано молекулским дескрипторима *CATS2D_06_DL* и *SHED_DL*. *Mor20s*, један од *3D-MoRSE* (енг. *3D-Molecule Representation of Structures based on Electron diffraction*) дескриптора, пружа информације из *3D* координата атома уз помоћ трансформације која се користи у студијама електронске дифракције за припрему теоријске криве расејања. *S* у *Mor20s* означава пондерисање вредности, тј. доделу тежина према интринзичном стању, што имплицира важност електростатичког потенцијала молекула. Узимањем у обзир електронегативност молекула, указује се на допринос атома флуора, кисеоника и хлора ретенционом понашању молекула, који су често носиоци негативног наелектрисања [131]. *CATS3D_NL* описује геометријску удаљеност између одабраних фармакофорних тачака, истичући важност просторног односа негативног и липофилног центра у молекулу. Тежине додељене *MD*, *GBT* алгоритмом приказане су графички на слици 20.

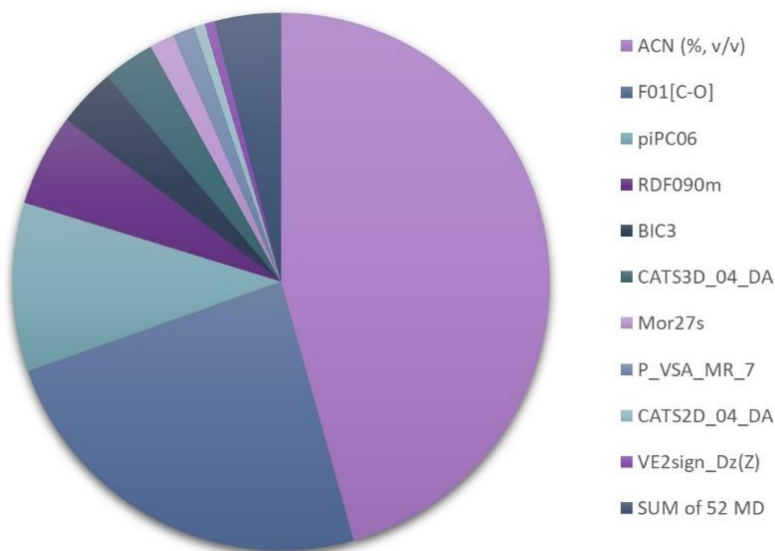


Слика 20 Приказ значајности фактора у RP/WCX систему који су истакнути $LA-GBT_{RP/WCX}$ QSRR моделом

Узимајући у обзир поменуте молекулске дескрипторе, сматра се да на ретенционо понашање анјона утичу тополошки и геометријски положај негативног наелектрисања и центри донора водоничних веза у односу на липофилне делове молекула. Претпоставља се да је њихово ретенционо понашање у великој мери под утицајем хидрофобних интеракцијама, могућношћу стварања водоничних веза, као и присуством електростатичких одбојних интеракција, које се приписују значају положаја негативно наелектрисаног молекулског центра.

Анализа MD истакнутих $LN-GBT_{RP/WCX}$ моделом:

У случају неутралних молекула, учесталост $C-O$ структурних делова молекула и њихов тополошки положај су се истакли као најрелевантнија особина молекула. $C-O$ у молекулу може да се посматра као извор поларности молекула. Дескриптор броја путања ($piPC06$) указује на значај тополошког приказа молекула. Дескриптори функције радијалне расподеле (енг. *Radial distribution function, RDF*) засновани су на расподели растојања у геометријском приказу молекула. RDF се тумачи као расподела вероватноће проналажења атома у сферној запремини дефинисаног радијуса, при чему се атоми дискриминишу на основу масе [128]. Индекс садржаја информација о вези (енг. *Bond Information Content Index, BIC3*) – симетрија везе трећег реда, која указује на значај молекуларне симетрије, која такође може бити фактор утицаја на молекуларни поларитет. Тежине додељене MD , GBT алгоритмом приказане су графички на слици 21.



Слика 21 Приказ значајности фактора у RP/WCX систему који су истакнути $LN-GBT_{RP/WCX}$ $QSRR$ моделом

Ретенционо задржавање неутралних молекула у испитаном хроматографском систему је у највећој мери одређено њиховом поларношћу, али је истакнут и значај топологије и геометрије молекула. Ретенционо понашање молекула у дефинисаном $MMLC$ систему је зависно од присутних хидрофобних интеракција и слично је класичним RP унимодалним системима.

4.1.4. Утицај експерименталних параметара на ретенционо понашање молекула у RP/WCX $MMLC$ систему

EP су укључени у $QSRR$ моделе према њиховом процењеном утицају на ретенционо понашање одређене групе анализата (молекули у облику катјона, анјона и неутрални молекули).

Садржај органског растварача је најзначајније утицао на ретенционо понашање свих испитаних молекула, без обзира на њихов јонизациони потенцијал, пратећи исти тренд утицаја. Повећање садржаја органског растварача довело је до скраћење ретенције молекула, што сугерише да делови молекула који учествују у хидрофобним интеракцијама, значајно доприносе њиховој ретенцији. Сходно томе, може се закључити да хидрофобне интеракције имају значајну улогу у механизму ретенције у RP/WCX систему.

Статистички значајан утицај pH вредности на ретенционо понашање анализата је изражен само на анализитима који јонизују у дефинисаном pH опсегу, са супротним трендом утицаја на позитивно и негативно наелектрисане молекуле. Више pH вредности доприносе повећаној јонизацији лиганда стационарне фазе, и последично доводе до дужег ретенционог задржавања катјонских молекула, подстичући привлачне електростатичке интеракције. Међутим, због свог негативног наелектривања, анјони интерагују са јонизованим функционалним групама стационарне фазе одбојним електростатичким силама. То је узрок њиховог бржег елуирања са стационарне фазе и последично краћег ретенционог времена. Са смањењем pH вредности мобилне фазе, претходно описане интеракције се сузбијају, смањењем јонизације функционалних група на површини

стационарне фазе, те се катјони задржавају краће, а ретенција анјона је продужена. Описан ефекат pH вредности био је израженији са повећањем удела воденог дела мобилне фазе. Значај pH вредности био је нижи за молекуле у облику анјона у односу на друге утицајне факторе, што је показано њиховим релативним доприносом смањењу грешке у $LA-GBT_{RP/WCX}$ моделу. Сматра се да је то последица израчунавања вредности MD где су узете у обзир стопе јонизације молекула које зависе од pH вредности (табела 13). Овакав ефекат није забележен $LC-GBT_{RP/WCX}$ моделом, јер су све анализиране супстанце биле скоро 100% јонизоване у одабраном pH опсегу.

Концентрација пуфера воденог дела мобилне фазе се испоставило да је од значајног утицаја на ретенционо понашање само анализата заступљених у облику катјона. Повећањем концентрације пуфера, повећава се број конкурентних катјона из мобилне фазе који заузимају активна места на стационарној фази, што резултира смањеним бројем активних места за везивање анализата, па је и њихова ретенција краћа, у поређењу са случајем када је концентрација пуфера нижа [1,50].

Иако се температура колоне није издвојила као један од најзначајнијих фактора у $QSRR$ моделима (слике 18-21), примећено је да њене повишене вредности доводе до бржег елуирања свих група анализата. Овај утицај може се повезати са смањењем јачине хидрофобних интеракција између анализата и стационарне фазе, као последицом промена у термодинамици процеса солватације и расподеле анализата између мобилне и стационарне фазе [16].

4.2. Примена RP/WCX бимодалне хроматографије у аналитици лекова

У циљу испитивања могућности примене RP/WCX хроматографије мешовитих режима у аналитици лекова, развијене су методе за сепарацију различитих смеша анализата, применом DoE . RP/WCX систем је примењен за испитивање: а) смеше анализата различитих јонских врста, позитивно и негативно наелектрисаних јона; б) смеше анализата исте јонске врсте, позитивних јона (смеша молекула адренергичних лекова); и в) смеше у којој су присутни контрајони сличних физичко-хемијских особина (соли диклофенака).

4.2.1. Примена RP/WCX хроматографског система за сепарацију смеше анализата различитих јонских врста

Смеша анализата различитих јонских врста обухватала је узорак који садржи следеће анализате: есциталопрам, атомоксетин, арипипразол, ибупрофен и ацеклофенак. У одабраним условима мобилне фазе молекули есциталопрама, атомоксетина и арипипразола су у највећем проценту били заступљени у свом катјонском облику, док су ибупрофен и ацеклофенак били заступљени у свом анјонском облику.

На основу евалуације ефеката експерименталних фактора на ретенцију анализата у RP/WCX који су детаљније описани у делу 4.1.4 Резултата и дискусије, извршен је одабир експерименталних фактора који су уврштени у DoE за оптимизацију методе. Иако се показало да концентрација пуфера (C , mM) није била статистички значајна за ретенционо понашање анализата у анјонском облику, због значајности утицаја на катјонске анализате, испитана је у току оптимизације методе. Тако је оптимизациони дизајн обухватио следеће експерименталне факторе: ACN [%], C [mM], pH и T [°C]. Вредности испитаних фактора и вредности факторских нивоа приказани су у табели 7.

Такође, дефинисани су и одговори система од интереса, који би омогућили добијање аналитичке методе жељених карактеристика тј. кратко трајање методе и адекватну раздвојеност свих пикова анализата. За праћење су одабрани ретенциони фактори ацеклофенака (k_{ACE}) и арипипразола (k_{ARI}), као и селективност атомоксетина и есциталопрама ($\alpha_{ESC-ATO}$). k_{ARI} је одговор од интереса, јер се пик арипипразола последњи елуира и индикатор је дужине трајања методе. k_{ACE} је праћен како би се избегло коелуирање ацеклофенака са пиком мобилне фазе, имајући у виду да се пик ацеклофенака први елуира, док је $\alpha_{ESC-ATO}$ праћена ради обезбеђивања адекватне раздвојености критичног пара пикова, есциталопрама и атомоксетина.

Ретенциони фактори рачунати су према једначини 2, док је фактор селективности рачунат према једначини 1, приказаним у делу 1.1.2 Увода. Експериментално добијени резултати ретенционих фактора (k_{ACE} , k_{ARI}) и фактора селективности ($\alpha_{ESC-ATO}$) према дефинисаном плану експеримената у поглављу 3.3.1 Експерименталног дела, приказани су у табели 16.

Табела 16 Вредности експерименталних фактора и добијених резултата ретенционих фактора и фактора селективности

Бр.	ACN [%, v/v]	C [mM]	pH	T [°C]	k_{ACE}	$\alpha_{ESC-ATO}$	k_{ARI}
1	30	20	3,8	30	7,5230	1,4153	41,0696
2	30	20	3,8	38	6,6296	1,3885	33,3852
3	50	20	3,8	38	0,8222	1,2613	9,4637
4	50	20	3,8	30	0,9363	1,2721	10,0267
5	50	40	3,8	30	0,9704	1,3854	8,0370
6	50	40	3,8	38	0,8474	1,2792	6,8030
7	30	40	3,8	30	8,2548	1,4204	31,6711
8	30	40	3,8	38	6,6593	1,4227	26,0963
9	40	30	3,8	34	2,0474	1,3396	13,3304
10	40	30	5,6	34	0,7230	1,4204	24,0919
11	30	40	5,6	38	2,2889	1,4839	59,8593
12	30	40	5,6	30	2,6993	1,4713	73,5630
13	50	40	5,6	30	0,4474	1,3448	10,5259
14	50	40	5,6	38	0,4267	1,3506	8,8815
15	50	20	5,6	38	0,2993	1,3445	13,4400
16	50	20	5,6	30	0,3230	1,3559	15,5822
17	30	20	5,6	30	1,9289	1,4758	108,1807
18	30	20	5,6	38	1,5881	1,4846	89,6425
19	40	30	4,7	30	0,9304	1,3880	20,1156
20	40	30	4,7	38	0,8074	1,6414	17,5733
21	30	30	4,7	34	3,0000	1,4520	49,0933
22	50	30	4,7	34	0,4519	1,3293	10,3437
23	40	40	4,7	34	0,9600	1,3911	16,3674
24	40	20	4,7	34	0,7674	1,3840	22,1215
25	40	30	4,7	34	0,9111	1,3931	16,8370
26*	40	30	4,7	34	0,9111	1,3935	16,8667
27*	40	30	4,7	34	0,8622	1,3925	17,9037
28*	40	30	4,7	34	0,8667	1,3896	18,7778

Добијени резултати су потом анализирани уз помоћ *Desing Expert* софтвера ради генерисања математичких модела. Коефицијенти математичких модела за кодиране вредности експерименталних фактора (-1, 0, +1) и статистички параметри за процену значајности модела *ANOVA* тестом (*p*-вредност, *lack of fit*, R^2 , *Adj. R²*, *Pred. R²*) приказани су у табели 17.

Табела 17 Вредности коефицијената математичких модела за кодиране вредности експерименталних фактора

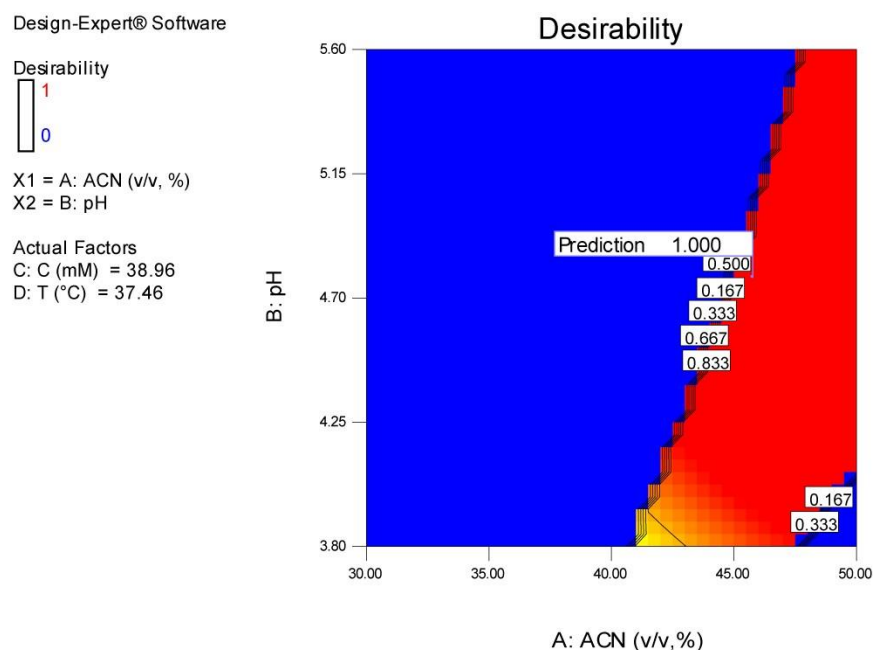
	$\ln(k_{ARI})$	$\ln(k_{ACE})$	$\alpha_{ESC-ATO}$
b_0	+2,90	-0,12	+1,39
b_1 (ACN)	-0,81	-0,96	-0,066
b_2 (pH)	+0,31	-0,53	+0,036
b_3 (C)	-0,16	+0,098	+3,766E-003
b_4 (T)	-0,082	-0,068	/
b_1b_2 (ACN * pH)	-0,14	+0,090	/
b_1b_4 (ACN * T)	/	+0,019	/
b_2b_3 (pH * C)	-0,034	+0,076	-5,062E-003
b_2b_4 (pH * T)	/	/	+3,591E-003
b_3b_4 (C * T)	/	/	+3,407E-003
b_1^2 (ACN ²)	+0,22	+0,26	/
b_2^2 (pH ²)	/	+0,30	-0,012
b_3^2 (C ²)	/	-0,044	/
<i>p</i> -вредност	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<i>lack of fit</i>	0,8417	0,7789	0,0448
R^2	0,9978	0,9995	0,9952
<i>Adj. R²</i>	0,9971	0,9993	0,9933
<i>Pred. R²</i>	0,9963	0,9988	0,9875

С обзиром да су вредности коефицијената детерминације биле веће од 0,98, за све математичке моделе, може се закључити да једначине модела са високом тачношћу описују праћене одговоре система. Такође, *p* вредност, која је мања од 0,05, указује да су модели статистички значајни. Статистичка значајност *lack of fit* математичког модела $\alpha_{ESC-ATO}$, указује на смањену могућност описивања дефинисаног система једноставним математичким моделима, чиме је додатно потврђена потреба за применом математичких модела који имају способност нелинеарног прилагођавања резултатима, као што је то случај са *MLA*. Међутим, у конкретном случају, иако је вредност *lack of fit* мања од 0,05 и има статистички значајну вредност за $\alpha_{ESC-ATO}$, сматра се да за потребе оптимизације методе и дефинисање вредности функције пожељних одговора добијени математички модел може бити употребљен.

Коефицијенти добијених математичких модела указују на утицај експерименталних фактора на исти начин који је описан и уз помоћ изграђених мешовитих *QSRR* модела (4.1.4. Резултати и дискусија). Вредности коефицијената које се односе на утицај удела *ACN*, указују да промена удела *ACN* у саставу мобилне фазе има најизраженији утицај на вредности ретенционог фактора, *k*, анализата. Такође негативан предзнак коефицијената, указује да су вредности *ACN* и *k* у обрнуто пропорционалном односу, тј. повећање удела ацетонитрила у мобилној фази узрокује смањење вредности ретенционог фактора, *k*. Негативне вредности коефицијената који се односе на утицај *T* сугеришу да повећане

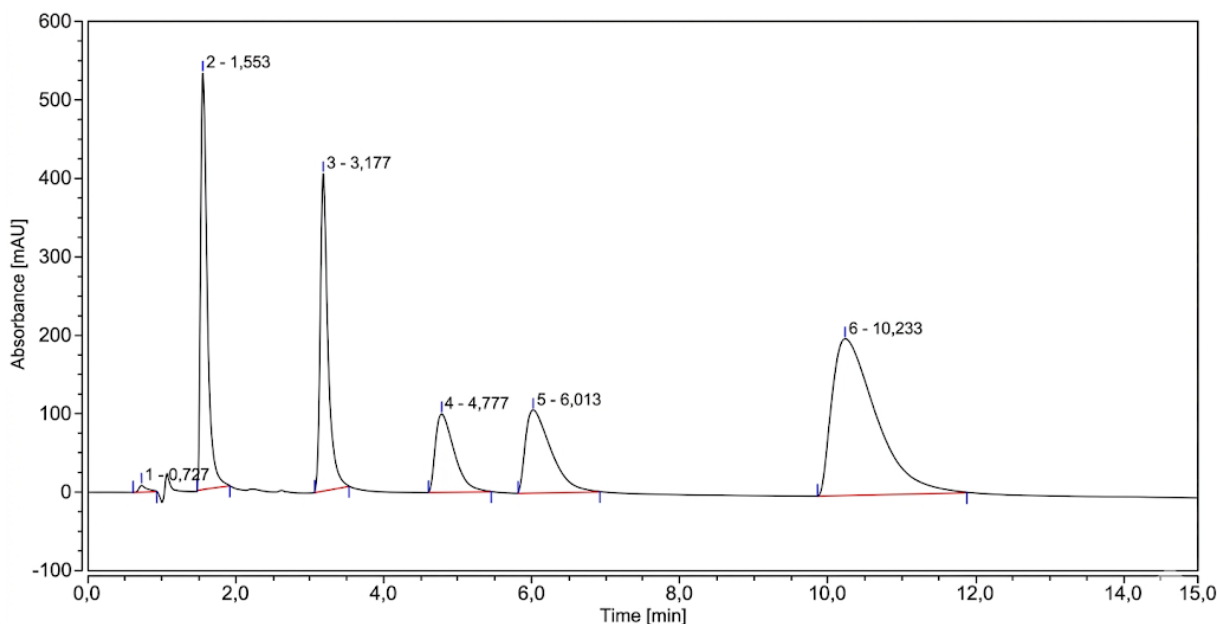
вредности T такође подстичу смањења вредности k . Међутим, ниже апсолутне вредности коефицијената које се односе на утицај T , у односу на вредности коефицијената удела ACN , указују да је утицај температуре много мање изражен него утицај удела ACN . Промене pH вредности мобилне фазе су такође показале утицај на вредности k , међутим наведена промена има супротни утицај на позитивно и негативно јонизоване анализе. Овакав утицај промене pH вредности воденог дела мобилне фазе се приписује подстакнутој јонизацији карбоксилних група стационарне фазе при вишим pH вредностима. Као последица наведеног, долази до повећања одбојних интеракције стационарне фазе и негативно наелектрисаних анализата, као и привлачних међумолекулских интеракција са анализитима у катјонском облику, и обрнуто [16].

За потребе дефинисања оптималних хроматографских услова употребљена је $MCDM$ методологија и Дерингерова функција пожељених одговора. С тим у вези дефинисани су и циљеви оптимизације, којима се обезбеђује пожељно временско трајање методе и раздвојеност свих пикова. Циљеви оптимизације су дефинисани тако да вредности k буду у опсегу 1–10 ($k_{ARI} < 10$ и $k_{ACE} > 1$). Пожељан опсег вредности ретенционих фактора пикова је $1 < k < 10$ [4]. За k_{ARI} дефинисана је пожељна вредност ($k_{ARI} < 10$), јер је арипипразол анализит који се последњи елуира са колоне и утиче на дужину трајања методе. Ретенциони фактор ацеклофенака ограничен је на вредност већу од 1, како би се избегло коелуирање са пиком мобилне фазе. Селективност критичног пара пикова дефинисана је $\alpha_{ESC-ATO} > 1,3$. Циљна вредност је дефинисана 1,3 због присутне асиметрије анализираних пикова, посебно катјона, што настаје као последица јоноизмењивачких интеракција и сматра се очекиваним понашањем пикова у RP/WCX систему. Имајући у виду да се стандардном сепарацијом (где је број теоријских платоа 10 000) постиже адекватна резолуција пикова ($R_s > 1,5$) са вредности $\alpha > 1,06$, узимањем у обзир ефикасност RP/WCX колоне (са бројем теоријских платоа 3500) сматра се да се задовољавајућа резолуција постиже са одабраним циљаним вредностима α [5]. Графички приказ добијене Дерингерове функције пожељних одговора, уз помоћ којег се дефинише експериментални простор у коме се добијају оптимални резултати хроматографског испитивања смеше, приказан је на слици 22.



Слика 22 Графички приказ Дерингерове функције пожељних одговора за дефинисање оптималних вредности експерименталних параметара за сепарацију одабраних анализата

Уз помоћ дефинисане Дерингерове функције пожељних одговора дефинисан је скуп оптималних вредности експерименталних услова: 45 %, v/v ACN, амонијум-ацетатни пуфер (39 mM, pH 4,77) и температура 38 °C. Хроматограм који је добијен употребом одабраних оптималних вредности приказан је на слици 23.



Слика 23 Репрезентативни хроматограм добијен при оптималним експерименталним условима за сепарацију смеше: ацеклофенака, ибупрофена, есциталопрама, атомоксетина и арипипразола, редом приказаних на хроматограму

4.2.2. Примена RP/WCX хроматографског система за сепарацију смеше анализата исте јонске врсте

Систем RP/WCX мешовитих режима омогућава и адекватну сепарацију молекула истих јонских облика, односно наелектрисања. Развој методе за сепарацију смеше фармаколошки блиских молекула (адренергика): биспролола, фенотерола, доксазосина, тетрахидразолина и лофексидина, изведен је помоћу оптимизационог дизајна $FC-CCD$ и *Design-Expert 7.0.0* софтвера. Евалуацијом факторских ефеката описаних у делу 4.1.4 Резултата и дискусије, извршен је одабир експерименталних фактора који су разматрани у току оптимизације методе. У току развоја методе испитани факторски ефекти следећих експерименталних фактора: ACN [% v/v], C [mM], pH и T [°C]. Вредности испитаних факторских нивоа су приказани у табели 7. У току оптимизације методе праћена је селективност критичних парова пикова: биспрола и фенотерола ($\alpha_{BP/FT}$), тетрахидразолина и биспролола ($\alpha_{TH/BP}$), лофексидина и доксазосина ($\alpha_{LOF/DOX}$). Ретенциони фактор доксазосина (k_{DOX}), пика који се последњи елуира, критичан је за обезбеђивање рационалног трајања методе. Селективности критичних парова пикова рачунати су према једначини 1, а ретенциони фактор је рачунат према једначини 2, приказаних у делу 1.1.2 Увода. Експериментално добијени резултати праћених одговора, приказани су у табели 18.

Табела 18 Приказ експериментално добијених вредности праћених одговора система, за оптимизацију методе за анализу смеше адренергика

Бр.	ACN [%, v/v]	pH	C [mM]	T [°C]	$\alpha_{BP/FT}$	$\alpha_{TH/BP}$	k_{DOX}	$\alpha_{LOF/DOX}$
1	30	3,8	20	30	1,3468	0,9843	34,8949	3,1980
2	30	3,8	20	38	1,4383	0,9516	29,7975	2,8930
3	50	3,8	20	38	1,1189	1,2114	11,4215	1,4209
4	50	3,8	20	30	1,0865	1,2333	12,7215	1,5090
5	50	3,8	40	30	1,0908	1,2624	9,1177	1,5091
6	50	3,8	40	38	1,1267	1,2351	8,1861	1,4235
7	30	3,8	40	30	1,3704	0,9929	26,4051	3,2356
8	30	3,8	40	38	1,4727	0,9618	22,4266	2,9299
9	40	3,8	30	34	1,2241	1,1336	14,2823	1,9544
10	40	5,6	30	34	1,2227	1,2536	15,0418	1,2259
11	30	5,6	40	38	1,4882	1,0679	32,3886	2,2159
12	30	5,6	40	30	1,3629	1,1115	42,7380	2,6026
13	50	5,6	40	30	1,0445	1,3809	5,6873	0,7724
14	50	5,6	40	38	1,0947	1,3483	4,4975	0,6755
15	50	5,6	20	38	1,0902	1,3421	6,9962	0,6245
16	50	5,6	20	30	1,0375	1,3813	8,8519	0,7217
17	30	5,6	20	30	1,3680	1,0870	63,4177	2,6022
18	30	5,6	20	38	1,4767	1,0566	49,5063	2,1240
19	40	4,7	30	30	1,2112	1,2452	18,5949	1,9210
20	40	4,7	30	38	1,2792	1,2038	15,8101	1,7469
21	30	4,7	30	34	1,4573	1,0438	39,9835	3,0334
22	50	4,7	30	34	1,1043	1,3270	9,9747	1,2655
23	40	4,7	40	34	1,2478	1,2389	15,2190	1,7830
24	40	4,7	20	34	1,2444	1,2124	21,7937	1,8137
25	40	4,7	30	34	1,2382	1,2274	16,6835	1,8072
26	40	4,7	30	34	1,2451	1,2265	16,3633	1,8258
27	40	4,7	30	34	1,2493	1,2233	17,2911	1,8255
28	40	4,7	30	34	1,2516	1,2220	17,5152	1,8231

На основу експериментално добијених резултата развијени су математички модели употребом *Design-Expert* софтвера. Вредности коефицијената математичких модела, за кодиране вредности експерименталних параметара приказани су у табели 19. Модели су статистички евалуирани *ANOVA* тестом. Статистички параметри (R^2 , $adj. R^2$ и $pred. R^2 > 0,99$), као и p -вредности и *lack of fit* на основу којих је процењена адекватност модела приказани су у табели 19.

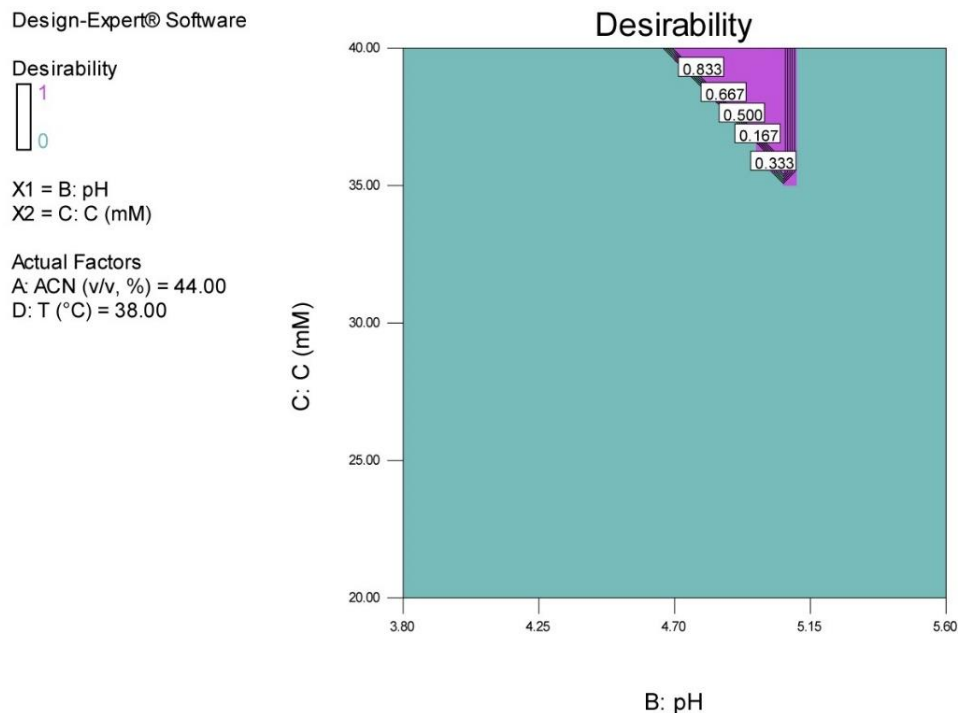
Табела 19 Вредности коефицијената математичких модела за кодиране вредности експерименталних параметара и вредности статистичких параметара добијених математичких модела

Коефицијенти	$\ln(\alpha_{BP/FT})$	$\alpha_{TH/BP}$	$\ln(\alpha_{DOX/LOF})$	$\ln(k_{DOX})$
b_0	0,2203	1,2240	0,5987	2,8511
b_1 (ACN)	-0,1329	0,1369	-0,4850	-0,7414
b_2 (pH)	-0,00547	0,0590	-0,2474	0,0046
b_3 (C)	0,00387	0,0077	/	-0,1828
b_4 (T)	0,0286	-0,0167	-0,0586	-0,0941
b_1b_2 (ACN * pH)	-0,0119	0,0049	-0,1227	-0,2423
b_1b_4 (ACN * T)	-0,0090	/	/	/
b_2b_3 (pH * C)	/	/	/	-0,0296
b_2b_4 (pH * T)	0,0038	/	-0,0203	-0,0286
b_1^2 (ACN ²)	0,0154	-0,0348	0,0692	0,1438
b_2^2 (pH ²)	-0,0208	-0,0267	-0,1664	-0,1654
p – вредност	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
lack of fit	0,4794	0,0799	0,0065	0,5
R²	0,9985	0,9983	0,9974	0,9983
Adj. R²	0,9978	0,9977	0,9966	0,9974
Pred. R²	0,9959	0,9964	0,9941	0,9963

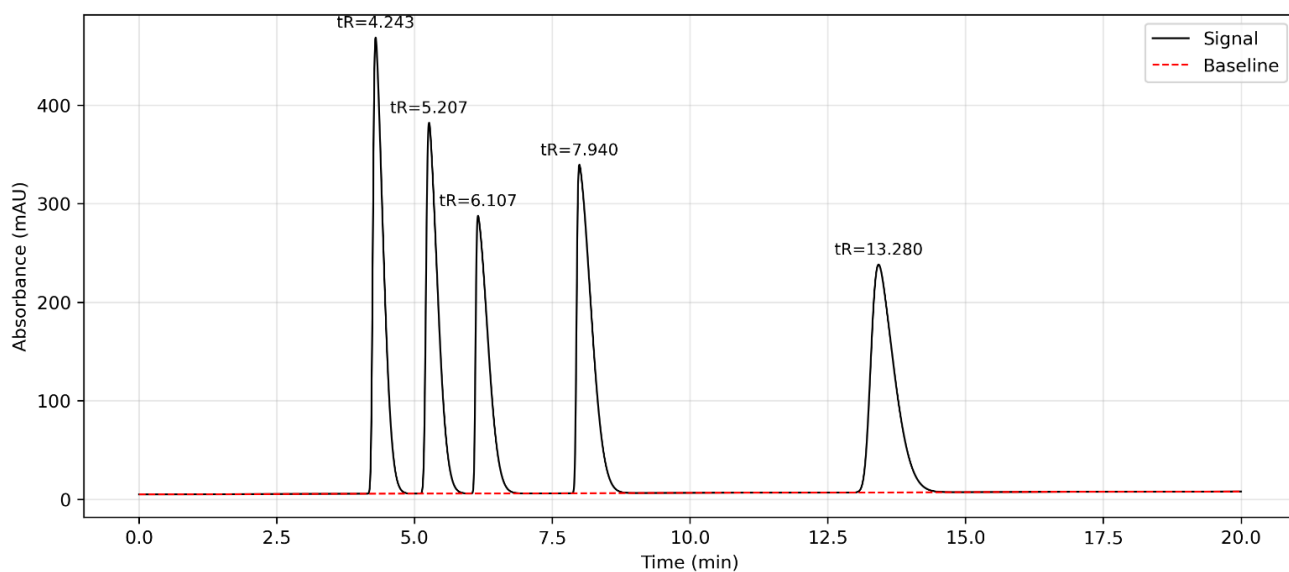
Статистичком проценом модела утврђено је да модели добро описују понашање одговора система (R^2 , $adj. R^2$ и $pred. R^2 > 0,99$). Евалуацијом ефеката фактора утврђено је да најизраженији утицај на праћене одговоре има садржај органског растварача, ACN, чије више вредности су последично узроковале повећања $\alpha_{TH/BP}$ и супротан ефекат на вредности $\alpha_{BP/FT}$, $\alpha_{LOF/DOX}$ и k_{DOX} . Повећање концентрације пуфера доводило је до боље сепарације бисопролола од фенотерола и тетрахидразола. Ово се може приписати конкурентном понашању између анализата и јона присутних у мобилној фази. Скраћење времена анализе је последица повећања удела органског растварача, концентрације пуфера воденог дела мобилне фазе и температуре колоне. Међутим, pH вредност воденог дела мобилне фазе је имала супротан ефекат, што се може објаснити јачим катјонским интеракцијама и дужим задржавањем базних анализата присутних у катјонском облику [16].

Дефинисани су циљеви оптимизације тако да се обезбеди сепарација пикова анализата ($\alpha_{BP/FT}$, $\alpha_{TH/BP}$, $\alpha_{LOF/DOX} > 1,2$). Сматра се да је циљана вредност α одабрана у складу са присутном асиметријом пикова испитаних анализата и бројем теоријских платоа колоне, раније описано у поглављу 4.2.1 Резултата и дискусије. Ретенциони фактор анализата који се последњи елуира (k_{DOX}) не би требало да буде већи од 10, како би се осигурало рационално време анализе. Дефинисани циљеви оптимизације су у складу са пожељним опсегом вредности ретенционих фактора пикова $1 < k < 10$ [4]. Примењена је методологија мултикритеријумског одлучивања како би се добио експериментални простор који омогућава генерисање оптималног хроматографског приказа. Конструисана је Дерингерава функција пожељних одговора у складу са дефинисаним циљевима методе и графички је приказана на слици 24. Она је употребљена за одабир оптималних хроматографских услова који одговарају свим посматраним одговорима система. Узимајући у обзир ефекте свих фактора, и вредности

Дерингерове функције пожељних одговора, вредности експерименталних фактора помоћу којих је могуће обезбедити оптималне вредности праћених одговора су 44% ацетонитрила, концентрација 36 mM, температура 38 °C и *pH* вредност мобилне фазе 5,1. Хроматограм који је добијен софтверском симулацијом и који представља оптималан хроматографски приказ након примене одабраних вредности хроматографских параметара, приказан је на слици 25.



Слика 24 Дерингерова функција пожељних одговора за мултикритеријумско одлучивање и избор оптималних експерименталних услова при оптимизацији методе за сепарацију адренергичких лекова



Слика 25 Рачунарски симулирани хроматографски приказ сепарације анализата: фенотерола, бисопролола, тетрахидразолина, лофексидина и доксазосина, редом при оптималним вредностима експерименталних услова

4.2.3. Примена *RP/WCX* хроматографског система за анализу соли диклофенака и присутних контрајона

На основу физичко-хемијских особина соли диклофенака (диклофенак-калијума и диклофенак-натријума) одабран је *RP/WCX MMLC* систем због свог интеракционог потенцијала. Молекул диклофенака у неутралном облику има хидрофобни карактер, што показује његов коефицијент расподеле октанол/вода ($\log P = 4,26$, израчунато софтвером *Marvin Sketch*, табела 20). Присуство карбоксилне групе у молекулу диклофенака подразумева могућност јонизације, у зависности од pH вредности средине (слика 13). Стога су вредности $\log D$ објективна мера молекуларне хидрофилно-липофилне равнотеже у аналитичком окружењу [132]. Израчунате $\log D$ вредности од интереса приказане су у табели 20, заједно са процентом заступљеног јонизованог облика молекула диклофенака. С друге стране, контрајони су присутни у облику позитивно наелектрисаних јона са изразито хидрофилним карактером. Физичко-хемијске карактеристике K^+ и Na^+ су сличне, углавном се разликују по молекулској маси и атомском радијусу. У складу са наведеним, сматра се да је одабир *RP/WCX MMLC* одговарајући систем за овакву врсту анализе.

Табела 20 Физичко-хемијске карактеристике молекула диклофенака, рачунате *Marvin Sketch* софтвером

pK_a	$\log P$	$\log P$	$\log D$			удео анјона диклофенака [%]		
	неутралан облик	јонски облик	$pH\ 4,6$	$pH\ 5,0$	$pH\ 5,4$	$pH\ 4,6$	$pH\ 5,0$	$pH\ 5,4$
4,0	4,26	0,73	3,56	3,21	2,84	80,08	90,99	96,21

4.2.3.1. Одабир вредности експерименталних параметара

Вредности експерименталних фактора одабраних у оптимизацији методе наведени су у поглављу 3.3.3 Експерименталног дела и табели 9.

pH вредност окружења (мобилне фазе) значајно утиче на степен јонизације и аналита и карбоксилних група стационарне фазе. Да би се подстакла јонизација лиганда стационарне фазе и тиме побољшала ретенција хидрофилних катјона, одабир pH воденог дела мобилне фазе (x_1) усмерен је pK_a вредношћу карбоксилних група стационарне фазе (процењена између 4 и 5) [120,133]. Тако је pH вредност варирана у опсегу од 4,6 до 5,4 (табела 9), како би се успешно испитала интеракциона способност мобилне фазе када су карбоксилне групе и у јонизованом и нејонизованом облику. Сматра се да ће подешавање pH вредности у овом опсегу резултирати повећаном депротонацијом карбоксилних група, чиме ће се трансформисати у карбоксилатне групе. Негативно наелектрисане карбоксилатне групе подстичу ретенцију позитивно наелектрисаних базних аналита путем електростатичних привлачних сила, обезбеђујући пожељно ретенционо понашање катјона (K^+ и Na^+). Због тога, изабран је амонијум-ацетатни пуфер јер подржава pH опсег који је одабран за испитивање (капацитет пуфера износи од 3,76 до 5,76) [120,133]. Додатно, компоненте амонијум-ацетатног пуфера су испарљиве, што је обавезан предуслов за мобилну фазу која се употребљава у комбинацији са *CAD*-ом. Поред pH вредности, вариране су и вредности концентрације пуфера, које не само да су важне за облик и симетрију пикова, већ у великој мери регулишу ретенционо понашање катјонских компоненти анализираног узорка у коришћеним *RP/WCX* системима [16]. У том смислу, разматран је релативно велики опсег концентрација пуфера воденог дела мобилне фазе (30–70 mM).

Поред уобичајено тестираних експерименталних параметара у *RP/WCX* хроматографским системима, у студији је разматрана и врста органског растварача, ради разматрања могућности развоја методе, која би пратила еколошки прихватљиве принципе. Два органска растварача су засебно испитана као саставни део мобилне фазе у току развоја метода. Прво је употребљен *ACN* који је добро познат и опсежно тестиран растварач. Потом је употребљен *ACE* који је потенцијално еколошки прихватљива замена за *ACN*. *ACE* је испитан као алтернативни растварач јер *ACN*, иако има одличне особине за примену у саставу мобилне фазе, класификован је као растварач класе 2 у оквиру токсиколошке класификације. То доводи до тога да је потребно ограничити употребу *ACN* према смерници Међународног савета за хармонизацију техничких захтева (енг. *International Council for Harmonisation, ICH*), *Q3C* [134]. Насупрот томе, *ACE* је класификован као безбеднији растварач класе 3, који има повољнији токсиколошки профил [134]. Иако *ACE* и други алтернативни растварачи не могу у потпуности да имитирају својства *ACN*, у одређеним ситуацијама могућа је њихова ефикасна интеграција и најчешћи је начин развоја еколошки прихватљивих *HPLC* метода [135,136]. *ACE* показује слична својства као *ACN* приликом употребе у саставу мобилне фазе у *RP-HPLC* системима, што га чини погодном заменом у току развоја метода [137]. *ACE* и *ACN* имају сличне физичко-хемијске карактеристике, у погледу густине и вискозности, са разликом да *ACE* има много бољи токсиколошки профил [137,138]. Иако ацетон није компатибилан са *UV* детекцијом, јер апсорбује електромагнетно зрачење таласних дужина до 330 nm, компатибилан је са другим детекционим техникама, између осталог и са *CAD* детекцијом. У тим случајевима употреба ацетона уместо ацетонитрила је могућа [137–139].

Варирање вредности удела органског растварача у мобилној фази је намерно искључено из *DoE*. Прелиминарна истраживања су указала на доминантну улогу вредности удела органског растварача у управљању хидрофобним интеракцијама, што у овој фази истраживања није сматрано критичним фактором. Такође, *ACE* је показао слабију елуциону моћ за K^+ и Na^+ јоне, у поређењу са *ACN*. Сходно томе, био је потребан већи удео *ACE* у односу на *ACN* да би се одржало упоредиво време анализе.

Према томе, састав мобилних фаза коришћених у овој фази истраживања одабран је на следећи начин: амонијум-ацетатни пуфер/ацетонитрил = 60/40 [%, v/v] и амонијум-ацетатни пуфер/ацетон = 50/50 [%, v/v]. Особине амонијум-ацетатног пуфера су вариране пратећи вредности у табели 9, тј. испитане су *pH* вредности 4,6, 5,0 и 5,4, и вредности концентрације 30 mM, 50 mM и 70 mM.

4.2.3.2. *DoE* за дефинисање експерименталног простора

Оптимизоване су две методе за сепарацију диклофенака и његових контрајона (K^+ и Na^+), употребом мобилних фаза различитог састава, тј. врсте органског растварача (*ACN* или *ACE*) и концентрације пуфера воденог дела мобилне фазе (*pH* вредност и концентрација амонијум-ацетатног пуфера). Приликом развоја обе методе, узети су у обзир фактори који значајно утичу на ретенционо понашање анализата. Као што је наведено, удео органског растварача у мобилној фази је одржаван константним, док су *pH* вредност и концентрација пуфера варирани према плану експеримената 3^2 FFD, приказаним у табели 10.

Циљ развоја метода био је дефинисање експерименталних вредности које омогућавају сепарацију свих анализата, у прихватљивом временском оквиру. Пикови јона натријума и калијума препознати су као критични пар пикова, стога су праћени фактори селективности

($\alpha_{Na/K}$) у оба *MMLC-CAD* система (*MMLC_{ACN}* и *MMLC_{ACE}*). Иако α није мера раздвајања на базној линији, омогућава праћење међусобне разлике у задржавања анализата на колони, и последично праћење сепарације два пика [18,140]. Поред $\alpha_{Na/K}$, посматрани су и ретенциони фактори јона калијума (k_K) као последње елуираног пика, јер од њих зависи трајање анализе. За методу у којој је *ACE* коришћен као модификатор мобилне фазе, додатно је праћен и ретенциони фактор диклофенака (k_{DK}) због уоченог неретенционог понашања у одређеним тачкама *DoE*. Експериментално добијени резултати за сваку тачку *DoE*, приказани су у табели 21.

Табела 21 Резултати испитивања ретенционог понашања диклофенака и контрајона у *RP/WCX* систему када је као органски модификатор коришћен *ACN* (*MMLC_{ACN}*) и када је коришћен *ACE* (*MMLC_{ACE}*)

<i>DoE</i> план експеримената			Амонијум-ацетатни пуфер / <i>ACN</i> = 60/40 [%, v/v]		Амонијум-ацетатни пуфер / <i>ACE</i> = 50/50 [%, v/v]		
Бр.	x_1	x_2	$\alpha_{Na/K}$	k_K	$\alpha_{Na/K}$	k_{DK}	k_K
1	4,60	30,00	1,12	5,89	1,15	2,02	8,52
2	5,40	30,00	1,06	6,78	1,06	0,94	9,85
3	4,60	70,00	1,10	3,67	1,12	1,93	5,20
4	5,40	70,00	1,03	3,78	1,04	1,00	5,27
5	4,60	50,00	1,11	4,42	1,13	2,07	6,04
6	5,40	50,00	1,04	4,74	1,04	0,95	6,70
7	5,00	30,00	1,10	5,81	1,10	1,35	9,17
8	5,00	70,00	1,05	2,71	1,06	1,41	4,52
9	5,00	50,00	1,06	3,49	1,07	1,44	5,52
10*	5,00	50,00	1,06	3,48	1,07	1,41	5,58
11*	5,00	50,00	1,07	3,49	1,07	1,41	5,59

Резултати добијени извођењем експеримената на основу претходно одабраног дизајна коришћени су за развој математичких модела који описују везу између варираних хроматографских услова и праћених одговора система. Понашање фактора селективности $\alpha_{Na/K,(ACN)}$ исказано је линеарним моделом, док је понашање осталих праћених одговора приказано квадратним једначинама. Статистичка значајност развијених модела процењена је *ANOVA* тестом, а слагање експерименталних и моделом предвиђених вредности коефицијенатом детерминације (R^2 , *adj. R²* и *pred. R²*) и вредностима *lack of fit* (табела 22). Вредности коефицијената детерминације приказане су у табели 22, на основу којих је утврђена прихватљивост модела због њихових високих вредности. Штавише, вредности *lack of fit* нису биле статистички значајне за ниво значајности од 0,05 и ниво поузданости од 95%, чиме је потврђена адекватност свих модела.

Табела 22 Генерисани математички модели на основу експеримената дефинисаних употребом *DoE*, који описују ретенционо понашање и селективност диклофенака и његових контрајона у *RP/WCX MMLC* са различитим саставима мобилне фазе

Мобилна фаза	Ацетатни пуфер/ <i>ACN</i> = 60/40 [%, <i>v/v</i>]				Ацетатни пуфер/ <i>ACE</i> = 50/50 [%, <i>v/v</i>]					
	$\alpha_{K/Na}$		k_K		k_{DK}		$\alpha_{K/Na}$		k_K	
	коэф.	<i>P</i>	коэф.	<i>P</i>	коэф.	<i>p</i>	коэф.	<i>p</i>	коэф.	<i>P</i>
<i>b₀</i>	1,07		3,60		1,42		1,07		5,67	
<i>b₁ (pH)</i>	-0,03	$< 10^{-4}$	0,22	0,02	-0,52	$< 10^{-4}$	-0,04	$< 10^{-4}$	0,35	$8,9 \cdot 10^{-3}$
<i>b₂ (C)</i>	-0,02	0,01	-1,39	$< 10^{-4}$	$3,42 \cdot 10^{-3}$	0,81	-0,02	$< 10^{-4}$	-2,09	$< 10^{-4}$
<i>b_{1b2} (pH*C)</i>	/	/	-0,19	0,07	0,04	0,06	$-4,95 \cdot 10^{-4}$	0,78	-0,31	$2,98 \cdot 10^{-2}$
<i>b₁² (pH²)</i>	/	/	0,90	$2,00 \cdot 10^{-4}$	0,09	$4,00 \cdot 10^{-3}$	0,01	$1,30 \cdot 10^{-3}$	0,56	$6,10 \cdot 10^{-3}$
<i>b₂² (C²)</i>	/	/	0,58	$1,70 \cdot 10^{-3}$	-0,04	0,11	$4,72 \cdot 10^{-3}$	$6,73 \cdot 10^{-2}$	1,04	$3,00 \cdot 10^{-4}$
<i>p</i> -вредност	$< 0,0001$		$< 0,0001$		$< 0,0001$		$< 0,0001$		$< 0,0001$	
<i>R</i> ²	0,8662		0,9888		0,9959		0,9941		0,9911	
<i>adj. R</i> ²	0,8364		0,9795		0,9924		0,9892		0,9836	
<i>pred. R</i> ²	0,8157		0,9211		0,9613		0,9773		0,9264	
<i>lack of fit</i>	0,9888		0,2267		0,0625		0,7769		0,0515	

Утицај фактора на праћене хроматографске одговоре је нумерички исказан коефицијентима математичких модела. Коефицијенти математичких модела су дати у табели 22.

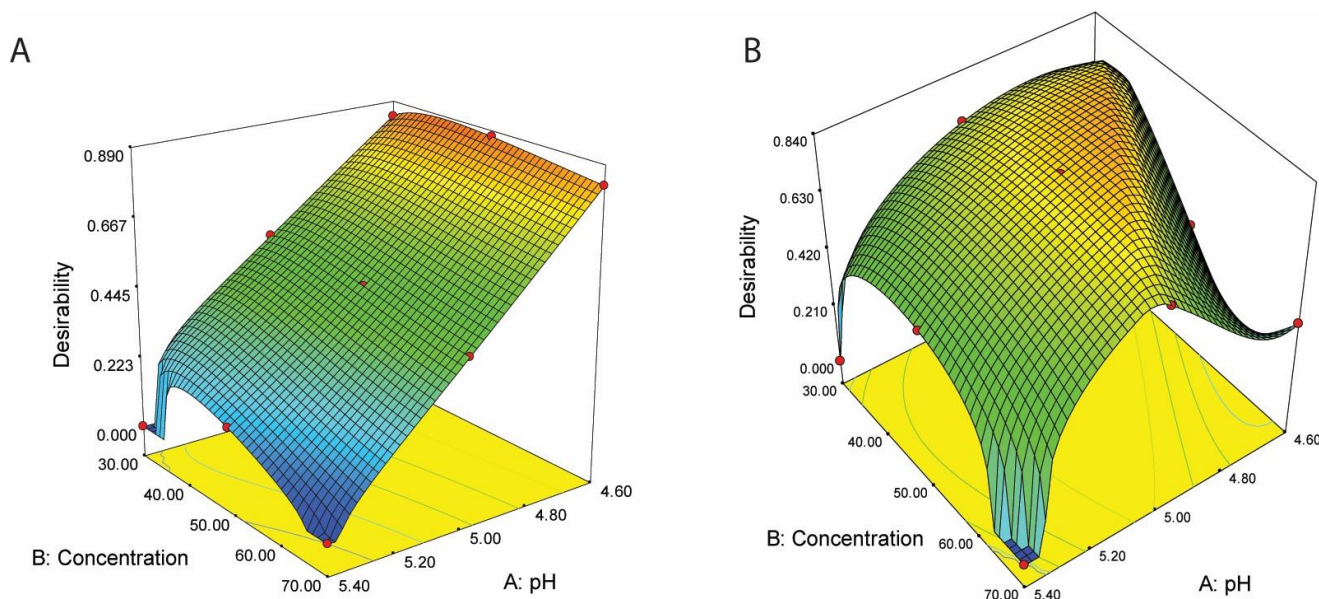
Утицај концентрације пуфера је интерпретиран кроз вредност коефицијента *b₂*. Једначине које описују *k_K* у обе мобилне фазе имплицирају да повећање концентрације пуфера доводи до скраћења ретенције калијумових јона. Овакво понашање се приписује повећаној концентрацији *NH₄⁺* у мобилној фази, због компетитивног понашања са *K⁺* за активна места на стационарној фази, што доводи до истискивања (померања) јона анализата и тиме долази до краћег ретенционог времена. Насупрот томе, повећање концентрације пуфера доводи до смањења растојања између пикова суседних анализата због мањег броја доступних анјонских активних места на стационарној фази, што негативно утиче на селективност [1,16]. Утицај концентрације пуфера на *k_{DK}* није разматран због његовог минималног утицаја на ретенционо понашање анјона [16].

Промена *pH* вредности воденог дела мобилне фазе је имала мање изражен ефекат на хроматографско понашање калијумових јона у односу на промену концентрације пуфера. Коефицијенти фактора (*b₁*) имају позитиван предзнак у случају *k_K* у обе мобилне фазе, негативан предзнак за *k_{DK}* у *ACE*/амонијум-ацетатном пуферском медијуму и негативан предзнак за $\alpha_{K/Na}$ у обе мобилне фазе. Ово указује да се са повећањем *pH* вредности водене фазе продужава ретенција јона калијума, а скраћује ретенционо време диклофенака и смањује раздвајање суседних пикова. Повећањем *pH* вредности воденог дела мобилне фазе повећава се број јонизованих карбоксилних група на површини стационарне фазе, што подстиче одбојне силе између диклофенака и карбоксилних група, односно бржег елуирања диклофенака. Утицај на ретенциони фактор калијумових јона је позитиван јер већи удео јонизованих (депротонованих) карбоксилних група омогућава интензивније интеракције између катјона и негативно наелектрисане површине стационарне фазе.

За мултикритеријумску оптимизацију две методе, примењена је методологија *MCDM* и Дерингера функција пожељних одговора. Циљне вредности током генерисања Дерингерове функције пожељних одговора постављене су у складу са дефинисаним циљевима оптимизације.

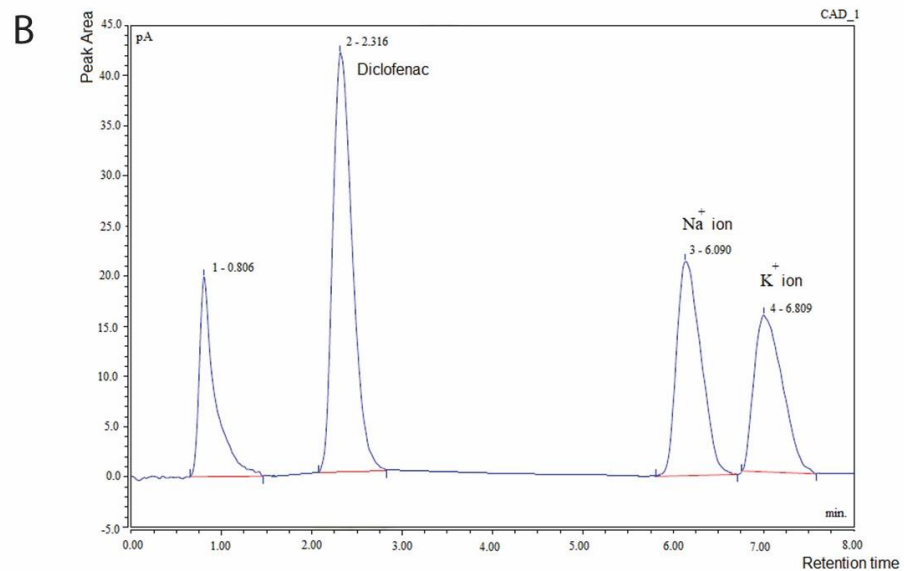
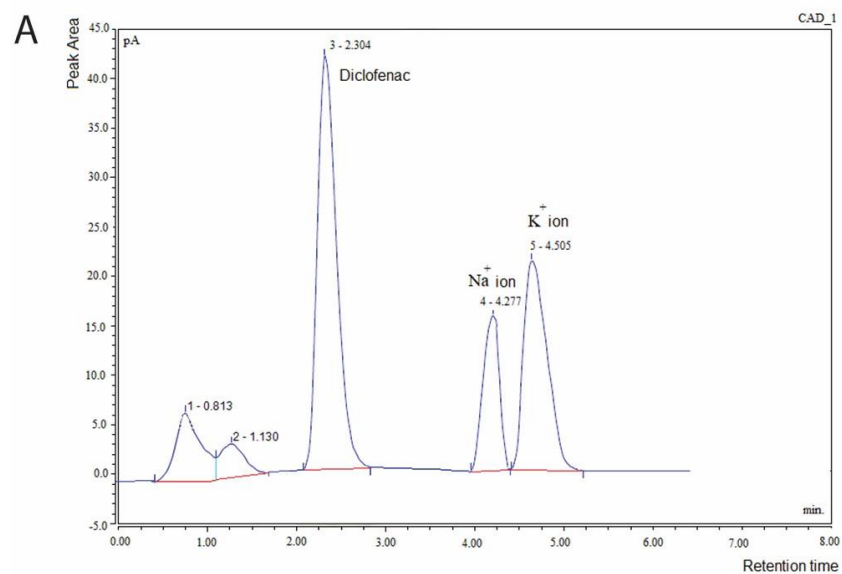
Да би се постигла оптимална сепарација анализата у што краћем временском оквиру, било је потребно дефинисати циљеве оптимизације. Примарни циљ оптимизације био је добијање максималне вредности α суседних пикова (K^+ и Na^+) како би се осигурала што боља сепарација овог критичног пара пикова. Секундарни циљ био је максимално повећање ретенционог времена негативно наелектрисаног диклофенака у *MMLC_{ACE}* систему како би се осигурала сепарација од пика мобилне фазе. И коначно, минимизација ретенционог фактора за последње елуирани пик (k_k) била је кључна како би се избегло непотребно продужавање хроматографске анализе, што је био последњи циљ развоја методе. Међу наведеним циљевима, максимална вредност фактора селективности била је од већег приоритета у *MMLC_{ACE}* систему, те је његовом значају додељена већа тежина. Овакво постављање приоритета допринело је повећању укупне вредности D , Дерингерове функције пожељних одговора.

Генерисане су 3D површине одговора да би се приказала укупна функција пожељних одговора у функцији pH и C [mM]. Ови графикони су креирани за оба хроматографска система, *MMLC_{ACE}* и *MMLC_{ACN}* (слика 26).



Слика 26 3D површине Дерингерове функције пожељних одговора за а) *MMLC_{ACE}* систем и б) *MMLC_{ACN}* систем

На генерисаним 3D површинама које графички приказују Дерингерову функцију пожељних одговора, уочена је област означена наранџастом бојом. Њом је означена комбинација вредности испитаних променљивих варијабли које најбоље испуњавају циљеве оптимизације. У *MMLC_{ACN}* систему, функција D има вредност 0,83 при концентрацији амонијум-ацетатног пуфера од 48,00 mM и pH вредности од 4,82. С друге стране, у *MMLC_{ACE}* систему, вредност D од 0,88 је постигнута при концентрацији амонијум-ацетатног пуфера од 40 mM и pH вредности од 4,62 (слика 26). Оптимални хроматограми су приказани на слици 27. Генерисани су софтверским алатима преклапањем појединачно добијених хроматограма у току испитивања диклофенак-натријума и диклофенак-калијума.



Слика 27 Хроматограми добијени софтверски потпомогнутом анализом преклапања пикова диклофенак-натријума и диклофенак-калијума под а) оптималним условима *MMLC_{ACN}* и б) оптималним условима *MMLC_{ACE}*

4.2.3.3. Процена еколошке прихватљивости развијених метода

Уз помоћ алата којима се тестира еколошка прихватљивост, прво је процењена еколошка прихватљивост употребљених органских растварача у саставу мобилне фазе, а потом и еколошки профил развијених метода. Оваквом проценом спроведена је евалуација могућности замене органског растварача у одабраном *RP/WCX* систему и сврсисходност исте.

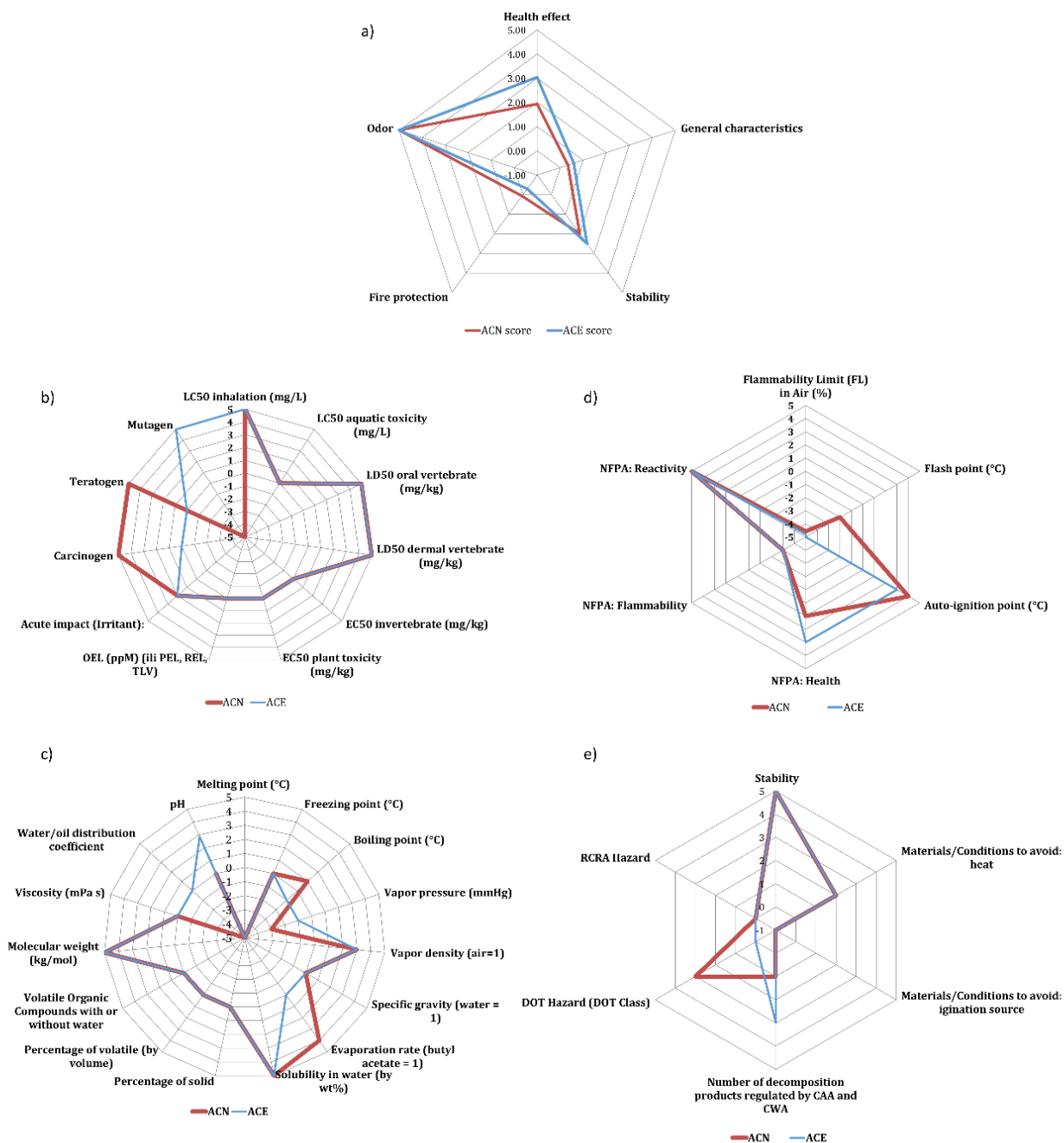
Да би се обезбедила свеобухватна процена коришћених органских растварача мобилне фазе (*ACN* и *ACE*), примењена је методологија индекса еколошке прихватљивости растварача (енг. *Greenness Index, GI*) у оквиру предложених *MMLC-CAD* метода. Индекс еколошке прихватљивости се ослања на информације које су наведене у листама безбедности растварача (енг. *Safety Data Sheets, SDS*). *GI* истиче различита својства и ефекте на безбедност, здравље и окружење (енг. *Safety, Health, and the Environment, SHE*) током животног циклуса растварача (за разлику од традиционалних сажетих описа растварача који често не узимају у обзир промене којима растварач подлеже у току употребе) [141].

Пратећи принципе зелене хемије који су детаљније објашњени у раду [135] (енг. *Green Analytical Chemistry, GAC*), атрибути растварача се на основу свеобухватне процене сврставају у пет категорија: утицаји на здравље, општа својства, мирис, противпожарна безбедност и стабилност. Развијени су алгоритми за сортирање и груписање како би се квантификовао сваки атрибут и кластер, што резултира квантитативним оценама. Додељене оцене се затим визуелно представљају пауковим дијаграмом који омогућава холистичко, вишепараметарско поређење растварача. Паукови дијаграми се користе за визуелно представљање укупне еколошке прихватљивости растварача превођењем информација из њихових безбедносних листа (*SDS*) на скалу од -5 (најмање еколошки прихватљиво) до +5 (највише еколошки прихватљиво). Поред тога, појединачни паукови дијаграми могу се креирати за четири од пет категорија (осим мириса), пружајући додатни увид у сваки критеријум. У случајевима када недостају битни подаци из Безбедносних листа, препоручује се да оцена буде нула. Коначан резултат је свеобухватна табела индекса еколошке прихватљивости (табела 23), која показује проценат доступних података коришћених у процени и тиме одражава ниво поузданости процене еколошке прихватљивости [141–144].

Табела 23 Свеобухватна табела индекса прихватљивости за органске раствараче *ACN* и *ACE*

Процењени критеријум	<i>ACN</i> бодовни резултат	Доступни подаци у %	<i>ACE</i> бодовни резултат	Доступни подаци у %
Утицај на здравље	1,94	61,54	3,05	38,46
Општа својства	0,33	53,33	0,59	46,67
Стабилност	2,00	80,00	2,50	60,00
Противпожарна безбедност	0,07	100,00	-0,30	100,00
Мирис	5,00	100,00	5,00	100,00

Паукови дијаграми приказани су на слици 28, која обухвата приказ примарног пауковог дијаграма и четири додатна секундарна дијаграма који илуструју резултате процене индекса еколошке прихватљивости за *ACN* и *ACE*. На слици 28а, примарни паукови дијаграм показује да *ACE* има боље особине од *ACN* у погледу безбедности, општих карактеристика и стабилности. Међутим, *ACN* показује нешто бољи профил својства запаљивости.



Слика 28 а) Примарни паукови дијаграм ацетонитрила (*ACN*) и ацетона (*ACE*); Секундарни паукови дијаграми *ACN*-а и *ACE*-а: **b)** Утицај на здравље; **c)** општа својства; **d)** заштита од пожара и **e)** стабилност

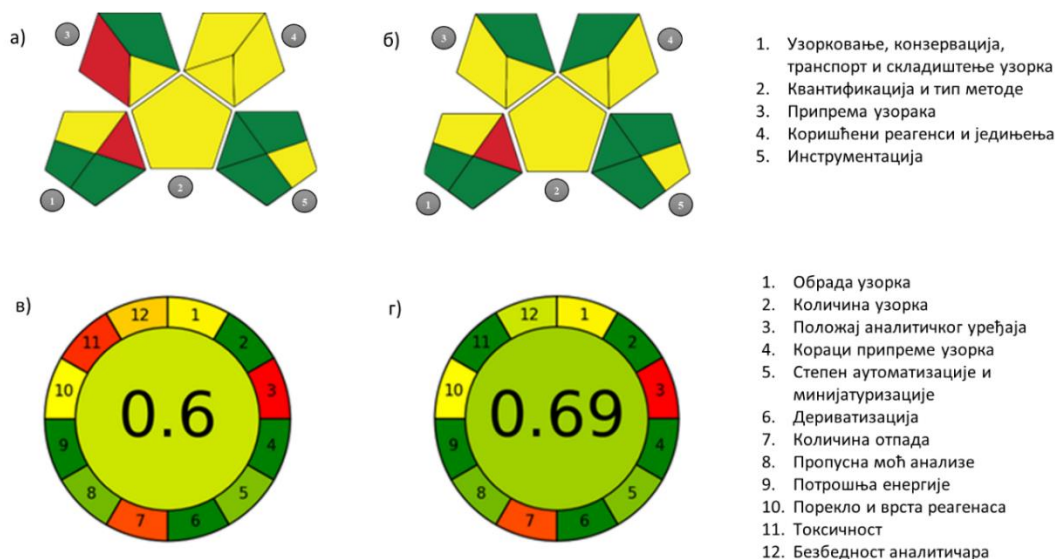
Секундарни паукови дијаграми (слика 28, *b-e*) пружају детаљан увид у појединачне резултате који доприносе укупној процени. Детаљни прорачуни за креирање паукових дијаграма могу се наћи као део додатног материјала 3 (доступан у оквиру реф. [145] и који се због обимности налази у ФарФаР репозиторијуму, <https://farfar.pharmacy.bg.ac.rs/>) у коме су наведене формуле и процедуре које се користе за бодовање индекса зеленила [143,144]. Овакав приступ поједностављује процену растварача, што га чини корисним алатом за поједностављивање прорачуна за које се зна да су дуготрајни и сложени, као што је назначено у референцама [142,146]. Употреба паукових дијаграма омогућава једноставно поређење растварача. Паукови дијаграми и табела индекса еколошке прихватљивости показују да *ACE* има виши ниво еколошке и здравствене безбедности у поређењу са *ACN*. Према овим резултатима, *ACE* је растварач избора, који је у складу са принципима зелене хемије.

Еколошки профили развијених метода за испитивање диклофенака и његових контрајона су потом процењене коришћењем *GAPI* и *AGREE* алата.

GAPI је алат који има могућност процене свих корака потребних за извођење аналитичке методе, од прикупљања узорака до коначне експерименталне реализације. *GAPI* пружа квантитативне и квалитативне информације о присутним ризицима извођења аналитичке методе. Степен утицаја на животну средину симболично је представљен са 5 петоуглова подељених у 15 сегмената, по један за сваки аспект аналитичке процедуре. У њиховом графичком приказу, сегменти имају боју у односу на степен еколошке прихватљивости (црвена: неприхватљиво, жута: прихватљиво, зелена: пожељно). Захваљујући овом релативно једноставном концепту за представљање еколошког профила аналитичке методе, *GAPI* је идеалан за поређење аналитичких метода [147].

Насупрот томе, *AGREE* калкулатор узима у обзир 12 *GAC* принципа, додељујући им вредности у опсегу од 0 до 1 за мерење нивоа еколошке прихватљивости. Вредност 1 означава потпуну усклађеност са еколошким принципима, док резултат 0 указује на еколошку неприхватљивост за вредновани сегмент. *AGREE* калкулатор омогућава креирање графика у облику сата, где централни део приказује укупни *AGREE* резултат методе, са периферним сегментима који описују сваки посматрани параметар [148,149]. Сваки укупни *AGREE* резултат који прелази 0,6 сматра се задовољавајућим за еколошку одрживост [150]. Ширина сваког сегмента означава ниво утицаја који параметри имају на укупни резултат додељених боја, које се крећу од црвене преко жуте до зелене, што указује на степен одрживости [149].

Генерисани *GAPI* пиктограми су приказани на слици 29 (а и б). Може се приметити да је главна разлика између две методе, са еколошког аспекта, еколошка прихватљивост коришћене мобилне фазе. Стога се може закључити да је *MMLC_{ACE}* метода одрживија, што је приказано кроз представљене *GAPI* пиктограме. Такође, и на *GAPI* и на *AGREE* дијаграмима, најкритичнији сегмент у погледу еколошке прихватљивости обе методе односи се на дисконтинуирано узорковање (*off-line*), што подразумева временско кашњење између узорковања и анализе. Такође, најизраженија разлика између две аналитичке методе са еколошког аспекта је еколошка прихватљивост коришћене мобилне фазе, што је приметно код оба алата за еколошку процену. Сходно томе, еколошка прихватљивост методе са *ACE* је већа у поређењу са методом у којој се користи *ACN* (слика 29).



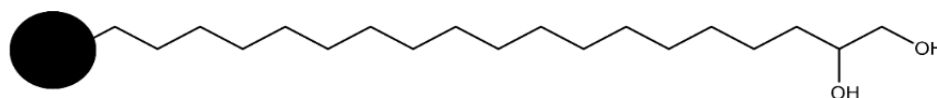
Слика 29 Приказани резултати добијени коришћењем GAPI алата за а) $MMLC_{ACN}$ и б) $MMLC_{ACE}$ и коришћењем AGREE алата за в) $MMLC_{ACN}$ и г) $MMLC_{ACE}$

4.3. Карактеризација $RP/HILIC$ хроматографског система применом мешовитих $QSRR$ модела

Карактеризација $RP/HILIC$ мултимодалног система, добијеног употребом *Acclaim mixed-mode HILIC-1* колоне, извршена је описаном методологијом у поглављу 3.4 Експерименталног дела.

4.3.1. Дефинисање испитаног експерименталног простора

$RP/HILIC$ систем, као и раније образложени RP/WCX , има способност испољавања различитих модалитета у зависности од састава мобилне фазе. $RP/HILIC$ систем је успостављен употребом *Acclaim mixed-mode HILIC-1* ($3\ \mu\text{m}$, $2,1 \times 150\ \text{mm}$) колоне и одговарајуће претколоне. Стационарна фаза одабране колоне је изграђена из октадецил ланаца ($C18$), извора хидрофобних интеракција и диолне групе као извор поларних интеракција (слика 30) [3,21]. Карактеристично за поменути систем је да је испољавање ретенционих механизма највише под утицајем састава мобилне фазе, односно вредности удела органског растварача. Са присуством високог процента ACN испољава се $HILIC$ режим, док се са смањеним нивоом органског растварача подстиче испољавање RP модалитета [151]. Карактеристично за $HILIC$ режим је појава слоја адсорбованих молекула воде на површини стационарне фазе, имобилисаних водоничним везама, а који значајно учествује у ретенционом процесу [13,152]. Графичко приказивање ретенционог понашања анализата у зависности од удела ацетонитрила у мобилној фази графички се представља обликом слова U [151]. Минимална вредност тако приказаног графика указује на тачку у којој долази до измене испољавања доминантног ретенционог механизма [152].



Слика 30 Графички приказ структуре лиганда *Acclaim mixed-mode HILIC-1* колоне

Током испитивања, одабране су вредности *ACN* тако да обухвају вредност удела *ACN* од 70 %, *v/v*, где је прелаз између *RP* и *HILIC* режима према приручнику за *Acclaim mixed-mode HILIC-1* колону [153]. Одабране су по две вредности за испитивање сваког модалитета, укључујући и претходно поменућу вредност од 70 %, *v/v*. Садржај органског растварача је дефинисан између 52 %, *v/v ACN* и 92 %, *v/v ACN*, како би се омогућило испитивање доминантног присуства *RP* механизма приликом нижих садржаја ацетонитрила и *HILIC* механизма, приликом присуства виших удела органског растварача [153].

Поред присуства очекиваних ретенционих механизма, у истраживањима је запажено и присуство *IEX* интеракција, које настају као последица присуства функционалних група лигананда стационарне фазе или јонизованих силанолних група, које превасходно имају утицај на ретенцију јонизованих анализата [13,151]. С тим у вези, у току извођења прелиминарних испитивања запажен је значајан утицај *pH* вредности и концентрације пуфера воденог дела мобилне фазе на анализите са способношћу јонизације. Одабране су *pH* вредности пуфера воденог дела мобилне фазе које подржавају радни услови колоне (*pH* 3-7 [153]), а које су у складу са проценом јонизације одабраних анализата. Такође, *pH* вредности су одабране тако да је целокупан распон испитаних вредности (3,78 – 5,72) унутар опсега пуферског капацитета амонијум-ацетатног пуфера, како би се избегла варијабилност резултата изазвана променом састава мобилне фазе. Концентрација употребљеног пуфера је варирана у опсегу 20 – 50 mM, јер високе концентрације пуфера доводе до сузбијања присутних јонских интеракција [154]. Експериментални фактори, укључујући и вредности испитаних факторских нивоа, приказани су у поглављу 3.4.1 Експерименталног дела у табели 11.

Утицај експерименталних фактора на ретенционо понашање одабраних молекула испитан је пратећи план експеримената, који је наведен у табели 12. Како је очекивано да ретенционо понашање молекула прати криву облика U, одабран је *DoE* који пружа увид у ретенционо понашање анализата у више тачака експерименталног простора. Као одговарајући дизајн препознат је *CCD-R*, којим се експериментални параметри испитују на 5 факторских нивоа, што је описано у 3.4.1. Експерименталног дела. Одабран *DoE* је примењен само за јонизоване анализите, за које се од значаја показала и *pH* вредност заједно са концентрацијом пуфера (*C*, mM), док је понашање неутралних анализата праћено у дефинисаних 5 тачака различитог састава мобилне фазе, јер је утицај *pH* и концентрације пуфера воденог дела мобилне фазе био занемарљив.

За испитивање *RP/HILIC* система одабрани су анализите који обухватају широк спектар поларности и различите способности јонизације. Због тога су за сваку групу јонске врсте (молекули у неутралном, катјонском и анјонском облику) бирани молекули који се међусобно разликују по хидрофилности (молекули који су хидрофилни, умерено хидрофилни и хидрофобни). Вредности *log P* испитаних молекула су у опсегу вредности од -1,87 до 3,88, што је праћено опсегом *log D* вредности од -2,64 до 3,64 (табела 24). Одабрани молекули се разликују у могућности формирања јонских врста и поларности, како би се проценили ретенциони механизми оба могућа хроматографска режима. Процена способности јонизације испитаних анализата и вредности *log P* и *log D* приказан је у табелама 24 и 25. Промена поларности молекула описана је путем *log D* вредности у зависности од *pH* вредности окружења. Процентуална заступљеност одговарајућег јонског облика, за молекуле у јонском облику у условима мобилне фазе приказани су у табели 25.

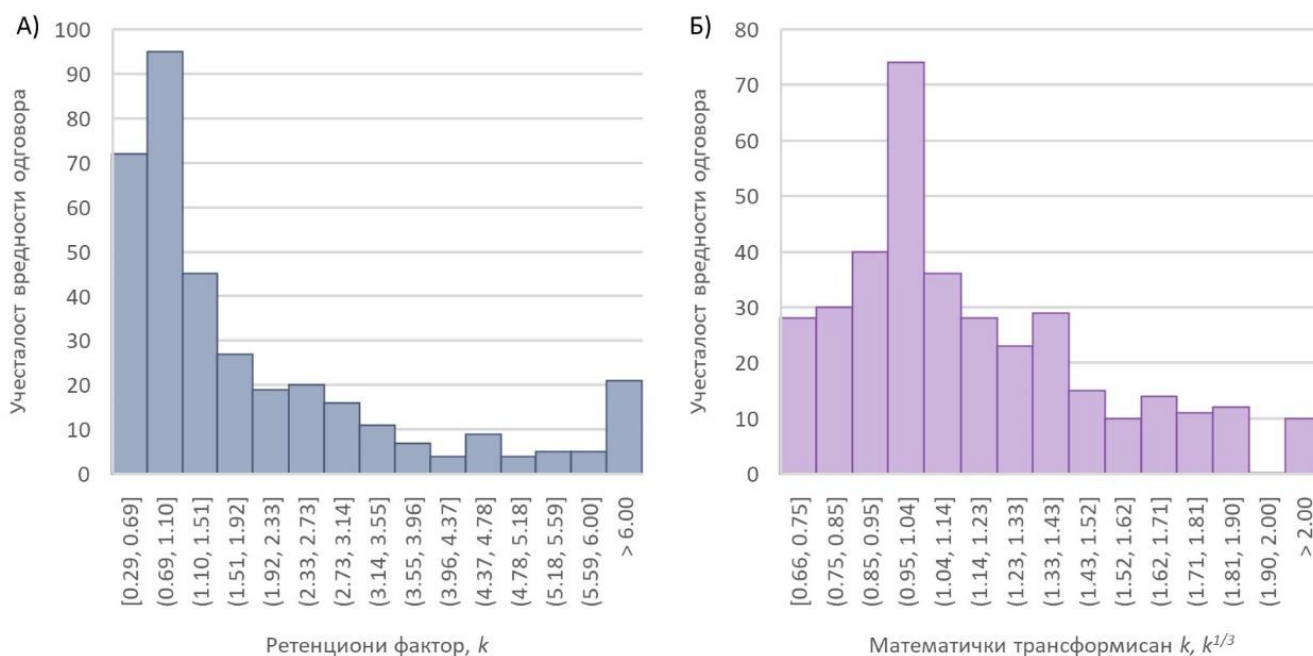
Табела 24 Приказ израчунатих вредности $\log P$ и $\log D$ за дефинисане pH услове мобилне фазе, за молекуле испитане у $RP/HILIC$ $MMLC$ систему

Молекул	Mr [g/mol]	$\log P$	$\log D$				
			pH 3,78	pH 4,17	pH 4,75	pH 5,33	pH 5,72
Н-ацетил-цистеин	163,195	-0,71	-0,99	-1,22	-1,69	-2,23	-2,61
Ацетил-салицилна киселина	180,1574	1,24	0,72	0,41	-0,11	-0,67	-1,04
Ацеклофенак	354,182	3,88	3,38	3,08	2,56	2,00	1,63
Атомоксетин	255,3547	3,81	0,57	0,57	0,57	0,59	0,62
Бензоева киселина	122,1213	1,63	1,45	1,28	0,87	0,35	0,00
Донепезил	379,4920	4,21	0,73	0,75	0,86	1,12	1,40
Есциталограм	324,3919	3,76	0,26	0,27	0,28	0,31	0,37
Етодолак	287,3535	3,44	3,40	3,34	3,13	2,74	2,41
Фуросемид	330,744	1,75	1,62	1,49	1,13	0,64	0,27
Фенилефрин	167,2050	0,60	-2,64	-2,64	-2,63	-2,58	-2,50
Гликлазид	323,411	1,73	1,58	1,44	1,16	0,94	0,86
Кетопрофен	254,2806	3,61	3,36	3,15	2,69	2,15	1,78
Прокаин	236,3101	1,88	-1,65	-1,61	-1,55	-1,38	-1,17
Псеудоефедрин	165,2322	1,32	-1,92	-1,92	-1,91	-1,88	-1,82
Салбутамол	239,3107	0,88	-2,36	-2,36	-2,35	-2,32	-2,28
Салицилна киселина	138,1207	1,98	0,95	0,58	0,02	-0,52	-0,86
Моклобемид	268,739	1,45	-0,77	-0,39	0,16	0,68	0,98
Трамадол	263,3752	2,45	-1,05	-1,04	-1,01	-0,91	-0,76
Аминофилин	180,1640	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77
Бетаметазон	392,4611	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68
Бромазепам	316,153	2,54	2,51	2,53	2,54	2,54	2,54
Диазепам	284,740	3,08	3,02	3,05	3,07	3,07	3,08
Етофилин	224,2166	-1,24	-1,24	-1,24	-1,24	-1,24	-1,24
Хидрокортизон	362,4599	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28
Кофеин	194,1906	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55
Лоразепам	321,158	3,53	3,53	3,53	3,53	3,53	3,53
Преднизолон	360,4440	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27
Ципротерон-ацетат	416,938	3,64	3,64	3,64	3,64	3,64	3,64
Дипрофилин	254,2426	-1,87	-1,87	-1,87	-1,87	-1,87	-1,87
Оксазепам	286,713	2,92	2,92	2,92	2,92	2,92	2,92
Мегестрол	342,4718	3,28	3,28	3,28	3,28	3,28	3,28
Флуоцинолон-ацетонид	452,4882	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
Карбамазепин	236,2686	2,77	2,77	2,77	2,77	2,77	2,77
Метилпреднизолон	374,4706	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
Пентоксифилин	278,3070	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Теофилин	180,1640	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77

Табела 25 Процентуални удео заступљености јонског облика молекула при дефинисаним *pH* вредностима мобилне фазе у *RP/HILIC MMLC* систему

Молекул	Јонски облик	Заступљеност јонизованог молекулског облика [%]				
		<i>pH</i> 3,78	<i>pH</i> 4,17	<i>pH</i> 4,75	<i>pH</i> 5,33	<i>pH</i> 5,72
Ацетилцистеин	Анјон	47,84	69,24	89,54	97,02	98,76
Ацетил-салицилна киселина	Анјон	69,87	85,05	95,58	98,8	99,51
Ацеклофенак	Анјон	68,4	84,16	95,28	98,71	99,47
Бензоева киселина	Анјон	33,63	55,43	82,54	94,73	97,78
Етодолак	Анјон	10,15	21,71	51,33	80,04	90,78
Фуросемид	Анјон	25,24	45,32	75,91	92,23	96,7
Гликлазид	Анјон	30,76	55,67	82,7	94,79	97,81
Кетопрофен	Анјон	44,12	65,97	88,05	96,55	98,57
Салицилна киселина	Анјон	90,72	96	98,92	99,71	99,88
Атомоксетин	Катјон	100	100	100	100	100
Донепезил	Катјон	100	100	100	100	100
Есциталопрам	Катјон	100	100	100	100	100
Фенилефрин	Катјон	100	100	100	100	100
Прокаин	Катјони	91,30+8,70	96,73+3,27	99,11+0,88	100	100
Псеудоефедрин	Катјон	100	100	100	100	100
Салбутамол	Катјон	100	100	100	100	100
Моклобемид	Катјон	99,42	98,6	94,88	82,96	66,49
Трамадол	Катјон	100	100	100	100	100

Вредности ретенционих података добијених извођењем експеримената према *CCD-R*, су употребљене за израчунавање вредности ретенционих фактора k , пратећи једначину 1. На добијене вредности k примењена је математичка трансформација кубног кореновања, $k^{1/3}$. Трансформација је примењена због процењене асиметричности расподеле вредности података, приказаних на слици 31. Она се примењује ради добијања расподеле података која приближније прати Гаусову криву нормалне расподеле. Ово помаже изградњи стабилнијих модела са бољим потенцијалом предвиђања, односно генерисањем мање вредности грешке, иако алгоритми машинског учења не захтевају рад са подацима чија расподела прати Гаусову криву [114]. Прикупљена база података се због своје обимности налази у ФарФар репозиторијуму, означена као додатни материјал 4, <https://farfar.pharmacy.bg.ac.rs/>.



Слика 31 Приказ дистрибуције података а) вредности ретенционог фактора б) вредности математички трансформисаног ретенционог фактора за молекуле испитане у *RP/HILIC MMLC* систему

4.3.2. Развој мешовитих *QSRR* модела за процену ретенционих механизма

За потребе карактеризације испитаног *RP/HILIC* система, развијено је три мешовита *QSRR* модела, који служе за идентификовање присутних међумолекулских интеракција, заступљених између молекула аналита и функционалних група стационарне фазе. Глобални модел (*G-GBT_{RP/HILIC}*) је развијен на основу података свих испитаних аналита, док су локални модели изграђени на издвојеним деловима базе података. Па тако први локални модел описује понашање молекула заступљених у јонском облику (*LI-GBT_{RP/HILIC}*), а други молекуле заступљене у неутралном облику (*LN-GBT_{RP/HILIC}*). Циљ развоја вишеструких модела је боља диференцијација присутних међумолекулских интеракција у току ретенционог понашања, зависно од типа молекула (локални модели), као и свеобухватна процена *RP/HILIC* система (глобални модел).

Модели су развијени употребом *GBT* алгоритма, чије су предности детаљније објашњене у делу 1.2.1.4.2. Увода. Хиперпараметри *GBT* алгоритма (број стабала, максимална дубина, минималан број узорака, број корпи (енг. *Number of Bins*), минимално побољшање за поделу (енг. *Min split improvement*), стопа учења и стопа узорковања (енг. *Sample rate*)), као и перформансе развијених модела (Q^2_{cv} , Q^2_{ext} , *RMSEE*, *RMSEP*, %*RMSEE*, %*RMSEP*) приказани су у табели 26. Перформансе модела процењене су интерним и екстерним метрикама валидације, на основу чега је потврђена одговарајућа предиктивна способност модела. Вредности метрике екстерне валидације *QSRR* модела, указују на добру способност предвиђања генерисаних модела (табела 26). То значи да се овакви модели могу примењивати не само у предвиђању вредности *k* за експериментално испитане анализе, већ и за анализе познатих структура и *a priori* непознатог ретенционог понашања. Ово даље имплицира могућност употребе развијених модела у току развоја *RP/HILIC* метода.

Табела 26 Приказ вредности хиперпараметара мешовитих *QSRR* модела, издвојених значајних фактора и стопама генерисане грешке, коришћених у процени *RP/HILIC* система

Модел		<i>G-GBT_{RP/HILIC}</i>	<i>LI-GBT_{RP/HILIC}</i>	<i>LN-GBT_{RP/HILIC}</i>
Вредности хиперпараметара	Број стабала	46	21	50
	Максимална дубина	6	6	15
	Минималан број узорака	5,19	10	3,0784
	Број корпи	15	20	22
	Минимално побољшање за поделу	0,001	0,001	0,0025
	Стопа учења	0,0967	0,3144	0,1497
	Стопа узорковања	0,702	0,9908	0,7003
Значајни <i>MD</i>		<i>mindssC</i>	<i>nBase</i>	<i>MATS1e</i>
		<i>ATSC2e</i>	<i>hmax</i>	<i>AATSC5e</i>
		<i>ATSC4m</i>	<i>minaaCH</i>	<i>PubchemFP189</i>
		<i>PubchemFP366</i>	<i>ATSC1i</i>	<i>ALogP</i>
		<i>minHBd</i>	<i>AATS0m</i>	<i>AATS7v</i>
		<i>AATSC3e</i>	<i>nsCH3</i>	<i>ATSC8v</i>
		<i>ATSC3m</i>	<i>MLFER_A</i>	<i>AATS0e</i>
				<i>AATS1v</i>
				<i>SCH-6</i>
Значајни <i>EP</i>		<i>ACN [% v/v]</i>	<i>ACN [% v/v]</i>	
		<i>pH</i>	<i>C [mM]</i>	<i>ACN [% v/v]</i>
		<i>C [mM]</i>	<i>pH</i>	
Q^2_{cv}		0,912 +/- 0,085	0,941 +/- 0,042	0,879 +/- 0,211
Q^2_{ext}		0,911	0,932	0,868
<i>RMSEE</i>		0,106 +/- 0,035	0,105 +/- 0,049	0,043 +/- 0,046
<i>RMSEP</i>		0,117	0,129	0,037
% <i>RMSEE</i>		0,6599	0,5198	0,3998
% <i>RMSEP</i>		1,6298	0,9672	2,1369

На основу изграђених модела препознате су варијабле које значајно утичу на ретенционо понашање анализата и које указују на присутне ретенционе механизме у испитаном *RP/HILIC* *MMLC* систему. Значајне варијабле које су издвојене изграђеним *QSRR* моделима приказане су у табели 26. Кратка образложења издвојених *MD* из свих развијених модела приказана су у табели 27.

Табела 27 Кратко образложење дескриптора значајних за опис *RP/HILIC* бимодалног система [111,125]

Модел	Молекулски дескриптор	Опис молекулског дескриптора	Група
G-GBT_{RP/HILIC}	<i>mindssC</i>	Минималне вредности електротополошког стања атома типа <i>dssC</i> ($=C<$)	Електротополошко стање типа атома
	<i>ATSC2e</i>	Центрирана <i>Broto-Moreau</i> аутокорелација за <i>lag</i> 2 пондерисане Сандерсоновом електронегативношћу	2D аутокорелациони MD
	<i>ATSC4m</i>	Центрирана <i>Broto-Moreau</i> аутокорелација за <i>lag</i> 4 пондерисане масом	2D аутокорелациони MD
	<i>PubchemFP366</i>	Указује на значај атома угљеника који у свом суседном окружењу има атоме водоника и кисеоника, независно до типа везе <i>C(~H)(~O)</i> [155]	<i>Pubchem</i> молекулски отисак прста (<i>fingerprint</i>)
	<i>minHBd</i>	Минималне електротополошке вредности за јаке доноре водоничних веза	Електротополошко стање типа атома
	<i>AATSC3e</i>	Просечна вредности центриране <i>Broto-Moreau</i> аутокорелације за <i>lag</i> 3 пондерисане Сандерсоновом електронегативношћу	2D аутокорелациони MD
	<i>ATSC3m</i>	Центрирана <i>Broto-Moreau</i> аутокорелације за <i>lag</i> 3 пондерисане масом	2D аутокорелациони MD
LI-GBT_{RP/HILIC}	<i>nBase</i>	Број базних група	Број базних група
	<i>Hmax</i>	Максималне вредности електротополошког стања водониковог атома (<i>H</i>)	Електротополошко стање типа атома
	<i>minaaCH</i>	Минималне вредности електротополошког стања атома типа <i>aaCH</i> ($:CH:$)	Електротополошко стање типа атома
	<i>ATSC1i</i>	Центрирана вредност <i>Broto-Moreau</i> аутокорелације за <i>lag</i> 1 пондерисана јонизационим потенцијалом	2D аутокорелациони MD
	<i>AATS0m</i>	Просечна <i>Broto-Moreau</i> аутокорелација за <i>lag</i> 0 пондерисана масом атома	2D аутокорелациони MD
	<i>nsCH3</i>	Број атома типа $-CH_3$	Електротополошко стање типа атома
	<i>MLFER_A</i>	Укупна киселост водоничне везе растворене супстанце [156]	<i>MLFER</i> дескриптор
LN-GBT_{RP/HILIC}	<i>MATS1e</i>	<i>Moran</i> аутокорелација за <i>lag</i> 1 пондерисана Сандерсоновом електронегативношћу	2D аутокорелациони MD
	<i>AATSC5e</i>	Просечна вредности центриране <i>Broto-Moreau</i> аутокорелације за <i>lag</i> 5 пондерисане Сандерсоновом електронегативношћу	2D аутокорелациони MD
	<i>PubchemFP189</i>	Најмање два незасићена неароматична прстена састављена само од угљеникоивих атома, величине шесточланог прстена [155]	<i>Pubchem</i> молекулски отисак прста (<i>fingerprint</i>)
	<i>ALogP</i>	<i>Ghose-Crippen</i> партициони коефицијент октанол/вода (<i>logP</i>)	Особине молекула

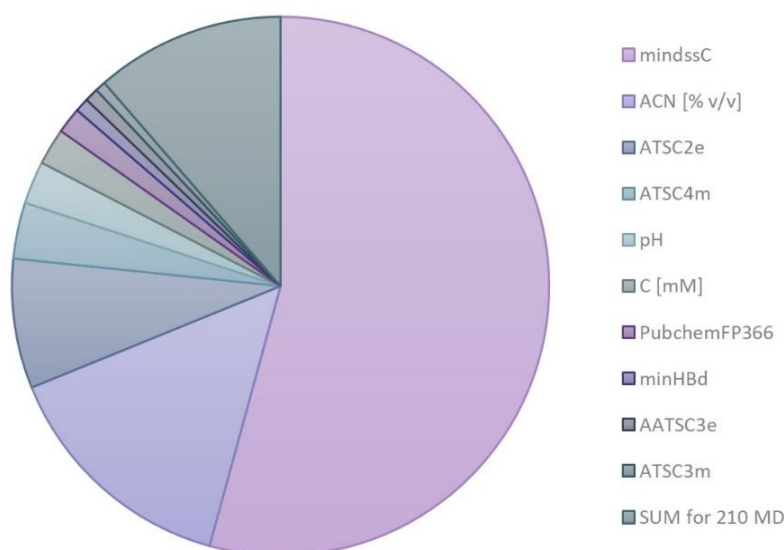
Кодови генерисаних мешовитих *QSRR* модела који се могу користити за њихову репродукцију у *RapidMiner* софтверу дати су у додатном материјалу 5, који се због обимности налази похрањен у ФарФар репозиторијуму, <https://farfar.pharmacy.bg.ac.rs/>.

4.3.3. Карактеризација ретенционих механизма путем изграђених *QSRR* модела

Развојем мешовитих *QSRR* модела (*LI-GBT_{RP/HILIC}*, *LN-GBT_{RP/HILIC}*, *G-GBT_{RP/HILIC}*), препознавањем и тумачењем високо-утицајних параметара на ретенционо понашање испитаних анализата у *RP/HILIC* систему, стиче се увид у интеракциони потенцијал испитаног хроматографског система.

4.3.3.1. Значајни параметри истакнути глобалним *QSRR* моделом (*G-GBT_{RP/HILIC}*)

Фактори који су у значајној вези са ретенционом понашањем анализата у *RP/HILIC* систему, *MD* и *EP*, истакнути глобалним моделом приказани су у табелама 26 и 27. Њихов релативни значај истакнут развијеним *G-GBT_{RP/HILIC}* приказан је графички на слици 32.



Слика 32 Приказ значајности фактора у *RP/HILIC* систему који су истакнути *G-GBT_{RP/HILIC}* *QSRR* моделом

Највише рангиран *MD mindssC* спада у дескрипторе који описују електро-тополошко стање атома у молекулу, прецизније указује на значајност атома угљеника у молекулу са једном двоструком ковалентном везом и две једноструке везе [157]. Посматрајући структуре испитаних молекула (слика 14), може се закључити да су овакви *C*-атоми извор и центри поларности молекула. Такође, као значајни су се показали и *MD* који припадају врсти *ATSC* (енг. *Autocorrelation of a Topological Structure - Centred*) дескриптора. *ATSC* спадају у 2D аутокореелационе дескрипторе. Изразиту значајност показао је *ATSC2e*, који изражава квантитативну вредност корелације између Сандерсонове електронегативности атомских парова који су тачно две везе међусобно удаљени. Односно, може се сматрати да *ATSC2e* дескриптор указује на значајност дистрибуције електронегативности унутар молекула, што последично указује и на учешће поларности молекула у току ретенционог понашања

[129]. Такође, њему сличан дескриптор, *AATSC3e*, пружа информације о електронском окружењу и поларности молекула, на сличан начин као и *ATSC* врста дескриптора, с тим да су вредности овог дескриптора нормализоване у односу на број атома. Такође, вредност овог дескриптора узима у обзир међуатомску удаљеност атома од три међумолекулске везе. Из исте класе, *ATSC 2D* дескриптора издвојили су се *ATSC4m* и *ATSC3m* (нешто ниже значајности), који у овом случају указују на важност маса атома који су међусобно удаљени четири (*ATSC4m*), односно три (*ATSC3m*) међуатомске везе [129]. Ови дескриптори указују на дистрибуцију масе, посебно атома већих молекулских маса унутар молекула. Указивањем на значајност маса атома, који су веће молекулске масе у структурама молекула укључених у испитивање (слика 14), такође се може довести у везу са значајном улогом центара који су извор поларности молекула (атоми сумпора, хлора и сл.). За разлику од претходно дефинисаних дескриптора, *PubchemFP366*, није дескриптор који дефинише физичко-хемијске особине молекула, већ спада у групу дескриптора тзв. отиска прста (енг. *fingerprint*) и рачунат је на основу базе података *PubChem* [155] и специфичне позиције *bit* 366. Вредности оваквих дескриптора су у ствари бинарни вектори који указују на присуство субмолекулских структура. Конкретно *PubchemFP366* молекулски дескриптор пружа информацију о присуству угљениковог атома чије окружење подразумева присуство атома кисеоника и водоника [155]. Увидом у молекулске структуре (слика 14), овакво окружење угљеничног атома је често у вези са присуством хидроксилних група, које не само да су извор поларности молекула, већ атом кисеоника има могућност грађења водоничних веза. Истицање важности електротополошког стања молекула, додатно је наглашено и *minHBd* дескриптором. Овај дескриптор указује на тополошку позицију електрона у атомима, помоћу чега могу да се идентификују сви атоми у молекулу који имају потенцијал да буду јаки донори водоничне везе. Израчунавањем се долази до појединачних индекса атома у молекулу и издваја се најмања израчуната вредност [157].

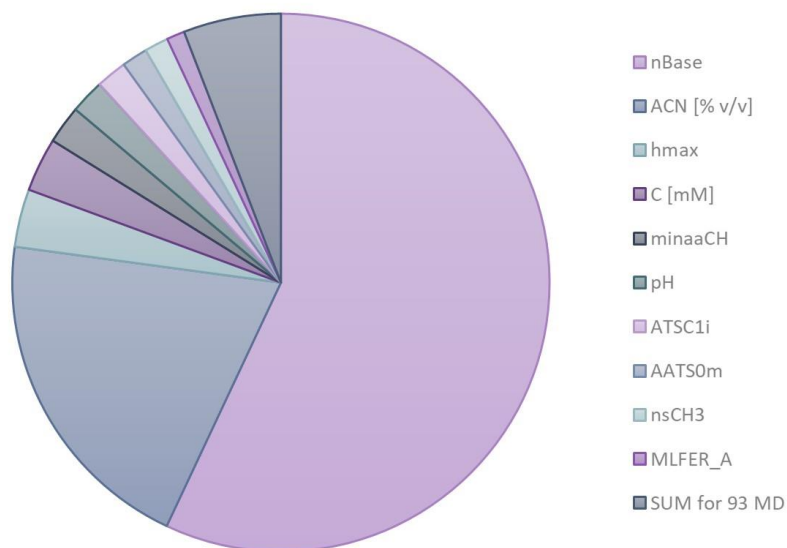
Молекулским дескрипторима који су узети у разматрање, истакнута је важност молекулских центара који су уско повезани са молекуларном поларношћу, али и електронско-тополошком дистрибуцијом унутар молекула. Стога се може сматрати да ови дескриптори указују на присуство превасходно поларних интеракција, али се не искључују ни потенцијално присуство електрон-зависних интеракција (*IEX* интеракције), које су посредно индиковане значајем поларних центара у молекулу. Осим наведених интеракција, препознаје се и присуство водоничних веза током ретенционог процеса, чији утицај је мање изражен.

Поред образложених *MD*, изражен утицај показали су и испитани *EP*: *pH*, *C* и *ACN*. Најснажнији утицај од три наведена експериментална фактора је испољио удео ацетонитрила. Његова вредност одређује степен заступљености хидрофобних односно хидрофилних интеракција, као и величину адсорбованог слоја воде на стационарној фази у *HILIC* режиму. Фактори као што су *pH* и концентрација пуфера су у много мањој мери доприносили ретенционом понашању анализата, изражавајући карактер секундарних интеракција. Ретенционо понашање молекула показало је карактеристично ретенционо понашање неправилног слова U, у зависности од састава мобилне фазе (удела *ACN*). Хидрофилнији молекули су имали већу тенденцију задржавања у *HILIC* региону у односу на *RP*, док су хидрофобнији молекули показали супротан тренд понашања. Такође, поларнији молекули у *HILIC* региону су показали слабије ретенционо понашање са повећањем удела воденог дела мобилне фазе до тренутка преласка *HILIC* модалитета у *RP* режим, када је поновно дошло до продуженог ретенционог времена под утицајем неполарних интеракција [152]. Поред тога, *pH* и *C* су имали много блажи утицај на ретенционо понашање анализата.

Повишене вредности pH и ниже вредности C су биле узрок дужег задржавања катјона на стационарној фази. Супротан ефекат pH и C је запажен код молекула у анјонском облику. Њихов значај и тренд утицаја указују на присуство јонских интеракција, које су последица присуства негативног наелектрисања на стационарној фази.

4.3.3.2. Значајни параметри истакнути локалним $QSRR$ моделом за јонизоване молекуле ($LI-GBT_{RP/HILIC}$)

Такође, у табелама 26 и 27 приказани су и параметри (MD и EP) од утицаја на ретенционо понашање јонизованих анализата који су истакнути $LI-GBT_{RP/HILIC}$ моделом (слика 33).



Слика 33 Приказ значајности фактора у $RP/HILIC$ систему који су истакнути $LI-GBT_{RP/HILIC}$ $QSRR$ моделом

Доминантно истакнута молекулска особина $QSRR$ моделом, која утиче на ретенционо понашање јонизованих молекула односила се на број базних функционалних група у молекулу, квантификоване $nBase$ молекулским дескриптором. Број базних група утиче на вредност pKa , односно на способност јонизације молекула у различитим pH окружењима. Овај дескриптор указује на значај присуства функционалних група са способношћу јонизације и формирања катјонских облика молекула, за ретенционо понашање молекула. Ово може да се доведе у везу са способношћу јонизације силанолних функционалних група, које могу да се јаве и у анјонском облику и тако ступе у јонске интеракције, доприносећи ретенционом понашању молекула [14]. Такође, базне функционалне групе испитаних молекула су и извор њихове поларности, што се доводи у везу и са поларним интеракцијама у току њиховог ретенционог понашања. Поред значаја присуства и броја базних група, истакла се и важност дистрибуције електрона у молекулу описана $hmax$ дескриптором, који изражава максималну вредност електро-тополошког стања атома водоника [157,158]. Овај дескриптор указује на најдоступније и високо поларне атоме водоника [158]. Атом водоника као такав је у уској вези са високим потенцијалом водоничног везивања молекула, односно показује потенцијал учешћа у формирању водоничне везе као снажан донор. Дескриптор $minaaCH$ је такође електро-тополошки дескриптор, који указује на најнижу вредност електро-тополошког стања атома у ароматичним $C-H$ типовима атома, односно атомима угљеника у ароматичним прстеновима, који су повезани са бар једним атомом

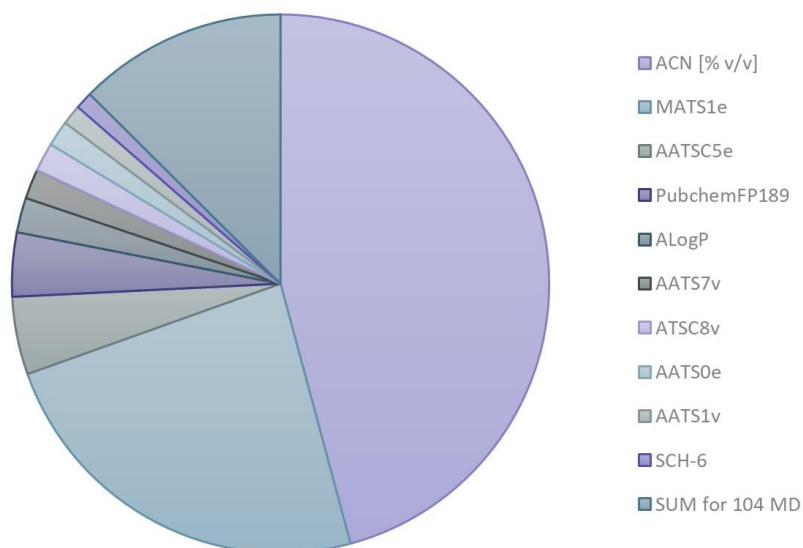
водоника. Нумеричка вредност овог дескриптора представља доступност електрона и њихов потенцијал међумолекулских интеракција ароматичних прстенова. Ниске вредности дескриптора сугеришу неполарност описаног дела молекула, односно у овом случају описују значајност учешћа у хидрофобним међумолекулским интеракцијама [157]. *2D* аутокорељациони дескриптори *ATSC1i* и *AATSC0m* су се такође издвојили као *MD* од значаја. *ATSC1i* је нумерички показатељ дистрибуције електрона у молекулу на раздаљини атома од једне међуатомске везе и указује на јонизациони потенцијал атома и описује уско електронско окружење атома. Значај јонизационог потенцијала атома у молекулу указује на значај учешћа јонизабилних група у ретенционом понашању молекула. Са друге стране *AATSC0m* указује на значај дистрибуције масе атома унутар молекулске структуре. Имајући у виду да је овај дескриптор нумерички показатељ збира квадрата вредности атомских маса, нормализован са бројем атомских парова на удаљености 0, овај дескриптор указује на значајност масе целокупног молекула [129]. Маса молекула од значаја је у процесу солватације молекула, што посредно може утицати на ретенциони процес. Дескриптор означен као *nsCH3* описује број присутних метил група ($-CH_3$) у молекулу. Овај дескриптор може да се посматра и као степен гранања молекула. Осим тога, он је и показатељ хидрофобности молекула, имајући у виду да су метил групе неполарне, па повећање њиховог броја доприноси и повећању целокупне хидрофобности. Издвајање овог дескриптора указује и на учешће хидрофобних центара молекула у процесу ретенције [157]. *MLFER_A* је дескриптор који служи за описивање киселости молекула унутар *MLFER* (енг. *Molecular Linear Free Energy Relationship*) модела [156]. Специфично он указује на способност молекула да функционише као донор водоничне везе и на тај начин учествује у међумолекулским интеракцијама у току ретенционог процеса.

Путем *LI-GBT_{RP/HILIC}* истакли су се и *EP*, као и описаним *G-GBT_{RP/HILIC}*, а њихов ефекат је претходно описан у делу 4.3.3.1 Резултата и дискусије.

Издвојени параметри *LI-GBT_{RP/HILIC}* моделом указују на значај учешћа јонизабилних група у ретенционом понашању молекула. У много већој мери учешће узимају базне функционалне групе у односу на киселе, као и хидрофобни центри. Те се показало да осим поларних и неполарних међумолекулских интеракција, учешће у ретенционом процесу узимају и јонске интеракције, односно *IEX* механизам. Осим тога, укључене су и водоничне везе, истакнуте са водоник-донор центрима молекула.

4.3.3.3. Значајни параметри истакнути локалним *QSRR* моделом за неутралне молекуле (*LN-GBT_{RP/HILIC}*)

У табелама 26 и 27 приказани су и најзначајнији параметри (*MD* и *EP*) екстраховани *LN-GBT_{RP/HILIC}* моделом (слика 34). Тумачен је ограничен број молекулски дескриптора издвојених *LN-GBT_{RP/HILIC}*, јер се показало да је значајност осталих дескриптора много нижа од значајности најутицајнијег дескриптора те њихово тумачење не би допринело квалитету дискусије резултата.



Слика 34 Приказ значајности фактора у *RP/HILIC* систему који су истакнути *LN-GBT_{RP/HILIC} QSRR* моделом

Највише рангиран *MD*, *MATS1e*, је врста *2D* аутокорелативног дескриптора. Његова вредност је у вези са дистрибуцијом Сандерсонове електронегативности специфичне за растојање од једне међуатомске везе [129]. Такође пружа информацију колико су суседни атоми слични у електронегативности. Његова значајност је показатељ да је ретенционо понашање неутралних молекула у највећој мери зависно од њихове поларности. На сличан начин *AATSC5e* указује на значај електронегативности атома у молекулу приликом процеса ретенције у дефинисаном хроматографском систему. *AATSC5e* је такође *2D* аутокорелативни дескриптор, међутим он указује на значај односа атома удаљених 5 међуатомских веза [129]. С обзиром на то да указује на удаљене везе, указује и на значај свеукупне *2D* молекулске структуре у току ретенционог понашања. Такође, значајан се показао и дескриптор *PubchemFP189* који спада у групу дескриптора отиска прста (енг. *fingerprint*), који је у овом случају показатељ присуства два шесточлана прстена, који нису ароматични [155]. Посматрањем структура испитаних молекула може се увидети да је овакав део структуре присутан код стероидних једињења, те да је као такав неполаран (слика 14). Ово указује на изражено учешће неполарних међумолекулских интеракција у току ретенционог процеса. Поред структурних дескриптора, истакнут је *ALogP* (логаритамска вредност партиционог коефицијента октанол/вода) који представља квантитативну вредност која указује на молекулску липофилност [159]. Ова вредност је рачунарски предвиђена, а не експериментално одређена.

Имајући у виду да се прелиминарним експериментима показало да експериментални параметри као што су *pH* и концентрација пуфера мобилне фазе нису од значајног утицаја, они нису ни разматрани у развијеном локалном моделу. Међутим, очекивано, удео органског растварача се показао од изузетног значаја за ретенционо понашање испитаних молекула. Према томе, из изграђеног локалног модела у којима је посебно дефинисано ретенционо понашање молекула који задржавају неутралан молекулски облик у испитаном опсегу *pH* вредности, испоставило се да неутрални молекули превасходно интерагују поларним међумолекулским везама.

5. ЗАКЉУЧАК

Сprovedеним истраживањем RP/WCX и $RP/HILIC$ бимодалних система течне хроматографије, добијених употребом *Acclaim mixed-mode* колона, стекао се увид и разумевање присутних ретенционих механизма. Употребом *GBT* алгоритама машинског учења развијени су мешовити *QSRR* модели, глобални и локални, помоћу којих су препознати заступљени ретенциони механизми. Глобалним моделима омогућено је грубо предвиђање ретенционог понашања молекула претходно непознатог ретенционог понашања и познатих структурних карактеристика, поред истицања значајних особина и експерименталних фактора за њихово ретенционо понашање. Локалним моделима је постигнут бољи увид у ретенционо понашање молекула одређених карактеристика, односно наелектрисања. Статистичком евалуацијом развијених модела, утврђена је погодност примене *GBT*-а као регресионог алата у току мешовитог *QSRR* моделовања, за оба испитана бимодална система. Такође, запажено је и да су локални модели показали ниже стопе грешке у поређењу са глобалним моделима.

Тумачењем значајних фактора (MD и EP) који су истакнути развијеним $G-GBT_{RP/WCX}$ моделом, описани су ретенциони механизми у RP/WCX систему, који је добијен употребом *Acclaim mixed-mode WCX-1* колоне. Показано је да важну улогу у ретенционом процесу имају састав мобилне фазе (поларност, pH вредност и концентрација пуфера) као и геометрија и топологија молекула. Посебно је истакнут значај положаја центра позитивног наелектрисања, липофилних центара у молекулу, као и центара донора водоничних веза. На основу наведеног, претпостављено је присуство, поред, очекиваних и доминантних хидрофобних и електростатичких веза, и присуство водоничних веза заједно са ван дер Валсовим и диполним интеракцијама.

Путем $LC-GBT_{RP/WCX}$ развијеног за RP/WCX систем, истакнути су значајни фактори специфични за ретенцију позитивно наелектрисаних молекула у окружењу испитане мобилне фазе. Истакнут је значај поларности мобилне фазе, pH вредности и концентрације употребљеног пуфера, праћен молекуларним карактеристикама као што су структура прстена, конформација молекула, поларност, наелектрисање, липофилни центри и центри донора водоничних веза. Истакнутим факторима указано је на доминантно присуство хидрофобних, електростатичких интеракција и водоничних веза.

За молекуле негативног наелектрисања, ретенциони процес је описан $LA-GBT_{RP/WCX}$ моделом. Промена тренда ретенционог понашања молекула вођеног електростатичким интеракцијама у односу на катјоне истакнута је дескрипторима који указују на значај негативног наелектрисања и електронских својстава молекула. Овакво понашање је образложено присуством електростатичких одбојних интеракција, што је такође подржано утицајем pH вредности мобилне фазе, при чему више вредности делују као промотер елуирања анјона. Такође, истакнут је и значај ценара донора водоничних веза у односу на липофилне делове молекула, због чега се поред електростатички одбојних интеракција, претпоставља и присуство хидрофобних интеракција и водоничних веза.

$LN-GBT_{RP/WCX}$ моделом истакнуто је да је поларитет неутралних молекула најважнији фактор за управљање ретенцијом у RP/WCX систему и да је ретенционо понашање неутралних молекула у највећој мери под утицајем RP модалитета. Ово је потврђено идентификацијом поларности мобилне фазе као јединим релевантним од испитаних фактора мобилне фазе које управљају ретенцијом молекула.

RP/WCX хроматографски систем, добијен употребом *Acclaim mixed-mode WCX-1* колоне показао је добар потенцијал за испитивање смеша различитог састава. Колона је успешно

употребљена у току развоја неколико метода применом хеометријски алата, *DoE* и Дерингерове функције пожељних одговора. Оваквим приступом развоја методе додатно је потврђена значајност и претходно описани трендови утицаја експерименталних фактора (удела органског раствара, *pH* вредност и концентрација воденог дела мобилне фазе и температура). Успешно су развијене методе за сепарацију смеша анализата следећих особина: истих наелектрисања (смеша адренергичких лекова), различитих наелектрисања и неорганских контрајона сличних физичко-хемијских карактеристика (калијумова и натријумова со диклофенака). У свим развијеним методама постигнута је развдојеност свих пикова анализата у разумном временском оквиру. Додатно, приликом испитивања соли диклофенака, потврђена је могућност замене ацетонитрила еколошки прихватљивијим ацетоном, што је процењено и алатима за евалуацију еколошког профила метода. Вредности резултата метрике еколошке прихватљивости метода (*AGREE* и *GAPI*) указали су на фаворизовање замене растварача и бољи еколошки профил методе у којој је употребљен ацетон (*AGREE* од 0,69) у односу на методу у којој је употребљен ацетонитрил (*AGREE* од 0,6), без обзира на већи утросак ацетона.

G-GBTRP/HILIC моделом идентификовани су и ретенциони механизми заступљени у *RP/HILIC* систему, добијен *Acclaim mixed-mode HILIC-1* колоном. Експонирани фактори (*MD* и *EP*) указали су на важану повезаност електротополошке структуре молекула и структурне карактеристике које указују на поларност молекула, са њиховим ретенционим понашањем. Ретенционо понашање молекула доведено је у везу са присуством превасходно поларних интеракција, али и посредно индикованим јонским интеракцијама. Ово је потврђено истицањем удела *ACN* у мобилној фази, као једног од најзначајних фактора ретенционог понашања, али и значајем *pH* и концентрације воденог дела мобилне фазе. Поред тога потврђен је и утицај водоничних веза, што је поткрепљено значајношћу *minHBd* дескриптора.

До сличних закључака се дошло и резултатима *LI-GBTRP/HILIC* модела. Међутим, додатно је наглашено учешће базних функционалних група, чиме је имплицирано присуство и јонских интеракција, поред хидрофилних и хидрофобних. Осим тога, истакнут је и значај водоник-донор центара у молекулима, чиме је указано на присуство водоничних веза.

LN-GBTRP/HILIC моделом су истакнути *MD* који превасходно указују на значај поларности молекула и последично присуство хидрофилних интеракција у току ретенционог понашања. Ово је додатно потврђено истакнутим утицајем удела органског растварача по ретенционо понашање неутралних молекула и присуством хидрофобних односно хидрофилних молекулских интеракција.

Овако развијени мешовити *QSRR* модели указали су на присуство ретенционих механизма присутних у испитаним бимодалним системима. Иако пружају значајан увид у ретенционе механизме и утицаје експерименталних параметара на такво ретенционо понашање, изведене закључке није могуће транспоновати на друге *MMLC* системе, нити их је могуће користити за предвиђање ретенционог понашања анализата у другим *MMLC* системима. Због тога, други *MMLC* системи захтевају додатна испитивања. Међутим, ови модели могу да послуже као почетна тачка у проширењу испитивања комплексних мултимодалних система.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Grybinik, S., Dousa, M., Bosakova, Z., Separation of pharmaceutically active compounds by multimodal chromatography with ultraviolet detection. *Sep. Sci. PLUS* 2021, 4, 228–239.
- [2] Bell, D. S., Modern Trends in Mixed-Mode Liquid Chromatography (LC) Columns. *LCGC N. Am.* 2021, 39, 56–60.
- [3] Mansour, F. R., Danielson, N. D., Multimodal liquid chromatography of small molecules. *Anal. Methods* 2013, 5, 4955–4972.
- [4] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W., Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sons, Inc 2009.
- [5] Kazakevich, Y., HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, Ltd 2007, pp. 25–74.
- [6] C. Moldoveanu, S., David, V., Essentials in Modern HPLC Separations. Elsevier n.d., pp. 145–190.
- [7] Prat, D., Wells, A., Hayler, J., Sneddon, H., McElroy, C. R., Abou-Shehada, S., Dunn, P. J., CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chem.* 2016, 18, 288–296.
- [8] D'Atri, V., Barrientos, R. C., Losacco, G. L., Rudaz, S., Delobel, A., Regalado, E. L., Guillarme, D., Trends in Pharmaceutical Analysis: The Evolving Role of Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 2025, 97, 4706–4727.
- [9] Mitrović, M., Protić, A., Malenović, A., Otašević, B., Zečević, M., Analytical quality by design development of an ecologically acceptable enantioselective HPLC method for timolol maleate enantiomeric purity testing on ovomucoid chiral stationary phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020, 180, 113034.
- [10] Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L., Guillarme, D., Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 113, 43–55.
- [11] Biopharmaceutical Processing. Elsevier 2018, pp. 421–432.
- [12] Brusotti, G., Calleri, E., Colombo, R., Massolini, G., Rinaldi, F., Temporini, C., Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review. *Chromatographia* 2018, 81, 3–23.
- [13] Jandera, P., Hájek, T., Dual-mode hydrophilic interaction normal phase and reversed phase liquid chromatography of polar compounds on a single column. *J. Sep. Sci.* 2020, 43, 70–86.
- [14] Wei, B., Dai, L., Zhang, K., Applications of hydrophilic interaction and mixed-mode liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Chromatogr. A* 2025, 1739, 465524.
- [15] Sýkora, D., Řezanka, P., Záruba, K., Král, V., Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases. *J. Sep. Sci.* 2019, 42, 89–129.
- [16] Lemasson, E., Richer, Y., Bertin, S., Hennig, P., West, C., Characterization of Retention Mechanisms in Mixed-Mode HPLC with a Bimodal Reversed-Phase/Cation-Exchange Stationary Phase. *Chromatographia* 2018, 81, 387–399.
- [17] Yang, Y., Geng, X., Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 8813–8825.
- [18] Zhang, K., Liu, X., Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 128, 73–88.
- [19] Orlovsky, V., Zelechonok, Y., Evolution of Mixed-Mode Chromatography. *Chromatography Today* n.d., 24–28.

- [20] Wang, L., Wei, W., Xia, Z., Jie, X., Xia, Z. Z., Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016, 80, 495–506.
- [21] Zhang, L., Dai, Q., Qiao, X., Yu, C., Qin, X., Yan, H., Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016, 82, 143–163.
- [22] Lesellier, E., West, C., Lemasson, E., Hennig, P., Bertin, S., Mixed-Mode Chromatography—A Review. *LCGC Suppl.* 2017, 30, 22–33.
- [23] Strege, M. A., Stevenson, S., Lawrence, S. M., Mixed-Mode Anion–Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery. *Anal. Chem.* 2000, 72, 4629–4633.
- [24] Liu, X., Pohl, C., New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. *J. Chromatogr. A* 2008, 1191, 83–89.
- [25] Zhu, B.-Y., Mant, C. T., Hodges, R. S., Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *J. Chromatogr. A* 1991, 548, 13–24.
- [26] Mant, C. T., Hodges, R. S., Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2754–2773.
- [27] Mant, C. T., Kondejewski, L. H., Hodges, R. S., Hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for separation of cyclic peptides. *J. Chromatogr. A* 1998, 816, 79–88.
- [28] Nováková, L., Vlčková, H., Petr, S., Evaluation of new mixed-mode UHPLC stationary phases and the importance of stationary phase choice when using low ionic-strength mobile phase additives. *Talanta* 2012, 93, 99–105.
- [29] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, France n.d.
- [30] Passarin, P. B. S., Lourenço, F. R., Enhancing analytical development in the pharmaceutical industry: A DoE-QSRR model for virtual Method Operable Design Region assessment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2024, 239, 115907.
- [31] den Uijl, M. J., Schoenmakers, P. J., Pirok, B. W. J., van Bommel, M. R., Recent applications of retention modelling in liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2021, 44, 88–114.
- [32] Put, R., Vander Heyden, Y., Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure–retention relationships. *Anal. Chim. Acta* 2007, 602, 164–172.
- [33] Golubović, J., Protić, A., Otašević, B., Zečević, M., Quantitative structure-retention relationships applied to development of liquid chromatography gradient-elution method for the separation of sartans. *Talanta* 2016, 150, 190–197.
- [34] Oumada, F. Z., Rosés, M., Bosch, E., Abraham, M. H., Solute–solvent interactions in normal-phase liquid chromatography: a linear free-energy relationships study. *Anal. Chim. Acta* 1999, 382, 301–308.
- [35] Snyder, L. R., Dolan, J. W., Carr, P. W., The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *J. Chromatogr. A* 2004, 1060, 77–116.
- [36] Marchand, D. H., Snyder, L. R., Dolan, J. W., Characterization and applications of reversed-phase column selectivity based on the hydrophobic-subtraction model. *J. Chromatogr. A* 2008, 1191, 2–20.
- [37] Abraham, M. H., Rosés, M., Poole, C. F., Poole, S. K., Hydrogen Bonding. 42. Characterization of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic C18 Stationary Phases. *J. Phys. Org. Chem.* 1997, 10, 358–368.
- [38] Abraham, M. H., Zhao, Y. H., Determination of Solvation Descriptors for Ionic Species: Hydrogen Bond Acidity and Basicity. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 4677–4685.

- [39] Miller, T. H., Musenga, A., Cowan, D. A., Barron, L. P., Prediction of Chromatographic Retention Time in High-Resolution Anti-Doping Screening Data Using Artificial Neural Networks. *Anal. Chem.* 2013, 85, 10330–10337.
- [40] Kaliszan, R., Foks, H., The relationship between the RM values and the connectivity indices for pyrazine carbothioamide derivatives. *Chromatographia* 1977, 10, 346–349.
- [41] Michotte, Y., Massart, D. L., Molecular Connectivity and Retention Indexes. *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1630–1632.
- [42] Kaliszan, R., QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships. *Chem. Rev.* 2007, 107, 3212–3246.
- [43] Komsta, Ł., Heyden, Y. V., Sherma, J. (Eds.), *Chemometrics in Chromatography*. CRC Press, Boca Raton 2018.
- [44] Haddad, P. R., Taraji, M., Szücs, R., Prediction of Analyte Retention Time in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 2021, 93, 228–256.
- [45] He, Q., Li, H., Jin, B., Li, W., Shao, B., Zhang, L., QSRR model for identification and screening of emerging pollutants based on artificial intelligence algorithms. *Environ. Pollut. Bioavailab.* 2022, 34, 331–337.
- [46] Fanali, C., Haddad, P. R., Poole, C. F., Riekkola, M.-L., *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition*. Elsevier 2017, pp. 1–784.
- [47] Muteki, K., Morgado, J. E., Reid, G. L., Wang, J., Xue, G., Riley, F. W., Harwood, J. W., Fortin, D. T., Miller, I. J., Quantitative Structure Retention Relationship Models in an Analytical Quality by Design Framework: Simultaneously Accounting for Compound Properties, Mobile-Phase Conditions, and Stationary-Phase Properties. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013, 52, 12269–12284.
- [48] Taraji, M., Haddad, P. R., Amos, R. I. J., Talebi, M., Szucs, R., Dolan, J. W., Pohl, C. A., Rapid Method Development in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for Pharmaceutical Analysis Using a Combination of Quantitative Structure–Retention Relationships and Design of Experiments. *Anal. Chem.* 2017, 89, 1870–1878.
- [49] Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., Panda, J., An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 147, 590–611.
- [50] Taraji, M., Haddad, P. R., Amos, R. I. J., Talebi, M., Szucs, R., Dolan, J. W., Pohl, C. A., Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. *Anal. Chim. Acta* 2018, 1000, 20–40.
- [51] Djajić, N., Petković, M., Zečević, M., Otašević, B., Malenović, A., Holzgrabe, U., Protić, A., A comprehensive study on retention of selected model substances in β -cyclodextrin-modified high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2021, 1645, 462120.
- [52] Maljurić, N., Golubović, J., Otašević, B., Zečević, M., Protić, A., Quantitative structure – retention relationship modeling of selected antipsychotics and their impurities in green liquid chromatography using cyclodextrin mobile phases. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410, 2533–2550.
- [53] Krmar, J., Vukićević, M., Kovačević, A., Protić, A., Zečević, M., Otašević, B., Performance comparison of nonlinear and linear regression algorithms coupled with different attribute selection methods for quantitative structure - retention relationships modelling in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2020, 1623, 461146.
- [54] Vera Candioti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S., Goicoechea, H. C., Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 2014, 124, 123–138.
- [55] Dispas, A., Avohou, H. T., Lebrun, P., Hubert, P., Hubert, C., ‘Quality by Design’ approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 101, 24–33.

- [56] Nistor, I., Lebrun, P., Ceccato, A., Lecomte, F., Slama, I., Oprean, R., Badarau, E., Dufour, F., Dossou, K. S. S., Fillet, M., Liégeois, J.-F., Hubert, P., Rozet, E., Implementation of a design space approach for enantiomeric separations in polar organic solvent chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013, 74, 273–283.
- [57] Rozet, E., Lebrun, P., Hubert, P., Debrus, B., Boulanger, B., Design Spaces for analytical methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2013, 42, 157–167.
- [58] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 2008, 76, 965–977.
- [59] Passerine, B. F. G., Breitzkreitz, M. C., Important Aspects of the Design of Experiments and Data Treatment in the Analytical Quality by Design Framework for Chromatographic Method Development. *Molecules* 2024, 29, 6057.
- [60] Kochling, J., Wu, W., Hua, Y., Guan, Q., Castaneda-Merced, J., A platform analytical quality by design (AQbD) approach for multiple UHPLC-UV and UHPLC-MS methods development for protein analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 125, 130–139.
- [61] Hibbert, D. B., Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B* 2012, 910, 2–13.
- [62] Rahman, M. S., Khan, M. K. H., Kawakami, J., Wang, K., Diaz, A., Riley, F., Recent applications of liquid chromatography-based QSRR models for pharmaceutically relevant small molecules: A review. *J. Pharm. Sci.* 2026, 115, 104047.
- [63] Dejaegher, B., Vander Heyden, Y., Response Surface Designs (Part 2) — Data Analysis and Multiresponse Optimization. *LCGC Eur.* 2009, 22, 581–585.
- [64] Otašević, B., Šljivić, J., Protić, A., Maljurić, N., Malenović, A., Zečević, M., Comparison of AQbD and grid point search methodology in the development of micellar HPLC method for the analysis of cilazapril and hydrochlorothiazide dosage form stability. *Microchem. J.* 2019, 145, 655–663.
- [65] Sivakumar, T., Manavalan, R., Muralidharan, C., Valliappan, K., Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 1842–1848.
- [66] Vera-Candioti, L., Olivieri, A. C., Goicoechea, H. C., Simultaneous multiresponse optimization applied to epinastine determination in human serum by using capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 2007, 595, 310–318.
- [67] Bandini, E., Kajtazi, A., Szucs, R., Lynen, F., The role and choice of molecular descriptors for predicting retention times in HPLC: A comprehensive review. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2025, 187, 118207.
- [68] Xie, J., Chen, S., Zhao, L., Dong, X., Application of artificial intelligence to quantitative structure–retention relationship calculations in chromatography. *J. Pharm. Anal.* 2025, 15, 101155.
- [69] Lo, Y.-C., Rensi, S. E., Torng, W., Altman, R. B., Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug Discov. Today* 2018, 23, 1538–1546.
- [70] Karthikeyan, A., Priyakumar, U. D., Artificial intelligence: machine learning for chemical sciences. *J. Chem. Sci.* 2021, 134, 2.
- [71] Sagandykova, G., Buszewski, B., Perspectives and recent advances in quantitative structure-retention relationships for high performance liquid chromatography. How far are we? *TrAC Trends Anal. Chem.* 2021, 141, 116294.
- [72] Amos, R. I. J., Haddad, P. R., Szucs, R., Dolan, J. W., Pohl, C. A., Molecular modeling and prediction accuracy in Quantitative Structure-Retention Relationship calculations for chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 105, 352–359.
- [73] Gritti, F., Perspective on the Future Approaches to Predict Retention in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 2021, 93, 5653–5664.

- [74] Bhande, A., What is underfitting and overfitting in machine learning and how to deal with it. *GreyAtom* 2018.
- [75] Bosten, E., Chen, K., Hellings, M., Cabooter, D., Artificial intelligence for method development in liquid chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2025, 192, 118320.
- [76] Sarker, I. H., Machine Learning: Algorithms, Real-World Applications and Research Directions. *SN Comput. Sci.* 2021, 2, 160.
- [77] Naylor, B. C., Catrow, J. L., Maschek, J. A., Cox, J. E., QSRR Automator: A Tool for Automating Retention Time Prediction in Lipidomics and Metabolomics. *Metabolites* 2020, 10, 237.
- [78] Fine, J., Mann, A. K. P., Aggarwal, P., Structure Based Machine Learning Prediction of Retention Times for LC Method Development of Pharmaceuticals. *Pharm. Res.* 2024, 41, 365–374.
- [79] Mazraeadoost, S., Žuvela, P., Ulenberg, S., Bączek, T., Liu, J. J., Cross-column density functional theory-based quantitative structure-retention relationship model development powered by machine learning. *Anal. Bioanal. Chem.* 2024, 416, 2951–2968.
- [80] Elith, J., Leathwick, J. R., Hastie, T., A working guide to boosted regression trees. *J. Anim. Ecol.* 2008, 77, 802–813.
- [81] Krmar, J., Džigal, M., Stojković, J., Protić, A., Otašević, B., Gradient Boosted Tree model: A fast track tool for predicting the Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry signal of antipsychotics based on molecular features and experimental settings. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2022, 224, 104554.
- [82] Zhang, T., Lin, W., Vogelmann, A. M., Zhang, M., Xie, S., Qin, Y., Golaz, J.-C., Improving Convection Trigger Functions in Deep Convective Parameterization Schemes Using Machine Learning. *J. Adv. Model. Earth Syst.* 2021, 13, DOI: 10.1029/2020MS002365.
- [83] Sorokin, A., Zhu, X., Lee, E. H., Cheng, B., SigOpt Mulch: An intelligent system for AutoML of gradient boosted trees. *Knowl.-Based Syst.* 2023, 273, 110604.
- [84] Pelletier, H., How-To: Cross Validation with Time Series Data. *Data Sci.* 2023.
- [85] Taraji, M., Haddad, P. R., Amos, R. I. J., Talebi, M., Szucs, R., Dolan, J. W., Pohl, C. A., Error measures in quantitative structure-retention relationships studies. *J. Chromatogr. A* 2017, 1524, 298–302.
- [86] Taraji, M., Haddad, P. R., Taraji, M., Haddad, P. R., Method Optimisation in Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography by Design of Experiments Combined with Quantitative Structure–Retention Relationships*. *Aust. J. Chem.* 2021, 74, 778–786.
- [87] Park, S. H., De Pra, M., Haddad, P. R., Grosse, S., Pohl, C. A., Steiner, F., Localised quantitative structure–retention relationship modelling for rapid method development in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2020, 1609, 460508.
- [88] Kazarian, A. A., Nesterenko, P. N., Soisungnoen, P., Burakham, R., Srijaranai, S., Paull, B., Comprehensive analysis of pharmaceutical products using simultaneous mixed-mode (ion-exchange/reversed-phase) and hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2014, 37, 2138–2144.
- [89] Kühnreich, R., Holzgrabe, U., Impurity profiling of l-methionine by HPLC on a mixed mode column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 122, 118–125.
- [90] Pawellek, R., Holzgrabe, U., Influence of the mobile phase composition on hyphenated ultraviolet and charged aerosol detection for the impurity profiling of vigabatrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021, 201, 114110.
- [91] Pinto, E. C., Gonçalves, M. da S., Cabral, L. M., Armstrong, D. W., de Sousa, V. P., Development and validation of a stability-indicating HPLC method for topiramate using a mixed-mode column and charged aerosol detector. *J. Sep. Sci.* 2018, 41, 1716–1725.
- [92] Lemasson, E., Bertin, S., Hennig, P., Lesellier, E., West, C., Impurity profiling of drug candidates: Analytical strategies using reversed-phase and mixed-mode high-performance liquid chromatography methods. *J. Chromatogr. A* 2018, 1535, 101–113.

- [93] Bharate, S. S., Recent developments in pharmaceutical salts: FDA approvals from 2015 to 2019. *Drug Discov. Today* 2021, 26, 384–398.
- [94] Bharate, S. S., Modulation of biopharmaceutical properties of acidic drugs using cationic counterions: A critical analysis of FDA-approved pharmaceutical salts. *Int. J. Pharm.* 2021, 607, 120993.
- [95] Streuli, A., Coxon, C. R., Steuer, C., Simultaneous Quantification of Commonly Used Counter Ions in Peptides and Active Pharmaceutical Ingredients by Mixed Mode Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection. *J. Pharm. Sci.* 2021, 110, 2997–3003.
- [96] Ngere, J. B., Ebrahimi, K. H., Williams, R., Pires, E., Walsby-Tickle, J., McCullagh, J. S. O., Ion-Exchange Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Life Science, Environmental, and Medical Research. *Anal. Chem.* 2023, 95, 152–166.
- [97] Zhang, K., Dai, L., Chetwyn, N. P., Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed-mode chromatography coupled with charged aerosol detector. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 5776–5784.
- [98] Li, J., Stolee, J. A., Meda, A., Simultaneous quantitation of inorganic ions in oligonucleotides using mixed-mode liquid chromatography coupled with a charged aerosol detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021, 204, 114244.
- [99] Samara, I. M., Ntorkou, M., Gioumouxouzis, C. I., Karavasili, C., Tzanavaras, P. D., Zacharis, C. K., Analytical QbD for the optimization of a multimode HPLC method for the investigation of hydrochlorothiazide, diltiazem and propranolol release from 3D printed formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2024, 248, 116324.
- [100] M. Mahgoub, S., A. Rudayni, H., M. Radallada, A., Younes, H. A., Allam, A., Mahmoud, R., A Versatile Mixed-Mode HPLC Method for Sensitive Quantification of Polyvinylpyrrolidone in Pharmaceutical, Cosmetic, and Environmental Samples with a Greenness Assessment. *J. Pharm. Innov.* 2025, 21, 69.
- [101] Kazarian, A. A., Taylor, M. R., Haddad, P. R., Nesterenko, P. N., Paull, B., Single column comprehensive analysis of pharmaceutical preparations using dual-injection mixed-mode (ion-exchange and reversed-phase) and hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013, 86, 174–181.
- [102] Aral, H., Dağ, B., Separation of polar and nonpolar compounds using HILIC/RPLC mixed-mode chromatography: evaluation of separation performance and retention mechanism of the Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 column. *Open Chem.* 2026, 24, DOI: 10.1515/chem-2025-0230.
- [103] Stevenson, P. G., Fairchild, J. N., Guiochon, G., Retention mechanism divergence of a mixed mode stationary phase for high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1822–1827.
- [104] Bernardi, S., Gétaz, D., Forrer, N., Morbidelli, M., Modeling of mixed-mode chromatography of peptides. *J. Chromatogr. A* 2013, 1283, 46–52.
- [105] Obradović, D., Oljačić, S., Nikolić, K., Agbaba, D., Investigation and prediction of retention characteristics of imidazoline and serotonin receptor ligands and their related compounds on mixed-mode stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2019, 1585, 92–104.
- [106] Badea, I. A., Mihăilă, A., Popa, D. E., Tencaliec, A. M., Buleandă, M., Mixed-Mode Chromatography: Studies on Hybrid Retention Mechanisms of Some Antihypertensive Drugs. *Separations* 2025, 12, DOI: 10.3390/separations12060136.
- [107] Frerichs, D., Hölzel, A., Steinhoff, A., Gritti, F., Wyndham, K. D., Walter, T. H., Tallarek, U., Molecular dynamics simulations of mixed-mode chromatography: Generation and solvation of a silica-based, reversed-phase/anion-exchange stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2026, 1770, 466746.

- [108] Ordoñez, E. Y., Quintana, J. B., Rodil, R., Cela, R., Computer assisted optimization of liquid chromatographic separations of small molecules using mixed-mode stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2012, 1238, 91–104.
- [109] Charifson, P. S., Walters, W. P., Acidic and Basic Drugs in Medicinal Chemistry: A Perspective. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 9701–9717.
- [110] Bratkowska, D., Marcé, R. M., Cormack, P. A. G., Sherrington, D. C., Borrull, F., Fontanals, N., Synthesis and application of hypercrosslinked polymers with weak cation-exchange character for the selective extraction of basic pharmaceuticals from complex environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 1575–1582.
- [111] Yap, C. W., PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 1466–1474.
- [112] Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., da Silva, E. G. P., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., David, J. M., de Andrade, J. B., Breitzkreitz, M. C., Jardim, I. C. S. F., Neto, B. B., Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J. Chromatogr. A* 2007, 1158, 2–14.
- [113] Szucs, R., Brown, R., Brunelli, C., Heaton, J. C., Hradski, J., Structure Driven Prediction of Chromatographic Retention Times: Applications to Pharmaceutical Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3848.
- [114] Brownlee, J., Data Preparation for Machine Learning: Data Cleaning, Feature Selection, and Data Transforms in Python. Machine Learning Mastery 2020.
- [115] Tropsha, A., Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inform.* 2010, 29, 476–488.
- [116] Almeling, S., Ilko, D., Holzgrabe, U., Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 69, 50–63.
- [117] Schilling, K., Holzgrabe, U., Recent applications of the Charged Aerosol Detector for liquid chromatography in drug quality control. *J. Chromatogr. A* 2020, 1619, 460911.
- [118] Huang, Z., Richards, M. A., Zha, Y., Francis, R., Lozano, R., Ruan, J., Determination of inorganic pharmaceutical counterions using hydrophilic interaction chromatography coupled with a Corona® CAD detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 50, 809–814.
- [119] Bouwmeester, R., Martens, L., Degroev, S., Comprehensive and Empirical Evaluation of Machine Learning Algorithms for Small Molecule LC Retention Time Prediction. *Anal. Chem.* 2019, 91, 3694–3703.
- [120] Product manual for Acclaim Mixed-Mode WCX-1, <http://www.cromlab.es/Articulos/Columnas/HPLC/Thermo/Acclaim/WCX-1/66620-Man-065221-02-Acclaim-MM-WCX1-Jul09.pdf> (last time accessed: August 4, 2022).
- [121] Dérerová, T., Vosáhlová, Z., Malý, M., Gilar, M., Kalíková, K., A novel method for characterisation of ionic properties of stationary phases using a buffer blending by the pumps. *Microchem. J.* 2025, 217, 114913.
- [122] Konermann, L., Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH “Buffer” for Native Electrospray Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, 28, 1827–1835.
- [123] Sammut, C., Webb, G. I., Encyclopedia of Machine Learning. Springer Science & Business Media 2011.
- [124] Svrkota, B., Krmar, J., Protić, A., Otašević, B., The secret of reversed-phase/weak cation exchange retention mechanisms in mixed-mode liquid chromatography applied for small drug molecule analysis. *J. Chromatogr. A* 2023, 1690, 463776.
- [125] alvaDesc Molecular Descriptors, <https://www.alvascience.com/alvadesec-descriptors/> (last time accessed: June 27, 2026).
- [126] Gregori-Puigjané, E., Mestres, J., SHED: Shannon Entropy Descriptors from Topological Feature Distributions. *J. Chem. Inf. Model.* 2006, 46, 1615–1622.
- [127] Labute, P., A widely applicable set of descriptors. *J. Mol. Graph. Model.* 2000, 18, 464–477.

- [128] Todeschini, R., Consonni, V., Handbook of Molecular Descriptors. John Wiley & Sons 2008.
- [129] Consonni, V., Todeschini, R., Molecular Descriptors for Chemoinformatics: Volume I: Alphabetical Listing / Volume II: Appendices, References. John Wiley & Sons 2009.
- [130] Consonni, V., Todeschini, R., New spectral indices for molecule description. *MATCH - Commun. Math. Comput. Chem.* 2008, 60, 3–14.
- [131] Devinyak, O., Havrylyuk, D., Lesyk, R., 3D-MoRSE descriptors explained. *J. Mol. Graph. Model.* 2014, 54, 194–203.
- [132] Kah, M., Brown, C. D., LogD: Lipophilicity for ionisable compounds. *Chemosphere* 2008, 72, 1401–1408.
- [133] Periat, A., Guillarme, D., Veuthey, J.-L., Boccard, J., Moco, S., Barron, D., Grand-Guillaume Perrenoud, A., Optimized selection of liquid chromatography conditions for wide range analysis of natural compounds. *J. Chromatogr. A* 2017, 1504, 91–104.
- [134] EMA, ICH Q3C (R8) Residual solvents - Scientific guideline, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3c-r8-residual-solvents-scientific-guideline> (last time accessed: September 10, 2023).
- [135] Gałuszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J., The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2013, 50, 78–84.
- [136] Welch, C. J., Wu, N., Biba, M., Hartman, R., Brkovic, T., Gong, X., Helmy, R., Schafer, W., Cuff, J., Pirzada, Z., Zhou, L., Greening analytical chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2010, 29, 667–680.
- [137] Atapattu, S. N., Applications and retention properties of alternative organic mobile phase modifiers in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. Open* 2024, 5, 100135.
- [138] Funari, C. S., Carneiro, R. L., Khandagale, M. M., Cavaleiro, A. J., Hilder, E. F., Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 1458–1465.
- [139] Yabré, M., Ferey, L., Somé, I. T., Gaudin, K., Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules* 2018, 23, 1065.
- [140] Jaekel, A., Legelli, M., Wirtz, M., Meyer, D., Schröder, N., Streckel, K., Lamotte, S., Selectivity optimization in liquid chromatography via stationary phase tuning. *J. Sep. Sci.* 2023, 46, 2300204.
- [141] Shen, Y., Lo, C., Nagaraj, D. R., Farinato, R., Essendorf, A., Somasundaran, P., Development of Greenness Index as an evaluation tool to assess reagents: Evaluation based on SDS (Safety Data Sheet) information. *Miner. Eng.* 2016, 94, 1–9.
- [142] Shi, M., Zheng, X., Zhang, N., Guo, Y., Liu, M., Yin, L., Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2023, 166, 117211.
- [143] SDS for Acetonitrile, <https://www.sigmaaldrich.com/RS/en/sds/saj/01-0650> (last time accessed: November, 11, 2023).
- [144] SDS for Acetone, <https://www.sigmaaldrich.com/RS/en/sds/sigald/34850> (last time accessed: November, 11, 2023).
- [145] Svrkota, B., Krmar, J., Petronijević, F., Protić, A., Otašević, B., Sustainable Analysis of Diclofenac Salts: A Chemometric Approach to Mixed-Mode Liquid Chromatography With Charged Aerosol Detection. *J. Sep. Sci.* 2025, 48, e70136.
- [146] Kayali, Z., Obaydo, R. H., Sakur, A. A., Spider diagram and sustainability evaluation of UV-methods strategy for quantification of aspirin and sildenafil citrate in the presence of salicylic acid in their bulk and formulation. *Heliyon* 2023, 9.
- [147] Płotka-Wasyłka, J., A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta* 2018, 181, 204–209.

- [148] Sajid, M., Płotka-Wasyłka, J., Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta* 2022, 238, 123046.
- [149] Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M., AGREE—Analytical GREEnness Metric Approach and Software. *Anal. Chem.* 2020, 92, 10076–10082.
- [150] A. Abdelgawad, M., A. Abdelaleem, E., Gamal, M., S. Abourehab, M. A., S. Abdelhamid, N., A new green approach for the reduction of consumed solvents and simultaneous quality control analysis of several pharmaceuticals using a fast and economic RP-HPLC method; a case study for a mixture of piracetam, ketoprofen and omeprazole drugs. *RSC Adv.* 2022, 12, 16301–16309.
- [151] Prieto-Blanco, M. C., Planas-Franco, A., Muniategui-Lorenzo, S., González-Castro, M. J., Mixed-mode chromatography of mixed functionalized analytes as the homologues of benzalkonium chloride. Application to pharmaceutical formulations. *Talanta* 2023, 255, 124228.
- [152] Jandera, P., Hájek, T., Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction–reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *J. Sep. Sci.* 2018, 41, 145–162.
- [153] Product Manual for Acclaim Mixed-Mode HILIC-1, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/64882-Man-065198-02-Acclaim-HILIC1-Jul09.pdf> (last time accessed: March 24, 2026).
- [154] West, C., Auroux, E., Deconvoluting the effects of buffer salt concentration in hydrophilic interaction chromatography on a zwitterionic stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2016, 1461, 92–97.
- [155] PubChem Substructure Fingerprint, https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pubchem/specifications/pubchem_fingerprints.txt (last time accessed: January 17, 2026).
- [156] Platts, J. A., Abraham, M. H., Butina, D., Hersey, A., Estimation of molecular linear free energy relationship descriptors by a group contribution approach. 2. Prediction of partition coefficients. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2000, 40, 71–80.
- [157] Hall, L. H., Kier, L. B., Electrotopological State Indices for Atom Types: A Novel Combination of Electronic, Topological, and Valence State Information. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1995, 35, 1039–1045.
- [158] Rose*, K., Hall, L. H., E-State Modeling of Fish Toxicity Independent of 3D Structure Information. *SAR QSAR Environ. Res.* 2003, 14, 113–129.
- [159] Ghose, A. K., Crippen, G. M., Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1987, 27, 21–35.

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

2D-LC – дводимензионална течна хроматографија (енг. *2 Dimensional Liquid Chromatography*)

ACN – ацетонитрил

ACE – ацетон

AGREE – енг. *Analytical GREEnness Metric Approach*

ANOVA – тест мултиваријантне анализе

ANN – вештачке неуронске мреже (енг. *Artificial Neural Networks*)

AQbD – квалитет заснован на дизајну (енг. *Analytical Quality by Design*)

ATSC – енг. *Autocorrelation of a Topological Structure - Centred*

AEX – ањонска измена (енг. *Anion Exchange*)

BBD – Бокс-Бенкенов дизајн (енг. *Box-Behnken Design*)

BIC – индекс садржаја информација о вези (енг. *Bond Information Content Index*)

CATS – дескриптори хемијски напредне претраге образаца (енг. *Chemically Advanced Template Search*)

CAD – детектор наелектрисања у аеросолу (енг. *Charged Aerosol Detector*)

CCD – централни композициони дизајн (енг. *Central Composite Design*)

CCD-R – централни композициони дизајн – сферни (енг. *Central Composite Design – Rotatable*)

CEX – катјонска измена (енг. *Cation Exchange*)

CSH – наелектрисани површински хибрид (енг. *Charged Surface Hybrid*)

CV – унакрсна валидација (енг. *Cross Validation*)

D/Dtr10 – индекс удаљености/заобилажења прстена реда 10 (енг. *Distance/Detour Ring Index of Order 10*)

DT – стабла одлучивања (енг. *Decision Trees*)

DoE – дизајн експеримената (енг. *Design of Experiments*)

EP – експериментални параметри (енг. *Experimental Parameters*)

ET – температура испаравања (енг. *Evaporation Temperature*)

FC – константа филтра (енг. *Filter Constant*)

FC-CCD – централни композициони дизајн ка центру оријентисан (енг. *Face-centered Central Composite Design*)

FFD – пун факторски дизајн (енг. *Full Factorial Design*)

FrFD – фракциони факторски дизајн (енг. *Fractional Factorial Design*)

GA – генетски алгоритам (енг. *Genetic Algorithm*)

GAC – принципи зелене хемије (енг. *Green Analytical Chemistry*)

GAPI – енг. *Green Analytical Procedure Index*

GBT – градијентно појачана стабла одлучивања (енг. *Gradient Boosted Trees*)
GI – индекс еколошке прихватљивости растварача (енг. *Greenness Index*)
G-GBT – глобални *GBT* модел (енг. *Global GBT*)
HILIC – хидрофилна интеракциона хроматографија (енг. *Hydrophilic Interaction Chromatography*)
HMS – хидрофобни супстракциони модел (енг. *Hydrophobic Subtraction Model*)
HPLC – течна хроматографија високих перформанси (енг. *High-Performance Liquid Chromatography*)
IEX – јоноизмењивачка хроматографија (енг. *Ion Exchange*)
ICH – Међународни савет за хармонизацију техничких захтева (енг. *International Council for Harmonisation*)
IPC – јон-пар хроматографија (енг. *Ion Pair Chromatography*)
k-NN – *k* најближих суседа (енг. *k-Nearest Neighbors*)
LA-GBT – локални *GBT* модел за анјоне (енг. *Local Anion GBT*)
LC-GBT – локални *GBT* модел за катјоне (енг. *Local Cation GBT*)
LFER – линеарни однос слободне енергије (енг. *Linear Free Energy Relationship*)
LI-GBT – локални *GBT* модел за јоне (енг. *Local Ion GBT*)
LMO – изостави много (енг. *Leave-Many-Out*)
LN-GBT – локални *GBT* модел за неутралне (енг. *Local Neutral GBT*)
LOO – изостави једног (енг. *Leave-One-Out*)
LSER – линеарни однос солватационе енергије (енг. *Linear Solvation Energy Relationship*)
LSS – линеарна јачина растварача (енг. *Linear Solvent Strength*)
MCDM – методологија мултикритеријумског одлучивања (енг. *Multicriteria Decision Making*)
MDE – дескриптори молекулске удаљености (енг. *Molecular Distance Edge Descriptors*)
MD – молекулски дескриптори (енг. *Molecular Descriptors*)
MMLC – течна хроматографија мешовитих режима (енг. *Mixed-Mode Liquid Chromatography*)
MLA – алгоритми машинског учења (енг. *Machine Learning Algorithms*)
MLFER – енгл. *Molecular Linear Free Energy Relationship*
MLR – мултилинеарна регресија (енг. *Multiple Linear Regression*)
MRS – средња површина одговора (енг. *Mean Response Surface*)
NARP – неводена реверзно-фазна хроматографија (енг. *Non-Aqueous Reversed Phase*)
NP – нормално-фазна хроматографија (енг. *Normal Phase*)
OFAT – појединачна евалуација факторских ефеката (енг. *One Factor at a Time*)
PCA – анализа главних компоненти (енг. *Principal Component Analysis*)
PDA – фотодиодни детектор (енг. *Photo Diode Array*)

PFV – вредност степене функције (енг. *Power Function Value*)
PLS – регресија најмањих делимичних квадрата (енг. *Partial Least Squares*)
QSRR – квантитативни однос структуре и ретенционог понашања (енг. *Quantitative Structure-Retention Relationship*)
qpmax – максимално позитивно наелектрисање (енг. *Maximum Positive Charge*)
RDF – дескриптори функције радијалне расподеле (енг. *Radial Distribution Function*)
RF – случајне шуме (енг. *Random Forests*)
RMSEE – корен средње квадратне грешке процене (енг. *Root Mean Square Error of Estimation*)
RMSEP – корен средње квадратне грешке предвиђања (енг. *Root Mean Square Error of Prediction*)
RSD – дизајни површине одговора (енг. *Response Surface Design*)
SCX – јака катјонска измена (енг. *Strong Cation Exchange*)
SEC – гел-ексклузиона хроматографија (енг. *Size Exclusion Chromatography*)
SHED – енгл. *Shannon Entropy Descriptors*
SAX – јака анјонска измена (енг. *Strong Anion Exchange*)
SD – стандардна девијација (енг. *Standard Deviation*)
SDS – листе безбедности растварача (енг. *Safety Data Sheets*)
SHE – безбедност, здравље и окружење (енг. *Safety, Health, and the Environment*)
SLR – степена линеарна регресија (енг. *Stepwise Linear Regression*)
SVM – машине потпорних вектора (енг. *Support Vector Machine*)
SVR – регресија потпорним векторима (енг. *Support Vector Regression*)
TDB – тродимензионални тополошки дескриптори базирани на удаљености (енг. *Three-Dimensional Topological Distance-Based*)
WAX – слаба анјонска измена (енг. *Weak Anion Exchange*)
WCX – слаба катјонска измена (енг. *Weak Cation Exchange*)
3D-MoRSE – енгл. *3D-Molecule Representation of Structures based on Electron diffraction*

7. ПРИЛОЗИ

ПУБЛИКАЦИЈЕ ОБУХВАЋЕНЕ ДОКТОРСКОМ ДИСЕРТАЦИЈОМ

Списак научних радова објављених у међународним часописима:

- 1) **Bojana Svrkota**, Jovana Krmar, Ana Protić, Biljana Otašević. *The Secret of Reversed-Phase/Weak Cation Exchange Retention Mechanisms in Mixed-Mode Liquid Chromatography Applied for Small Drug Molecule Analysis*. *Journal of chromatography A* 2023; 1690: 463776; DOI: 10.1016/j.chroma. 2023.463776;

Назив часописа: *Journal of chromatography A*

Импакт фактор, *IF* (2021): 4,601

Категорија (2023): M21

Ранг часописа у области *Chemistry, Analytical* (2023): 26/106, *IF*=3,800

- 2) **Bojana Svrkota**, Jovana Krmar, Filip Petronijević, Ana Protić, Biljana Otašević. *Sustainable Analysis of Diclofenac Salts: A Chemometric Approach to Mixed-Mode Liquid Chromatography with Charged Aerosol Detection*. *Journal of Separation Science* 2025; 48: 70136; DOI: 10.1002/jssc.70136;

Назив часописа: *Journal of separation science*

Импакт фактор, *IF* (2025): 3,600

Категорија (2025): M22

Ранг часописа у области *Chemistry, Analytical* (2025): 42/110, *IF*=3,600

Списак саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

- 1) **Bojana Svrkota**, Jovana Krmar, Ana Protić, Biljana Otašević. *Mixed-mode RP/WCX chromatographic system evaluation using QSRR modelling approach*. 12th International Symposium of Drug Analysis 32nd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 11-14 September 2022, Mon, Belgium.
- 2) **Bojana Svrkota**, Jovana Krmar, Ana Protić, Mira Zečević, Biljana Otašević. *Optimization of Mixed-Mode HPLC Method Intended for Analysis of Adrenergic Drugs*. The 12th International Conference on Instrumental Analysis —Modern Trends and Applications. 20–23 September 2021, Thessaloniki, Greece. Virtual Event
- 3) **Bojana Svrkota**, Jovana Krmar, Nevena Đajić, Ana Protić, Biljana Otašević. *Chemometrically supported optimization of RP/WCX-HPLC method*. 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences. 22-25 June 2021, Ankara, Turkey. Virtual Event

БИОГРАФИЈА

Бојана Свркота Конрад је рођена 23. априла 1994. године у Суботици, где је завршила основну школу и гимназију, природно-математички смер, са одличним успехом за који је награђена Вуковом дипломом. Школске 2013/14. уписала је интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету, Универзитета у Новом Саду. Студије је завршила 2018. године, са просечном оценом 9,02 чиме је стекла звање магистра фармације. У току студија била је носилац стипендије намењене студентима са територије града Суботице. Учествовала је на 59. Националном конгресу студената са интернационалним учешћем, где је награђена за најбољи рад из области фармацеутске технологије и козметологије.

По завршетку студија, завршила је приправнички стаж, након чега је 2019. године положила стручни испит за магистра фармације при Министарству здравља Републике Србије. Школске 2018/19. уписала се на програм докторских академских студија Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду - модул аналитика лекова. До данас, положила је све испите са просечном оценом 9,93. Од 2020. године била је у звању истраживач-приправник, након чега је 2023. године је бирана у звање истраживач-сарадник. У току студија била је носилац стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије намењене студентима докторских студија, ради обављања научно-истраживачке делатности на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду. Током истраживачких активности учествовала је на научним скуповима у земљи и иностранству. Аутор је седам научних радова објављених у националним и интернационалним часописима и десет саопштења штампаних у изводу. Професионални рад је наставила у Агенцији за лекове и медицинска средства Србије на радном месту проценитељ документације о квалитету лека, на коме је запослена до данас.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Бојана Свркота Конрад

Број индекса 3/18

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена хеометријских алата за карактеризацију интеракционог потенцијала течне хроматографије мешовитих режима, реверзних фаза, слабе катјонске измене и хидрофилних интеракција

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бојана Свркота Конрад

Број индекса 3/18

Студијски програм Аналитика лекова

Наслов рада Примена хеометријских алата за карактеризацију интеракционог потенцијала течне хроматографије мешовитих режима, реверзних фаза, слабе катјонске измене и хидрофилних интеракција

Ментор др Биљана Оташевић, редовни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Примена хеометријских алата за карактеризацију интеракционог потенцијала течне хроматографије мешовитих режима, реверзних фаза, слабе катјонске измене и хидрофилних интеракција

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступни у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

③ Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.