

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena B. Golubović

**Primena veštačkih neuronskih mreža u  
građenju modela za predviđanje retencionog  
ponašanja i intenziteta odgovora masenog  
spektrometra u analizi odabranih azola i  
sartana metodom tečne hromatografije pod  
visokim pritiskom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

## **MENTOR**

---

Dr sc. Mira Zečević (mentor, predsednik komisije), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## **ČLANOVI KOMISIJE**

---

Dr sc. Ana Protić, docent,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Biljana Otašević, docent,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Marina Radišić, naučni saradnik, Inovacioni centar Tehnološko-Metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru projekta OII72033, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitiku lekova, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, pod mentorstvom prof. dr Mire Zečević. Deo doktorske disertacije koji se odnosi na postavljanje QSPR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u cilju predviđanja odgovora masenog spektrometra urađen je na Institutu za analitičku hemiju Fakulteta za hemiju i mineralogiju, Univerzitet u Lajpcigu, Nemačka pod rukovodstvom dr Kladije Birkemajer.*

*Pre svega želim da izrazim zahvalnost mentoru ovog rada prof. dr Miri Zečević na posvećenosti i strpljenju u svim fazama izrade ove disertacije, kao i na slobodi koju sam imala u naučno-istraživačkom radu.*

*Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Ani Protić i doc. dr Biljani Otašević na pomoći u ekperimentalnom radu i divnoj saradnji u svim aspektima izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Marini Radišić na korisnim savetima pri oblikovanju doktorske disertacije u oblasti masene spektrometrije.*

*Veliko hvala prof. dr Danici Agbabi, rukovodiocu projekta, na razumevanju i podršci u realizaciji svih ideja i poduhvata.*

*Zahvalila bih se dr Kladiji Birkemajer na pozivu za rad u njenoj grupi i prenetom znanju i iskustvu u oblasti masene spektrometrije.*

*Zahvaljem se kolegama sa Katedre za analitiku lekova i Katedre za farmaceutsku hemiju na prijatnoj radnoj atmosferi i toleranciji u laboratoriji.*

*Najveću zahvalnost dugujem majci i bratu za bezrezervnu podršku i ljubav.*

# **PRIMENA VEŠTAČKIH NEURONSKIH MREŽA U GRAĐENJU MODELA ZA PREDVIĐANJE RETENCIONOG PONAŠANJA I INTENZITETA ODGOVORA MASENOG SPEKTROMETRA U ANALIZI ODABRANIH AZOLA I SARTANA METODOM TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM**

## **REZIME**

Kvantitativni odnosi strukture i osobine (eng. *Quantitative Structure – Property Relationships* QSPR) predstavlja matematičko modelovanje kojim se predviđaju fizičke, hemijske ili biološke osobine grupe analita na osnovu njihovih molekulskih deskriptora. Molekulski deskriptor je broj koji može biti rezultat logičke i matematičke procedure kojom se transformiše hemijska informacija koju nosi simbolički prikaz molekula u upotrebljiv broj (teorijski deskriptor), ili rezultat standardizovanog eksperimenta (eksperimentalni deskriptor).

QSRR su matematički dobijene veze između hromatografskih odgovora određenih za seriju analita u datom hromatografskom sistemu i molekulskih deskriptora. Mogu se primeniti u cilju predviđanja retencije, kao i identifikovanja deskriptora koji najbolje opisuju retenciono ponašanje. Ukoliko se kao ispitivani faktori uključe i hromatografski parametri, QSRR metodologija se može primeniti za optimizaciju hromatografske metode, kao i sticanje uvida u molekulske mehanizme razdvajanja u ispitivanom hromatografskom sistemu između analita i stacionarne faze.

QSPR u kojima je odgovor koji se prati intenzitet signala u masenom spektrometru je relativno nov koncept osmišljen u cilju predviđanja odgovora, optimizacije uslova u cilju povećanja osetljivosti metode, identifikacije deskriptora koji najbolje opisuju proces jonizacije u masenom spektrometru, kao i sticanje uvida u mehanizme formiranja jona pri ispitivanim hromatografskim uslovima.

Hemometrija je matematičko-statistička disciplina koja omogućava dizajn i selekciju optimalnih procedura merenja i eksperimenata, i dobijanje što više relevantnih informacija iz hemijskih podataka. Veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks*, ANN) predstavljaju biološki inspirisane kompjuterske modele i na taj način jednu od tehnika za građenje QSRR modela. Višeslojne nerekurentne mreže (eng. *Multi-layer Feed-forward* ili *Multi-layer Perceptron*, MLP) trenirane algoritmom povratnog prolaska greške su najčešće korišćena vrsta mreža u analitičkoj hemiji.

Ispitivane supstance pripadaju farmakološkim grupama: antimikotici – azoli i antagonisti angiotenzin II receptora – sartani. Zajedničko u strukturi im je prisustvo heterocikličnih poliazolnih prstenova – imidazola, 1,2,4-triazola ili tetrazola.

U prvom delu ove doktorske disertacije po prvi put su veštačke neuronske mreže upotrebljene za građenje QSRR modela uz variranje hromatografskih uslova koji omogućavaju predviđanje retencionog ponašanja analita (*i*) u UHPLC sistemu, (*ii*) u cilju razvoja *stability-indicating* metode i (*iii*) u cilju razvoja metode za separaciju analita u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem. Molekulski deskriptori koji su učestvovali u modelovanju odabrani su na osnovu teorije hromatografije i literaturnih podataka, uz eliminaciju deskriptora koji korelišu međusobno. Kao rezultat toga, odabrani su deskriptori koji dominantno zavise od veličine molekula (površina molekula (MA), refraktivnost (MR), van der Waals energija između atoma udaljenih najmanje tri atoma (NON-1,4 VDW), polarizabilnost (POL) i zapremina nedostupna rastvaraču (SEV)) ili polarnosti analitâ (POL, oktanol-voda distribicioni koeficijent (logD), dipol-dipol energija (DEN), broj vodonikovih atoma koji mogu graditi vodonične veze (H-don) i broj slobodnih elektronskih parova koji mogu graditi vodonične veze (H-acc)). Hromatografski parametri koji su učestvovali u građenju modela odabrani su na osnovu preliminarnih ispitivanja, u skladu sa tipom eluiranja (izokratski ili gradijentno). Primenjena je eksterna validacija mreže, tj. mreža je testirana setom podataka koji nije učestvovao u treniranju. Sem toga, nakon svakog ciklusa treninga (epohe), mreža se testira na validacionom setu podataka. MLP mreže trenirane algoritmom povratnog prolaska greške su optimizovane u smislu topologije i parametara treninga u cilju dobijanja mreže koja dobro predviđa odgovor, praćenjem greške u predviđanju. Dobijene

mreže pokazuju visok stepen predviđanja retencionog ponašanja analita, koji se ogleda u visokoj korelaciji eksperimentalno dobijenih i predviđenih odgovora za test set podataka, kao i maloj grešci, tj. maloj razlici između eksperimentalno dobijenih i predviđenih odgovora. Dobijene mreže su upotrebljene za predviđanje retencionog ponašanja odabranih azola u UHPLC sistemu, optimizaciju HPLC metode za kompletnu separaciju kandesartan cileksetila i njegovih degradacionih proizvoda, odnosno optimizaciju HPLC metode za kompletnu separaciju sartana u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem. Svi molekularni deskriptori pokazuju značajan uticaj na model i retenciono ponašanje analita. Izvršena je analiza trendova odgovora predviđenih od strane mreže pri promeni pojedinačnih molekularnih deskriptora i hromatografskih faktora i uočeno veliko slaganje sa teorijskim pretpostavkama.

U drugom delu disertacije veštačke neuronske mreže upotrebljene su za građenje QSPR modela uz variranje hromatografskih uslova koji omogućava predviđanje intenziteta signala u masenom spektrometru (MS) na grupi odabranih sartana. Odabir molekularnih deskriptora se zasnivao na prethodno publikovanim istraživanjima i opšteprihvaćenim pretpostavkama o procesima elektrosprej jonizacije (ESI) – konstanta disocijacije konjugovane kiseline (pKa), oktanol-voda particioni koeficijent (logP), SEV i H-acc. Hromatografski faktori – pH mobilne faze, koncentracija pufera i udeo organskog rastvarača su varirani u skladu sa ograničenjima hromatografskog sistema i masene spektrometrije. Mreža je optimizovana na isti način kao pri građenju QSRR modela. Primenom dobijene mreže je sa velikom tačnošću predviđen intenzitet signala protonovanih molekula na setu podataka koji je poslužio za testiranje. Izvršena je analiza uticaja ulaznih promenljivih na model, odnosno molekularnih deskriptora na odgovor i zaključeno je da logP, pKa i SEV pokazuju znatno veći uticaj na odgovor u odnosu na H-acc, kao i veliko slaganje sa teorijskim pretpostavkama. Takođe, urađeno je poređenje trendova koje predviđa optimalna mreža i eksperimentalno dobijenih trendova za date faktore. Ispitan je uticaj hromatografskih uslova na odnos intenziteta signala dominantnih tranzicija, ali nije uočen značajniji uticaj.

Primenom veštačkih neuronskih mreža dobijeno je mnogo bolje predviđanje odgovora u odnosu na multilinearu regresionu analizu (MLR) za date ispitivane faktore. Veštačke neuronske mreže kao tehnika nelinearnog modelovanja pokazuju jako dobre rezultate u

opisivanju kompleksnih procesa kao što su retenciono ponašanje u HPLC sistemu i jonizacija u masenom spektrometru.

**Ključne reči:** QSRR, QSPR, veštačke neuronske mreže, azoli, HPLC, *stability-indicating* metoda, molekulski deskriptori, gradijentno eluiranje, sartani, masena spektrometrija

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Analitika lekova

**UDK broj:** 615.225:543.544.5:004.94(043.3)

**APPLICATION OF ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS IN  
BUILDING MODELS TO PREDICT RETENTION BEHAVIOUR AND  
INTENSITY OF MASS SPECTROMETRIC RESPONSE IN THE  
ANALYSIS OF THE SELECTED AZOLES AND SARTANS BY HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

**ABSTRACT**

Quantitative Structure – Property Relationships (QSPR) is a mathematical modeling which enables prediction of physical, chemical or biological properties of the groups of analytes based on their molecular descriptors. Molecular descriptor is a number that can be the result of logical and mathematical procedure that transforms chemical information carried by the symbolic representation of molecules in a usable number (theoretical descriptor), or the result of a standardized experiment (experimental descriptor).

QSRR are mathematically derived relationships between chromatographic response determined for a representative series of analytes in given chromatographic system and the molecular descriptors. They can be used to predict retention, as well as to identify descriptors that best describe the retention behavior. If chromatographic parameters are also included as inputs, QSRR methodology can be applied to optimize chromatographic methods, as well as gain insight into the molecular mechanisms of separation in the investigated chromatographic system between the analytes and the stationary phase.

QSPR in which mass spectrometric signal intensity is the observed response is a relatively new concept designed to predict response, optimize the conditions in order to increase the sensitivity of the method, identify the descriptors that best describe the process of ionization in a mass spectrometer, as well as gain insight into the mechanisms of formation of ions under the tested chromatographic conditions.



Chemometrics is a mathematical – statistical discipline that enables design and selection of optimal measurement procedure and experiments, and obtaining as much relevant information from chemical data. Artificial neural networks (ANN) are biologically inspired computer models and thus one of the techniques for building QSRR models. Multi-layer feed-forward or multi-layer perceptron (MLP) trained with backpropagation algorithm are most commonly used type of network in analytical chemistry.

The examined substances belong to the pharmacological groups: antifungal agents – azoles and angiotensin II receptor antagonists – sartans. Their structural similarity is based on the presence of heterocyclic polyazole - imidazole, 1,2,4-triazole or tetrazole.

In the first part of this doctoral thesis artificial neural networks were used for the first time for building QSRR models under varied chromatographic conditions in order to predict the retention behavior of the analytes (i) in UHPLC system, (ii) with the aim of developing stability-indicating method and (iii) with the aim of developing a method for the separation of analytes in a gradient-elution HPLC system. Molecular descriptors that participate in the modeling were selected on the basis of the theory of chromatography and literature data, along with the elimination of the descriptors that correlate with each other. As a result, selected descriptors dominantly depend on the molecular size of the analytes (molecular area (MA), refractivity (MR), van der Waals energy between the atoms distant at least three carbon (1.4 NON-VDW), polarizability (POL) and solvent excluded volume (SEV)) or the polarity of the analytes (POL, octanol-water distribution coefficient (log D), dipole-dipole energy (DEN), number of hydrogen atoms that can build hydrogen bonds (H-don) and number of free electron pairs which can build hydrogen bonds (H-acc)). Chromatographic parameters involved in the construction of the model were selected on the basis of preliminary tests, in accordance with the type of elution (isocratic or gradient).

External validation of the network has been applied, i.e. the network is tested using the data that did not participate in training. In addition, after each training cycle (epoch), the network is tested on a validation data set. MLP networks trained with backpropagation are optimized in terms of topology and parameters of training in order to obtain a network that

successfully predicts response, by monitoring prediction errors. Selected networks have shown a high level of retention behavior predictivity, which is reflected in the high correlation between the experimentally obtained and predicted responses for the test data set, and a small error, i.e. small difference between the experimentally obtained and the predicted responses. Obtained networks have been used to predict the retention behavior of the selected azoles in UHPLC system, to optimize an HPLC method for the complete separation of candesartan cilexetil and its degradation products, and to optimize an HPLC method for the complete separation of sartans in the gradient-elution HPLC system. All molecular descriptors show a significant impact on the model and the retention behavior of analytes. The analysis of the predicted response trends when changing individual molecular descriptors and chromatographic factors was performed and extensive agreement with the theoretical assumptions has been observed.

In the second part of the thesis, artificial neural networks were used for building QSPR model under varied chromatographic conditions in order to predict mass spectrometric (MS) signal intensity for the selected sartans. The choice of molecular descriptors was based on previously published research and generally accepted assumptions about the processes of electrospray ionization (ESI) – conjugate acid dissociation constant ( $pK_a$ ), octanol-water partition coefficient ( $\log P$ ), SEV and H-acc. Chromatographic factors – mobile phase pH, buffer concentration and organic phase content were varied with respect to the limitations of the chromatographic system and mass spectrometry. The network is optimized in the same way as for the QSRR modeling. The obtained network enabled very accurate predictivity of the signal intensity of the protonated molecules for the data set used for testing. The analysis of the impact of the input variables on the model, and the molecular descriptors on the response indicated that  $\log P$ , and  $pK_a$  SEV show much greater impact on the response compared to H-acc, as well as high agreement with the theoretical assumptions. Also, the trends predicted by the optimal network and experimentally obtained trends for the examined factors were compared. Moreover, the effect of the chromatographic conditions on the ratio of signal intensities of the dominant transitions was assessed, but it is no significant influence has been observed.

Much better predictivity has been accomplished by means of artificial neural networks, compared to multiple linear regression analysis for the examined factors. Artificial neural networks as a nonlinear modeling technique has shown very good results in describing complex processes such as retention behavior in the HPLC system and the mass spectrometric ionization.

**Key words:** QSRR, QSPR, artificial neural networks, azoles, HPLC, *stability-indicating* method, molecular descriptors, gradient elution, sartans, mass spectrometry

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Drug Analysis

**UDK number:** 615.225:543.544.5:004.94(043.3)

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Kvantitativni odnos strukture i osobina .....</b>   | <b>2</b>  |
| 1.1.1. Molekulski deskriptori .....   | 2         |
| 1.1.2. Kvantitativni odnosi strukture i retencionog ponašanja .....   | 3         |
| 1.1.2.1. QSRR koncepti .....  | 4         |
| 1.1.2.2. Tehnike za građenje QSRR modela .....  | 5         |
| 1.1.2.3. Primena QSRR metodologije u tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom<br>(eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ..... | 7         |
| 1.1.2.4. Osnovne interakcije u RP-HPLC sistemu .....  | 8         |
| 1.1.2.5. Molekulski deskriptori u QSRR studijama.....   | 9         |
| 1.1.3. Kvantitativni odnosi strukture i signala u masenom spektrometru .....  | 11        |
| <b>1.2. Veštačke neuronske mreže .....</b>  | <b>14</b> |
| 1.2.1. Definicija i istorijski razvoj.....  | 14        |
| 1.2.2. Osnovni pojmovi .....  | 15        |
| 1.2.3. Višeslojne nerekurentne mreže .....  | 17        |
| 1.2.3.1. Prenos signala.....  | 18        |
| 1.2.3.2. Treniranje mreže.....  | 19        |
| 1.2.3.3. Testiranje i procena kvaliteta mreže.....  | 20        |
| 1.2.3.4. Primeri i problemi pri treniranju mreže .....  | 22        |
| 1.2.4. Ostali tipovi ANN .....  | 25        |
| 1.2.5. Prednosti i nedostaci ANN.....   | 26        |
| 1.2.6. Primena ANN u farmaceutskim istraživanjima .....   | 27        |
| 1.2.6.1 Primena ANN u ispitivanju retencionog ponašanja analitâ u HPLC sistemima<br>.....   | 29        |
| 1.2.6.2. Primena ANN u ispitivanju retencionog ponašanja analitâ u HPLC<br>sistemima sa gradijentnim eluiranjem .....                         | 30        |
| <b>1.3. Studije forsirane degradacije i razvoj <i>stability-indicating</i> metode .....</b>   | <b>31</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.4. Model supstance – odabrani predstavnici iz grupe azola i sartana .....</b>  | <b>32</b> |
| 1.4.1. Azoli .....  | 33        |
| 1.4.1.1. Fizičko-hemijske osobine azola.....  | 33        |
| 1.4.1.2. Mehanizam dejstva azola.....   | 33        |
| 1.4.1.3. Veza strukture i aktivnosti azola .....  | 33        |
| 1.4.1.4. Analitika azola.....   | 35        |
| 1.4.2. Sartani.....   | 40        |
| 1.4.2.1. Fizičko-hemijske osobine sartana.....  | 40        |
| 1.4.2.2. Mehanizam dejstva sartana.....   | 43        |
| 1.4.2.3. Veza strukture i aktivnosti sartana .....  | 43        |
| 1.4.2.4. Analitika sartana .....  | 44        |
| <b>2. CILJ RADA .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>3.1. Opšti deo .....</b>   | <b>51</b> |
| 3.1.1. Standardne supstance .....   | 51        |
| 3.1.2. Rastvarači i reagensi.....   | 51        |
| 3.1.3. Oprema .....   | 52        |
| 3.1.4. Računarski programi .....  | 53        |
| <b>3.2. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u UHPLC sistemu.....</b>   | <b>53</b> |
| 3.2.1. Priprema rastvora uzoraka i mobilne faze.....  | 53        |
| 3.2.2. Hromatografski uslovi.....   | 54        |
| 3.2.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora, odabir značajnih hromatografskih faktora i modelovanje primenom ANN .....            | 54        |
| <b>3.3. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu za potrebe razvoja <i>stability-indicating</i> metode .....</b> | <b>55</b> |
| 3.3.1. Priprema rastvora i uslovi za izvođenje studije forsirane degradacije .....  | 55        |
| 3.3.2. Hromatografski i MS uslovi:.....   | 56        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora, odabir značajnih hromatografskih faktora i modelovanje primenom ANN .....            | 57        |
| <b>3.4. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem .....</b>                            | <b>58</b> |
| 3.4.1. Priprema rastvora uzoraka.....   | 58        |
| 3.4.2. Hromatografski uslovi.....   | 58        |
| 3.4.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora i modelovanje primenom ANN.....   | 58        |
| <b>3.5. Postavljanje QSPR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u cilju predviđanja odgovora masenog spektrometra.....</b>                     | <b>59</b> |
| 3.5.1. Priprema rastvora uzoraka.....   | 59        |
| 3.5.2. Hromatografski i MS uslovi.....  | 60        |
| 3.5.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora i modelovanje primenom ANN.....   | 61        |
| <b>4. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>4.1. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u UHPLC sistemu.....</b>   | <b>64</b> |
| 4.1.1. Odabir deskriptora koji učestvuju u građenju modela .....  | 64        |
| 4.1.2. Izbor značajnih hromatografskih faktora .....  | 64        |
| 4.1.4. Poređenje sa MLR.....  | 74        |
| <b>4.2. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu za potrebe razvoja <i>stability-indicating</i> metode .....</b> | <b>76</b> |
| 4.2.1. Studije forsirane degradacije.....   | 76        |
| 4.2.2. Izbor deskriptora koji učestvuju u građenju modela .....   | 79        |
| 4.2.3. Izbor značajnih hromatografskih faktora za građenje ANN modela.....  | 81        |
| 4.2.4. ANN modelovanje.....   | 82        |
| 4.2.5. Analiza efekata ulaznih promenljivih na model i odgovor .....  | 95        |
| 4.2.6. Poređenje sa MLR.....  | 100       |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.3. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu sa gradijntnim eluiranjem .....</b>           | <b>100</b> |
| 4.3.1. Izbor deskriptora i hromatografskih faktora za građenje modela .....   | 100        |
| 4.3.2. ANN modelovanje.....   | 101        |
| 4.3.2.1. Test set odabran nasumično iz ukupnog seta podataka .....  | 101        |
| 4.3.2.2. Test set sastavljen od podataka koji pripadaju jednom analitu .....  | 106        |
| 4.3.3. Analiza efekata ulaznih promenljivih na model i odgovor .....  | 108        |
| <b>4.4. Uspostavljanje QSPR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u cilju predviđanja odgovora masenog spektrometra.....</b> | <b>116</b> |
| 4.4.1. Optimizacija instrumentalnih uslova.....   | 116        |
| 4.4.2. Izbor deskriptora i hromatografskih faktora za građenje modela .....   | 117        |
| 4.4.3. ANN modelovanje.....   | 118        |
| 4.4.3. Analiza efekata ulaznih promenljivih na model i odgovor .....  | 120        |
| 4.4.4. Poređenje sa MLR.....  | 130        |
| 4.4.5. Uticaj variranih instrumentalnih faktora na intenzitet signala MS/MS tranzicija .....  | 131        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>135</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>  | <b>139</b> |
| <b>7. PRILOZI .....</b>   | <b>164</b> |
| <b>8. BIOGRAFIJA .....</b>  | <b>167</b> |

# **1. UVOD**



## 1.1. Kvantitativni odnos strukture i osobina

Kvantitativni odnosi strukture i osobina (eng. *Quantitative Structure – Property Relationships* QSPR) je opšti pojam koji predstavlja matematičko modelovanje kojim se predviđaju fizičke, hemijske ili biološke osobine određene grupe analita na osnovu njihovih deskriptora, numeričkih vrednosti dodeljenih na osnovu strukturnih karakteristika. Začetnikom QSPR pristupa smatra se *Louis Hammett* koji je 1935. objavio članak u kome se korelišu konstante ravnoteže baza i kiselina sa reaktivnošću [1]. Svakako najčešće korišćene vrste QSPR su kvantitativni odnosi strukture i dejstva (eng. *Quantitative Structure – Activity Relationships*, QSAR) [2] u sintezi lekova, i kvantitativni odnosi strukture i retencionog ponašanja (eng. *Quantitative Structure – Retention Relationships*, QSRR) [3] u separacionim tehnikama. Osobine koje se predviđaju ovom metodologijom odnose se na različite oblasti razvoja, proizvodnje, analize i primene lekova. Neke od osobina koje se predviđaju na osnovu strukture lekova su: organoleptičke osobine [4-6], rastvorljivost [7, 8], lipofilnost [9-13], reaktivnost [14-16], permeabilnost i penetracija kroz tkiva [17-21], farmakokinetika [22-25], toksičnost i mutagenost [26-28].

QSPR studije, bez sumnje, imaju veliki značaj u modernoj hemiji i biohemiji. Kada se uspostavi veza između strukture i osobine, bilo koje jedinjenje, uključujući i ona koja još nisu sintetisana, može biti testirano u cilju pronalaženja jedinjenja sa željenim osobinama. Ovo je posebno značajno kod QSAR studija. Moguće je odabrati jedinjenja koja pokazuju najbolje osobine, i sintetisati ih u laboratoriji. Na taj način QSPR/QSAR pristup štedi resurse i ubrzava proces razvoja novih molekula – lekova, aditiva, različitih materijala itd. [29].

### 1.1.1. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori su veoma značajni u hemijskim i farmaceutskim naukama, istraživanju u oblasti zdravlja i sl. Molekulski deskriptor je broj može biti rezultat logičke i matematičke procedure kojom se transformiše neka hemijska informacija koju predstavlja simbolički prikaz molekula u upotrebljiv broj (teorijski deskriptor), ili rezultat standardizovanog eksperimenta (eksperimentalni deskriptor). Molekulski deskriptori doprinose boljem razumevanju osobina molekula i/ili mogu da se upotrebe za predviđanje

osobina hemijskih jedinjenja. Oblast molekulskih deskriptora je izrazito interdisciplinarna i uključuje ogroman broj različitih teorija. Mnogi deskriptori odražavaju jednostavne molekulske osobine i na taj način omogućavaju analizu fizičko-hemijske prirode procesa čiji odgovor se prati. Napredak u računarskom hardveru i razvoj efikasnih algoritama omogućio je skoro rutinsko računanje molekulskih deskriptora. Novim semi-empirijskim metodama je omogućeno računanje kvantum-hemijskih deskriptora za relativno kratko vreme. Da bi se odredili molekulski deskriptori potrebno je znanje algebre, teorije grafova, kompjuterske hemije, kao i teorija organske reaktivnosti i nekih procesa fizičke hemije. Da bi se molekulski deskriptori pravilno koristili potrebno je znanje statistike, hemometrije, i principa QSAR/QSPR pristupa, uz poznavanje samog problema. [3, 29, 30].

Broj deskriptora koji se može pridodati nekom analitu je praktično neograničen. Teorijski deskriptori se mogu podeliti na nula- (0D), jedno- (1D), dvo- (2D), tro- (3D) i četvorodimenzione (4D). 0D deskriptori se izvode iz molekulske formule i ne zavise od strukture. Primeri su broj i vrsta atoma, molekulska masa i bilo koja funkcija atomskih osobina (npr. zbir *van der Waals*-ovih zapremina). Ukoliko se pri izračunavanju uzimaju u obzir funkcionalne grupe molekula ili supstituenti, takvi molekulski deskriptori su 1D. Ukoliko se uzima u obzir topologija molekula, dobijaju se 2D deskriptori. Oni opisuju način na koji su atomi povezani u molekulu, vrstu veze i interakcije određenih atoma. 3D-prikaz predstavlja geometrijsku strukturu i 3D deskriptori zavise ne samo od prirode i načina vezivanja atoma, već i od prostorne konfiguracije. 4D deskriptori se izvode iz stereoelektronskog prikaza (rešetke) molekula. Ovi deskriptori se izračunavaju na osnovu molekuskog prikaza koji opisuje molekulske osobine koje ukazuju na elektronsku raspodelu-interakciju molekula sa prostorom koji ga okružuje [3].

### **1.1.2. Kvantitativni odnosi strukture i retencionog ponašanja**

Ideja o predviđanju hromatografskog ponašanja na osnovu molekulske strukture dovela je do koncepta QSRR metodologije. QSRR su matematički dobijene veze između hromatografskih odgovora određenih za seriju analita u datom hromatografskom sistemu i molekulskih deskriptora koji ukazuju na razlike između ispitivanih analita. Ove veze

uključuju algoritam koji povezuje molekulske deskriptore i praćeni odgovor, i koji opisuje retenciono ponašanje [31]. Ukoliko je moguće predvideti retenciju analitâ i/ili razdvajanje smeše u hromatografskom sistemu relativno dobro, onda teorijski pristup može, u nekoj meri, da zameni vremenski zahtevan eksperimentalni pristup [3]. Da bi QSRR model dobro predviđao retenciono ponašanje, neophodno je primeniti molekulske deskriptore koji obuhvataju sve fizičko-hemijske osobine molekulâ relevantne za proces retencije. Do sada je definisano preko 6000 molekulskih deskriptora, i ovaj broj je u stalnom porastu [30].

Dva pristupa QSRR koja prednjače u literaturi su: (a) modeli zasnovani na malom broju *a priori* odabranih deskriptora, odabranih na osnovu njihovih poznatih fizičko-hemijskih osobina, poznatim hemičarima [32, 33] i (b) modeli kod kojih se počinje od velikih setova deskriptora (stotina ili hiljada), i primenom neke od metoda selekcije bira mali broj varijabli za građenje modela [34, 35]. Nijedan od pomenutih pristupa nije uspešniji ili bolji *a priori*, jer je neophodno izabrati relevantne deskriptore. Uspešnost prvog pristupa zavisi u najvećoj meri od znanja o retencionim mehanizmima i dostupnosti molekulskih deskriptora koji ih najbolje opisuju. Za QSRR modele dobijene drugim pristupom najvažnija je adekvatna selekcija promenljivih [36]. Sa hemijske tačke gledišta značajni su samo oni matematički deskriptori, izvedeni iz hemijske strukture, koji se mogu povezati sa fizičko-hemijskim osobinama analita. Sa druge strane, moguće je osmisliti hiljade deskriptora bez fizičko-hemijskog značenja. Postavlja se pitanje u QSRR naučnoj javnosti da li je bolje razviti QSRR model sa velikom sposobnošću predviđanja uz upotrebu molekulskih deskriptora sa nejasnom fizičko-hemijskom interpretacijom ili model nešto slabijeg potencijala za predviđanje odgovora uz primenu deskriptora koji jasno definišu fizičko-hemijske osobine analita [3].

#### 1.1.2.1. QSRR koncepti

Najstariji QSRR model uspostavlja vezu između retencionih faktora i logaritma oktanol-voda particionog koeficijenta ( $\log P$ ) [37]. Drugi pristup u QSRR se zasniva na tzv. linearnoj korelaciji solvatohromnih energija solvatacije (eng. *Linear Solvation Energy Relationship* (LSER) [38-40].

$$\log k = \log k_0 + rR_2 + vV_x + s\pi_2^H + \alpha \sum \alpha_2^H + b \sum \beta_2^H \quad (1)$$

U jednačini (1) predstavljena je opšta LSER jednačina.  $R_2$  predstavlja molarnu refraktivnost analita,  $V_x$  je zapremina molekula računata po *Gowan*-ovom algoritmu,  $\pi_2^H$  dipolarnost/polarizabilnost,  $\sum \alpha_2^H$  ukazuje na sposobnost molekula da donira vodoničnu vezu,  $\sum \beta_2^H$  je deskriptor analog prethodnom, koji ukazuje na sposobnost molekula da primi vodoničnu vezu.  $\log k_0$  je konstanta, dok su  $r$ ,  $v$ ,  $s$ ,  $a$  i  $b$  regresioni koeficijenti koji dopunjuju opis odgovarajućih osobina hromatografskog sistema – sistema koga čine data stacionarna i mobilna faza. Ova teorija predviđa tri mehanizma koji doprinose retencionom ponašanju: efekat šupljine, dipola i vodoničnih veza. Efekta šupljine kvantifikuje endoergni proces razdvajanja molekula rastvarača kako bi se omogućilo umetanje molekula analita. Efekta dipola zapravo predstavlja proizvod  $\pi^*$  interakcija između analita i rastvarača, kada se  $\pi^*$  određuje kao mera dipolarnosti/polarizabilnosti pomenutih supstanci. Na kraju, efekta vodoničnih veza se odnosi na sposobnost analita da prima i otpušta vodonik [38-40].

Treći, i najzastupljeniji QSRR pristup obuhvata primenu manjeg ili većeg broja deskriptora odabranih na jedan od dva načina navedena u poglavlju 1.1.3 [41-44] i neke od tehnika za građenje QSRR modela. Miller et al. [43] su ukazali na neke nedostatke LSER modelovanja. Svaki LSER descriptor mora biti izračunat, a pojedinačni koeficijenti se obično dobijaju preko izmerenih retencionih podataka za grupu jedinjenja. Stoga, vreme koje je potrebno da se dobije tačan LSER model je nekada veoma dugo (posebno za jedinjenja koja jonizuju). Pošto LSER koeficijenti zavise i od izmerene retencije na stacionarnoj fazi, tehnički faktori kao što je starenje faze mogu da dovedu do značajnih promena i smanjene tačnosti modela u toku vremena [43].

#### 1.1.2.2. Tehnike za građenje QSRR modela

Najčešće korišćene tehnike za građenje QSRR modela (i QSPR modela generalno) su multilinearne regresione analize (eng. *Multiple Linear Regression*, MLR) [45-50], metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) [51, 52], metode odlučivanja po sistemu granjanja (eng. *Classification and Regression Trees*, CART) [53], metoda multivarijantnih adaptivnih regresionih žlebova (engl. *Multivariate Adaptive*

*Regression Splines*, MARS) [35] i veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks*, ANN).

MLR je verovatno najzastupljenija tehnika za građenje QSRR modela. U MLR, regresiona analiza se vrši tako da se dobije statistički značajan model, gde je retencija u datom hromatografskom sistemu funkcija ograničenog broja molekulskih deskriptora. Ukoliko se kreće od većeg broja deskriptora, potrebno je izvršiti odabir deskriptora značajnih za model. U tu svrhu primenjuje se postupna multilinearne regresiona analiza (eng. *Stepwise-MLR*), u kojoj se ciklično ponavlja izbor deskriptora „ka napred“ sa eliminacijom deskriptora „ka nazad“. Postupnom MLR se promenljive selektuju korak po korak iz određenog seta deskriptora (x), imajući u vidu njihovu korelaciju sa retencionim parametrom koji se prati (y). Najpre se uključuje promenljiva sa najvećom korelacijom sa y, a potom se testira značaj regresionog koeficijenta F-testom. Ukoliko je koeficijent značajan, promenljiva se uključuje u model. Korak u kome se uključuju nove promenljive u model se zove selekcija „ka napred“. Posle svakog uključivanja se sprovodi parcijalni F-test značaja promenljivih koje su već uključene u model. Ukoliko neka promenljiva više ne doprinosi značajno modelu, ona se isključuje iz modela. Ovaj korak se zove selekcija „ka nazad“. Proces se ponavlja sve dok se postiže napredak dodavanjem ili isključivanjem promenljivih. Jedan od nedostataka postupne-MLR procedure je što se zasniva na fitovanju podataka, tj. dobijeni model može biti previše fitovan, što onemogućava dobro predviđanje odgovora. Da bi se ovo izbeglo, primenjuje se ukrštena validacija, kojom se testira sposobnost predviđanja od strane modela [3]. Druge tehnike koje se često koriste za pre-selekciju ulaznih promenljivih su genetski algoritmi [41, 54, 55] i analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) [56].

PLS se zasniva na pronalaženju linearne veze između nezavisno promenljive, i seta latentnih promenljivih. PLS pristup je veoma koristan u slučajevima rešavanja problema multikolinearnosti, zamenom prvobitnih promenljivih malim brojem latentnih promenljivih – PLS faktorima. Ovi faktori su linearne kombinacije prvobitnih promenljivih, tj. deskriptora, kojim se ostvaruje maksimalna kovarijansa unutar seta deskriptora i odgovora. Do optimalnog broja latentnih faktora se dolazi pomoću „ostavi jedan van“ ukrštene validacije

(eng. *Leave-One-Out Cross-Validation* (LOO-CV)). Optimalan broj faktora je onaj koji daje minimalnu CV grešku [3].

### 1.1.2.3. Primena QSRR metodologije u tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom (eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Dobar i pouzdan QSRR model može se upotrebiti za:

- predviđanje retencije novog analita
- predviđanje retencije analita pri novim hromatografskim uslovima
- identifikovanje deskriptora koji najbolje opisuju retenciono ponašanje i imaju najveći uticaj na predviđanje retencionog ponašanja
- sticanje uvida u molekulske mehanizme razdvajanja u datom hromatografskom sistemu između analita i stacionarne faze
- određivanje fizičko-hemijskih osobina analita, npr. lipofilnosti i kiselosti [57, 58]
- predviđanje relativne biološke (farmakološke) aktivnosti i farmakokinetičkih parametara u okviru grupe lekova odnosno ksenobiotika [59-62].

QSRR metodologija primenjuje se u različitim tipovima HPLC sistema: reverzno-faznoj (eng. *Reverse Phase*, RP-HPLC) kao najčešće primenjivanom tipu HPLC [33, 54, 63, 64], ali i normalno-faznoj (eng. *Normal Phase*, NP-HPLC) [65], u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC)[33, 66, 67], jonskoj hromatografiji (eng. *Ionic Chromatography*, IC) [68-70] i td.

Uspostavljanje kvantitativnih odnosa između retencije u određenom HPLC sistemu i fizičko-hemijskih osobina analita (preko molekulskih deskriptora) bi omogućilo predviđanje retencije analita poznatih osobina, ili pronalaženje analita koji ima željenu retenciju. Ukoliko se u model uključe i hromatografski uslovi, kao što je npr. sastav mobilne faze, tada nastaje QSRR model koji su *D'Archivio* i saradnici nazvali QSERR (eng. *Quantitative Structure/Eluent–Retention Relationships*). Ova vrsta QSRR modelovanja je zahtevnija od „konvencionalne“ QSRR (u kojoj se uključuju samo molekulski deskriptori), zbog veće kompleksnosti odnosa koji uključuju najčešće nelinearne efekte i interakcije [42]. Ovo može

da bude veoma korisno u pronalaženju optimalnih uslova za razdvajanje analita u toku razvoja metode.

QSRR strategija ima za cilj karakterizaciju određenog hromatografskog sistema, korišćenjem odabranog seta analita. Analiti bi trebalo da budu tako odabrani da su interkorelacije molekulskih deskriptora u okviru seta analita minimalne. Istovremeno, set treba da bude takav da obezbeđuje širok opseg deskriptora i ravnomernu raspodelu deskriptora. Set analita treba da bude dovoljno veliki da obezbedi statistički značaj QSRR modela, ali ne preveliki kako ne bi zahtevao previše eksperimentalnog rada [71].

#### 1.1.2.4. Osnovne interakcije u RP-HPLC sistemu

U RP-HPLC sistemu međusobno ostvaruju interakcije: analit, ugljivodonicima vezani za siliku, silanolne grupe i sve komponente mobilne faze. Čini se nemogućim uspostaviti model za predviđanje retencije u tako kompleksnom sistemu. Ipak, moguće je racionalno objašnjenje razlika u retenciji na osnovu intermolekulskih interakcija. Tipično za RP-HPLC sistem je povećanje logaritma retencionog faktora ( $\log k$ ) analita sa većim brojem ugljenika u okviru nekog homolognog reda jedinjenjâ. Najpre, disperzne sile (*London-Hall* efekat) dovode do vezivanja ugljovodoničnog lanca za stacionarnu fazu, i one dovode do razlike među homolozima. Lako bi moglo da se pretpostavi da je razdvajanje homologa koje potiče od razlika u interakcijama koje uključuju orijentaciju (*Keesom* efekat) zanemarljiva jer je polarnost (dipolni momenat) ugljovodoničnog dela praktično nula. Takođe, dipol-indukovani dipol interakcije (*Debye* efekat) bi trebalo da su slične za sve homologe jer su dipolni momenti u okviru homolognog reda slični. Sa druge strane, snaga disperznih interakcija se povećava sa povećanjem veličine molekula (masivnosti). U pogledu interakcija homolognih analitâ sa eluentom (koji je polaran), efekti orijentacije i induktivni efekti su nesumnjivo jači od interakcija analita sa nepolarnim ugljovodonicima stacionarne faze. Naravno, dipol-dipol i dipol-indukovani dipol interakcije sa eluentom su slične kod homologa usled sličnosti u njihovim dipolnim momentima. Privlačne sile homolognih analita sa mobilnom fazom koje potiču od disperznih i dipol-indukovani dipol interakcija zavise od polarizabilnosti. Pošto disperzne interakcije prevladavaju među ostalim intermolekulskim interakcijama, i

polarizabilnost ugljovodonika (npr. oktadecil lanca) stacionarne faze je veća od polarizabilnosti malih molekula koji su tipični eluenti u RP-HPLC, ukupan efekat svih *van der Waals*-ovih interakcija (*Keesom*, *Debye*, i *London-Hall* efekti) biće povećanje retencije velikih homologa. Naravno, interakcije analitâ su dalje zakomplikovane ne-*van der Waals*-ovim interakcijama (Tabela 1), naročito vodoničnim vezama i interakcijama prenosa naelektrisanja.

Smanjenje retencije analitâ sa povećanjem stepena jonizacije, koje se zapaža u RP-HPLC sistemima, može se takođe objasniti poznatim intermolekulskim interakcijama. Logično je da se disperzne interakcije jona analita sa obe faze ne razlikuju od interakcija nejonizovanih molekula analita. Međutim, u slučaju jona analita, jon-dipol interakcije postaju dominantne. Takve privlačne interakcije između jona analitâ i polarnih molekulâ eluenta su od praktičnog značaja, za razliku od interakcija jonâ sa nepolarnim ugljovodoničnim grupama stacionarne faze. Udaljene jon-dipol interakcije su jače od bliskih *van der Waals*-ovih interakcija i opadaju proporcionalno kvadratu rastojanja između interagujućih vrsta. Stoga, pH eluenta jako utiče na retenciju slabih kiselina i baza. U Tabeli 1 date su najvažnije interakcije u RP-HPLC sistemima [72] .

#### 1.1.2.5. Molekulski deskriptori u QSRR studijama

Strukturni deskriptori koji zavise od veličine molekula (masivnosti) su najčešće povezani sa sposobnošću analita da učestvuje u nespecifičnim intermolekulskim interakcijama (disperznim ili *London*-ovim interakcijama) sa komponentama hromatografskog sistema. Oni su dovoljni da mogu objasniti razdvajanje analitâ u sistemu u kom vladaju isključivo disperzne sile, ili kada je razlika u polarnim interakcijama među analitima zanemarujuća. Deskriptori koji se odnose na polarnost bi trebalo da ukažu na razlike među analitima u smislu dipol-dipol, dipol-indukovani dipol, vodonične veze, i donor elektronskog para-akceptor elektronskog para interakcije. Sa druge strane, nije jednostavno kvantifikovati polarnost nedvosmisleno. Empirijski fizičko-hemijski deskriptori imaju veliku informativnu vrednost u analizi mehanizama retencije u određenom hromatografskom sistemu. Problem je sa druge strane, slaba dostupnost empirijskih deskriptora. Oblik



molekula je u RP-HPLC sistemu od mnogo manjeg značaja u poređenju sa veličinom molekula i polarnošću. Dakle, dve osnovne vrste privlačnih interakcija se moraju uzeti u razmatranje: (i) hemijski nespecifične interakcije, zavisne od veličine molekula ili masivnosti – disperzne (*London-ove*) interakcije i (ii) polarne interakcije koje zavise više ili manje od hemijske strukture (orijentacije, vodoničnih veza i transfera naelektrisanja). Stoga u QSRR jednačinama, odnosno modelima generalno figurišu dve vrste deskriptora: oni koji se odnose na veličinu odnosno masivnost analita i oni koji se odnose na polarnost. Deskriptori masivnosti su dominantni u GC nepolarnih faza ili RP-HPLC, dok se značaj deskriptora polarnosti povećava sa povećanjem polarnosti stacionarne faze i analitâ.

Tabela 1. Tipovi veza karakteristični za RP-HPLC, energije veza i primeri [72].

| Vrsta interakcije  | Energija interakcije (KJ/mol) | Primer   |
|--|-------------------------------|--|
| Kovalentne veze  | -(170-460)                    | $\text{CH}_3\text{-OH}$  |
| Jake jonske veze   | - 40                          | $\text{HRN-H} \cdots \text{O}=\text{C-R}'$<br>$\text{H}^\oplus \cdots \ominus \text{O}$    |
| Jonske veze  | - 20                          | $\text{R}_4\text{N}^\oplus \cdots \text{Cl}^\ominus$                                       |
| Jon-dipol interakcije  | -(4-17)                       | $\text{R}_4\text{N}^\oplus \cdots \text{:NR}_3$  |
| Dipol-dipol i dipol-indukovani dipol interakcije (Keesom efekat i Debye efekat)                | -(4-17)                       | $\text{O}=\overset{\delta+}{\text{C}} \cdots \text{:NR}_3$                                 |
| Vodonične veze   | -(4-17)                       | $\text{-OH} \cdots \text{O}=\overset{\cdot}{\text{C}}$                                     |
| Interakcije donor elektronskog para-akceptor elektronskog para (efekat prenosa naelektrisanja) | -(4-17)                       | $\text{-OH} \cdots \text{C}=\text{C}$  |
| Disperzivne interakcije ( <i>London-Hall</i> efekat)   | -(2-4)                        | $\text{C} \cdots \text{C}$   |
| Hidrofobne interakcije (hibrid nepolarnih i polarnih interakcija)                              | - 4                           | $\text{R-CH}_2 \cdots \text{CH}_2\text{-R}$<br>$\text{R-CH}_2 \cdots \text{CH}_2\text{-R}$ |

Nekoliko QSRR studija u kojima su korišćeni LSER, (jednačina 1) odnosno linearne jednačine su ukazale da su najvažniji deskriptori masivnosti (volumen, refraktivnost) i kiselost/baznost pri formiranju vodoničnih veza. Dipolarnost/polarizabilnost se pokazala manje značajnim faktorom. U RP-HPLC sistemu ukupan pozitivan efekat imaju deskriptori masivnosti. Disperzne veze analita su jače sa voluminoznim ugljovodoničnim ligandima

stacionarne faze nego sa malim polarnim molekulima mobilne faze (voda, metanol acetonitril). Zato je koeficijent ispred  $V_x$  (zapremine molekula računata po *Gowan*-ovom algoritmu) sa pozitivnim predznakom. Sa druge strane, deskriptori polarnosti imaju negativan uticaj na retenciju jer su dipol-dipol i dipol-indukovani dipol interakcije jače između polarnih (polarizovanih) molekula analita i polarnih molekula eluenta nego između analita i nepolarnih lanaca ugljovodonika stacionarne faze. Stoga je u studijama sa LSER modelima dobijan negativan koeficijent ispred polarizabilnosti/dipolarnosti. Uticaj deskriptora koji se odnose na donore odnosno akceptore vodonične veze je nešto kompleksniji, jer se i sami eluenti ponašaju različito: acetonitril je donor elektronskog para u građenju H-veze, dok je metanol i akceptor H-veze. U sistemima sa acetonitriplom (za razliku od onih sa metanolom kao eluentom), polarne interakcije su se pokazale manje značajnim.

Dalje, uočena je veća zavisnost retencije od logP pri korišćenju metanola kao eluenta u odnosu na acetonitril. Ugljovodonične stacionarne faze solvatisane acetonitriplom su manje slične oktanolu nego one solvatisane metanolom. Hidrofobnost (lipofilnost) je zbirni efekat različitih kompetirajućih intermolekulskih interakcija analita u dvofaznom voda-organski rastvarač sistemu u kome molekuli čine okolinu.

Površina molekula analita dostupna rastvaraču (eng. *Solvent Accessible Surface*, SAS) je parametar koji ukazuje na sposobnost analita da učestvuje u disperznim, interakcijama. Ove interakcije analita su jače sa ugljovodonicima stacionarne faze u odnosu na polarne molekule eluenta, te je koeficijent ispred ovog parametra u studijama imao pozitivan predznak [32, 71].

### **1.1.3. Kvantitativni odnosi strukture i signala u masenom spektrometru**

U literaturi se može naći nekoliko pristupa istraživanju veze između molekulskih deskriptora i intenziteta odgovora masenog spektrometra (MS), upotrebom pre svega danas najčešće korišćenog tipa jonizacije, elektrosprej (eng. *Electrospray Ionization*, ESI), i retko hemijske jonizacije pod atmosferskim pritiskom (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). *Caetano* i saradnici [73] su primenili različite statističke tehnike za

predviđanje odgovora nakon ESI i APCI jonizacije upotrebom velikog broja deskriptora kako bi identifikovali bolju tehniku jonizacije za određene analite. PLS se pokazala kao uspješnija od postupne MLR, ali PLS pruža nedovoljno informacija o sistemu i teže je interpretirati uticaj deskriptora. Međutim, nijedna od primenjenih statističkih metoda nije bila uspješna u predviđanju efikasnije tehnike jonizacije. *Ehrmann* i saradnici [74] su ispitivali korelaciju između baznosti u rastvoru, baznosti u gasu i površinske aktivnosti, kroz oktanol-voda particioni koeficijent ( $\log P$ ), sa ESI-MS signalom. Pronašli su korelaciju samo u slučaju baznosti u rastvoru i zaključili da naelektrisanje ima veći uticaj na odgovor u odnosu na polarnost. *Cech* i *Enke* [75] su dobili linearnu zavisnost između *Gibbs*-ove slobodne energije i ESI-MS odgovora (koeficijent korelacije,  $R = 0,91$ ), i još veću korelaciju između nepolarne površine molekula i MS odgovora ( $R = 0,98$ ). Uticaj polarnosti ( $\log P$ ) i kiselosti na intenzitet signala je ispitivan i u negativnom jonizacionom modu [76]. Dobijena je pozitivna korelacija  $\log P$  i signala, ali ne i pouzdano i jasno predviđanje odgovora. Autori su zaključili da je, s obzirom na kompleksnost procesa ESI jonizacije, teško korelisati odgovor malih molekula u ESI-MS sa jednim parametrom. *Raji* i saradnici su ispitivali primenu tri tehnike modelovanja u cilju predviđanja MS odgovora i sticanja uvida u proces jonizacije, korišćenjem nekoliko molekulskih deskriptora: nepolarne površine, polarne površine, baznosti u gasnoj fazi, afiniteta za proton i  $\log D$ . Metoda potpornih vektora (eng. *Support Vector Machine*, SVM) kao nelinearna tehnika pokazala se kao efikasnija u odnosu na MLR i CART. Ipak, autori su zaključili da je uspostavljanje sveobuhvatnog modela koji potpuno opisuje uticaj svih relevantnih fizičko-hemijskih parametara na ESI-MS odgovor težak, ako ne i nemoguć zadatak [77]. *Huffman* i saradnici su uočili da se efikasnost jonizacije u negativnom modu povećava sa povećanjem dužine alkilnog lanca u okviru grupe homologa, a takođe i uvođenjem supstituenta koji je elektron-akceptor [78]. *Chalcraft* i saradnici [79] su razvili QSRR model pomoću MLR tehnike, proučavajući zavisnost efikasnosti jonizacije od zapremine molekula izražene preko *Connolly* zapremine nedostupne rastvaraču (eng. *Solvent-Excluded Volume*, SEV), oktanol-voda distribucionog koeficijenta ( $\log D$ ), apsolutne pokretljivosti i efektivnog naelektrisanja. Jonizaciona efikasnost koju je model predviđao je bila u značajnoj korelaciji sa molekulskom zapreminom i  $\log D$ . *Oss* i saradnici [80] su uspostavili MLR model zavisnosti efikasnosti jonizacije od zapremine molekula. U

pomenutim studijama [73-76, 78-80] instrumentalni parametri, uključujući i sastav rastvarača, su bili konstantni, tj. njihov uticaj nije ispitivan.

Sa druge strane, nekoliko objavljenih članaka se bavi uticajem hromatografskih parametara (tip organskog rastvarača, tip pufera, aditivi u mobilnoj fazi, pH mobilne faze, protok mobilne faze) [81-84], ili ESI parametara [85-87] na ESI-MS signal u grupi analita i/ili optimizacijom instrumentalnih parametara, ali ne uzimajući molekulske deskriptore u obzir. Negativna korelacija između protoka i intenziteta MS signala dobijena je i u studiji ponašanja pesticida u masenom spektrometru [84]. U studiji u kojoj je proučavan uticaj mobilne faze na intenzitet MS signala saponina dobijenih iz ginka u negativnom jonizacionom modu zaključeno je da se dobija jači signal pri kiseloj u odnosu na neutralnu i baznu mobilnu fazu [83]. *Rainville* i saradnici [81] su ispitivali osetljivost MRM tranzicija hemijski i farmakološki heterogene grupe lekova od kiselosti mobilne faze. Zaključili su da je za većinu lekova veća osetljivost postignuta pri baznoj u odnosu na kiselu mobilnu fazu.

Istovremen uticaj sastava rastvarača i molekulskih deskriptora nalazimo u dva objavljena članka, u kojima se autori bave samo pKa vrednošću kao deskriptorom [88, 89]. *Yang* i saradnici [88] su pronašli da dodatak modifikatora, kao što je amonijak, značajno povećava jonizaciju nekoliko pesticida. Oni su naglasili da transfer protona u gasnoj fazi ima značajnu ulogu u ESI jonizaciji jedinjenja sa  $pK_a < 3$ . *Lüigand* i saradnici [89] su varirali koncentraciju acetonitrila u mobilnoj fazi, kao i modifikatore mobilne faze, čime su postigli i varijaciju pH mobilne faze. Set analita je imao širok opseg pKa vrednosti. Slabe baze su davale najveći odgovor u kiseloj mobilnoj fazi, gde se intenzivno protonuju. Sa druge strane, jake baze davale su najveći signal u jako baznom medijumu. Dodatno, odgovor slabih i istovremeno visoko hidrofobnih baza pokazao se nezavisnim od kiselosti medijuma. Sem toga, pokazano je da efikasnost jonizacije zavisi od udela organske faze u mobilnoj fazi. Uopšteno, veći procenat organskog rastvarača daje veći MS signal [89].

## 1.2. Veštačke neuronske mreže

### 1.2.1. Definicija i istorijski razvoj

Hemometrija matematičko-statistička disciplina koja ima široku primenu, između ostalog, u analitici lekova kao i u analitici uopšte. Ona omogućava dizajn i selekciju optimalnih procedura merenja i eksperimenata i dobijanje što više relevantnih informacija iz hemijskih podataka [90]. Jedna od hemometrijskih tehnika je modelovanje veštačkim neuronskim mrežama (eng. *Artificial Neural Networks*, ANN). ANN su kompjuterski programi dizajnirani da simuliraju način na koji ljudski mozak obrađuje informacije. ANN uče (treniraju se) kroz iskustvo odgovarajućim primerima, baš kao i ljudi, ne programiranjem. Neuronske mreže stiču znanje opažanjem šema i veza među podacima. Kada mi pogledamo u čašu, znamo da je to čaša jer su nervi u određenom delu mozga bili u kontaktu sa sličnim ulaznim podatkom i naučili da tu šemu povežu sa pojmom “čaša”. U Tabeli 2 prikazane su razlike u konceptu ANN i klasičnog programiranja [91].

Tabela 2. Razlike između klasičnog programiranja i veštačkih neuronskih mreža [91]

| Osobine       | Klasično programiranje     | Veštačke neuronske mreže   |
|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Metoda učenja | Prema pravilu (didaktički) | Prema iskustvu (sokratski) |
| Funkcije      | Logičke                    | Perceptualne šeme          |
| Stil obrade   | Sekvencijalno              | Paralelno                  |

Veštačke neuronske mreže su najpre razvijene kao model za svoje biološke dvojnike. Kompjuterska verzija je pogodna za izvođenje tipičnih radnji ljudskog mozga: pamćenje objekata, prepoznavanje (simboličnih) šema, generalizaciju, procenu parametara i donošenje odluka. Ove osobine su obećavale da ANN mogu da nadomeste nedostatke “tradicionalnih” tehnika za obradu podataka [90].

Začeci rada na ANN pripisuju se *McCulloch-u* i *Pitts-u* 1943. godine [92]. Oni su pokušali da razumeju funkcionisanje nervnog sistema, definisanjem najjednostavnijih

elemenata obrade informacija, zasnovanim na matematičkoj logici, koji predstavljaju apstrakciju funkcionalnih osobina bioloških neurona i njihovih veza. 1945. *Hebb* je 1949. opisao pravilo učenja izvedenog na osnovu neurofizioloških eksperimenata na biološkim neuronskim mrežama [93]. Međutim, u to vreme, istraživanja su bila isključivo teorijska jer nije bilo dovoljno sofisticirane kompjuterske tehnologije. Razvoj kompjutera omogućio je da se modeli neuronskih mreža testiraju “u praksi”. Prva precizno definisana, kompjuterski orijentisana neuronska mreža bio je Perceptron, razvijen od strane *Rosenblatt*-a 1958 [94] i bila je “vetar u leđa” istraživanju ANN. Sve više istraživača posvetilo se razvoju u ovoj oblasti, te se i preterivalo u mogućnostima koje ANN pružaju. Sa druge strane *Minsky* i *Papert* objavljuju knjigu o Perceptronu 1988. godine [95] u kojoj predviđaju beskorisnost neuronskih mreža. Ovo je imalo negativan uticaj na istraživanje i dovelo je do smanjenja finansijskog ulaganja u ovu oblast [90].

Na sreću, ovo nije demotivisalo nekoliko naučnika, čija je istrajnost dovela do konačnog proboja: razvoja novog pravila učenja, tj. sistema povratnog prolaska greške (eng. *Back-propagation*), koji je služio za mnogo kompleksnije mreže od prvobitnog Perceptrona. Ovo oživljavanje je dovelo do značajnog povećanja istraživanja u ovoj oblasti, te i u rešavanju hemijskih problema. Ipak, današnje ANN imaju veoma malo zajedničkog sa prvobitnim biološkim neuronskim mrežama [90].

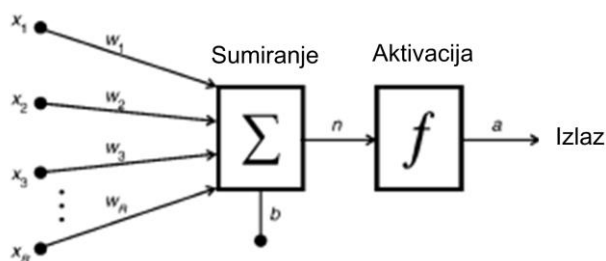
### **1.2.2. Osnovni pojmovi**

Veštačke neuronske mreže su biološki inspirisani kompjuterski modeli, sačinjeni od pojedinačnih jedinica koje predstavljaju veštačke neurone, povezanih koeficijentima (težinama) koji skupa čine neuronsku strukturu. Zovu se i procesni elementi (PE), jer procesuiraju (obrađuju) informaciju. Svaki PE ima ulaz opterećen težinom, prenosnu funkciju i izlaz. Težine predstavljaju memoriju sistema. Iako se mreže sastoje od značajno manje neurona u odnosu na ljudski mozak, one uspevaju da obrade ogromnu količinu podataka i predvide izlaz zadovoljavajuće tačno. Danas postoji veliki broj vrsta mreža, koje se definišu prema prenosnoj funkciji, pravilu učenja i načinu povezivanja neurona.

Tabele 3. Terminologija ANN [96]

| Pojam              | Objašnjenje  |
|--------------------|--|
| Arhitektura        | Broj slojeva u neuronskoj mreži, uključujući prenosnu funkciju u svakom sloju, broj neurona po slojevima i broj veza između neurona                                      |
| Prag okidanja      | Vrednost koju ukupni signal koji pristize u neuron mora prevazići da bi se neuron aktivirao  |
| Nerekurentna mreža | Mreža sastavljena od slojeva tako da svaki sloj prima signal samo iz prethodnog sloja  |
| Generalizacija     | Sposobnost mreže da predviđa vrednosti odgovora (izlaznih promenljivih) za vrednosti ulaznih promenljivih koje drugačijih od onih koje su učestvovala u treniranju mreže |
| Postupno smanjenje | Proces kojim se greška mreže dovodi do minimuma, pri čemu su promene težina i praga okidanja proporcionalne prvom izvodu greške mreže                                    |
| Sloj               | Grupa neurona koja prima signal od istih neurona i sprovodi signal do istih neurona.   |
| Algoritam učenja   | Procedura adaptacije mreže kojom se menjaju parametri tako da se dolazi do željenih (ciljanog) odgovora (vrednosti izlaznih promenljivih)                                |
| Bias               | Vrednost koja se dodaje (ili oduzima) sumi ulaza u neuron pod težinama. Ovim procesom se formira ukupan ulaz u neuron.   |
| Prenosna funkcija  | Funkcija koja transformiše izlaz iz neurona u stvarni izlaz  |
| Težina             | Snaga veze između dva neurona  |

Veštački neuron (Slika 1) je komponenta ANN koja simulira funkciju biološkog neurona. Signali koji stižu (ulazi) se množe težinama (podešavaju) i najpre sabiraju (kombinuju) a onda prolaze kroz prenosnu funkciju dajući izlaz iz neurona. Aktivaciona funkcija sumira ulaze u neuron pod težinama pre nego što prođu kroz prenosnu funkciju [91]. Neuroni se organizuju u slojeve (ulazni, izlazni sloj, bez ili sa određenim brojem skrivenih slojeva), što predstavlja topologiju (arhitekturu mreže). U Tabeli 3 su objašnjeni osnovni pojmovi koncepta veštačkih neuronskih mreža.



Slika 1. Veštački neuron. Ulazni signali pod težinama ( $w_1, w_2, w_3, \dots, w_R$ ) se sabiraju sa *bias*-om formirajući ukupan ulaz  $n$ , koji se obrađuje prenosnom funkcijom  $f$  i daje izlazni signal  $a$ .  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_R$  su pojedinačni ulazni signali [96]

### 1.2.3. Višeslojne nerekurentne mreže

Cilj nadgledanog učenja je da se predvidi jedna ili više ciljanih vrednosti na osnovu jedne ili više ulaznih promenljivih. Nadgledano učenje se oslanja na parove primera (ulaz-izlaz) iz trening seta. Pokazuju najbolje rezultate kada je cilj predviđanje ili klasifikacija. Višeslojne nerekurentne mreže (eng. *Multi-layer Feed-forward* ili *Multi-layer Perceptron*, MLP) se zbog najčešće primenjivanog trening algoritma takođe nazivaju i mreže povratnog prolaska greške (eng. *Back-Propagation Neural Networks*). To je najčešće korišćena vrsta mreža u analitičkoj hemiji, a i uopšte [90]. Predstavlja nadgledani, kompletno povezani tip mreže, koja se sastoji od ulaznog sloja kome, sem ulaznih neurona, pripada i uticaj biasa, izlaznog sloja i jednog ili više skrivenih slojeva neurona (Slika 2). Broj neurona u ulaznom i izlaznom sloju je, naravno, jednak broju promenljivih koje učestvuju u modelovanju. Broj neurona u skrivenom sloju (skrivenim slojevima) utiče na broj veza i stoga, ima veliki uticaj na uspešnost mreže. Postoje određene smernice kada je reč o broju neurona u skrivenom sloju: (i) 2 puta više od broja ulaznih neurona, (ii) 2/3 broja neurona u ulaznom sloju i (iii) 1/2 ukupnog broja neurona u ulaznom i izlaznom sloju. Ipak, pokazuje se u praksi da se ne treba oslanjati isključivo na smernice već da treba optimizovati topologiju mreže. Mreža sa premalo skrivenih neurona ne uspeva da završi process treninga, dok previše neurona u skrivenom sloju izaziva pretreniranost.



### 1.2.3.1. Prenos signala

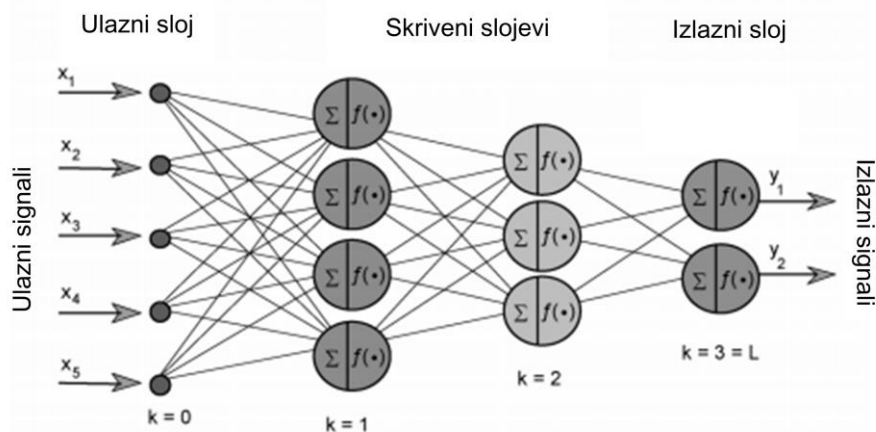
Neuron prima signale iz drugih neurona i spolja i šalje signale drugim neuronima ili spolja, preko veza. Svaki signal se opterećuje težinskim faktorom (težinom) koja je pridodata toj vezi. Primljeni signali pod težinama zajedno određuju ulaz u neuron. Ulaz u neuron ( $net_j$ ) se može prikazati jednačinom (2):

$$net_j = \sum_i w_{ij} o_i \quad (2)$$

gde  $i$  označava neurone u prethodnom sloju,  $w_{ij}$  je težina veze između neurona  $i$  i  $j$ , a  $o_i$  je izlaz iz neurona  $i$ . Aktivaciona funkcija daje ukupni ulaz u neuron (aktivnost neurona) koji se potom obrađuje prenosnom funkcijom. Postoji nekoliko tipova prenosnih funkcija: linearna, sigmoidalna (logistička), hiperbolička (tangenta, *tanh*) itd. Linearna se najčešće primenjuje samo u ulaznom sloju, dok je sigmoidalna najviše primenjivana transfer funkcija u ostalim slojevima MLP mreža (jednačina 3).

$$o_j = f(net_j) = \frac{1}{1 + e^{-net_j + \theta_j}} \quad (3)$$

gde je  $\theta$  bias, koji se može posmatrati kao težina na neuron  $j$  sa dodatnog neurona [90]. Svrha sigmoidalne funkcije je stvaranje nelinearnosti između ulaza i izlaza [96].



Slika 2. Grafički prikaz višeslojne nerekurentne mreže sa dva skrivena sloja, topologije 5-4-3-2 [96]

### 1.2.3.2. Treniranje mreže

Funkcionisanje neuronskih mreža zavisi od načina na koji se signal prenosi kroz mrežu. Treniranje ili učenje mreže se zapravo sastoji u podešavanju težina do optimalnog seta vrednosti. Stoga se težine na početku postavljaju kao slučajne, *random*, vrednosti. Težine se podešavaju putem nagledanog učenja. Tokom treninga, primeri parova ulaz-izlaz se prikazuju iznova mreži koja je na početku netrenirana. Svaki put kada se par prikaže mreži, izlaz koji predviđa mreža se poredi sa poznatom, željenom vrednošću izlaza, i na osnovu ove razlike (greške) mreža podešava težine u malim koracima. Ovo se ponavlja dok se greška ne smanji do zadovoljavajuće, ponekad unapred definisane vrednosti. Broj ovih ciklusa predstavlja broj epoha. Ova procedura treniranja se zove pravilo učenja ponovnog prolaska greške. Algoritam ponovnog prolaska greške pokušava da nađe minimalnu grešku u oblasti težina koristeći pristup postupnog smanjenja (eng. *Gradient Descent*). Greška ( $e$ ) se može predstaviti:

$$e = \frac{1}{2} \sum_j (d_j - o_j)^2 \quad (4)$$

gde je koeficijent  $\frac{1}{2}$  uključen isključivo iz matematičkih razloga,  $d_j$  i  $o_j$  su ciljani i stvarni izlaz. Prema pravilu ponovnog prolaska greške, najpre se podešavaju težine na izlaznom sloju, onda težine između skrivenih slojeva, i na kraju one koje učestvuju u prenosu signala između ulaznog sloja i prvog skrivenog sloja. Podešavanje (prilagođavanje) greške se može predstaviti jednačinom (5):

$$\Delta w_{ij} = \eta \delta_j o_j \quad (5)$$

gde je  $\Delta w_{ij}$  prilagođavanje težine veze od neurona  $i$  do neurona  $j$  u sledećem sloju,  $o_j$  je izlaz na neuronu  $j$ ,  $\eta$  je stopa učenja, dok je  $\delta_j$  parametar korekcije greške i zavisi od toga koji je sloj u pitanju. Za izlazni sloj parametar korekcije greške ( $\delta_j$ ) se može definisati kao:

$$\delta_j = (d_j - o_j) f'_j(\text{net}_j) \quad (6)$$

gde su  $d_j$  i  $o_j$  ciljani i stvarni izlaz za neuron  $j$ ,  $f'_j(net_j)$  prvi izvod prenosne funkcije  $f(net_j)$  koja figuriše u jednačini 3. Kada je u pitanju skriveni sloj, ova veličina se računa kao:

$$\delta_j = f'_j(net_j) \sum_k \delta_k w_{kj} \quad (7)$$

gde je  $k$  označava neurone u sledećem sloju.

Stopa učenja (eng. *Learning Rate*) predstavlja veličinu koraka u kojima algoritam menja težine. Stopa učenja je važan parameter jer u velikoj meri određuje napredak procedure treniranja. Ako se postavi niska vrednost, težine konvergiraju ka optimalnim uslovima tačno ali sporo, i postoji mogućnost da mreža ostane zaglavljena u lokalnom minimum. Ukoliko je, sa druge strane, postavljena visoka stopa učenja, sistem previše osciluje. Da bi se ovo oscilovanje ublažilo, uvodi se pojam momentuma,  $\alpha$ . Momentum sprečava da algoritam ostane zaglavljen u lokalnom minimumu, i daje stabilnost algoritmu. U tom slučaju je promena (prilagođavanje) težine:

$$\Delta w_{ij}(n+1) = \eta \delta_j o_j + \alpha \Delta w_{ij}(n) \quad (8)$$

Trening set mora sadržati dovoljno primera. Faza treniranja može trajati dugo, u zavisnosti od topologije mreže, broja primera u trening setu i broja ponavljanja [90].

Pored opisanog algoritma ponovnog prolaska, neki od algoritama učenja koji se manje koriste u treniranju MLP su algoritam konjugovanog postupnog smanjenja (eng. *Conjugate Gradient Descent*), *Levenberg-Marquart*, algoritam brzog prenosa (eng. *Quick Propagation*) itd.

### 1.2.3.3. Testiranje i procena kvaliteta mreže

Uspešnost mreže se najčešće procenjuje preko:

- kvadratnog korena srednje vrednosti sume kvadrata greške (eng. *Root Mean Square Error*, RMSE). Greška predstavlja razliku između eksperimentalno dobijenog odgovora i odgovora koga predviđa mreža.

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_{exp} - y_{pred})^2} \quad (9)$$

- koeficijenta determinacije između eksperimentalno dobijenog odgovora i odgovora koji koga predviđa mreža,  $R^2$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_{exp} - y_{pred})^2}{\sum(y_{exp} - \bar{y}_{exp})^2} \quad (10)$$

- grafikona slaganja eksperimentalno dobijenog odgovora i odgovora koga predviđa mreža. Poželjno je da se tačke na grafikonu nalaze što bliže pravoj sa jednačinom  $y = x$ .

Kao što je već rečeno, mreža bi trebalo da ima sposobnost generalizacije slučajeva, tj. predviđanja. Da bi se izbegla pretreniranost mreže, sposobnost predviđanja se testira nakon svakog ciklusa podešavanja težina (epohe) na odvojenom testu podataka (validacionom testu). Minimalna greška pri validaciji je kriterijum za zaustavljanje procesa treniranja kao i za izbor optimalne mreže. Ponovni rast ove greške, nakon dostizanja minimuma, je znak pretreniranosti mreže.

Nakon optimizacije, stvarna moć predviđanja istrenirane mreže se proverava na novom setu podataka (test ili eksterna validacija). Dva osnovna pristupa testiranju mreže su ukrštena validacija (eng. *Cross-Validation*) i nezavisna (eksterna) validacija, poznata i kao *Hold-out* validacija. Tri najznačajnija tipa ukrštene validacije su:

- „ostavi jedan van“ ukrštena validacija (eng. *Leave-One-Out Cross-Validation*, LOOCV)
- „ostavi više van“ ukrštena validacija (eng. *Leave-Many-Out Cross-Validation*, LMOCV)
- ukrštena validacija sa k-odeljaka (eng. *K-Fold Cross-Validation*)

U LOOCV pristupu, jedan primer (slučaj) iz trening seta ne učestvuje u treningu već se ostavlja za testiranje mreže. Ovo se ponavlja sa svakim pojedinačnim slučajem iz trening seta, nakon čega se računaju RMSE i  $R^2$  radi procene sposobnosti predviđanja mreže. LMOCV se zasniva na istom principu kao LOOCV s tim što se više od jednog slučaja iz treninga odvaja za test. Ovo je vremenski najzahtevniji tip ukrštene validacije jer je broj slučajeva u test setu jednak  $C_p^n$ , gde je n ukupan broj slučajeva u trening setu, a p odabran broj

između 1 i n. *K-fold* validacija podrazumeva podelu trening seta na k particija, gde u svakom ciklusu sledeća particija postaje test set, te ima k ciklusa. K je najčešće 3. Nezavisna (eksterna), *Hold-out* validacija podrazumeva primenu odvojenog seta podataka koji se koristi kao test set, i koji uopšte nije učestvovao u modelovanju mreže. Koeficijent determinacije ukrštene validacije se najčešće obeležava sa Q, te slično jednačini (10) računa po jednačini:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum(y_{exp} - y_{LOO})^2}{\sum(y_{exp} - \bar{y}_{exp})^2} \quad (11)$$

gde je  $y_{LOO}$  odgovor koji predviđa mreža [97].

Treba naglasiti da se u literaturi sreće različita terminologija za pomenute setove podataka. Trening set se ponekad zove modeling set. Validacija se naziva i verifikacija. Test i validacioni set nekada označavaju obrnute pojmove. Stoga je bitno napomenuti da je jedan set podataka korišćen za fino „tjuniranje“ mreže pri optimizaciji, dok se drugi, koji nije učestvovao u optimizaciji mreže, koristi za procenu sposobnosti generalizacije (predviđanja) od strane mreže.

Ne postoji generalno najbolji pristup za validaciju mreže [98]. Ukrštena validacija je neophodna ukoliko ne postoji dovoljno podataka da bi se trening i test set potpuno odvojili u startu, tj. da bi se primenila eksterna validacija. LMOCV je pouzdanija od LOOCV ali zahteva puno više vremena.

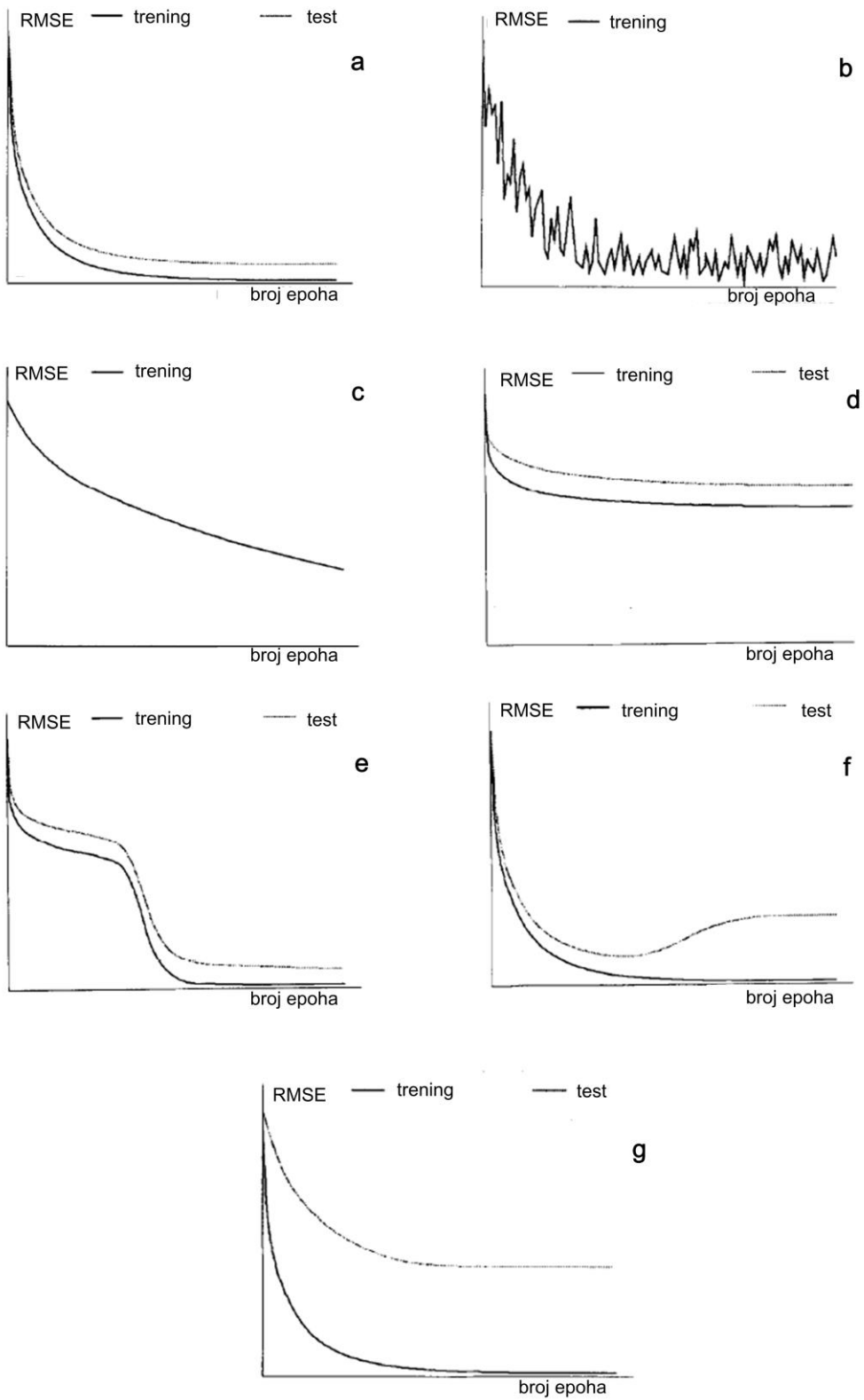
#### 1.2.3.4. Primeri i problemi pri treniranju mreže

Kao što je već rečeno parametar koji se prati i koji predstavlja kriterijum za završetak treninga i izbor optimalne mreže je greška u validacijom setu, najčešće u obliku RMSE. Naravno, RMSE nije uvek najbolji indikator sposobnosti mreže. U slučaju kada postoji *outlier*, RMSE je visok zbog greške koja potiče od *outlier*-a generalno greška nije velika.

U nastavku teksta biće predstavljeno nekoliko tipičnih situacija pri optimizaciji mreža, gde je RMSE osnovni indikator uspešnosti mreže. Primeri se zasnivaju samo na promenama u topologiji mreže i postavci parametara, dok je podela podataka na setove fiksna.

Uspešno treniranje mreže je prikazano na Slici 3a – RMSE konvergira ka minimumu i za trening i za test set. Na Slici 3b prikazana je situacija kada je stopa učenja ( $\eta$ ) previsoka. RMSE za trening konvergira ali sa velikim oscilacijama, te uspešnost mreže puno zavisi od momenta završetka treninga jer mreža „šeta“ oko minimuma. Ako je, sa druge strane,  $\eta$  preniska, mreži je potrebno mnogo epoha da bi konvergirala do minimuma u RMSE, što zahteva previše vremena (Slika 3c). Takođe, niska  $\eta$  povećava mogućnost da mreža ostane zaglavljena u lokalnom minimumu. Na Slici 3d je tipičan izgled kretanja RMSE kada mreža upadne u lokalni minimum. Potencijalno rešenje su niže početne vrednosti težina i/ili druga vrsta skale za ulazne promenljive. Ponekad je jedino rešenje promeniti algoritam treniranja, mada svi postojeći algoritmi nose ovaj rizik. Da bi se ovaj problem sprečio, savetuju se povećanje  $\eta$  ili započinjanje treninga više puta sa različitim početnim težinama. Proces treninga u kom mreža uspeva da pobegne iz lokalnog minimuma je prikazana na Slici 3e. Preveliki broj epoha ili neurona u skrivenom sloju može da dovede do pretereniranosti mreže, objašnjene ranije (Slika 3f). Do pretereniranosti mreže može doći i zbog premalo primera u trening setu.

Situacija slična pretereniranosti prikazana je na Slici 3g. Ovde postoji velika razlika u RMSE između treninga i testa. Ova razlika ukazuje na to da postoji drugačija veza ulaz-izlaz u treningu u odnosu na test. Ovo se može desiti i kada test set sadrži više *outlier*-a, te onda podatke treba drugačije podeliti. Drugi razlog može biti nedovoljno podataka, te je poželjno primeniti LOOCV ili LMOCV metodu testiranja. Takođe, do ove pojave dolazi kada ima previše ulaznih varijabli, naročito ako istovremeno ima premalo neurona u skrivenom sloju [90].



Slika 3. Karakteristični tokovi kretanja greške treninga i testa [90]

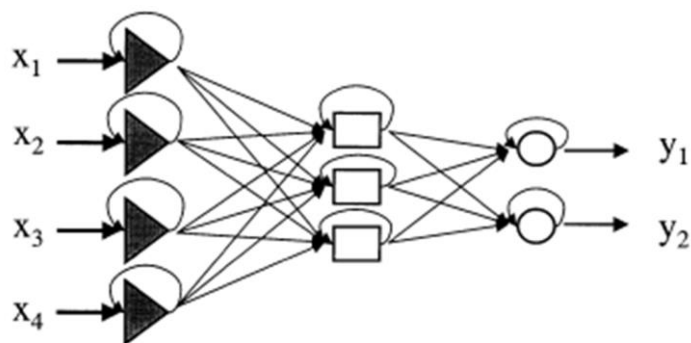
#### 1.2.4. Ostali tipovi ANN

Postoji veliki broj vrsta mreža koje se razlikuju prema algoritmu, tipu učenja, organizaciji slojeva itd. Ovde su navedene vrste mreža, najznačajnije posle MLP.

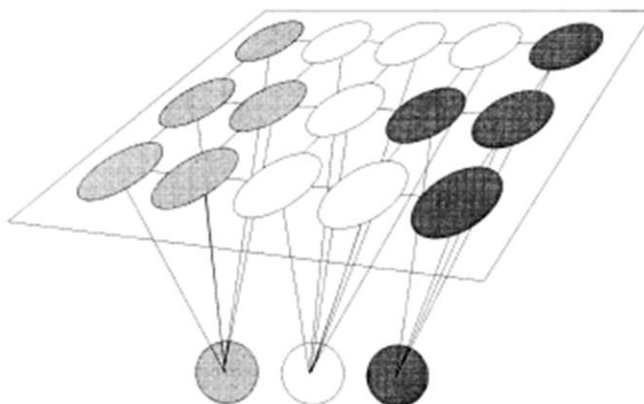
Rekurentne (povratne) mreže (eng. *Feedback Neural Networks*) razlikuju se od pomenutih nerekurentnih po tome što se izlazni signal iz jednog sloja vraća u prethodni sloj ili u isti. Svaki neuron ima dodatnu težinu kao ulaz, što daje dodatni stepen slobode pri traženju minimalne greške tokom treninga. Ovakve mreže pamte stanje u prethodnoj epohi, tako da sledeće stanje ne zavisi samo od ulaznih signala, već i od prethodnih stanja mreže [90]. Uveo ih je *John Hopfield* 1983. godine, te se zovu i *Hopfield-ove* mreže [99]. Na Slici 4 prikazana je šematski jedna rekurentna mreža.

Postoje dva pristupa treniranju mreže: nadgledano (već objašnjeno) i nenadgledano treniranje. Pri nenadgledanom treniranju mreža “vidi” ulazne, ali ne i izlazne podatke. Sistem potom odlučuje koje karakteristike uzima kako bi organizovao ulazne podatke. Stoga se one zovu samoorganizujuće mape ili Kohonen mreže (Slika 5). Ovo samoorganizovanje podrazumeva kompeticiju, kooperaciju između neurona, ili oba. Neuron se organizuju u grupe slojeva. Kompetitivno učenje podrazumeva da, kada jedan neuron jače reaguje na neki ulazni signal, on suprimira ili inhibira izlazne signale iz drugih neurona iz iste grupe. U kooperativnom učenju, neuroni udruženo pojačavaju izlazni signal u okviru jedne grupe. Cilj nenadgledanih mreže koje služe za pronalaženje odnosa unutar kompleksnih setova podataka i konstruisanje varijabli koje nose karakteristike na osnovu kojih se mogu predvideti ulazne i izlazne promenljive. One su zapravo nelinearni pandan PCA. Koriste se kao alternativa klasičnoj PCA, radi smanjenja broja ulaznih promenljivih [91].





Slika 4. Grafički prikaz rekurentne mreže sa topologijom 4-3-2 [91].



Slika 5. Kohonen mreža ili samoorganizujuća mapa sa nenadgledanim treniranjem [91].

### 1.2.5. Prednosti i nedostaci ANN

ANN imaju mnogo prednosti u svojoj sposobnosti da izvedu zaključke iz velikih i kompleksnih setova podataka. Prvo, one se ne oslanjaju na podatke koji su normalno distribuirani, što je pretpostavka klasičnih metoda parametarske analize. One mogu da obrade podatke koji sadrže kompleksne i nelinearne odnose i interakcije koje su često previše kompleksne da bi se interpretirale klasičnim linearnim metodama. Sledeća prednost je u tome što su tolerantne na greške, tj. na šum i *fuzzy* informacije, a takođe obrađuju i nepotpune setove podataka. Imaju sposobnost generalizacije (kao i druge metode mašinskog učenja), tj. interpretiranja informacija koje su drugačije od onih kojim su mreže trenirane, tako da mogu da predvide buduće slučajeve ili trendove na osnovu ulaznih podataka koje nisu obrađivale

u toku treniranja. ANN se mogu koristiti za klasifikaciju nepoznatog slučaja, što ima primenu u dijagnostici.

Poput svih drugih pristupa, i ANN imaju svojih ograničenja. Treniranje može trajati dugo, u zavisnosti od kompleksnosti podataka, kao i topologije mreže – veći broj skrivenih slojeva zahteva duže treniranje mreže. Stoga se najčešće sreću mreže sa jednim ili dva skrivena sloja. Sledeći veliki problem je pretreniranost mreže, pri kojoj mreža pamti slučajeve iz faze treniranja, tako da slabo predviđa buduće slučajeve. Jedna od glavnih prepreka koje istraživači vezuju za ANN je to što nije jasno definisano kako se dolazi do rešenja, te se zbog ovog za ANN kaže da predstavljaju “crne kutije”. Na kraju, ANN ne uspevaju da razlikuju “pozadinski šum”, tj. ne razlikuju nekvalitetne podatke i podatke koji odudaraju više od ostalih (*outlier-e*). Da bi se ovo prevazišlo, poželjno je primeniti neku od pred-procesnih tehnika [100]. Dakle, ANN su najefikasnije kada postoji nelinearna zavisnost između ispitivanih promenljivih, pri čemu nije neophodno preliminarno znanje o matematičkom obliku odnosa između promenljivih [101].

#### **1.2.6. Primena ANN u farmaceutskim istraživanjima**

Primena ANN metodologije u farmaceutskim naukama je široka i obuhvata primenu u:

- modelovanju u farmaceutskoj analizi i kontroli kvaliteta lekova i interpretaciji analitičkih podataka
- dizajnu lekova (QSAR i molekulsko modelovanje)  
razvoju formulacije i dizajnu farmaceutskih oblika (optimizacija procesa proizvodnje)
- kliničkoj farmaciji (farmakokinetičko i farmakodinamsko modelovanje, *in vitro/in vivo* korelisanje)

ANN su korišćene u predviđanju odgovora različitih analitičkih tehnika, npr. difraktometrije x-zraka radi razlikovanja kristalnih formi u prahu ranitidin-hidrohlorida [102], IR spektrometrije radi standardizacije spektrometara u različitim laboratorijama [103], FT-IR spektroskopije radi analize prirodnih proizvoda roda *Fusarium* [104], kvantitativne TLC radi analize fenilpropanoide u preparatima *Echinacea* [105] itd.

Dizajn lekova zasnovan na strukturi je bolji od tradicionalnih pristupa – čuva vreme i novac. Jedan od ciljeva kompjuterske hemije je razvoj kvantitativnih modela koji mogu brzo i tačno predvideti aktivnost novosintetisanih jedinjenja. ANN se intenzivno primenjuju u QSAR studijama. Neki od primera su: modelovanje aktivnosti 101 analoga kapsaicina izražene kroz EC50 vrednost primenom mreže trenirane parametrima izvedenim od različitih molekulskih deskriptora [106], predviđanje antitumorske aktivnosti serije derivata akridinona [107] ili predviđanje antimikrobne aktivnosti fluorohinolonskih derivata [108]. Razvoj farmaceutskog proizvoda je takođe multifaktorski problem – uključuje optimizaciju formulacije i procesnih parametara. S obzirom da ANN pokazuju najbolje rezultate sa kompleksnim, nelinearnim odnosima, te su često pogodnije za optimizaciju, odnosno pokazuju se robusnijim od jednačina drugog reda koje se najčešće dobijaju kao rezultat modelovanja primenom polinomijalne regresione analize [109, 110]. Jednom trenirana, mreža može da predvidi izlazne promenljive na novim setovima podataka [91]. ANN se pokazuju kao veoma korisna tehnika optimizaciji različitih farmaceutskih doziranih oblika pri čemu se određena osobina od značaja predviđa kao izlazna promenljiva dok su ulazne promenljive parametri sastava formulacije ili procesa proizvodnje. Neki od primera primene ANN u farmaceutskoj tehnologiji su: optimizacija sastava ili dizajna tableta sa trenutnim ili produženim oslobađanjem praćenjem uticaja ekscipijenasa i pritiska kompresije na brzinu rastvaranja (*dissolution*) [111, 112].

Farmakokinetika je još jedna farmaceutska nauka koja koristi prednosti ANN u predviđanju farmakokinetičkih parametara: volumena distribucije, klirensa ili procenta leka vezanog za proteine plazme na osnovu demografskih parametara i režima doziranja [113], farmakokinetičkih parametara kod životinja [114] ili osobina lekova izraženih preko molekulskih deskriptora [115].

ANN se koriste u studijama bioekvivalencije radi predviđanja *in vivo-in vitro* (IVIVC) korelacija [116, 117].

### 1.2.6.1 Primena ANN u ispitivanju retencionog ponašanja analitâ u HPLC sistemima

Predviđanje hromatografskog ponašanja na osnovu molekulske strukture je osnovni cilj QSRR koncepta. ANN predstavljaju tehniku koja omogućava da se pronađu molekulski parametri koji utiču na RP retenciono vreme i da se predvidi retencija kao funkcija promena u instrumentalnim uslovima (pH mobilne faze, sastav mobilne faze...) zajedno sa molekulskim deskriptorima analita. Predviđanje retencionog vremena, odnosno retencionog faktora ima primenu pre svega u:

- predviđanju retencionog ponašanja „novog analita“. Ovaj analit ima poznatu strukturu što omogućava određivanje njegovih molekulskih deskriptora i slične fizičko-hemijske osobine kao analiti koji su učestvovali u formiranju modela, tako da se njegovi molekulski deskriptori nalaze unutar prostora podataka (eng. *Data Space*) tj. granica koje formiraju molekulski deskriptori analita koji učestvuju u formiranju modela. „Novi analiti“ mogu biti analiti API iz iste farmakološke i/ili hemijske grupe, nečistoće, degradacioni proizvodi ili metaboliti.
- predviđanju retencionog ponašanja pri različitim hromatografskim uslovima: sastavu mobilne faze (udeo organskog rastvarača, koncentracija modifikatora mobilne faze, pH mobilne faze itd.), temperature i/ili protoka mobilne faze. Ovo je suština optimizacije metode, kada se unapred postavljaju uslovi koje treba ispuniti a koji su najčešće: neophodna minimalna retencija analita koji se najslabije zadržava na stacionarnoj fazi, što kraće trajanje hromatografske analize (rana), tj. što manje retenciono vreme analita koje se najjače vezuje za stacionarnu fazu, i zadovoljavajuća separacija (rezolucija) analita prisutnih u uzorku.

Sem retencionog vremena, odnosno retencionog faktora, ANN se mogu primeniti i za predviđanje čistoće pika, odnosno analizu pikova koji se preklapaju [118, 119].

Prema tome, arhitektura neuronske mreže postavlja se na osnovu ciljeva istraživanja: ulazne promenljive su molekulski deskriptori i/ili hromatografski uslovi koji se variraju, dok su izlazne promenljive odgovori koji se prate (retenciono vreme, retencioni faktor, faktor selektivnosti, faktor rezolucije itd) i može ih biti jedan ili više.

Tehnike mapiranja retencije se koriste kako bi se pronašli optimalni uslovi [120]. Mapiranje retencije je osmišljeno tako da kompletno opiše “mapu” hromatografskog ponašanja analita u prostoru eksperimentalnog dizajna preko površine odgovora (eng. *Response Surface*), koja pokazuje odnos između odgovora (npr. retencionog faktora analita) i ulaznih promenljivih. Ovako se može odabrati optimalan odgovor, umesto da se nasumično variraju eksperimentalni uslovi [121]. Trodimenzionalno mapiranje odgovora naziva se i metodologija površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology*, RSM).

#### 1.2.6.2. Primena ANN u ispitivanju retencionog ponašanja analitâ u HPLC sistemima sa gradijentnim eluiranjem

Nedostaci izokratskog eluiranja su slaba rezolucija pikova supstanci koje se rano eluiraju, pojava širokih pikova supstanci koje se duže zadržavaju na koloni, što nekad može otežati detekciju i kvantifikaciju, pojava *tailing*-a pikova i nepotrebno dugo vreme trajanja rana. Ovi nedostaci se mogu prevazići gradijentnim eluiranjem, drugim rečima, promenom eluacione jačine eluenta u toku trajanja analitičkog rana. Da bi se pronašli pogodni uslovi gradijenta, najčešće se primenjuje sistem pokušaja i pogreške, koji je često neefikasan. Stoga se sve više koriste strategije koje uključuju računare .

U literaturi se može naći priličan broj objavljenih članaka u kojima su ANN upotrebljene kao računarska (matematička) tehnika za predviđanje retencionog ponašanja u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem, na osnovu fizičko-hemijskih osobina izraženih preko molekulskih deskriptora [31, 43-46, 48, 122, 123]. Ova metodologija ne može da se koristi za predviđanje retencije analita pri različitim hromatografskim uslovima. Drugi pristup predstavlja istovremeno uključivanje molekulskih deskriptora i parametara gradijenta ali bez razdvajanja analita kao cilja [41, 42, 123]. Nekoliko objavljenih članaka opisuje metode u kojima su primenjene ANN u cilju optimizacije razdvajanja analita u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem, ali bez uzimanja u obzir osobina analita [124-126]. Nedostatak informacija o strukturama bi mogao biti razlog zbog koga nije postignuto kompletno razdvajanje analita u članku koji je objavljen od strane *Webb*-a i saradnika [125]. Sem toga, ovim pristupom ne može da se predvidi retenciono ponašanje „novog“ analita slične

strukture. Na kraju, ovim pristupom se ne dobijaju informacije o vezi između molekulskih deskriptora i retencionog ponašanja.

### 1.3. Studije forsirane degradacije i razvoj *stability-indicating* metode

Studije forsirane degradacije (stres) studije predstavljaju proces koji uključuje degradaciju farmaceutskog doziranog oblika ili aktivne farmaceutske supstance (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) pri uslovima koji su mnogo drastičniji od onih pri ubrzanim studijama stabilnosti i ima za cilj određivanje stabilnosti molekula. Prema smernicama Međunarodne konferencije za harmonizaciju (eng. *International Conference on Harmonisation – ICH*) [127], studije forsirane degradacije služe za identifikaciju potencijalnih degradacionih proizvoda, određivanje unutrašnje (intrinzičke) stabilnosti molekula, utvrđivanje degradacionih puteva, kao i validaciju analitičke metode za praćenje stabilnosti – *stability indicating* metode. Pitanje koliko degradacije je dovoljno, je predmet diskusije među farmaceutskim naučnicima. Degradacija između 5 i 20 % je najšire prihvaćena kao optimalna. Degradacija preko 20 % može dovesti do formiranja sekundarnih degradacionih proizvoda, što se ne očekuje u realnim uslovima stajanja API ili farmaceutskog doziranog oblika. Sa druge strane, previše blagi uslovi studija forsirane degradacije mogu dovesti do toga da ne nastanu važni degradacioni proizvodi. Stres uslovi su takvi da dovode do kisele i bazne hidrolize, termalne degradacije, fotolize i oksidacije [128].

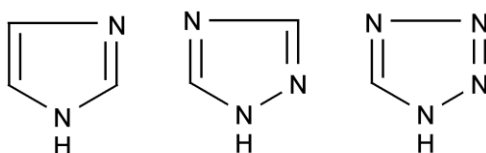
*Stability-indicating* metoda je analitička procedura koja služi za kvantifikaciju smanjenja količine API u farmaceutskom doziranom obliku usled degradacije. *Stability-indicating* metodom se tačno mere promene u koncentraciji API u prisustvu degradacionih proizvoda, te stress studije služe da potvrde specifičnost razvijene metode. RP-HPLC metoda sa UV detektorom je najčešće primenjivana tehnika *stability-indicating* metode. Za identifikaciju i karakterizaciju degradacionih proizvoda se u toku razvoja metode primenjuju različite tehnike među kojima su najvažnije LC-MS, LC-MS/MS i LC-NMR [128].

U literaturi se može naći svega nekoliko članaka u kojima je primenjen QSRR-ANN koncept za predviđanje retencije API u prisustvu nečistoća [129], odnosno ANN za razvoj *stability-indicating* metode ali bez uzimanja u obzir strukture analita [130, 131]. Nisu

pronađeni literaturni podaci o primeni QSRR-ANN modela za ispitivanje i predviđanje retencionog ponašanja aktivne farmaceutske supstance i degradacionih proizvoda koji nastaju tokom studija forsirane degradacije u cilju razvoja *stability-indicating* metode.

#### 1.4. Model supstance – odabrani predstavnici iz grupe azola i sartana

Model supstance koje su odabrane za ispitivanje u svojoj strukturi imaju heterociklične poliazole – imidazol, 1,2,4-triazol ili tetrazol (Slika 6). Jedinjenja sa ovim funkcionalnim grupama imaju široku primenu u farmaciji i pripadaju različitim farmakološkim grupama.



Slika 6. Imidazol (a), 1,2,4-triazol (b) i tetrazol (c)

Imidazolnu funkcionalnu grupu imaju antimikotici azoli (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol), antiparazitici (metronidazol, albendazol, tinidazol), antihipertenzivi – agonisti  $\alpha_2$  receptora (klonidin, moksonidin), vazokonstriktori (nafazolin, tetrazolin), blokatori protonske pumpe (lanzoprazol, omeprazol) i antihipertenzivi – antagonisti angiotenzin II receptora (losartan, eprosartan).

Triazolnu funkcionalnu grupu imaju antimikotici azoli (flukonazol, vorikonazol), antineoplastici (letrozol, vorozol), antidepresivi (trazodon), hipnotici (alprazolam, ketazolam), antivirolici (ribavirin). U fazi ispitivanja su nosintetisana jedinjenja sa triazolnom grupom koji pokazuju različito farmakološko dejstvo: antibakterijsko, antiparazitsko, antikonvulzantno itd [132].

Najznačajniji lekovi sa tetrazolnom funkcionalnom grupom su antihipertenzivi – antagonisti angiotenzin II receptora - sartani (losartan, valsartan) i cefalosporinski antibiotici (cefamandol, cefoperazon). Nosintetisana jedinjenja sa tetrazolnom strukturom imaju antiviralni, antiinflamatorni, antiulkusni potencijal itd. [133].

### 1.4.1. Azoli

#### 1.4.1.1. Fizičko-hemijske osobine azola

Na Slikama 7 i 8 prikazane su strukturne formule i nazivi po IUPAC imena najznačajnijih imidazolnih i triazolnih antimikotika azola koji se primenjuju u terapiji. To su supstance u obliku belog ili beličastog praška, slabo ili nerastovne u vodi, a umereno do dobro rastvorne u metanolu i acetonitrilu. U Tabeli 4 su navedene log P i pKa vrednosti azola dobijeni korišćenjem softvera *MarvinSketch* 14.12.15., *ChemAxon Ltd.* (Budimpešta, Mađarska). Imidazolni azoli su baze, sa imidazolom kao baznim centrom i baznim pKa oko 6,7. Triazolni azoli su veoma slabe baze sa baznim pKa oko 2-2,5. Izuzetak su itrakonazol, posakonazol i terkonazol koji imaju nešto bazniji pirazin u strukturi, te više pKa vrednosti.

#### 1.4.1.2. Mehanizam dejstva azola

Fungicidno dejstvo azoli ostvaruju oštećenjem ćelijske membrane, eliminacijom esencijalnih ćelijskih komponenata, kao što su joni kalijuma i aminokiseline. Fungistatski efekat azola u niskim koncentracijama povezan je sa inhibicijom membranskih proteina. Lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaza je enzim iz grupe citohrom P-450, i ciljno mesto dejstva azola. P-450 ima hem u okviru svoje strukture. Bazni elektronski parovi na azolnim prstenovima okupiraju vezno mesto na P-450, blokirajući fleksibilnost enzima. Funkcija lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaze je oksidativna demetilacija lanosterola za vreme biosinteze. Na ovaj način se destabilizuje membrana gljivica.

Lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaza učestvuje u biosintezi holesterola kod sisara, tako da azoli inhibiraju sintezu holesterola. Ipak, potrebne su veće koncentracije leka da bi se inhibirao enzim kod sisara, na čemu se zasniva selektivnost azola. Triazoli pokazuju manju incidencu endokrinih efekata i hepatotoksičnosti u odnosu na imidazole zbog manjeg afiniteta za citohrom P-450 sisara [134].

#### 1.4.1.3. Veza strukture i aktivnosti azola

Fungicidne osobine azola otkrivene su 1944. Hlormidazol je prvo jedinjenje koje se pojavilo na tržištu i koje je korišćeno u medicinskoj praksi od 1958. Zajedničko u strukturi



ove grupe lekova je slaba baza – imidazol ili 1,2,4-triazol (pKa 6,5 do 6,8), vezan N-C vezom sa ostatkom strukture. Smatra se da se na molekulskom nivou N-3 imidazola, odnosno N-4 triazola vezuju za gvožđe hema u citohromu P-450, inhibirajući oksidaciju steroidnih supstrata enzima. Najpotentniji azoli antimikotici imaju dva ili tri aromatična prstena, od kojih je najmanje jedan susptituisan halogenom (npr. 2,4-dihlorofenil, 4-hlorofenil ili 2,4-difluorofenil) i nepolarni deo. Samo supstitucija na položajima 2 i/ili 4 omogućava aktivnost. Halogen koji daje najveću potentnost je fluor, kao i sulfonska kiselina kao funkcionalna grupa. Supstitucija na drugim mestima na prstenu dovodi do gubitka aktivnosti. Veliki, nepolarni deo molekula azola imitira nepolarni steroidni deo lanosterola. Upravo ovom nepolarnom delu u strukturi azoli duguju svoju lipofilnost. Uglavnom su nerastvorni u vodi, a rastvorni u većini organskih rastvarača. Flukonazol je izuzetak, poseduje dve polarne triazolne grupe, te se formuliše kao intravenska injekcija u obliku slobodne baze [134].

Prvoj generaciji imidazola pripadaju klotrimazol, mikonazol i ekonazol. Mikonazol se nešto bolje resorbuje u gastro-intestinalnom traktu. On se jako vezuje za lipoproteine, tako da samo oko 20-30 % doze dolazi u sistemsku cirkulaciju, te je efektivna koncentracija značajno smanjena. Sem toga, imidazolni prsten je veoma podložan metaboličkoj deaktivaciji. Istraživanja imidazolnih derivata tekla su u smeru poboljšanja aktivnosti i širenja spektra dejstva, te je razvijen ketokonazol. Testirani su svi heterociklusi, i samo je 1,2,4-triazolni ciklus pokazao metaboličku stabilnost. U poređenju sa imidazolima, triazoli pokazuju manju aktivnost *in vitro*, ali veću aktivnost *in vivo* [135].

Prvoj generaciji triazola pripadaju flukonazol i itrakonazol. Flukonazol ima dobru aktivnost na *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*. Ipak, postoji rezistencija na ne-*albicans* vrste kao što su *C. Krusei* i *C. Glabrata*. Primenjuje se oralno i intravenski. Itrakonazol ima bolju aktivnost prema kvasnicama i plesnima (*Aspergillus*), ali su nedostaci promenljiva raspoloživost i neprijatan ukus. Bioraspoloživost kapsula veoma zavisi od hrane koja se unosi, i postoji velika inter- i intraindividualna razlika u biološkoj raspoloživosti. Farmakokinetički profil je puno povoljniji u obliku rastvora. Vorikonazol i posakonazol predstavljaju drugu generaciju triazola sa širim spektrom dejstva prema kvasnicama i plesnima. Posakonazol je azol sa najširim spektrom, jedini je aktivan prema zigomicetama.

Resorpcija se pospešuje kad se uzima sa određenim namirnicama ili dijetetskim suplementima. Najnoviji triazolni antimikotici koji su još uvek u fazi ispitivanja su ravukonazol, izavukonazol i albakonazol [135].

#### 1.4.1.4. Analitika azola

U Ph. Eur 8 oficinalni su sledeći azoli: bifonazol, mikonazol, ekonazol, klotrimazol, ketokonazol, fentikonazol (u obliku nitrata), flutrimazole, izokonazol, sertakonazol (u obliku nitrata), terkonazol, tiokonazol, flukonazole, i vorikonazol. Za određivanje sadržaja u API, farmakopeja za sve oficinalne azole, osim vorikonazola, propisuje metodu titracije sa potencijometrijskim određivanjem završne tačke titracije i perhlornom kiselinom kao titrantom.

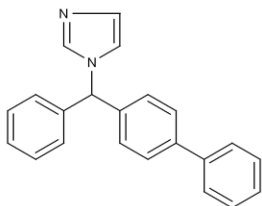
Tabela 4. Log P i pKa vrednosti azola

| Supstanca      | log P | pKa1 (bazni) | pKa2 (bazni) | pKa3 (kiseli) |
|----------------|-------|--------------|--------------|---------------|
| Bifonazol      | 5,23  | 6,69         |              |               |
| Ekonazol       | 5,35  | 6,77         |              |               |
| Flutrimazol    | 5,52  | 6,62         |              |               |
| Fentilikonazol | 6,94  | 6,77         |              |               |
| Izokonazol     | 5,96  | 6,77         |              |               |
| Ketokonazol    | 4,19  | 3,96         | 6,77         |               |
| Klotrimazol    | 5,84  | 6,62         |              |               |
| Mikonazol      | 5,96  | 6,77         |              |               |
| Tiokonazol     | 5,3   | 6,77         |              |               |
| Sertakonazol   | 6,23  | 6,77         |              |               |
| Albakonazol    | 2,82  | 1,64         | 2,38         | 12,61         |
| Flukonazol     | 0,56  | 1,96         | 2,56         | 12,71         |
| Itrakonazol    | 7,31  | 2,23         | 3,92         |               |
| Posakonazol    | 5,41  | 2,25         | 3,93         | 14,83         |
| Ravukonazol    | 4,14  | 1,83         | 2,46         |               |
| Izavukonazol   | 4,14  | 1,83         | 2,46         | 12,61         |
| Vorikonazol    | 1,82  | 0,43         | 2,27         | 12,71         |
| Terkonazol     | 5,37  | 2,24         | 8,41         |               |

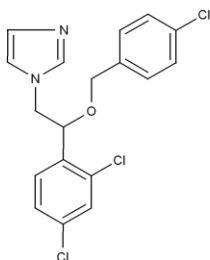
Srodne supstance svih oficinalnih azola i sadržaj vorikonazola u API određuju se HPLC metodom. Najvažniji hromatografski parametri su prikazani u Tabeli 5.

U literaturi se mogu naći različite metode za određivanje azola iz bioloških uzoraka ili farmaceutskih doziranih oblika. Razvijene su i opisane elektrohemijske metode kao i HPLC metode sa elektrohemijskim detektorom [136-139], voltametrijske i polarografske [140-142] i spektrofotometrijske metode [143, 144] za određivanje azola, pojedinačno, ili u smeši.

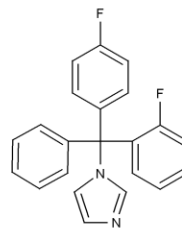
Tankoslojna hromatografija (eng. *Thin Layer Chromatography*, TLC) i tankoslojna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC) se relativno manje koristi u analitici azola, pre svega za određivanje azola u smeši, ili u prisustvu srodnih supstanci. Stacionarna faza je u najvećem broju slučajeva silika gel 60. Mobilna faza je smeša nekoliko rastvarača različite polarnosti, zavisno od cilja metode i sastojaka smeše. Rastvarači koji ulaze u sastav mobilne faze su: heksan, etil-acetat, metanol, voda, glacijalna sirćetna kiselina, hloroform, toluen, etilen hlorid, amonijak, 1-butanol, aceton, propanol [145-148]. U literaturi se može naći izvestan broj metoda određivanja gasnom hromatografijom, i to bez prethodne derivatizacije [149, 150]. Kao četvrta najznačajnija hromatografska metoda u analitici azola pojavljuje se superkritična fluidna hromatografija (eng. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) [151, 152].



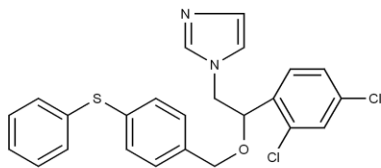
**Bifonazol**  
1-[(RS)-(bifenil-4-il)fenilmetil]-1H-imidazol



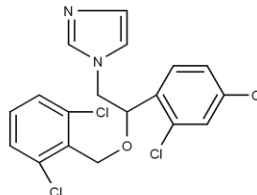
**Ekonazol**  
1-[(2RS)-2-[(4-hlorobenzil)oksi]-2-(2,4-dihlorofenil)etil]-1H-imidazol



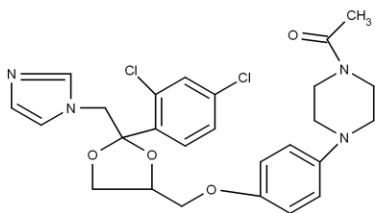
**Flutrimazol**  
(RS)-1-[(2-fluorofenil)(4-fluorofenil)fenilmetil]-1H-imidazol



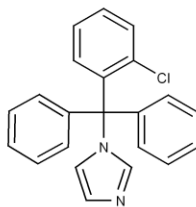
**Fentikonazol**  
1-[(2RS)-2-(2,4-dihlorofenil)-2-[[4-(fenilsulfanil)benzil]oksi]etil]-1H-imidazol



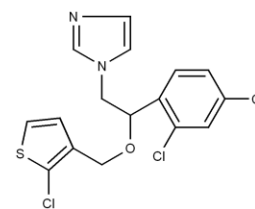
**Izokonazol**  
1-[(2RS)-2-[(2,6-dihlorobenzil)oksi]-2-(2,4-dihlorofenil)-etil]-1H-imidazol



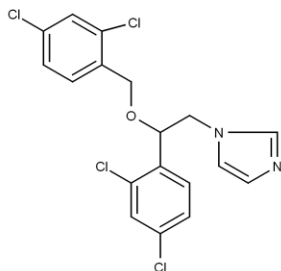
**Ketokonazol**  
1-acetil-4-[4-[[[(2RS,4SR)-2-(2,4-dihlorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)1,3-dioksolan-4-il]metoksi]fenil]piperazin



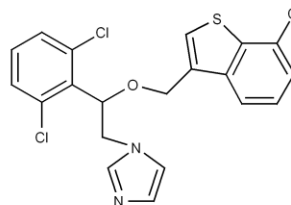
**Klotrimazol**  
1-[(2-hlorofenil)difenilmetil]-1H-imidazol



**Tiokonazol**  
1-[(2RS)-2-[(2-hlorotiofen-3-il)metoksi]-2-(2,4-dihlorofenil)etil]-1H-imidazol

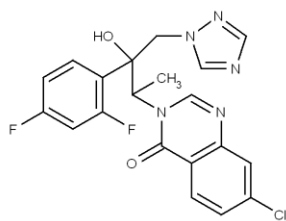


**Mikonazol**  
1-[(2RS)-2-[(2,4-dihlorobenzil)oksi]-2-(2,4-dihlorofenil)-etil]-1H-imidazol



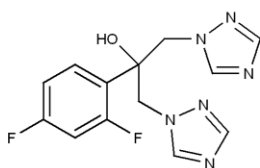
**Sertakonazol**  
(RS)-1-[2-[(7-hloro-1-benzotiofen-3-il)metoksi]-2-(2,4-dihlorofenil)etil]-1H-imidazol nitrat

Slika 7. Strukture i IUPAC imena najvažnijih imidazolnih azola



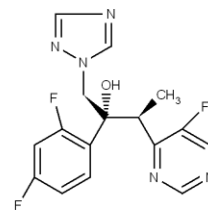
**Albakonazol**

7-hloro-3-[(2R,3R)-3-(2,4-difluorofenil)-3-hidroksi-4-(1,2,4-triazol-1-il)butan-2-il]hinazolin-4-on



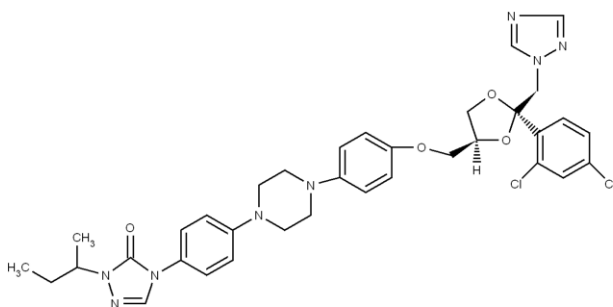
**Flukonazol**

2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol



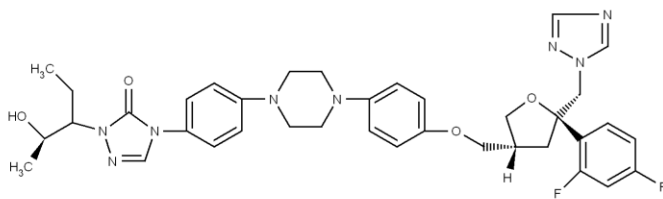
**Vorikonazol**

(2R,3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoropirimidin-4-il)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol



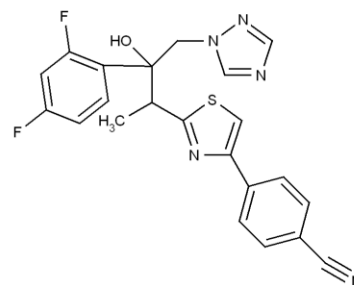
**Itrakonazol**

4-[4-[4-[[[cis-2-(2,4-dihlorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioksolan-4-il]metoksi]fenil]piperazin-1-il]fenil]-2-[(1RS)-1-metilpropil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on.



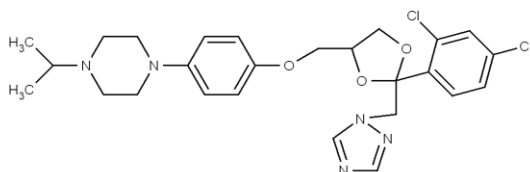
**Posakonazol**

4-{4-[4-(4-[[[(5R)-5-(2,4-difluorofenil)-5-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)oksolan-3-il]metoksi]fenil]piperazin-1-il]fenil]-1-[(2S,3S)-2-hidroksipentan-3-il]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on



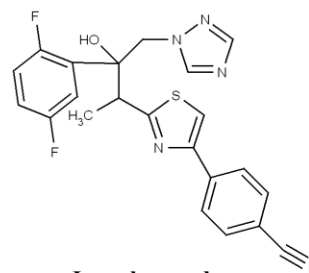
**Ravukonazol**

4-{2-[(2R,3R)-3-(2,4-difluorofenil)-3-hidroksi-4-(1,2,4-triazol-1-il)butan-2-il]-1,3-tiazol-4-il}benzonitril



**Terkonazol**

1-[4-[[[(2R,4SR)-2-(2,4-dihlorofenil)-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]-1,3-ioksolan-4-il]metoksi]fenil]-4-(1-metiletil)piperazin



**Izavukonazol**

4-{2-[(2R,3R)-3-(2,5-difluorofenil)-3-hidroksi-4-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-il]-1,3-tiazol-4-il}benzonitril

Slika 8. Strukture i IUPAC imena najvažnijih triazolnih azola

Tabela 5. Hromatografski uslovi za analizu srodnih supstanci oficinalnih azola po Ph. Eur. 8

| Supstanca | Tip kolone                     | Mobilna faza  | $\lambda$ |
|-----------|--------------------------------|---|-----------|
| BIF       | C18,                           | A: ACN, 2mL/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +TEA pH 3,2 (20:80 v/v)<br>B: ACN, 2mL/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +TEA pH 3,2 (80:20 v/v), gradijent | 210 nm    |
| CLO       | C18, deaktivirana              | A: 1 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.5 g/L TBAHS<br>B: ACN, gradijent   | 210 nm    |
| EKO       | C18, deaktivirana              | A: MeOH, 0,77g/L NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO (20:80 v/v)<br>B: MeOH, ACN (40:60 v/v), gradijent   | 225 nm    |
| FEN       | C18                            | ACN, 3,4 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,0 (70:30 v/v)   | 229 nm    |
| FLU       | C18,                           | ACN, 0,63 g/L NH <sub>4</sub> COO (14:86 v/v)   | 260 nm    |
| IZO       | C18                            | 6 g NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO/300mL ACN, 320 mL MeOH, 380 mL H <sub>2</sub> O   | 235 nm    |
| ITR       | C18, deaktivirana, endkapovana | ACN, 27,2 g/L TBAHS*, gradijent   | 225 nm    |
| KET       | C18                            | ACN/3,4 g L TBAHS* (5:95 v/v)<br>ACN/3,4 g L TBAHS* (50:50 v/v), (gradijent)  | 220 nm    |
| MIK       | C18                            | 6 g NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO/300mL ACN, 320 mL MeOH, 380 mL H <sub>2</sub> O   | 235 nm    |
| SER       | CN                             | ACN/1,5 g/L Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (37:63 v/v)   | 220 nm    |
| TER       | C18, deaktivirana              | ACN/3,4 g L THS, gradijent  | 220 nm    |
| TIO       | C18, endkapovana               | MeOH, 1,7 g/L TBAHS* +NH <sub>3</sub> pH 7,4 (3:1 v/v)  | 218 nm    |
| VOR       | C18, endkapovana               | ACN, MeOH, 1,9g/L NH <sub>4</sub> COO pH 4.0 (15:30:55 v/v/v)   | 256 nm    |

\*tetrabutilamonijum hidrogensulfat

Najzastupljenija metoda u analitici azola je svakako HPLC. U Tabeli 6 prikazan je kratak pregled metoda pronađenih u literaturi za određivanje azola iz biološkog materijala, aktivne farmaceutske supstance ili farmaceutskih doziranih oblika. Pregledom literature uočava se primena tri vrste detektora: UV (DAD), MS ili fluorimetrijskog. RP-HPLC je više nego dominantna, a tip stacionarne faze je uglavnom oktadecil silica, ili fenil silica u manjoj meri. Mobilna faza je smeša organskog rastvarača: acetonitril (ACN) ili metanol (MeOH) i vodenog rastvora koji je kiseo ili neutralan. Vodena faza zavisi od tipa detektora, te se za HPLC-UV analize koristi i fosfatni pufer, dok se za HPLC-MS analize koriste acetatni ili formijatni pufer.

Na osnovu log P i pKa datih u Tabeli 4, parametara koji ukazuju na polarnost, odnosno kiselo/baznost supstanci, osobine koje značajno utiču na retenciono ponašanje supstanci, kao i ponašanje u masenom spektrometru, može se uočiti da su azoli relativno nepolarna jedinjenja (logP oko 5), te je reverzno fazni sistem logično rešenje za analizu.

Izuzetak je flukonazol, koji je dosta polaran, te zahteva niži udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Imidazoli imaju pKa oko 6,7, te su pri pH vrednostima primenjenim u metodama iz Tabele 5 dominantno u protonovanom obliku. Većina triazola ima dva bazna centra (triazolni i piperazinski), a neki imaju veoma slabo kiseli centar (tercijarnu ili sekundarnu alkoholnu grupu). pH mobilne faze za analizu nepolarnih triazola je uglavnom između 2,5 i 4,5 u kom su supstance protonovane. Flukonazol i vorikonazol su relativno polarni te je potrebno favorizovati nejoničovan oblik (pH iznad 4,5). Sem toga, zbog prisustva baznog centra, mobilnoj fazi se dodaje trietilamin (TEA) ili dietilamin (DEA) koji suzbijaju interakcije protonovanih baznih centara analita sa slobodnim silanolnim grupama. Na ovaj način se smanjuje asimetrija i *tailing* pika. U slučaju LC-MS ili LC-MS/MS metoda, dodaje se mravlja kiselina ili formijatni pufer kome se podešava pH tako da se favorizuje protonovanje analita i analiza u pozitivnom jonizacionom modu.

## 1.4.2. Sartani

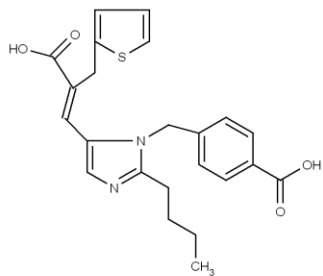
### 1.4.2.1. Fizičko-hemijske osobine sartana

Na Slici 9 prikazane su strukturne formule i IUPAC imena najznačajnijih sartana. To su supstance u obliku belog ili beličastog praška, nerastovne u vodi, a umereno do dobro rastvorne u metanolu i acetonitrilu. U Tabeli 7 su navedene log P i pKa vrednosti azola dobijene korišćenjem softvera *MarvinSketch*. Većina sartana (sem valsartana i kandesartana) imaju imidazolni bazni centar koji se protonuje u pH oblasti od značaja u konvencionalnoj RP-HPLC analizi (2-8). Sa druge strane imaju tetrazolni kiseli centar, dok su eprosartan i valsartan karboksilne kiseline, te se u pomenutoj pH oblasti neki sartani u značajnoj meri nalaze i u obliku zwitter jona.

Tabela 6. Uslovi za određivanje azola HPLC i LC-MS/MS metodama

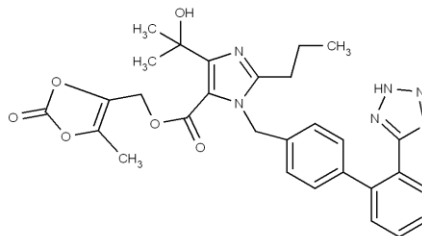
| Supstanca         | Vrsta uzorka          | Metoda   | Tip kolone | Mobilna faza   | $\lambda$ / jonizacioni mod | Referenca br. |
|-------------------|-----------------------|----------|------------|--|-----------------------------|---------------|
| MIK, EKO          | Krem                  | HPLC     | C18        | MeOH, THF, 0,1 M TEA CH <sub>3</sub> COO pH 7,0 (70:12:18 v/v/v)   | 230 nm                      | [153]         |
| MIK               | API, krem             | HPLC     | C18        | H <sub>2</sub> O, MeOH, ACN (gradijent)  | 232 nm                      | [154]         |
| KET               | Plazma                | LC-MS/MS | C18        | ACN, H <sub>2</sub> O, HCOOH (75:25:1, v/v/v)  | Pozitivan                   | [155]         |
| KET               | Lipidne nano-čestice  | HPLC     | C18        | ACN, 0,2% TEA pH 6,4 (48:52, v/v)  | 230 nm                      | [156]         |
| FEN               | API                   | HPLC     | C8         | ACN, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6 (gradijent)  | 220 nm                      | [157]         |
| KET               | Plazma                | LC-MS/MS | C18        | MeOH, 0,1% HCOOH (gradijent)   | Pozitivan                   | [158]         |
| KET               | Tablete, krem, šampon | HPLC     | C18        | ACN, 20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2%DEA pH 4 (60:40 v/v)  | 232 nm                      | [159]         |
| IZO               | API, krem             | HPLC     | Fenil      | 1% TEA, MeOH, ACN, THF (4:3:2:2, v/v/v/v)  | 225 nm                      | [160]         |
| KLO               | Prirodne voda         | LC-MS/MS | C18        | 5mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO, MeOH (gradijent)  | Pozitivan                   | [161]         |
| TIO               | API                   | HPLC     | C18        | A: MeOH, ACN (70:30, v/v)<br>B: 0,05 mol/L TEAfosfat + 0,025 mol/L 1-oktansulfonska kiselina, pH 4; A:B (58:42, v/v) | 260 nm                      | [162]         |
| BIF               | Krem                  | HPLC     | C18        | MeOH, 65 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO pH 3,6 (65:35, v/v)  | 220/252 nm                  | [163]         |
| KLO EKO, KET, MIK | Otpadne vode, mulj    | LC-MS/MS | C18        | ACN, 5mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO 0,1 % HCOOH pH 2,9, gradijent   | Pozitivan                   | [164]         |
| KLO               | Sprej rastvor         | HPLC     | Fenil      | ACN, H <sub>2</sub> O pH 3,5 (65:35, v/v)  | 210 nm                      | [165]         |
| FLU               | API                   | LC-MS/MS | C18        | 0,02 M NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO, ACN (86:14, v/v)   | Pozitivan                   | [166]         |
| FLU               | Plazma                | HPLC     | C18        | ACN, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,7 (30:70, v/v)  | 210 nm                      | [167]         |
| FLU               | Plazma                | HPLC     | C18        | 0,1 M NaCH <sub>3</sub> COO pH5, MeOH (70:30, v/v)   | 210 nm                      | [168]         |
| FLU               | Serum                 | HPLC     | C18        | ACN, 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5 (26,8:73,2 v/v)   | 210 nm                      | [169]         |
| ITR               | Plazma                | LC-MS/MS | C18        | MeOH, 10mM NH <sub>4</sub> COO pH 4 (90:10, v/v)   | Pozitivan                   | [170]         |
| ITR               | Plazma                | LC-MS/MS | C18        | ACN, 10 mM NH <sub>4</sub> COO (85:15, v/v)  | Pozitivan                   | [171]         |
| VOR               | Prašak                | HPLC     | C18        | ACN, H <sub>2</sub> O (50:50, v/v)   | 260 nm                      | [172]         |
| VOR               | Prašak                | HPLC     | C18        | ACN, H <sub>2</sub> O pH 4,5 sa CH <sub>3</sub> COOH (60:40, v/v)  | 255 nm                      | [173]         |
| VOR               | Plazma                | LC-MS/MS | C18        | MeOH, 2mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO 0,1 % HCOOH (gradijent)  | Pozitivan                   | [174]         |
| POS               | Urin, plazma          | LC-MS/MS | C18        | MeOH, 5mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO (85:15, v/v)   | pozitivan                   | [175]         |
| POS               | Plazma                | LC-MS/MS | C18        | 0,1 % HCOOH u vodi, 0,1 % ACN (gradijent)  | Pozitivan                   | [176]         |
| RAV               | Plazma                | HPLC     | C18        | ACN/H <sub>2</sub> O (58:42, v/v)  | 284 nm                      | [177]         |





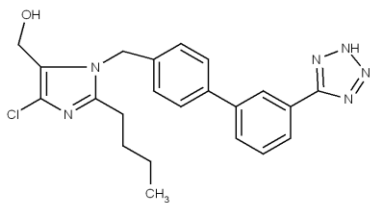
**Eprosartan**

4-({2-butil-5-[(1E)-2-karboksi-2-(tiofen-2-ilmetil)et-1-en-1-il]-1H-imidazol-1-il};metil)benzoeva kiselina



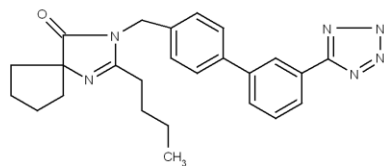
**Olmesartan medoksomil**

4-(2-hidroksiopropan-2-il)-2-propil-1-({4-[2-(1H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)-1H-imidazol-5- karboksilna kiselina



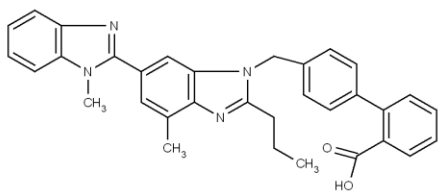
**Losartan**

[2-butyl-4-chloro-1-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)fenil]fenil}metil)-1H-imidazol-5-yl]methanol



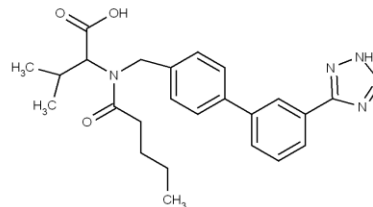
**Irbesartan**

2-Butil-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on



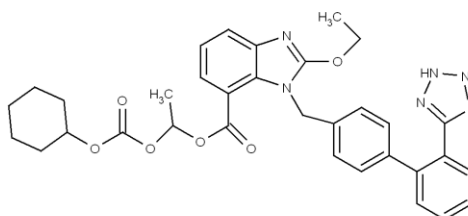
**Telmisartan**

4'-[[4-metil-6-(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)-2-propil-1Hbenzimidazol-1-il]metil]bifenil-2-karboksilna kiselina



**Valsartan**

(2S)-3-metil-2-[pentanoil[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]amino]butanska kiselina



**Kandesartan cileksetil**

2-etoksi-1-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)-1H-1,3-benzodiazol-7-karboksilna kiselina

Slika 9. Strukture i IUPAC imena najvažnijih sartana

Tabela 7. Log P i pKa vrednosti sartana

| Supstanca              | log P | pKa1 (bazni) | pKa2 (bazni) | pKa1 (kiseli) | pKa (kiseli) |
|------------------------|-------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| Irbesartan             | 5,50  | 4,12         |              | 4,34          |              |
| Losartan               | 5,08  | 4,12         |              | 4,34          | 14,27        |
| Telmisartan            | 6,04  | 4,78         | 6,13         | 3,65          |              |
| Valsartan              | 5,27  | -1,2         |              | 3,95          | 4,56         |
| Kandesartan cileksetil | 5,17  | 1,72         |              | 4,23          |              |
| Olmesartan medoksomil  | 5,55  | 3,93         |              | 4,27          | 13,72        |
| Eprosartan             | 3,80  | 4,31         |              | 3,63          | 4,2          |

#### 1.4.2.2. Mehanizam dejstva sartana

Angiotenzin II receptor ima dva podtipa – AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub>. AT<sub>1</sub> receptori se nalaze u mozgu, na neuronima, krvnim sudovima, bubrezima, jetri, nadbubrežnoj žlezdi i srcu i učestvuju u kardiovaskularnim, bubrežnim i moždanim efektima angiotenzina II. Sartani koji se nalaze na tržištu imaju oko 10 000 puta veću selektivnost prema AT<sub>1</sub> receptoru i deluju kao kompetitivni antagonisti. U pogledu relativnog afiniteta za AT<sub>1</sub> receptor kandesartan i olmesartan imaju najveći afinitet, iza njih su irbesartan i eprosartan, dok su telmisartan, valsartan i losartan najmanje selektivni. Svi sartani sprečavaju pozitivne efekte angiotenzina II: brzi i spori presorni odgovor, stimulatorni efekat na periferni simpatički nervni sistem, CNS efekat, oslobađanje kateholamina, sekreciju aldosterona, direktne i indirektne bubrežne efekte i sve efekte stimulacije rasta. Funkcija AT<sub>2</sub> receptora nije konačno razrešena, ali se smatra da su odgovorni za različite procese rasta, razvoja i diferencijacije. Postoji mogućnost da istovremena stimulacija AT<sub>2</sub> receptora i blokada AT<sub>1</sub> receptora dovodi do neželjenih efekata. Stoga se istraživanja vode u pravcu jedinjenja koja će pokazivati istovremeni antagonizam za oba podtipa receptora. Indikacije za primenu sartana su: hipertenzija, kongestivna srčana insuficijencija, dijabetična nefropatija i prevencija ponovnog potencijalno fatalnog kardio-vaskularnog događaja [178].

#### 1.4.2.3. Veza strukture i aktivnosti sartana

Prvi pokušaji sinteze lekova sa ovim mehanizmom dejstva datiraju od 1970-tih i zasnivali su se na peptidnoj strukturi supstrata za ovaj receptor. Saralasin je oktapeptid, koji

se razlikuje od angiotenzina II u dve aminokiseline. Međutim, ovo jedinjenje ima parcijalno agonističko dejstvo, te u slučajevima nižeg nivoa angiotenzina II, povećava krvni pritisak. Ipak, nakon godina istraživanja, ova logika dovela je do derivata imidazol-5-sirćetne kiseline koji su pokazivali efikasnost u prekliničkim istraživanjima. Prvo jedinjenje koje je uspešno plasirano na tržište bilo je losartan. Dalji razvoj ove grupe lekova išao je u pravcu uvođenja bifeniil-metil derivata sa kiselim osobinama koje se vezuju za različita mesta na receptoru, poput angiotenzina II. Kandesartan cileksetil ima, kao i losartan, tetrazolnu kiselu grupu, dok je imidazol zamenjen benzimidazolom. On je *pro-drug*, u gastro-intestinalnom traktu (GIT) dolazi do hidrolize estra i oslobađanja aktivnog metabolita kandesartana. Irbesartan nema kiseli bočni lanac, te aktivnost ima zahvaljujući vodoničnim vezama karbonilnog dela amidne grupe. Telmisartan se hemijski veoma razlikuje od ostalih predstavnika grupe. Umesto tetrazolne ima karboksilnu grupu, dok umesto kisele grupe u blizini imidazola ima strukturu koja podseća na purinsko jezgro i odgovorno je za vezivanje za receptor. Olmesartan medoksomil je takođe *pro-drug* i aktivira se hidrolizom estra u GITu. Valsartan umesto imidazolne grupe ima valin, koji je odgovoran za vezivanje za angiotenzin II receptor. Poslednji sintetisan sartan koji se nalazi na tržištu je eprosartan, kod koga je sirćetna kiselina na položaju 5 imidazola kod losartana zamenjena tienakrilnom kiselinom kojom se imitira C-kraj angiotenzina II. Ova modifikacija, uz karboksilnu grupu u para- položaju daje eprosartanu veliku potentnost ( $IC_{50} = 0,015 \mu M$ ) Potencijalni lekovi koji se nalaze u fazi ispitivanja su embusartan, fonsartan, pratosartan i milfasartan [178, 179].

#### 1.4.2.4. Analitika sartana

Kao oficinalni, u Ph. Eur 8 se nalaze irbesartan, losartan, telmisartan i valsartan, olmesartan medoksomil i kandesartan cileksetil. Za određivanje sadržaja u API farmakopeja za sve oficinalne, sem valsartana i olmesartana, propisuje metodu titracije sa potenciometrijskim određivanjem završne tačke titracije i perhlornom kiselinom kao titrantom. Valsartan u API se određuje metodom titracije sa potenciometrijskim određivanjem završne tačke titracije i tetrabutylamonijum-hidroksidu u 2-propanolu kao titrantom. Sadržaj olmesartana se određuje HPLC metodom uz primenu istih hromatografskih uslova kao za analizu srodnih susptanci (Tabela 8), sa razlikom u sastavu

mobilne faze – u ovom slučaju primenjuje se izokratsko eluiranje sa odnosom mobilne faze A i B 75:25 (v/v). Srodne supstance svih oficinalnih sartana i sadržaj olmesartana u API određuju se HPLC metodom. Najvažniji hromatografski parametri su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Hromatografski uslovi za analizu srodnih supstanci oficinalnih sartana po Ph. Eur. 8

| Supstanca | Tip kolone       | Mobilna faza  | $\lambda$ |
|-----------|------------------|---|-----------|
| LOS       | C18, endkapovana | 1mL/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , ACN, gradijent   | 220 nm    |
| IRB       | C18, endkapovana | 5,5mL/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + TEA pH 3,2, ACN (67:33, v/v)   | 220 nm    |
| TEL       | C18              | A: 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 3,8 g Na-pentansulfonat monohidrat /L pH 3,0 sa H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>B: MeOH, ACN (20:80, v/v), gradijent  | 230 nm    |
| OLM       | C18, endkapovana | A: 2,04g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,4 sa H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , ACN (80:20, v/v)<br>B: 2,04g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,4 sa H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , ACN (20:80, v/v), gradijent | 250 nm    |
| VAL       | C18, endkapovana | Glac. CH <sub>3</sub> COOH, ACN, H <sub>2</sub> O (1:500:500, v/v/v)  | 225 nm    |
| CAN       | C18              | A: Glac. CH <sub>3</sub> COOH, ACN, H <sub>2</sub> O (1:57:43, v/v/v)<br>B: Glac. CH <sub>3</sub> COOH, ACN, H <sub>2</sub> O (1:90:10, v/v/v), gradijent   | 254 nm    |

U literaturi se mogu pronaći različite metode sa određivanje sartana iz aktivne farmaceutske supstance, doziranog oblika ili biološkog materijala. Sartani se mogu određivati spektrofotometrijski u oblasti vidljive svetlosti (Vis) građenjem jonskih kompleksa sa bojama [180, 181]. Nedostatak ove metode je što se obojeni kompleks mora ekstrahovati. Derivativna spektrofotometrija omogućava određivanje sartana u doziranom obliku, u monokomponentnim ili vešekomponentnim preparatima (najčešće sa tiazidnim diureticima). Prednosti derivativne spektrofotometrije su veća osetljivost i selektivnost. Za određene vrste analiza postiže se selektivnost koja se može porediti sa HPLC metodama [182-185]. TLC metode skoro su potpuno potisnute HPLC metodama. Ipak, zbog jednostavnosti opreme i troškova, mogu imati prednosti u određenim vrstama analiza. TLC i HPTLC metode, najčešće se koriste u svrhe rutinske kontrole kvaliteta. Stacionarna faza je najčešće silika gel 60, dok je mobilna faza smeša nekoliko rastvarača različite polarnosti, među kojima su: toluen, metanol, sirćetna kiselina, mravlja kiselina, etil acetat, hloroform

itd. [186, 187]. Elektrohemijske i spektrofluorimetrijske metode se neznatno koriste u analitici azola [188-190].

Najviše korišćena metoda u analitici sartana je svakako HPLC metoda uz različite vrste detektora: UV (DAD), MS ili fluorimetrijskog. UV, odnosno DAD detektor dominantan je u kontroli kvaliteta, dok se maseni detektor koristi pre svega u analizama iz biološkog materijala, pošto su koncentracije u biološkom materijalu veoma niske. U Tabeli 9 prikazan je kratak pregled metoda pronađenih u literaturi za određivanje sartana iz biološkog materijala, farmaceutske supstance ili doziranih oblika. Reverzno-fazni sistem sa C18 stacionarnom fazom se većinski koristi u analizama sartana. Mobilna faza je smeša jednog ili dva organska rastvarača i kisele vodene faze. Sartani većinom imaju baznu imidazolnu grupu (pKa oko 4) i kiselu tetrazolnu ili karboksilnu grupu. pH mobilne faze najčešće je na granici kompatibilnosti sa klasičnim kolonama (2,5 – 3,0) gde su sartani skoro potpuno protonovani, ili u području 5,5 – 6,5. Pošto imaju kiselu i baznu grupu u masenom spektrometru mogu se analizirati u pozitivnom i negativnom modu. S obzirom da im kisela sredina odgovara za hromatografsko razdvajanje, vodena faza za LC-MS/MS analize je najčešće acetatni ili formijatni pufer čiji je pH oko 3 i koristi se pozitivna jonizacija. Takođe, uočava se da je pod nekim uslovima favorizovana negativna jonizacija u kiseljoj sredini, fenomen poznat pod nazivom '*wrong-way-round*' jonizacija [191].

U literaturi se može naći nekoliko metoda koje se bave razdvajanjem više sartana (do 5) sa vremenom analitičkog rana između 18 i 25 minuta [192-196].

Tabela 9. Uslovi za određivanje azola HPLC i LC-MS/MS metodama

| Supstanca          | Vrsta uzorka | Metoda     | Tip kolone     | Mobilna faza   | $\lambda$ / jonizacioni mod | Referenca br. |
|--------------------|--------------|------------|----------------|--|-----------------------------|---------------|
| LOS                | Kapsule      | HPLC       | C18            | 58 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,2, ACN (65:35, v/v)                         | 254 nm                      | [197]         |
| LOS                | Plazma, urin | HPLC-MS/MS | CN             | ACN, 0,2 % HCOOH (55:45, v/v)  | Pozitivan                   | [198]         |
| VAL                | API, tablete | HPLC       | C18            | 0,01 M NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,5, MeOH (50:50, v/v)        | 210 nm                      | [199]         |
| VAL                | Plazma       | HPLC-MS/MS | Aq C18         | ACN, 10 mM, NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO (60:40, v/v)                           | Negativan                   | [200]         |
| TEL                | Tablete      | HPLC       | C18            | 50 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO pH 5,5, ACN (60:40, v/v)                     | 260 nm                      | [201]         |
| TEL                | Plazma       | HPLC-MS/MS | C18            | MeOH, 10mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO pH 4,5 sa HCOOH (85:15, v/v)            | Pozitivan                   | [202]         |
| CAN                | Tablete      | HPLC       | C18            | 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,5, MeOH, ACN (2:80:18, v/v/v)               | 260 nm                      | [203]         |
| IRB                | API, tablete | HPLC       | C18,           | 50 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO pH 5,5, ACN (70:30, v/v)                     | 235 nm                      | [204]         |
| IRB                | Plazma       | HPLC-MS/MS | C18            | 2,5 % HCOOH, MeOH,ACN (40:45:15, v/v/v)  | Negativan                   | [205]         |
| OLM                | API,tablete  | HPLC       | C18            | MeOH, ACN, H <sub>2</sub> O pH 3,5 sa H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (60:15:25, v/v/v) | 260 nm                      | [206]         |
| OLM                | Plazma/urin  | HPLC-MS/MS | C18            | HCOOH, MeOH, H <sub>2</sub> O (0,5:70:30, v/v/v)                                       | Pozitivan                   | [207]         |
| EPR, TEL, VAL, IRB | Urin         | HPLC       | C18            | A: ACN, 0,1 % TFA<br>B: H <sub>2</sub> O, 0,1 % TFA, gradijent                         | 232 nm                      | [195]         |
| EPR                | API,tablete  | HPLC       | C18, 5 $\mu$ m | 0,03 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,5, ACN (65:35, v/v)                        | 215 nm                      | [208]         |
| EPR                | Plazma, urin | HPLC-MS/MS | C18, 5 $\mu$ m | 0,5 % HCOOH, ACN (72:28, v/v)  | Pozitivan                   |               |

## **2. CILJ RADA**

Ciljevi doktorske disertacije su:

1. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža:
  - u UHPLC sistemu sa izokratskim eluiranjem kojim se predviđa retenciono ponašanje aktivnih farmaceutskih supstanci iz iste hemijske i farmakološke grupe,
  - u HPLC sistemu sa izokratskim eluiranjem kojim se predviđa retenciono ponašanje aktivne farmaceutske supstance i degradacionih proizvoda koji nastaju tokom studija forsirane degradacije u cilju razvoja *stability - indicating* metode i omogućava analiza uticaja ispitivanih parametara na retenciono ponašanje analita,
  - u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem kojim se predviđa retenciono ponašanje aktivnih farmaceutskih supstanci iz iste hemijske i farmakološke grupe u cilju optimizacije metode za separaciju ispitivanih supstanci i omogućava analiza uticaja ispitivanih parametara na retenciono ponašanje analita.
2. Postavljanje QSPR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža kojim se predviđa odgovor u LC-MS sistemu – intenzitet signala protonovanog molekula aktivnih farmaceutskih supstanci iz iste hemijske i farmakološke grupe, i omogućava analiza uticaja hromatografskih uslova i molekulskih deskriptora na ponašanje ispitivanih supstanci u masenom spektrometru u smislu intenziteta signala protonovanog molekula, jonâ-adukta i odnosa dominantnih MRM tranzicija.



### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3.1. Opšti deo

#### 3.1.1. Standardne supstance

Mikonazol (*Selectchemie AG*, Švajcarska)

Ekonazol (*Selectchemie AG*, Švajcarska)

Ketokonazol (*Selectchemie AG*, Švajcarska)

Klotrimazol (*Selectchemie AG*, Švajcarska)

Itrakonazol (*Selectchemie AG*, Švajcarska)

Posakonazol (*Selectchemie AG*, Švajcarska)

Vorikonazol (*Selectchemie AG*, Švajcarska)

Kandesartan cileksetil (*Astra Zeneca*, Velika Britanija)

Degradacioni proizvodi kandesartan cileksetila označeni kao DP11–DPVI (*Astra Zeneca*, Velika Britanija)

Kandesartan cileksetil (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Telmisartan (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Eprosartan mesilat (*Solvay*, Brisel, Belgija)

Valsartan (*Pharmanova*, Beograd, Srbija)

Irbesartan (*Krka*, Novomesto, Slovenija)

Losartan (*Alkaloid*, Skopje, Macedonia)

Olmesarant medoksomil (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

#### 3.1.2. Rastvarači i reagensi

Acetonitril HPLC čistoće (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Acetonitril HPLC čistoće (*J.T.Baker*, Deventer, SAD)

Destilovana voda

Voda LC-MS čistoće (*VWR International GmbH*, Darmstadt, Nemačka)

Metanol HPLC čistoće (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Metanol LC-MS čistoće (*Carl Roth GmbH*, Darmstadt, Nemačka)

Amonijum acetat (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Sirćetna kiselina (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)  
Amonijum hidroksid (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)  
Amonijum hidroksid p.a. (*Merck KGaA*, Darmstadt, Nemačka)  
Mravlja kiselina (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)  
Mravlja kiselina p.a. (*Carl Roth GmbH*, Darmstadt, Nemačka)  
Amonijum formijat (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)  
Amonijum formijat (Prof. Berger, Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry and Mineralogy, University of Leipzig, Nemačka).  
Trietilamin, HPLC čistoće (*Fisher Scientific UK Limited*, Velika Britanija)

### **3.1.3. Oprema**

*Millipore Simplicity 185* sistem za prečišćavanje vode (*Billerica*, MA, SAD)  
*PHM210 Standard* pH-metar (*Radiometer Analytical SAS*, Francuska)  
*pH Level1* pH-metar (*WTW GmbH*, Weilheim, Nemačka).  
0,45 mm najlonski membranski filteri (*Agilent Technologies*, SantaClara, SAD)  
Magnetna mešalica *Rotamix SHP-10* (*Tehnica*, Železniki, Slovenija)  
Analitička vaga *Sartorius* (*Sartorius Werke GmbH*, Nemačka)  
Vodeno kupatilo *Bandelin Sonorex* (*Bandelin electronic GmbH*, Berlin, Nemačka)  
Komora za ispitivanje fotostabilnosti *Sanyo PSC022.AHA.C* (*Sanyo Gallenkamp PLC*, Loughborough, Velika Britanija)

UHPLC-DAD-MS/MS sistem (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Madison, WI, SAD)

- UHPLC tečni hromatograf *ACELLA*
- DAD detektor
- trostruki kvadrupol *TSQ Quantum Access MAX*
- program *TSQ EZ Tune 2.3.0.1206* SPI
- program *Xcalibur 2.1.0.1139*
- program *ChromQuest 5.0*

HPLC sistem *Dionex Ultimate 3000* (*Thermo Fisher Scientific*, Germering, Nemačka)

- *Dionex Ultimate 3000* tečni hromatograf
- DAD detektor
- program *Chromeleon 7*

#### HPLC-MS/MS sistem

- *Jasco DG-980-50* tečni hromatograf (*Jasco Corporation*, Tokyo, Japan)
- MS/MS trostruki kvadrupol *API 2000* (*PE AppliedBiosystems*, Weiterstadt, Germany)
- program *Analyst 1.4.2* (*AB Sciex*, Framingham, USA).

Kolona *Hypersil Gold*, 50 x 4,6mm, dijametar čestica 1,9 µm (*Thermo Fisher Scientific*, Germering, Nemačka)

Kolona *X-Bridge Shield RP 18*, 50 x 4,6 mm, dijametar čestica 3,5 µm (*Waters*, Wexford, Irska)

Kolona *Luna ciano*, 100 x 4,6 mm, dijametar čestica 3 µm (*Phenomenex* Torrance, USA).

#### 3.1.4. Računarski programi

*Design-Expert 7.0.0.* (*Stat-Ease, Inc.*, Minneapolis, USA)

*STATISTICA Neural Networks* (*StatSoft, Inc.*, USA)

*Microsoft Office Excel 2007* (*Microsoft Corporation*, USA)

*Marvin Sketch 4.1.13* (*Chem Axon Ltd.*, Budimpešta, Mađarska)

*Chem 3D® Pro* (*Cambridge Soft Corporation*, Cambridge, SAD)

*Origin Pro9* (*OriginLab Corporation*, Northampton, SAD)

### 3.2. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u UHPLC sistemu

#### 3.2.1. Priprema rastvora uzoraka i mobilne faze

Model supstance su sedam jedinjenja koja pripadaju grupi antimikotika azola: mikonazol, ekonazol, ketokonazol, klotrimazol, itrakonazol, vorikonazol i posakonazol.

Osnovni rastvori (1 mg/mL) su pripremani rastvaranjem tačno odmerenih 10 mg svake supstance u metanolu HPLC čistoće i dopunjavanjem odmernog suda od 10 mL do crte, nakon čega su osnovni rastvori čuvani na temperature od 4 °C. Radni rastvori su pripremani razblaživanjem osnovnih rastvora u skladu sa spektralnim osobinama u sudovima od 10 mL. Stoga su koncentracije radnih rastvora bile sledeće: klotrimazol – 0,1 mg/mL, ketokonazol – 0,2 mg/mL, dok su ostali azoli razblaženi do koncentracije od 0,5 mg/mL. Nakon prenosa u viala, rastvori pojedinačnih azola su injektovani u HPLC sistem. Vodeni deo mobilne faze predstavlja 20 mM amonijum acetat uz dodatak određene količine TEA i pH podešene sirćetnom kiselinom.

### **3.2.2. Hromatografski uslovi**

Hromatograf: UHPLC tečni hromatograf *Thermo Acella*, opremljen kvaternernom pompom, autosemplerom, degaserom i PDA detektorom

Kolona: *Hypersil Gold*, 50 x 4,6mm, dijametar čestica 1,9 µm

Zapremina injektovanja: 5 µL

Talasna dužina detekcije: 240 nm

Program za obradu podataka: *ChromQuest 5.0*

### **3.2.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora, odabir značajnih hromatografskih faktora i modelovanje primenom ANN**

Dominantni oblici pri različitim pH vrednostima za sva ispitivana jedinjenja dobijeni su primenom *Marvin Sketch* programa. Nakon toga je svaka od struktura podvrgnuta minimizaciji energije semi-empirijskim MOPAC/AM<sub>1</sub> metodom u okviru programa *Chem 3D Pro*. Potom su izračunati molekulski deskriptori za strukture sa minimalnom energijom primenom istog programa. Oktanol/voda distribicioni koeficijent (logD), polarizabilnost (POL), broj vodonikovih atoma koji mogu graditi vodonične veze (eng. *Hydrogen Bond Donor*, H-don) i broj slobodnih elektronskih parova koji mogu graditi vodonične veze (eng. *Hydrogen Bond Aceptor*, H-acc) su izračunati primenom *Marvin Sketch* programa. Connolly površina dostupna rastvaraču (eng. *Solvent Accessible Surface*, SAS), molarna refraktivnost

(MR), dipol-dipol energija (DEN), površina molekula (eng. *Molecular Area*, MA), *Connolly* zapremina nedostupna rastvaraču (eng. *Solvent-Excluded Volume*, SEV), *van der Waals* energija (VDW), *van der Waals* energija između atoma udaljenih najmanje tri atoma (eng. *Non-1,4 van der Waals Energy*, NON-1,4 VDW), prečnik molekula (dijametar, D), energija najviše popunjene orbitale (eng. *Highest occupied molecular orbital*, HOMO) i energija najniže nepopunjene orbitale (eng. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO) su izračunati primenom programa *Chem 3D*. Korelacija između deskriptora analizirana je primenom *Microsoft Excell* programa.

Uloga skrining eksperimenata je pronalaženje faktora koji imaju najveći, tj. statistički značajan uticaj na retenciono ponašanje analiziranih supstanci u hromatografskom sistemu. Sa druge strane sprečava se opterećenje mreže prevelikim brojem ulaznih promenljivih. U ovu svrhu primenjen je  $2^{4-1}$  frakcioni faktorski dizajn (FFD). Statistički značaj ispitivanih faktora je procenjen u odnosu na retencioni faktor (k) azola, kao izlaznu promenljivu modela. Eksperimentalna šema i analiza FFD dobijeni su korišćenjem programa *Design Expert*.

Računarski program upotrebljen za ANN modelovanje je *Statistica Neural Networks*.

### **3.3. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu za potrebe razvoja *stability-indicating* metode**

#### **3.3.1. Priprema rastvora i uslovi za izvođenje studije forsirane degradacije**

Studija forsirane degradacije izvedena je prema ICH vodiču Q1A(R2)[127]. Stres uslovi su varirani dok nije postignuto 5-20 % degradacije u odnosu na nedegradiran kandesartan cileksetil kao 100 %. Sprovedeno je ispitivanje degradacije u kiseljoj, baznoj i neutralnoj sredini, termalnoj i fotolitičkoj degradaciji.

Osnovni rastvor kandesartan cileksetila (1 mg/mL) je pripremljen u acetonitrilu. Procedura forsirane degradacije sastoji se u dodavanju 1 mL stres agensa, u obliku rastvora, 1mL osnovnog rastvora u sudu od 10 mL i/ili prisustvo ostalih stresornih agenasa (svetlost, temperature). Nakon predviđenog vremena su sudovi dopunjeni smešom acetonitril/voda

(50:50, v/v) do oznake. Finalni stres uslovi: vreme degradacije, stresorni agensi, njihove koncentracije ukoliko su u obliku rastvora, temperatura i ostali podaci prikazani su u Tabeli 13. Fotostabilnost je ispitivana primenom *Sanyo PSC022.AHA.C* komore. Uzorci su nakon završene procedure degradacije prebačeni u viala i injektovani u HPLC sistem, odnosno razblaženi 10 puta i injektovani u LC-MS/MS sistem.

### **3.3.2. Hromatografski i MS uslovi:**

#### Ispitivanje retencionog ponašanja:

Hromatograf: *Dionex Ultimate 3000*, opremljen kvaternom pumpom, autosemplerom, degaserom i PDA detektorom

Kolona: *X-Bridge Shield RP 18* (50 x 4,6mm, dijametar čestica 3,5 µm)

Zapremina injektovanja: 20 µL

Talasna dužina detekcije: 254 nm

Program za obradu podataka: *Chromeleon 7*

#### Identifikacija degradacionih proizvoda:

Hromatograf: UHPLC tečni hromatograf *Thermo Acella*, opremljen kvaternom pumpom, autosemplerom, degaserom i PDA detektorom

Kolona: *X-Bridge Shield RP 18* (50 x 4,6mm, dijametar čestica 3,5 µm)

Mobilna faza: 55 % ACN, 45 % 5mM amonijum acetat pH 2,8 (podešena sirćetnom kiselinom)

Temperatura kolone 30 °C

Protok mobilne faze: 1 mL/min

Maseni spektrometar: trostruki kvadrupol *TSQ Quantum Access MAX*, spregnut sa UHPLC sistemom

Program: *Xcalibur 2.1.0.1139*

Jonizacioni mod: pozitivan

Gas za raspršivanje: azot

Kolizioni gas: argon

Postupak podešavanja instrumentalnih parametara (tjuniranje): infuzija kandesartan cileksetil standardnog rastvora u koncentraciji 1 µg/mL “iz šprica”, protokom 10 µL/min; program *TSQ EZ Tune*, nakon čega su dobijeni sledeći parametri kao optimalni:

Napon spreja: 4500 V

Temperatura isparivača: 354 °C

Temperatura transfer kapilare: 321 °C

Pritisak desolvacionog gasa: 60 arbitrarnih jedinica (a.j.)

Pritisak pomoćnog desolvacionog gasa 55 a.j.

Kolizioni pritisak: 2 mTorra

Koliziona energija: 10 V

### **3.3.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora, odabir značajnih hromatografskih faktora i modelovanje primenom ANN**

Dominantni oblici aktivne farmaceutske supstance i njenih degradacionih proizvoda pri različitim pH vrednostima dobijeni su primenom *Marvin Sketch* programa. Nakon toga je svaka od struktura podvrgnuta minimizaciji energije semi-empirijskim MOPAC/AM<sub>1</sub> metodom u okviru programa *Chem 3D Pro*. Vrednosti logD, POL, H-don i H-acc su izračunati primenom *Marvin Sketch* programa. Vrednosti SAS, MR, DEN, MA, SEV, VDW, NON-1,4 VDW, D, HOMO i LUMO su izračunati primenom programa *Chem 3D*. Korelacija između deskriptora analizirana je primenom *Microsoft Excell* programa.

2<sup>5-1</sup> FFD eksperimentalni dizajn poslužio je za odabir statistički značajnih hromatografskih parametara koji su dalje uključeni u modelovanje primenom ANN. Statistički značaj ispitivanih faktora je procenjen u odnosu na retencioni faktor (k) kandesartan cileksetila i njegovih degradacionih proizvoda, kao izlaznu promenljivu modela. FFD šema eksperimenata i analiza izvršeni su korišćenjem programa *Design Expert*.

Računarski program upotrebljen za ANN modelovanje je *Statistica Neural Networks*.



### **3.4. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem**

#### **3.4.1. Priprema rastvora uzoraka**

Model supstance su šest jedinjenja koja pripadaju grupi antagonista angiotenzin II receptora – sartana: losartan, valsartan, irbesartan, telmisartan, kandesartan cileksetil i eprosartan.

Osnovni rastvori model supstanci su dobijeni rastvaranjem pojedinačnih sartana u acetonitrilu do koncentracije 1 mg/mL. Smeša sartana u koncentraciji po 50 µg/mL u rastvaraču ACN: pufer molariteta i pH prema eksperimentalnom dizajnu (50:50, v/v) je injektovana u HPLC sistem.

#### **3.4.2. Hromatografski uslovi**

Hromatograf: *Dionex Ultimate 3000*, opremljen kvaternernom pumpom, autosemplerom, degaserom i PDA detektorom

Kolona: *Luna ciano*, 100 x 4.6 mm, dijametar čestica 3 µm

Zapremina injektovanja: 10 µL

Protok mobilne faze: 1,5 mL/min

Temperatura kolone: 25 °C

Talaska dužina detekcije: 235 nm

Program za obradu podataka: *Chromeleon 7*

#### **3.4.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora i modelovanje primenom ANN**

Za sve ispitivane supstance određeni su dominantni oblici pri različitim pH vrednostima za sva ispitivana jedinjenja primenom *Marvin Sketch* programa, kao i njihova procentualna zastupljenost. Nakon toga je svaka od struktura podvrgnuta minimizaciji energije semi-empirijskim MOPAC/AM<sub>1</sub> metodom u okviru programa *Chem 3D Pro*. Potom su izračunati molekulski deskriptori za strukture sa minimalnom energijom primenom istog

programa za SEV, POL i NON-1,4 VDW. Vrednosti log D, H-don i H-acc su izračunate za svaku strukturu pri svim ispitivanim pH korišćenjem programa *Marvin Sketch*. Finalni molekularni deskriptori pri određenim pH izračunati su uzimanjem u obzir procentualne zastupljenosti svake forme. Pomenuti molekularni deskriptori ne korelišu u značajnoj meri. Eksperimentalna šema čiji podaci predstavljaju setove podataka za ANN dobijena je primenom *Box-Behnken* ekperimentalnog dizajna, korišćenjem programa *Design Expert*. Računarski program upotrebljen za ANN modelovanje je *Statistica Neural Networks*.

Nakon pronalaženja optimalnog modela, on se koristi za optimizaciju razdvajanja sartana, predviđanjem njihovih retencionih vremena. Cilj je postići zadovoljavajući faktor rezolucije ( $R_s$ ) za sve parove. Pronalaženje optimalnih hromatografskih uslova mapiranjem faktora rezolucije rađeno je primenom programa *Origin Pro*.

### **3.5. Postavljanje QSPR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u cilju predviđanja odgovora masenog spektrometra**

#### **3.5.1. Priprema rastvora uzoraka**

Model supstance su sedam jedinjenja koja pripadaju grupi antagonista angiotenzin II receptora – sartana: eprosartan, olmesartan medoksomil, irbesartan, losartan, telmisartan, valsartan, i kandesartan cileksetil.

Osnovni rastvori model supstanci su dobijeni rastvaranjem pojedinačnih sartana u metanolu do koncentracije 1 mg/mL. Koncentracija analitâ u injekcionoj smeši (uzorku) i injekciona zapremina su određeni ispitivanjem dinamičkog opsega. Analiza je vršena injektovanjem radnih rastvora smeše sartana u odgovarajućoj mobilnoj fazi.

Tabela 10. Vrednosti instrumentalnih parametara pri različitim protocima mobilne faze u cilju održavanja optimalnih uslova, prema uputstvu proizvođača

| Protok (mL/min) | Temperatura transfer kapilare (°C) | Desolvacioni pomoćni gas (psi) | Desolvacioni gas (psi) | Pozicija probe                |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| 0.04            | 300                                | 20                             | 40                     | 2 vertikalno – 0 horizontalno |
| 0.125           | 350                                | 25                             | 45                     | 3 vertikalno – 4 horizontalno |
| 0.25            | 400                                | 30                             | 50                     | 3 vertikalno – 5 horizontalno |
| 0.375           | 425                                | 35                             | 55                     | 4 vertikalno – 6 horizontalno |
| 0.46            | 450                                | 40                             | 60                     | 4 vertikalno – 7 horizontalno |

(Prilagođeno iz: J. Golubović, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević, J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

### 3.5.2. Hromatografski i MS uslovi

Hromatograf: *Jasco DG-980-50* tečni hromatograf

Maseni spektrometar: trostruki kvadrupol *API 2000* spregnut sa HPLC sistemom program

Program: *Analyst 1.4.2*

Jonizaciona tehnika: ESI u pozitivnom modu

Gas za raspršivanje: azot

Kolizioni gas: argon

Nekoliko instrumentalnih parametara kao što su: pozicija probe, pritisak desolvacionog i pomoćnog desolvacionog gasa i temperatura transfer kapilare su podešeni prema uputstvu proizvođača opreme za dati protok mobilne faze, kako bi se održali optimalni uslovi u sistemu i izbegle greške u zaključivanju izazvane suboptimalnim instrumentalnim uslovima. Njihove vrednosti su prikazane u Tabeli 10. Na ovaj način, protok zapravo čini set parametara: protok i odgovarajuća pozicija probe, pritisak desolvacionog i pomoćnog desolvacionog gasa i temperatura transfer kapilare. Broj ponovljenih injektovanja istog uzorka (replikata) je optimizovan na osnovu relativne standardne devijacije odgovora dobijenih nakon 3 i 6 replikata. Injekciona zapremina iznosila je 50 µL. *Full scan m/z* opseg je podešen na *m/z* 400–700, sa vremenom skeniranja od 4,5 sekundi.

Za potrebe MS/MS analiza, skeniranje jona produkata za sve analite izvršeno je u opsegu  $m/z$  50 do  $[M+H]^+ + 10$ , vreme skeniranja 3 sekunde pod uslovima koji odgovaraju centralnoj tački eksperimentalnog dizajna (60 % MeOH u mobilnoj fazi, pH mobilne faze 5,5, protok 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Dva fragmenta sa najjačim odgovorom (signalom), za svaki od analita, su odabrani za dalju optimizaciju. Kolizijska energija (eng. *Collision Energy*, CE) i potencijal na izlazu iz kolizijske ćelije (eng. *Cell Exit Potential*, CXP) su optimizovani u cilju dobijanja maksimalnog intenziteta odabranih tranzicija. Kolizijski gas (*Collision-activated dissociation*, CAD) je podešen na 4 a.j. prema uputstvu proizviđača. S obzirom da nije bilo značajnog odstupanja u odnosu signalâ jona-aduktâ (natrijum, kalijum i amonijum adukti i dehidratirani joni) prema signalu protonovanog molekula analita,  $[M+H]^+$  jona pri različitim uslovima, adukti jona fragmenata nisu dalje uzeti u razmatranje.

Odgovor je meren u *full scan* (MS analiza) i modu praćenja više reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM) (MS/MS analiza) kao površina pika  $m/z$  signala ciljnih jonskih vrsta.

### **3.5.3. Programi i postupak za računanje molekulskih deskriptora i modelovanje primenom ANN**

Za sve ispitivane supstance određeni su dominantni oblici pri različitim pH vrednostima za sva ispitivana jedinjenja dobijeni su primenom *Marvin Sketch* programa, kao i njihova procentualna zastupljenost. Nakon toga je svaka od struktura podvrgnuta minimizaciji energije semi-empirijskim MOPAC/AM<sub>1</sub> metodom u okviru programa *Chem 3D Pro*. Potom su izračunati molekulski deskriptori za strukture sa minimalnom energijom primenom istog programa za log P i SEV. Vrednosti H-acc su izračunate za svaku strukturu pri svim ispitivanim pH korišćenjem programa *Marvin Sketch*. Finalni molekulski deskriptori pri određenim pH izračunati su uzimanjem u obzir procentualne zastupljenosti svake forme. Pomenuti molekulski deskriptori ne korelišu u značajnoj meri. Bazne pKa vrednosti su takođe određene korišćenjem *Marvin Sketch* programa. Za analite koji imaju više od jedne pKa vrednosti (eprosartan i telmisartan), viša vrednost je uzeta u obzir, jer ona definiše pH pri kojoj analit dobije prvo naelektrisanje u okviru eksperimentalnog opsega pH.

Podaci za modelovanje uz primenu neuronskih mreža dobijeni su izvođenjem eksperimenata prema eksperimentalnoj šemi centralnog kompozicionog eksperimentalnog dizajna (eng. *Central Composite Experimental Design*, CCD), primenom *Design Expert* programa.

Računarski program upotrebljen za ANN modelovanje je *Statistica Neural Networks*.

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## **4.1. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u UHPLC sistemu**

### **4.1.1. Odabir deskriptora koji učestvuju u građenju modela**

Pri preliminarnom odabiru deskriptora, obuhvaćene su sve najvažnije grupe: fiziko-hemijski, kvantum-hemijski, topološki i prostorni strukturni deskriptori. Za potrebe građenja mreža, odabrani su deskriptori koji međusobno ne korelišu u velikoj meri. Deskriptori sa koeficijentom korelacije većim od 0,99 su isključeni iz ANN modelovanja. Analiza korelacije služi da se ispita da li dva ili više deskriptora nose istu fizičko-hemijsku informaciju i, u tom slučaju, eliminišu nekorisni deskriptori, koji su samo dodatno opterećenje za mreže. U Tabeli 11 prikazani su koeficijenti korelacije ispitivanih molekulskih deskriptora. U grupi deskriptora koji visoko korelišu, deskriptor koji najviše koreliše sa ostalim deskriptorima, tj MA, se uključuje u dalji rad. Stoga su deskriptori koji su uključeni u ANN modelovanje bili logD, MA, MR, DEN, NON-1,4 VDW, H-don i H-acc.

### **4.1.2. Izbor značajnih hromatografskih faktora**

Ispitivanja u ovoj fazi izvršena su primenom  $2^{4-1}$  FFD dizajna prema šemi prikazanoj u Tabeli 12. Preliminarni eksperimenti su pokazali mali uticaj protoka mobilne faze na odgovor sistema, te je postavljena vrednost protoka mobilne faze od 400  $\mu\text{L}/\text{min}$  za FFD, kao za eksperimente koji su služili za dobijanje podataka koji su uključeni u ANN modelovanje. Na osnovu opšteg znanja o RP-HPLC mehanizmima, faktori koji su ispitivani primenom FFD dizajna su udeo (procenat) organskog rastvarača u mobilnoj fazi (ACN), pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (pH), temperatura kolone (T) i procenat trietilamina (TEA) u vodenom delu mobilne faze koji se koristi kao modifikator pri analizi baznih jedinjenja (TEA).

Tabela 11. Koeficijenti korelacije između parova deskriptora

| Deskriptor     | SAS    | MA     | SEV    | MR     | DEN    | NON-1,4<br>VDW | VDW   | D     | H-don  | H-acc  | LUMO  | HOMO  | POL   | Log D |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| SAS            | 1      |        |        |        |        |                |       |       |        |        |       |       |       |       |
| MA             | 0,999  | 1      |        |        |        |                |       |       |        |        |       |       |       |       |
| SEV            | 0,994  | 0,997  | 1      |        |        |                |       |       |        |        |       |       |       |       |
| MR             | -0,180 | -0,178 | -0,184 | 1      |        |                |       |       |        |        |       |       |       |       |
| DEN            | -0,637 | -0,635 | -0,634 | 0,288  | 1      |                |       |       |        |        |       |       |       |       |
| NON-1,4<br>VDW | 0,294  | 0,322  | 0,364  | 0,167  | -0,252 | 1              |       |       |        |        |       |       |       |       |
| VDW            | 0,993  | 0,996  | 0,999  | -0,180 | -0,631 | -0,252         | 1     |       |        |        |       |       |       |       |
| D              | 0,994  | 0,995  | 0,992  | -0,158 | -0,576 | -0,631         | 0,989 | 1     |        |        |       |       |       |       |
| H-don          | 0,036  | 0,024  | 0,013  | -0,066 | -0,252 | -0,576         | 0,029 | 0,007 | 1      |        |       |       |       |       |
| H-acc          | 0,866  | 0,866  | 0,863  | -0,237 | -0,452 | -0,252         | 0,847 | 0,889 | -0,092 | 1      |       |       |       |       |
| LUMO           | 0,991  | 0,993  | 0,995  | -0,210 | -0,662 | -0,452         | 0,990 | 0,988 | 0,034  | 0,900  | 1     |       |       |       |
| HOMO           | 0,991  | 0,993  | 0,995  | -0,210 | -0,662 | -0,662         | 0,990 | 0,988 | 0,034  | 0,900  | 1     | 1     |       |       |
| POL            | 0,998  | 0,999  | 0,998  | -0,147 | -0,696 | 0,176          | 0,998 | 0,991 | 0,038  | 0,8900 | 0,988 | 0,988 | 1     |       |
| logD           | 0,727  | 0,733  | -0,731 | 0,782  | -0,463 | 0,686          | 0,742 | 0,702 | -0,538 | 0,368  | 0,673 | 0,673 | 0,744 | 0,727 |

(Prilagođeno iz: J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Talanta 100 (2012) 329–337)

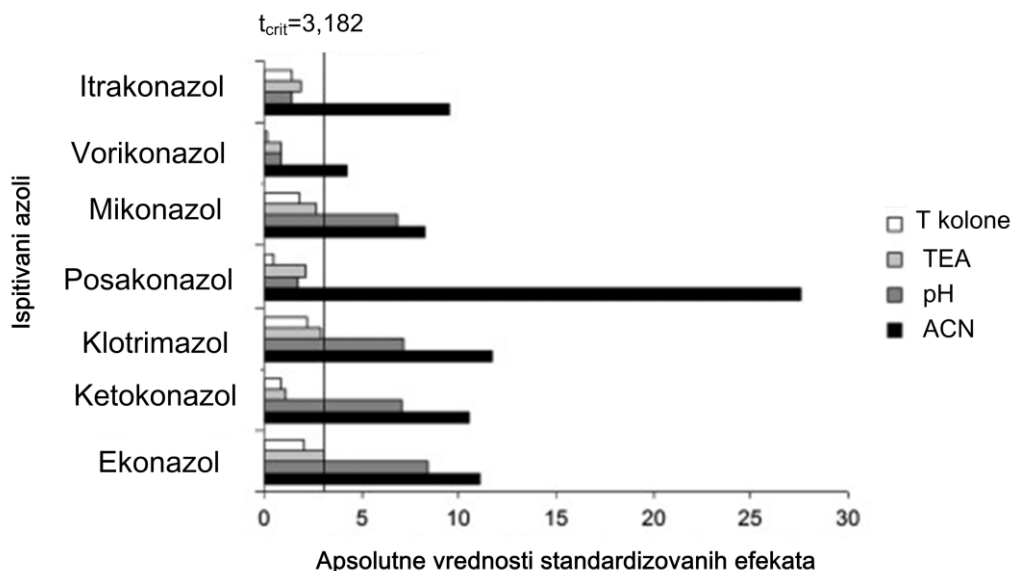


Uticao svakog od faktora je procenjen primenom Studentovog t-testa za odgovarajuću p-vrednost. Statistički značaj ispitivanih faktora je procenjen u odnosu na retencioni faktor (k) azola, kao izlaznu promenljivu modela. Uticao svakog od faktora je procenjen primenom Studentovog t-testa za odgovarajuću p-vrednost. Kritična t-vrednost za nivo značajnosti 0,05 za 3 stepena slobode je 3,182. Svi faktori čije su apsolutne vrednosti standardizovanih efekata bile iznad kritične t-vrednosti smatraju se statistički značajnim, i obrnuto. *Pareto* dijagrami, u kojima je dužina stubićâ proporcionalna apsolutnoj vrednosti standardizovanih efekata, su prikazani na Slici 10. Isprekidana linija predstavlja kritičnu t-vrednost ( $p=0,05$ ), te se lako uočavaju značajni faktori. Kao što se može uočiti, procenat acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vodenog dela mobilne faze su pokazali statistički značajan uticao na retenciju azola, te su odabrani kao hromatografski parametri koji su učestvovali u građenju modela primenom ANN. Na osnovu dobijenih rezultata, odlučeno je da se temperatura kolone održava na 20 °C, dok je udeo TEA u vodenom delu mobilne faze dalje održavan konstantnim na nivou 0,01 % (v/v).

Tabela 12. Eksperimentalni dizajn za ispitivanje značajnih hromatografskih parametara

| Faktor                  | Nivo |       |     |
|-------------------------|------|-------|-----|
|                         | -1   | 0     | 1   |
| ACN (%)                 | 40   | 50    | 60  |
| pH                      | 3,5  | 4,75  | 6   |
| Temperatura kolone (°C) | 20   | 35    | 50  |
| Tea (%)                 | 0,01 | 0,055 | 0,1 |

(Prilagođeno iz: J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Talanta 100 (2012) 329–337)



Slika 10. Apsolutne vrednosti standardizovanih efekata ispitivanih faktora na retenciju azola.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Talanta 100 (2012) 329–337)

#### 4.1.3. ANN modelovanje

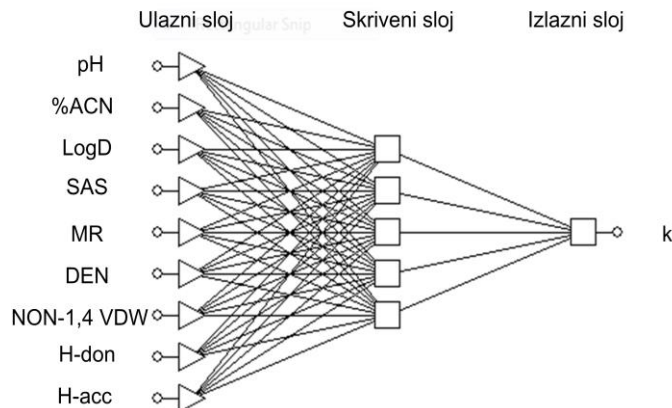
MLR mreža je optimizovana tako da se greška treninga svede na minimum, što se postiže podešavanjem težina nakon svake epohe, što je objašnjeno u poglavlju 1.2.3.2. Optimizacija topologije i parametara treninga mreže (stopa učenja, momentum, broj epoha, tip aktivacione i prenosne funkcije itd.) rađena je po principu pokušaja i pogreške (eng. *Trial and Error*) u cilju minimizacije RMSE validacionog seta. Na početku treninga, težinama i *bias*-u su nasumično dodeljivane vrednost između -1 i 1. Minimum greške u okviru validacije, odnosno trenutak kada greška validacije počinje da raste je kriterijum za zaustavljanje treninga. Sem RMSE, kriterijum za odabir optimalne mreže bio je i koeficijent korelacije između eksperimentalno dobijenih odgovora i odgovora dobijenih predviđanjem od strane mreže. Podaci dobijeni HPLC analizom šest jedinjenja su korišćeni kao trening set, za građenje modela, dok je sedmo jedinjenje (ekonazol) sačuvano za procenu efikasnosti predviđanja od strane modela. Ekonazol je jedino među ispitivanim jedinjenjima čiji se svi deskriptori nalaze unutar prostora podataka kojeg formiraju deskriptori ispitivanih azola.

Sem statistički značajnih deskriptora, udeo acetonitrila u mobilnoj fazi (%ACN) i pH vodenog dela mobilne faze (pH) su bili ulazne promenljive sistema. Hromatografski parametri su varirani na po 5 nivoa, što je dalo 25 kombinacija, tj. slučajeva za svaki analit. %ACN je variran između 40 i 60 % u koracima od po 5 % (40; 45; 50; 55; i 60 %), dok je pH varirana između 3,5 i 6 u koracima od po 0,6 ili 0,7 (3,5; 4,2; 4,8; 5,4; i 6). Primeri (slučajevi) u okviru trening seta podataka su podeljeni nasumično na trening i validacioni set, tako da je trening set obuhvatao 125 slučajeva a validacioni 25.

Najbolje rezultate dala je MLP mreža koja se sastojala od tri sloja: ulaznog, skrivenog i izlaznog, sa pet neurona u skrivenom sloju (Slika 11). Ovakva topologija se kraće prikazuje 9-5-1. Devet predstavlja broj ulaznih neurona: 2 hromatografska parametra (%ACN i pH) i 7 molekulskih deskriptora (logD, MA, MR, DEN, NON-1,4 VDW, H-don i H-acc). Grafički je optimalna mreža prikazana na Slici 11. Sigmoidalna (logistička) funkcija postavljena je kao prenosna funkcija u skrivenom i izlaznom sloju. Optimalni rezultati dobijeni su mrežom treniranom algoritmom ponovnog prolaska greške sa stopom učenja od 0,6 i momentumom od 0,1. Kao što je već rečeno u poglavlju 1.2., stalni rast greške validacije je bio kriterijum za zaustavljanje procesa treniranja. Broj epoha koji je bio potreban za treniranje mreže je 10 000. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori, kao i odgovori koje predviđa optimalna mreža prikazani su u Tabeli 13. RMSE treninga, validacije i testa bili su 1,789, 0,7498 i 2,777, redom. Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) između eksperimentalno dobijenih vrednosti odgovora –  $k(\text{exp})$  i vrednosti odgovora koje predviđa mreža –  $k(\text{ANN})$  je 0,9861, 0,9957 i 0,9871 za trening, validaciju i test, redom. Visoka vrednost  $R^2$  i niska vrednost RMSE trening i validacionog seta ukazuju na dobru deskriptivnu sposobnost mreže. Sa druge strane, visoka vrednost  $R^2$  i niska vrednost RMSE test seta ukazuju na dobru sposobnost predviđanja, kao i to da nije došlo do pretreniranja mreže.

Još jedan od načina za predstavljanje efikasnosti mreže je i grafički prikaz slaganja vrednosti  $k(\text{exp})$  i  $k(\text{ANN})$ . Da bi se slaganje ovih vrednosti vizuelno predstavilo bolje, uključuje se i prava sa jednačinom  $y = x$ . Što su tačke bliže ovoj pravoj, veće je slaganje i bolji je model (Slika 12). Logaritamska transformacija vrednosti odgovora u ovom slučaju daje informativniju sliku jer je opseg vrednosti  $k$  širok. Slika 12b predstavlja slaganje

eksperimentalno dobijenih i odgovora koje predviđa mreža za test supstancu, ekonazol. Može se primetiti da postoji visoka stopa slaganja u oblasti željene retencije ( $k = 1 - 10$ ), kao i oblasti slabe retencije ( $k = 0 - 1$ ) i nešto veće retencije ( $k = 10 - 30$ ). Sa druge strane, dobijena mreža pokazuje slabe sposobnosti predviđanja, odnosno visoke vrednosti RMSE odgovora pri uslovima u kojima se ekonazol dugo zadržava u sistemu. Ovo, pak, ne predstavlja problem, s obzirom da je osnovni cilj primene ovog modela predviđanje retencionog ponašanja pri optimizaciji HPLC metode za analizu nekog imidazolnog ili triazolnog antimikotika, što podrazumeva željenu retenciju. Mreža pokazuje dobre rezultate u širem području vrednosti  $k$  ( $10 - 30$ ) u odnosu na željenu ( $1 - 10$ ), što dobijenom QSRR-ANN modelu daje i određenu robusnost.



Slika 11. Grafički prikaz optimalne mreže, topologije: 9-5-1

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Talanta 100 (2012) 329–337)

Tabela 13. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori –  $k(\text{exp})$ , i odgovori koje predviđa optimalna mreža –  $k(\text{ANN})$  za ispitivane azole

| Jedinjenje | Set | pH   | % AcN | logD | SAS   | MR    | DEN  | NON<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | $k(\text{exp})$ | $k(\text{ANN})$ |
|------------|-----|------|-------|------|-------|-------|------|-------------------|-------|-------|-----------------|-----------------|
| MIK        | TR  | 3,50 | 60    | 4,67 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 2,59            | 2,38            |
| MIK        | TR  | 3,50 | 55    | 4,67 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 3,46            | 2,95            |
| MIK        | TR  | 3,50 | 50    | 4,67 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 4,95            | 3,72            |
| MIK        | TR  | 3,50 | 45    | 4,67 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 7,66            | 5,47            |

| Jedinjenje | Set | pH   | % AcN | logD | SAS   | MR    | DEN  | NON<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | k(exp) | k(ANN) |
|------------|-----|------|-------|------|-------|-------|------|-------------------|-------|-------|--------|--------|
| MIK        | TR  | 3,50 | 40    | 4,67 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 13,39  | 12,04  |
| MIK        | TR  | 4,20 | 60    | 4,68 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 5,30   | 4,71   |
| MIK        | TR  | 4,20 | 55    | 4,68 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 6,77   | 6,32   |
| MIK        | TR  | 4,20 | 50    | 4,68 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 9,62   | 8,66   |
| MIK        | TR  | 4,20 | 45    | 4,68 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 14,97  | 13,53  |
| MIK        | TR  | 4,20 | 40    | 4,68 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 25,72  | 28,03  |
| MIK        | TR  | 4,80 | 60    | 4,70 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 7,10   | 6,83   |
| MIK        | TR  | 4,80 | 55    | 4,70 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 10,45  | 10,32  |
| MIK        | TR  | 4,80 | 50    | 4,70 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 16,60  | 16,36  |
| MIK        | TR  | 4,80 | 45    | 4,70 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 27,16  | 28,53  |
| MIK        | TR  | 4,80 | 40    | 4,70 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 49,88  | 53,08  |
| MIK        | TR  | 5,40 | 60    | 4,77 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 7,95   | 7,38   |
| MIK        | VAL | 5,40 | 55    | 4,77 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 12,71  | 12,02  |
| MIK        | TR  | 5,40 | 50    | 4,77 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 21,79  | 21,72  |
| MIK        | TR  | 5,40 | 45    | 4,77 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 39,63  | 42,28  |
| MIK        | TR  | 5,40 | 40    | 4,77 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 78,79  | 71,11  |
| MIK        | TR  | 6,00 | 60    | 4,95 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 7,85   | 6,79   |
| MIK        | TR  | 6,00 | 55    | 4,95 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 12,55  | 11,25  |
| MIK        | TR  | 6,00 | 50    | 4,95 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 21,64  | 22,03  |
| MIK        | TR  | 6,00 | 45    | 4,95 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 41,80  | 47,65  |
| MIK        | TR  | 6,00 | 40    | 4,95 | 528,2 | 10,44 | 3,32 | -1,01             | 1     | 4     | 89,61  | 77,89  |
| KET        | TR  | 3,50 | 60    | 2,83 | 730,0 | 13,89 | 2,31 | -2,27             | 2     | 7     | 0,59   | 0,70   |
| KET        | TR  | 3,50 | 55    | 2,83 | 730,0 | 13,89 | 2,31 | -2,27             | 2     | 7     | 0,68   | 0,68   |
| KET        | TR  | 3,50 | 50    | 2,83 | 730,0 | 13,89 | 2,31 | -2,27             | 2     | 7     | 0,87   | 0,68   |
| KET        | TR  | 3,50 | 45    | 2,83 | 730,0 | 13,89 | 2,31 | -2,27             | 2     | 7     | 1,24   | 0,74   |
| KET        | TR  | 3,50 | 40    | 2,83 | 730,0 | 13,89 | 2,31 | -2,27             | 2     | 7     | 2,00   | 1,12   |
| KET        | TR  | 4,20 | 60    | 3,23 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 0,90   | 1,26   |
| KET        | VAL | 4,20 | 55    | 3,23 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 1,09   | 1,18   |
| KET        | TR  | 4,20 | 50    | 3,23 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 1,44   | 1,14   |
| KET        | TR  | 4,20 | 45    | 3,23 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 2,03   | 1,26   |
| KET        | TR  | 4,20 | 40    | 3,23 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 3,22   | 2,03   |
| KET        | TR  | 4,80 | 60    | 3,39 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 1,09   | 1,74   |
| KET        | TR  | 4,80 | 55    | 3,39 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 1,48   | 1,75   |
| KET        | TR  | 4,80 | 50    | 3,39 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 2,14   | 1,86   |
| KET        | TR  | 4,80 | 45    | 3,39 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 3,28   | 2,40   |
| KET        | TR  | 4,80 | 40    | 3,39 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 5,46   | 4,97   |
| KET        | TR  | 5,40 | 60    | 3,50 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 1,22   | 2,00   |
| KET        | TR  | 5,40 | 55    | 3,50 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 1,69   | 2,14   |
| KET        | TR  | 5,40 | 50    | 3,50 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 2,57   | 2,47   |
| KET        | TR  | 5,40 | 45    | 3,50 | 709,0 | 13,89 | 1,06 | -2,15             | 1     | 8     | 4,17   | 3,63   |

| Jedinjenje | Set | pH   | % AcN | logD | SAS   | MR    | DEN   | NON<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | k(exp) | k(ANN) |
|------------|-----|------|-------|------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|--------|--------|
| KET        | VAL | 5,40 | 40    | 3,50 | 709,0 | 13,89 | 1,06  | -2,15             | 1     | 8     | 7,93   | 8,94   |
| KET        | TR  | 6,00 | 60    | 3,70 | 709,0 | 13,89 | 1,06  | -2,15             | 1     | 8     | 1,16   | 2,09   |
| KET        | TR  | 6,00 | 55    | 3,70 | 709,0 | 13,89 | 1,06  | -2,15             | 1     | 8     | 1,70   | 2,30   |
| KET        | TR  | 6,00 | 50    | 3,70 | 709,0 | 13,89 | 1,06  | -2,15             | 1     | 8     | 2,58   | 2,80   |
| KET        | TR  | 6,00 | 45    | 3,70 | 709,0 | 13,89 | 1,06  | -2,15             | 1     | 8     | 4,47   | 4,55   |
| KET        | TR  | 6,00 | 40    | 3,70 | 709,0 | 13,89 | 1,06  | -2,15             | 1     | 8     | 8,74   | 12,52  |
| POS        | TR  | 3,50 | 60    | 5,71 | 942,0 | 18,79 | -5,42 | -0,36             | 2     | 11    | 1,37   | 2,81   |
| POS        | TR  | 3,50 | 55    | 5,71 | 942,0 | 18,79 | -5,42 | -0,36             | 2     | 11    | 1,97   | 2,99   |
| POS        | VAL | 3,50 | 50    | 5,71 | 942,0 | 18,79 | -5,42 | -0,36             | 2     | 11    | 3,15   | 3,33   |
| POS        | TR  | 3,50 | 45    | 5,71 | 942,0 | 18,79 | -5,42 | -0,36             | 2     | 11    | 5,67   | 4,37   |
| POS        | TR  | 3,50 | 40    | 5,71 | 942,0 | 18,79 | -5,42 | -0,36             | 2     | 11    | 11,72  | 8,52   |
| POS        | TR  | 4,20 | 60    | 6,11 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 1,37   | 2,84   |
| POS        | TR  | 4,20 | 55    | 6,11 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 2,03   | 3,16   |
| POS        | TR  | 4,20 | 50    | 6,11 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 3,35   | 3,75   |
| POS        | VAL | 4,20 | 45    | 6,11 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 6,17   | 5,45   |
| POS        | VAL | 4,20 | 40    | 6,11 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 13,49  | 12,25  |
| POS        | TR  | 4,80 | 60    | 6,24 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 1,36   | 2,66   |
| POS        | TR  | 4,80 | 55    | 6,24 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 2,07   | 2,98   |
| POS        | TR  | 4,80 | 50    | 6,24 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 3,41   | 3,63   |
| POS        | TR  | 4,80 | 45    | 6,24 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 6,22   | 5,56   |
| POS        | TR  | 4,80 | 40    | 6,24 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 13,29  | 13,53  |
| POS        | TR  | 5,40 | 60    | 6,28 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 1,35   | 2,43   |
| POS        | TR  | 5,40 | 55    | 6,28 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 2,06   | 2,73   |
| POS        | VAL | 5,40 | 50    | 6,28 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 3,39   | 3,35   |
| POS        | VAL | 5,40 | 45    | 6,28 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 6,15   | 5,32   |
| POS        | TR  | 5,40 | 40    | 6,28 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 13,49  | 13,68  |
| POS        | TR  | 6,00 | 60    | 6,29 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 1,27   | 2,22   |
| POS        | TR  | 6,00 | 55    | 6,29 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 1,95   | 2,49   |
| POS        | TR  | 6,00 | 50    | 6,29 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 3,17   | 3,07   |
| POS        | VAL | 6,00 | 45    | 6,29 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 5,84   | 4,99   |
| POS        | TR  | 6,00 | 40    | 6,29 | 931,7 | 18,79 | -4,42 | 0,65              | 1     | 12    | 12,41  | 13,40  |
| ITR        | TR  | 3,50 | 60    | 7,92 | 883,3 | 18,82 | 0,43  | 6,74              | 1     | 11    | 3,38   | 3,35   |
| ITR        | TR  | 3,50 | 55    | 7,92 | 883,3 | 18,82 | 0,43  | 6,74              | 1     | 11    | 5,62   | 7,66   |
| ITR        | TR  | 3,50 | 50    | 7,92 | 883,3 | 18,82 | 0,43  | 6,74              | 1     | 11    | 10,26  | 10,07  |
| ITR        | TR  | 3,50 | 45    | 7,92 | 883,3 | 18,82 | 0,43  | 6,74              | 1     | 11    | 19,99  | 18,58  |
| ITR        | TR  | 3,50 | 40    | 7,92 | 883,3 | 18,82 | 0,43  | 6,74              | 1     | 11    | 45,30  | 45,29  |
| ITR        | VAL | 4,20 | 60    | 8,31 | 924,7 | 18,82 | 0,57  | -0,29             | 0     | 12    | 3,58   | 4,99   |
| ITR        | TR  | 4,20 | 55    | 8,31 | 924,7 | 18,82 | 0,57  | -0,29             | 0     | 12    | 5,90   | 6,16   |
| ITR        | TR  | 4,20 | 50    | 8,31 | 924,7 | 18,82 | 0,57  | -0,29             | 0     | 12    | 10,70  | 9,46   |
| ITR        | TR  | 4,20 | 45    | 8,31 | 924,7 | 18,82 | 0,57  | -0,29             | 0     | 12    | 21,72  | 22,00  |

| Jedinjenje | Set | pH   | % AcN | logD | SAS   | MR    | DEN  | NON<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | k(exp) | k(ANN) |
|------------|-----|------|-------|------|-------|-------|------|-------------------|-------|-------|--------|--------|
| ITR        | TR  | 4,20 | 40    | 8,31 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 53,40  | 54,40  |
| ITR        | TR  | 4,80 | 60    | 8,44 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 3,57   | 4,60   |
| ITR        | TR  | 4,80 | 55    | 8,44 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 6,04   | 5,78   |
| ITR        | TR  | 4,80 | 50    | 8,44 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 11,04  | 9,19   |
| ITR        | VAL | 4,80 | 45    | 8,44 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 22,66  | 22,40  |
| ITR        | TR  | 4,80 | 40    | 8,44 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 53,34  | 54,76  |
| ITR        | TR  | 5,40 | 60    | 8,48 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 3,56   | 4,10   |
| ITR        | TR  | 5,40 | 55    | 8,48 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 6,00   | 5,19   |
| ITR        | TR  | 5,40 | 50    | 8,48 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 10,96  | 8,47   |
| ITR        | VAL | 5,40 | 45    | 8,48 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 22,22  | 21,50  |
| ITR        | TR  | 5,40 | 40    | 8,48 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 55,00  | 53,01  |
| ITR        | VAL | 6,00 | 60    | 8,49 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 3,39   | 3,61   |
| ITR        | VAL | 6,00 | 55    | 8,49 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 5,73   | 4,60   |
| ITR        | TR  | 6,00 | 50    | 8,49 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 10,32  | 7,69   |
| ITR        | TR  | 6,00 | 45    | 8,49 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 20,90  | 20,32  |
| ITR        | TR  | 6,00 | 40    | 8,49 | 924,7 | 18,82 | 0,57 | -0,29             | 0     | 12    | 49,00  | 50,75  |
| VOR        | TR  | 3,50 | 60    | 1,28 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,74   | 0,60   |
| VOR        | TR  | 3,50 | 55    | 1,28 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,82   | 0,61   |
| VOR        | TR  | 3,50 | 50    | 1,28 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,17   | 0,64   |
| VOR        | TR  | 3,50 | 45    | 1,28 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,61   | 0,71   |
| VOR        | TR  | 3,50 | 40    | 1,28 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 2,34   | 0,98   |
| VOR        | TR  | 4,20 | 60    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,74   | 0,61   |
| VOR        | TR  | 4,20 | 55    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,92   | 0,61   |
| VOR        | TR  | 4,20 | 50    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,19   | 0,63   |
| VOR        | TR  | 4,20 | 45    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,64   | 0,68   |
| VOR        | TR  | 4,20 | 40    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 2,38   | 0,89   |
| VOR        | TR  | 4,80 | 60    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,71   | 0,63   |
| VOR        | VAL | 4,80 | 55    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,89   | 0,63   |
| VOR        | VAL | 4,80 | 50    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,17   | 0,65   |
| VOR        | TR  | 4,80 | 45    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,60   | 0,69   |
| VOR        | TR  | 4,80 | 40    | 1,30 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 2,39   | 0,90   |
| VOR        | VAL | 5,40 | 60    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,71   | 0,73   |
| VOR        | VAL | 5,40 | 55    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,90   | 0,71   |
| VOR        | TR  | 5,40 | 50    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,18   | 0,72   |
| VOR        | TR  | 5,40 | 45    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,58   | 0,78   |
| VOR        | VAL | 5,40 | 40    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 2,33   | 1,08   |
| VOR        | TR  | 6,00 | 60    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,70   | 0,95   |
| VOR        | TR  | 6,00 | 55    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 0,88   | 0,92   |
| VOR        | VAL | 6,00 | 50    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,16   | 0,93   |
| VOR        | TR  | 6,00 | 45    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75 | -5,63             | 1     | 8     | 1,61   | 1,05   |

| Jedinjenje | Set  | pH   | % AcN | logD | SAS   | MR    | DEN   | NON<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | k(exp) | k(ANN) |
|------------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|--------|--------|
| VOR        | TR   | 6,00 | 40    | 1,31 | 450,4 | 8,35  | 2,75  | -5,63             | 1     | 8     | 2,33   | 1,71   |
| KLO        | TR   | 3,50 | 60    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 2,06   | 2,22   |
| KLO        | TR   | 3,50 | 55    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 2,46   | 2,34   |
| KLO        | TR   | 3,50 | 50    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 3,19   | 2,71   |
| KLO        | TR   | 3,50 | 45    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 4,27   | 3,67   |
| KLO        | VAL  | 3,50 | 40    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 6,27   | 6,67   |
| KLO        | TR   | 4,20 | 60    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 3,07   | 3,73   |
| KLO        | VAL  | 4,20 | 55    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 4,11   | 4,20   |
| KLO        | TR   | 4,20 | 50    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 5,93   | 5,18   |
| KLO        | TR   | 4,20 | 45    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 8,89   | 7,56   |
| KLO        | VAL  | 4,20 | 40    | 4,80 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 14,44  | 15,05  |
| KLO        | VAL  | 4,80 | 60    | 4,83 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 3,39   | 4,43   |
| KLO        | TR   | 4,80 | 55    | 4,83 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 4,97   | 5,24   |
| KLO        | TR   | 4,80 | 50    | 4,83 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 7,68   | 6,82   |
| KLO        | TR   | 4,80 | 45    | 4,83 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 12,48  | 10,70  |
| KLO        | TR   | 4,80 | 40    | 4,83 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 21,98  | 23,14  |
| KLO        | TR   | 5,40 | 60    | 4,92 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 3,48   | 4,47   |
| KLO        | TR   | 5,40 | 55    | 4,92 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 5,12   | 5,39   |
| KLO        | TR   | 5,40 | 50    | 4,92 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 8,11   | 7,17   |
| KLO        | TR   | 5,40 | 45    | 4,92 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 13,56  | 11,67  |
| KLO        | TR   | 5,40 | 40    | 4,92 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 25,90  | 26,80  |
| KLO        | TR   | 6,00 | 60    | 5,14 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 3,31   | 4,26   |
| KLO        | TR   | 6,00 | 55    | 5,14 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 4,95   | 5,15   |
| KLO        | TR   | 6,00 | 50    | 5,14 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 7,82   | 6,86   |
| KLO        | TR   | 6,00 | 45    | 5,14 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 13,26  | 11,38  |
| KLO        | TR   | 6,00 | 40    | 5,14 | 480,5 | 10,40 | -1,15 | 3,11              | 1     | 1     | 25,77  | 27,46  |
| EKO        | TEST | 3,50 | 60    | 4,15 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 1,78   | 1,30   |
| EKO        | TEST | 3,50 | 55    | 4,15 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 2,26   | 1,55   |
| EKO        | TEST | 3,50 | 50    | 4,15 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 3,16   | 2,01   |
| EKO        | TEST | 3,50 | 45    | 4,15 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 4,85   | 3,01   |
| EKO        | TEST | 3,50 | 40    | 4,15 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 8,34   | 6,47   |
| EKO        | TEST | 4,20 | 60    | 4,16 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 3,10   | 2,33   |
| EKO        | TEST | 4,20 | 55    | 4,16 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 4,08   | 2,87   |
| EKO        | TEST | 4,20 | 50    | 4,16 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 5,74   | 3,89   |
| EKO        | TEST | 4,20 | 45    | 4,16 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 8,57   | 6,28   |
| EKO        | TEST | 4,20 | 40    | 4,16 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 14,52  | 14,28  |
| EKO        | TEST | 4,80 | 60    | 4,18 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 4,29   | 3,51   |
| EKO        | TEST | 4,80 | 55    | 4,18 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 6,29   | 4,64   |
| EKO        | TEST | 4,80 | 50    | 4,18 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 9,62   | 6,93   |
| EKO        | TEST | 4,80 | 45    | 4,18 | 523,5 | 9,95  | 2,21  | -0,43             | 1     | 4     | 14,07  | 12,66  |

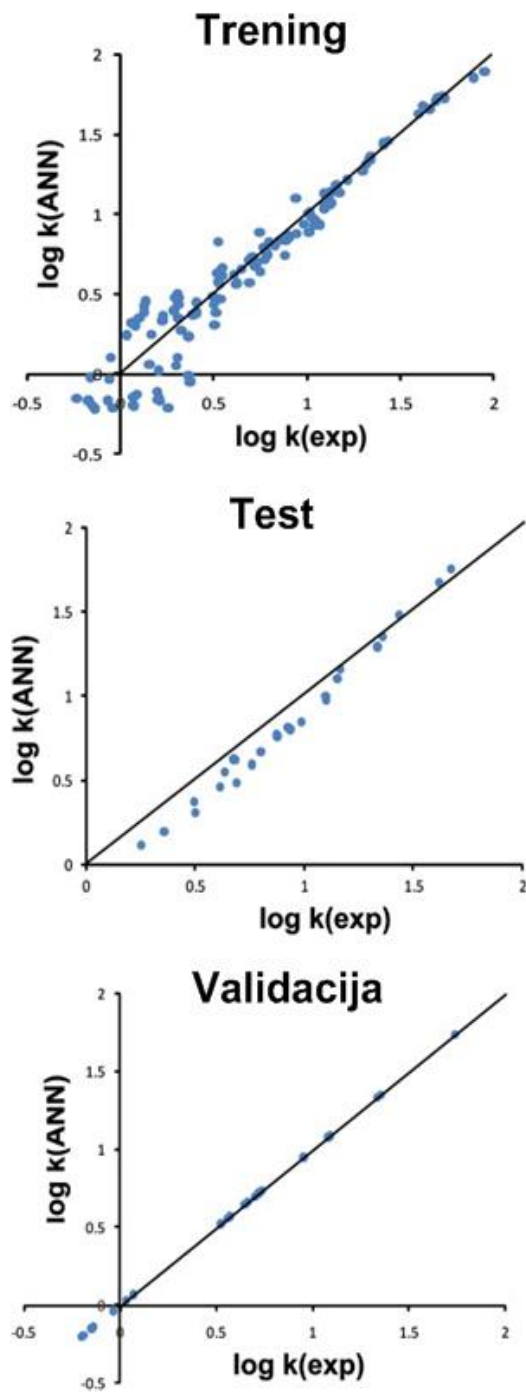


| Jedinjenje | Set  | pH   | % AcN | logD | SAS   | MR   | DEN  | NON<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | k(exp) | k(ANN) |
|------------|------|------|-------|------|-------|------|------|-------------------|-------|-------|--------|--------|
| EKO        | TEST | 4,80 | 40    | 4,18 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 26,99  | 29,99  |
| EKO        | TEST | 5,40 | 60    | 4,25 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 4,80   | 4,15   |
| EKO        | TEST | 5,40 | 55    | 4,25 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 7,48   | 5,75   |
| EKO        | TEST | 5,40 | 50    | 4,25 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 12,48  | 9,37   |
| EKO        | TEST | 5,40 | 45    | 4,25 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 21,51  | 19,43  |
| EKO        | TEST | 5,40 | 40    | 4,25 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 41,45  | 47,15  |
| EKO        | TEST | 6,00 | 60    | 4,43 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 4,72   | 4,18   |
| EKO        | TEST | 6,00 | 55    | 4,43 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 7,42   | 5,86   |
| EKO        | TEST | 6,00 | 50    | 4,43 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 12,46  | 9,92   |
| EKO        | TEST | 6,00 | 45    | 4,43 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 22,76  | 22,47  |
| EKO        | TEST | 6,00 | 45    | 4,43 | 523,5 | 9,95 | 2,21 | -0,43             | 1     | 4     | 46,69  | 56,31  |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Talanta 100 (2012) 329–337)

#### 4.1.4. Poređenje sa MLR

MLR je kao najprimenjenija linearna tehnika odabrana radi poređenja uspešnosti predviđanja odgovora sa dobijenim QSRR-ANN modelom. MLR zahteva samo dva seta podataka: trening set koji služi za formiranje (konstrukciju) modela i test set kojim se proverava sposobnost predviđanja odgovora. Stoga su trening i validacioni set upotrebljeni za ANN modelovanje ovde činili trening set ( $n = 150$ ), dok je test set iz ANN modela zadržan kao takav ( $n = 25$ ). Kao značajni faktori pokazali su se %ACN, DEN, pH, H-don i MR, prema opadajućoj značajnosti regresionog koeficijenta ( $p < 0,05$ ). Postupna MLR dala je loše rezultate:  $R^2$  za trening set bio je 0,564, uz  $F = 20,18$ . Sposobnost predviđanja mreže proverena je kroz test set (ekonazol) i dobijena je vrednost  $R^2$  od 0,692. Ovi rezultati ukazuju na značajnu nelinearnu zavisnost ulaznih i izlazne promenljive, gde ANN pokazuju mnogo bolje rezultate od MLR.



Slika 12. Grafički prikaz slaganja eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih faktora  $k(\text{exp})$  i retencionih faktora koje predviđa optimalna mreža  $k(\text{ANN})$  ispitivanih azola

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Talanta 100 (2012) 329–337)

## 4.2. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu za potrebe razvoja *stability-indicating* metode

### 4.2.1. Studije forsirane degradacije

Tabela 14. Procenti degradacije i degradacioni proizvodi dobijeni pod finalnim stres uslovima

| Stres agens   | Koncentracija stress agensa       | Uslovi izlaganja | Trajanje izlaganja | Procenat degradacije | Dobijeni degradacioni proizvodi |
|---|-----------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|---------------------------------|
| <i>Hidroliza</i>  |                                   |                  |                    |                      |                                 |
| Kisela  | 1M HCl                            | 70 °C            | 5 h                | 12,4%                | DPI-DPVI                        |
| Neutralna   | H <sub>2</sub> O                  |                  | 24 h               | 16,8%                |                                 |
| Bazna   | 0,01 M NaOH                       |                  | 5 h                | 7,2%                 |                                 |
| <i>Oksidacija</i>   | 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |                  | 3 d                | 2,5%                 | DPI                             |
| <i>Fotoliza 8500 lx fluorescentna i 0,05W/m<sup>2</sup> UV svetlost</i> |                                   |                  |                    |                      |                                 |
| Kisela  | 0,01 M HCl                        |                  | 7 d + 7 d          | 23,2%                | DPII, DPVII                     |
| Neutralna   | H <sub>2</sub> O                  |                  | 7 d + 7 d          | 8,1%                 | DPII, DPVII                     |
| Bazna   | 0,01 M NaOH                       |                  | 7 d + 7 d          | 86,3%                | DPI, DPVII, DPVIII              |
| <i>Fotoliza – dnevna svetlost</i>                                       |                                   |                  | 14 d               | 16%                  | DPI, DPVII                      |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, *Chemometr. Intell. Lab. 140* (2015) 92–101)

Procenat degradacije kandesatan cileksetila kao API je računat prema jednačini (11), gde je  $P_p(\text{deg})$  površina pika API dobijenog analizom uzorka API podvrgnutoj stres agensu, dok je  $P_p(\text{nulti})$  površina pika API dobijenim analizom uzorka API bez stres agensa.

$$\% \text{ degradacije} = \frac{P_p(\text{nulti}) - P_p(\text{deg})}{P_p(\text{nulti})} \quad (11)$$

Kao što je navedeno u poglavlju 3.3.1., cilj studije forsirane degradacije je pronalaženje uslova koji dovode do umerene degradacije API, 5 – 20 % i identifikacija nastalih proizvoda. Stoga se varira koncentracija stress agensa i/ili trajanje izloženosti stress agensu. Svaki test je sproveden na četiri vrste uzoraka: (i) blanko rastvor bez stress agensa, (ii) blanko podvrgnut stresu na isti način kao rastvor API, (iii) uzorak u nultom trenutku (eng. *zero-time*) koji je sadržao API bez stress agensa i (iv) API podvrgnuta stresu. Poređenjem pikova dobijenim analizom ovih uzoraka, stiče se uvid u kompletnu degradaciju, jer se na ovaj način razlikuju proizvodi dobijeni degradacijom stress agensa ili nečistoće već prisutne u API, u odnosu na

degradacione proizvode API pod ispitivanim stres uslovima [209]. Procenti degradacije i degradacioni proizvodi dobijeni pod finalnim stres uslovima prikazani su u Tabeli 14. Balans mase, koji predstavlja ukupan sadržaj aktivne supstance i degradacionih proizvoda i poželjno je da bude što bliže 100 % kako bi se osiguralo da su svi značajni degradacioni proizvodi uzeti u razmatranje je bio veći od od 97 % pri svim praćenim stres uslovima.

Kao što se može uočiti u Tabeli 14, pod uticajem 1 M HCL na 70 °C u toku 5 h degradira se 12,4 % API, dok se pod uticajem 0,01 M NaOH na 70 °C u toku 5 h degradira 7,2 % API. Za neutralnu degradaciju, potrebno je 24 h izlaganja vodenog rastvora API pri 70 °C da bi se degradiralo 16,8 % API. Pri hidrolizi, formira se šest degradacionih proizvoda, označenih kao DPI-DPVI. Nakon 3 dana izlaganja 30%-tnom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradiralo se svega 2,5 % API, te se zaključuje da je kandesartan cileksetil stabilan na oksidaciju. Jedini degradacioni proizvod koji nastaje je DPI, koji je zapravo proizvod hidrolize. Pri ispitivanju fotolitičke degradacije, API je izložena fluorescentnoj i UV svetlosti u skladu sa ICH vodičima [210]. Pri tome je degradirano 23,2 % API u kiselom rastvoru, 8,1 % u neutralnom rastvoru, i čak 86,3 % u baznom rastvoru nakon 14 dana. Pri kiselim i neutralnim uslovima nastali su DPVI i DPVII, dok se pri baznim uslovima formira i DPVIII. Međutim, lako se zaključuje da je DPVIII zapravo sekundarni degradacioni proizvod koji se formira pri baznoj fotolizi, ili kao proizvod fotodegradacije DPI, ili kao proizvod hidrolize DPVII. Da bi se dobila značajna količina DPVIII, API se mora degradirati daleko više od 20 %, kako bi najpre nastalo dovoljno DPI ili DPVII, a onda dovoljno DPVIII. Stoga se ne očekuje da se DPVIII pojavi u studijama formalne stabilnosti, i isključuje se iz daljeg ispitivanja. Fotoliza od 14 dana pri dnevnoj svetlosti dala je degradaciju od 16 % i proizvode DPI i DPVII. Na Slici 13 prikazane su strukture nastalih degradacionih proizvoda DPI-DPVIII.

Degradacioni proizvodi su identifikovani na osnovu retencionog vremena i spektara jona produkata za DP za koje su standardi bili dostupni (DPVI – DPVI), odnosno spektara jona produkata za DP za koje standardi nisu bili dostupni (DPI, DPVII, DPVIII). S obzirom na ograničenja UHPLC hromatografa spregnutog sa masenim spektrometrom u pogledu protoka mobilne faze (max. 1 mL/min), primenjeni su uslovi dobijeni modelovanjem, uz smanjeni protok od 1 mL/min. API i degradacioni proizvodi snimljeni su u oba ESI

jonizaciona moda. Pozitivan mod se pokazao efikasnijim, što je i očekivano imajući u vidu bazne osobine analita i kiselu mobilnu fazu. Snimljeni su spektri jona produkata pikova hromatograma stres uzoraka pod uslovima navedenim u poglavlju 3.3.2. (Slika 14). Identitet degradacionih proizvoda za koje su referentni standardi bili dostupni (DPII-DPVI) potvrđeni su poređenjem spektara pikova dobijenih na hromatogramu stres uzoraka sa spektrom referentnog standarda sa kojim se datom piku poklapa retenciono vreme na hromatogramu. Za degradacione proizvode za koje odgovarajući referentni standardi nisu bili dostupni (DPI, DPVII, DPVIII), identiteti su potvrđeni poređenjem spektara pikova dobijenih na hromatogramu stres uzoraka sa spektrima dobijenih od strane *Mehta* i saradnika [211].

U literaturi se može naći nekoliko članaka sa ciljem ispitivanja stabilnosti kandesartan cileksetila. Kandesartan cileksetil je podložan baznoj hidrolizi u plazmi do slobodnog kandesartana (DPI) [212]. *Subba Rao* i saradnici [213] su sproveli studije forsirane degradacije i dobili tri degradaciona proizvoda (DPI, DPII i DPV). Međutim, u ovoj studiji, API je bila izložena previše jakim stres agensima pri kiseljoj, baznoj i neutralnoj hidrolizi, dok je, sa druge strane, bila nedovoljno izložena drugim stres uslovima. *Mohan* i saradnici su izveli studije ubrzane i forsirane degradacije i identifikovali pet degradacionih proizvoda (DPII-DPVI) [214]. Ipak, protokol studija forsirane degradacije nije opisan detaljno. Studije su sprovedene u trajanju od 2 nedelje, na povišenoj temperaturi od 60 °C, pri čemu koncentracija kiseline i baze, intenzitet svetlosti kao i procenat degradacije nisu naznačeni. *Mehta* i saradnici [211] su sproveli sveobuhvatnu studiju forsirane degradacije i identifikaciju degradacionih proizvoda primenom HPLC spregnute sa masenim spektrometrom koji meri vreme preleta jona (eng. *Time-of-Flight*, TOF). Oni su dobili i identifikovali degradacione proizvode prikazane na Slici 13, a koji su dobijeni i u ovoj disertaciji. Ipak, autori nisu naznačili procenat degradacije. Može se uočiti da su uslovi koji su primenjeni u ovoj disertaciji bili nešto blaži od onih koje su primenili *Mehta* i saradnici. [211]. To je razumljivo imajući u vidu da je njihov osnovni cilj bio identifikacija svih eventualnih degradacionih proizvoda, te nisu strogo pratili smernice ICH. Razvili su HPLC-UV metodu sa gradijentnim eluiranjem i trajanjem rana od 28 minuta. Ono što je sigurno je

da je dobijena visoka analogija sa rezultatima stres studija sprovedenih od strane *Mehta* i saradnici [211].

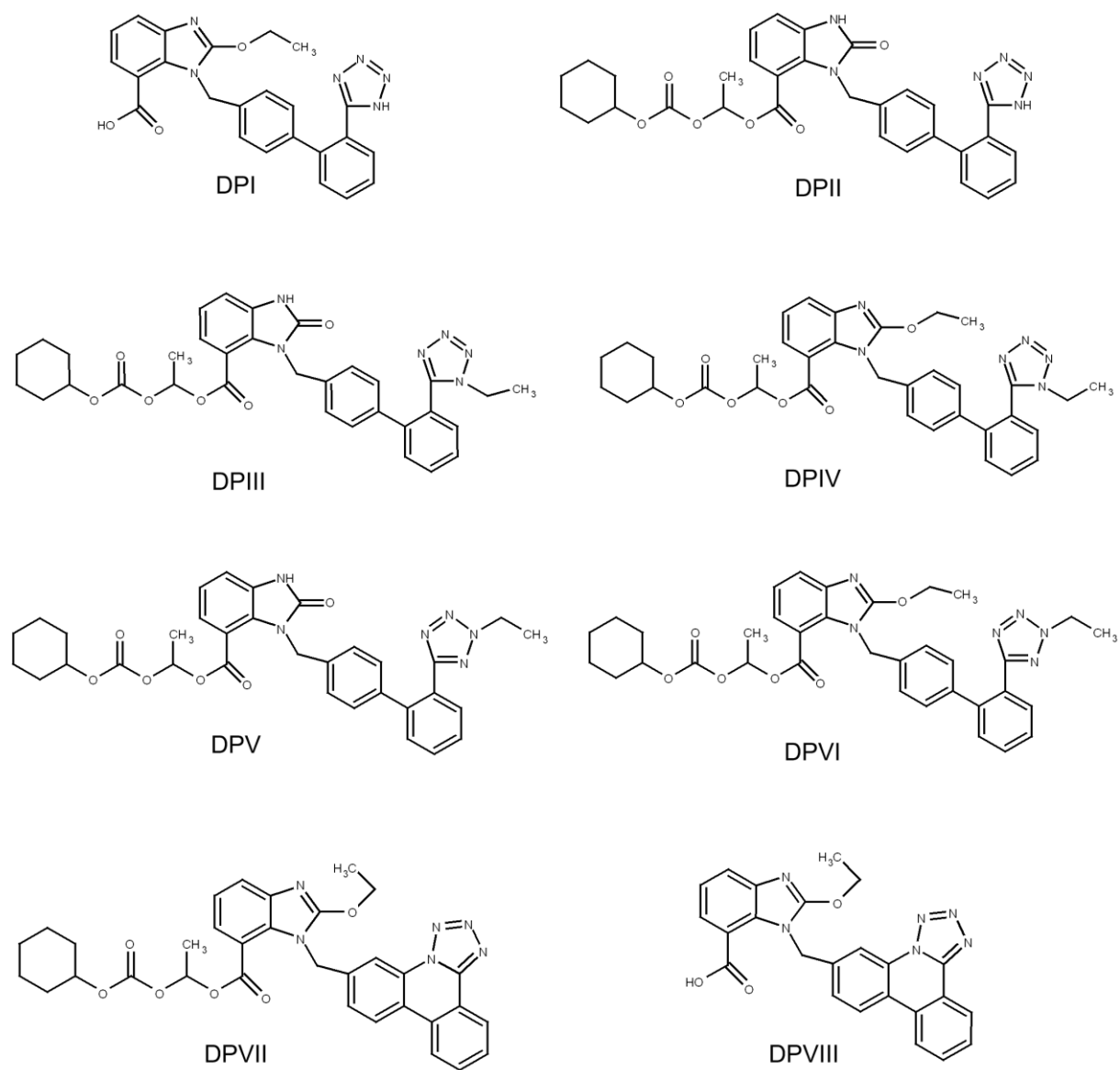
Tabela 15. Koeficijenti korelacije između parova deskriptora

| Deskriptor  | POL  | H-don | H-acc | LUMO | HOMO | SAS  | MA   | SEV  | MR   | NON-1,4 VDW | VDW  | D    | logD |
|-------------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|-------------|------|------|------|
| POL         | 1    |       |       |      |      |      |      |      |      |             |      |      |      |
| H-don       | 0,42 | 1     |       |      |      |      |      |      |      |             |      |      |      |
| H-acc       | 0,79 | -0,42 | 1     |      |      |      |      |      |      |             |      |      |      |
| LUMO        | 0,99 | -0,35 | 0,82  | 1    |      |      |      |      |      |             |      |      |      |
| HOMO        | 0,99 | -0,35 | 0,82  | 1,00 | 1    |      |      |      |      |             |      |      |      |
| SAS         | 0,96 | -0,40 | 0,85  | 0,98 | 0,98 | 1    |      |      |      |             |      |      |      |
| MA          | 0,97 | -0,41 | 0,86  | 0,98 | 0,98 | 1,00 | 1    |      |      |             |      |      |      |
| SEV         | 0,98 | -0,35 | -0,35 | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,99 | 1    |      |             |      |      |      |
| MR          | 1,00 | -0,38 | 0,81  | 1,00 | 1,00 | 0,98 | 0,98 | 0,99 | 1    |             |      |      |      |
| NON-1,4 VDW | 0,60 | -0,18 | 0,32  | 0,62 | 0,62 | 0,61 | 0,59 | 0,59 | 0,63 | 1           |      |      |      |
| VDW         | 0,98 | -0,43 | 0,75  | 0,98 | 0,98 | 0,94 | 0,93 | 0,95 | 0,98 | 0,66        | 1    |      |      |
| D           | 0,95 | -0,22 | 0,80  | 0,98 | 0,98 | 0,97 | 0,95 | 0,96 | 0,97 | 0,67        | 0,94 | 1    |      |
| logD        | 0,83 | -0,54 | 0,88  | 0,84 | 0,84 | 0,89 | 0,93 | 0,89 | 0,84 | 0,35        | 0,68 | 0,76 | 1    |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, *Chemometr. Intell. Lab. 140* (2015) 92–101)

#### 4.2.2. Izbor deskriptora koji učestvuju u građenju modela

Deskriptori sa koeficijentom korelacije većim od 0,95 su isključeni iz ANN modelovanja. Analiza korelacije služi da se ispita da li dva ili više deskriptora nose istu fizičko-hemijsku informaciju i, u tom slučaju, elimiše nekorisni deskriptori, koji su samo dodatno opterećenje za mreže. U Tabeli 15 prikazani su koeficijenti korelacije ispitivanih molekulskih deskriptora. Stoga, deskriptori koji su uključeni u ANN modelovanje bili su POL, NON-1,4 VDW, H-don i H-acc i logD.



Slika 13. Strukture degradacionih proizvoda kandesartan cileksetila

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, *Chemometr. Intell. Lab.* 140 (2015) 92–101)

### 4.2.3. Izbor značajnih hromatografskih faktora za građenje ANN modela

Ispitivano je ukupno 5 faktora: udeo (procenat) organskog rastvarača u mobilnoj fazi (ACN), pH vodenog dela mobilne faze (pH), temperatura kolone (T), molaritet acetatnog pufera i protok mobilne faze. Vodeni deo mobilne faze predstavlja amonijum acetat određenog molariteta čija je pH podešena dodatkom sirćetne kiseline ili amonijum hidroksida. Statistički značaj ispitivanih faktora je procenjen u odnosu na retencioni faktor (k) API i degradacionih proizvoda, kao izlaznu promenljivu modela. Uticaj svakog od faktora je procenjen primenom Studentovog t-testa za odgovarajuću p-vrednost. U Tabeli 16 prikazani su eksperimentalni domen i ispitivanih parametara prema  $2^{5-1}$  FFD dizajnu. Kritična t-vrednost za nivo značajnosti 0,05 za 3 stepena slobode je 3,182. Svi faktori čije su apsolutne vrednosti standardizovanih efekata bile iznad kritične t-vrednosti smatraju se statistički značajnim, i obrnuto. Na Slici 15 su prikazani *Pareto* dijagrami efekata ispitivanih faktora. Procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodenog dela mobilne faze i molaritet pufera su pokazali statistički značajan uticaj na retenciju ispitivanih analita, dok je temperatura kolone značajno uticala na retenciono ponašanje nekih analita. Stoga su ovi faktori odabrani za građenje modela primenom ANN. Na osnovu dobijenih rezultata, odlučeno je da se protok održava konstantnim na 1,5 mL/min.

Tabela 16. Vrednosti nivoa faktora za frakcioni faktorski dizajn

| Faktor                  | Nivo |     |    |
|-------------------------|------|-----|----|
|                         | -1   | 0   | 1  |
| ACN (%)                 | 50   | 60  | 70 |
| pH                      | 3    | 4.5 | 6  |
| Molaritet pufera (mM)   | 5    | 15  | 25 |
| Temperatura kolone (°C) | 20   | 30  | 40 |
| Protok (mL/min)         | 1    | 1,5 | 2  |

(Prilagođeno iz: J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Chemometr. Intell. Lab. 140 (2015) 92–101)

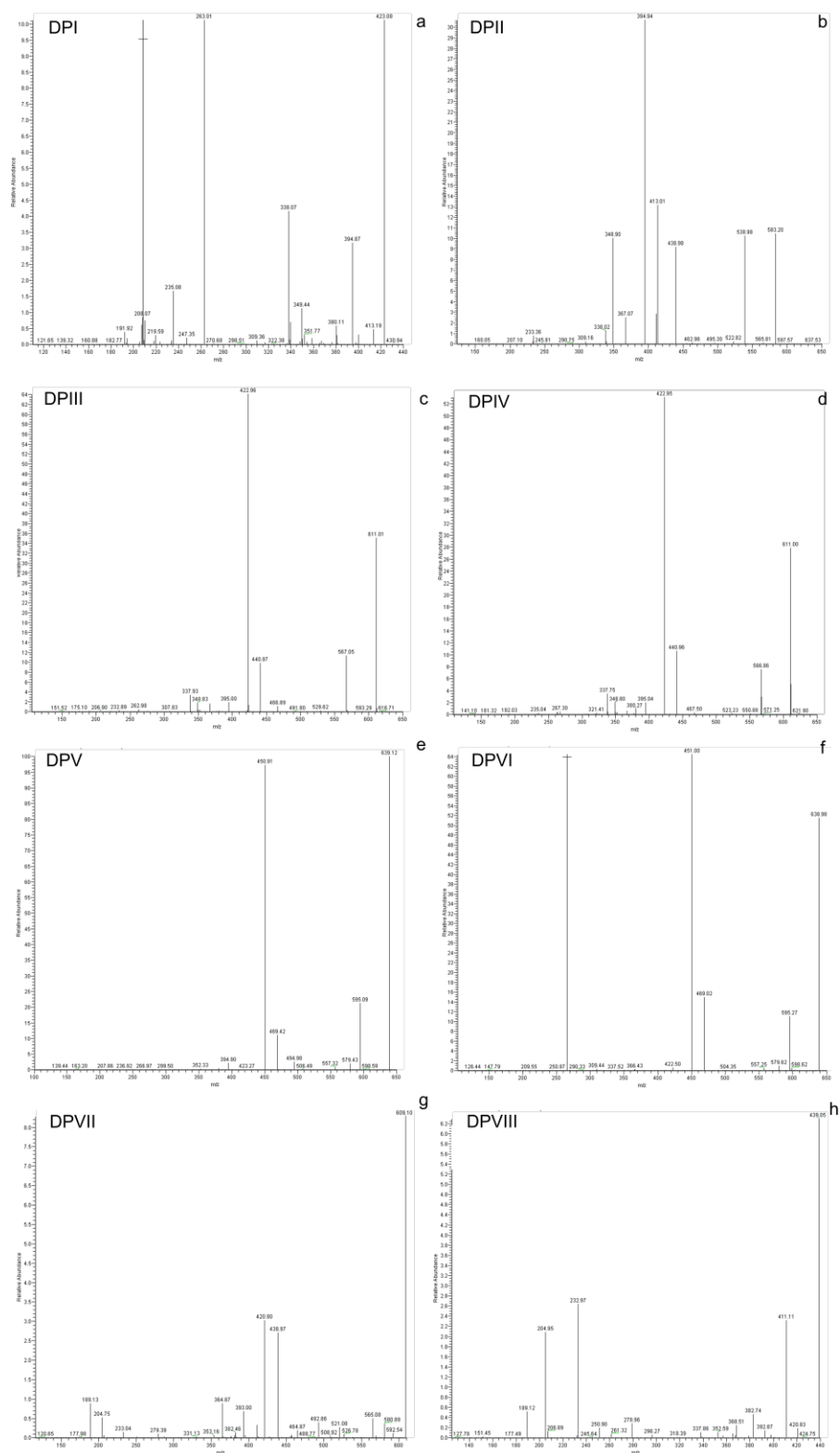


#### 4.2.4. ANN modelovanje

Eksperimentalni plan variranja značajnih hromatografskih parametara, koji je odredio slučajevne ANN modela dobijen je primenom optimizacionog tipa dizajna, *Box-Behnken* dizajna. Najpre je postavljen dizajn sa eksperimentalnim domenima ispitivanih parametara prikazanim u Tabeli 17 (*Box-Behnken* dizajn I). Međutim, nijedan eksperiment nije pružio zadovoljavajuću retenciju analita koji se najslabije zadržava na koloni (DPI), tj.  $k(DPI)$  je pri svim eksperimentalnim uslovima bio manje od 1. Stoga je postavljen još jedan dizajn (*Box-Behnken* dizajn II) sa eksperimentalnim domenima ispitivanih parametara prikazanim u Tabeli 17. U drugom dizajnu donji nivo pH vodenog dela mobilne faze je 2,4, kiselij za 0,4 pH jedinice u odnosu na prvi dizajn. DPI predstavlja kandesartan, kiselinu koja se formira hidrolizom kandesartan cileksetila. Jonizacija će pri nižem pH tj, kiselijem rastvoru biti suzbijena, te će dominirati nejonizvan oblik DPI koji se jače vezuje za nepolarnu stacionarnu fazu. Pošto se temperatura kolone pokazala delimično značajnim faktorom u ispitivanju primenom FFD dizajna u prethodnom poglavlju, a varirana je u *Box-Behnken* dizajnu I, isključena je iz *Box-Behnken* dizajna II, kako bi se smanjio broj dodatnih eksperimenata. Na ovaj način dobijen je dovoljno veliki prostor podataka, koji je potreban za uspešno treniranje mreže. S obzirom da je cilj modelovanja bio separacija i zadovoljavajuća retencija poznatih jedinjenja, sva jedinjenja su učestvovala u svim setovima podataka. Ukupno je dobijeno 344 slučajeva za ANN modelovanje, koji su nasumično podeljeni na trening- ( $n = 280$ ), validacioni- ( $n = 32$ ) i test set ( $n = 32$ ). Podela na trening, validacioni i test set je izvršena nasumično. Optimizacija topologije i parametara treninga mreže (stopa učenja, momentum, broj epoha, tip aktivacione i prenosne funkcije itd.) rađena je po principu pokušaja i pogreške u cilju minimizacije RMSE validacionog seta. Sem RMSE, kriterijum za odabir optimalne mreže bio je i koeficijent korelacije između eksperimentalno dobijenih odgovora i odgovora dobijenih predviđanjem od strane mreže. Na početku treninga, težinama i *bias*-u se nasumično dodeljuje neka vrednost između -1 i +1. Najbolje rezultate dala je MLP mreža koja se sastoji od četiri sloja: ulaznog, dva skrivena i izlaznog, sa po pet neurona u svakom skrivenom sloju (Slika 16). Ovakva topologija se kraće prikazuje 9-5-5-1. Devet predstavlja broj ulaznih neurona: četiri hromatografska parametra

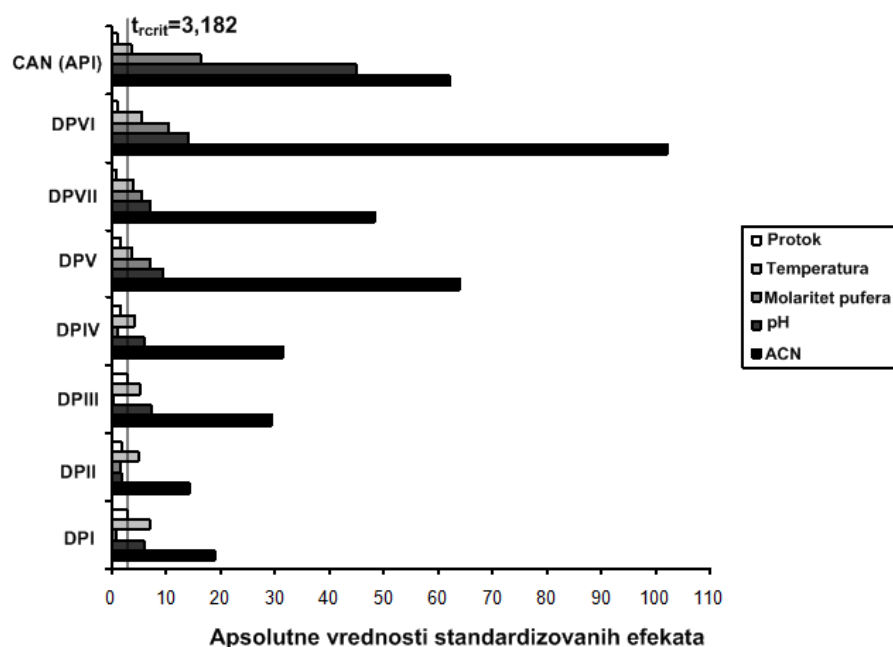
(%ACN, T kolone, pH i molaritet pufera) i 5 molekulskih deskriptora (POL, NON-1,4 VDW, H-don, H-acc i log D). Sigmoidalna (logistička) funkcija postavljena kao prenosna funkcija u oba skrivena i izlaznom sloju. Optimalni rezultati dobijeni su mrežom treniranom algoritmom ponovnog prolaska greške sa stopom učenja od 0,6 i mometumom od 0,1. Stalni rast greške validacije je bio kriterijum za zaustavljanje procesa treniranja, te je broj epoha koji je bio potreban za treniranje mreže 20 000. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori, kao i odgovori koje predviđa optimalna mreža prikazani su u Tabeli 18. RMSE treninga, validacije i testa bili su 0,4242, 0,6177 i 0,6763, redom. Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) između eksperimentalno dobijenih vrednosti odgovora –  $k(\text{exp})$  i vrednosti odgovora koje predviđa mreža –  $k(\text{ANN})$  je 0,9993, 0,9969 i 0,99561 za trening, validaciju i test, redom. Visoka vrednost  $R^2$  i niska vrednost RMSE trening i validacionog seta ukazuju na dobru deskriptivnu sposobnost mreže. Sa druge strane, visoka vrednost  $R^2$  i niska vrednost RMSE test seta ukazuju na dobru sposobnost predviđanja, kao i to da nije došlo do pretreniranja mreže.

Na Slici 17a-c prikazani su grafici slaganja  $k(\text{exp})$  i  $k(\text{ANN})$ , uz predstavljanje jednačine idealnog slaganja,  $y = x$ . Pokazana je visoka stopa slaganja  $k(\text{exp})$  i  $k(\text{ANN})$  u celom opsegu vrednosti retencionih faktora, što je važno, jer je za optimizaciju metode potrebno predvideti retenciono ponašanje API i svih degradacionih proizvoda.



Slika 14. Spektri jona produkata degradacionih proizvoda DPI-DPVIII

(Preuzeto iz: J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Chemometr. Intell. Lab. 140 (2015) 92–101)

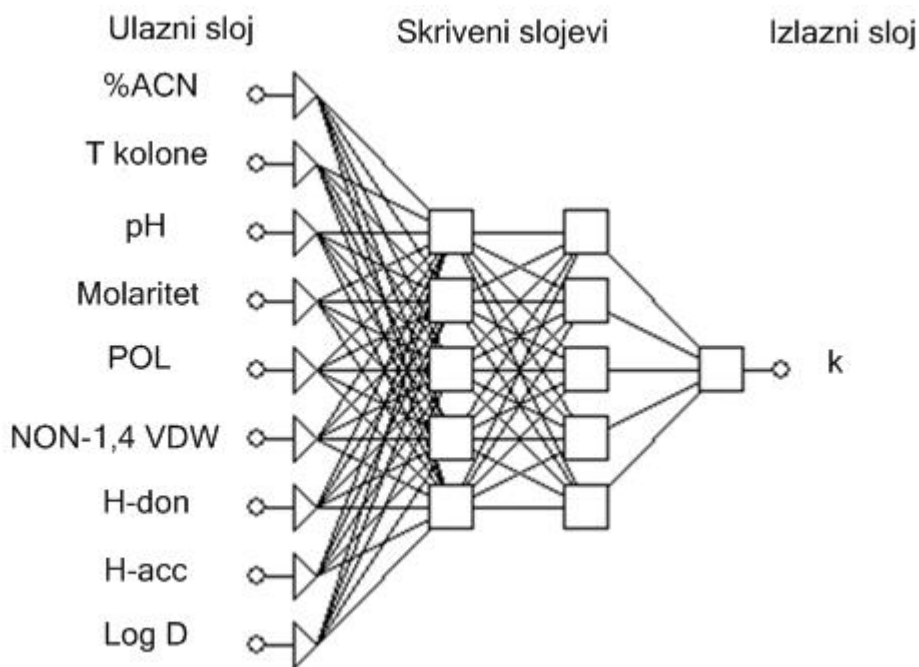


Slika 15. Apsolutne vrednosti standardizovanih efekata ispitivanih faktora na retenciju azola.

Tabela 17. Vrednosti faktora na različitim nivoima *Box-Behnken* dizajna

| <i>Box-Behnken</i> dizajn I |      |     |     | <i>Box-Behnken</i> dizajn II |      |      |     |
|-----------------------------|------|-----|-----|------------------------------|------|------|-----|
| Faktor                      | Nivo |     |     | Faktor                       | Nivo |      |     |
|                             | -1   | 0   | 1   |                              | -1   | 0    | 1   |
| ACN (%)                     | 50   | 55  | 60  | ACN (%)                      | 45   | 52,5 | 60  |
| pH                          | 2,8  | 3,8 | 4,8 | pH                           | 2,4  | 3,8  | 5,2 |
| Molaritet pufera (mM)       | 5    | 15  | 25  | Molaritet pufera (mM)        | 5    | 15   | 25  |
| T kolone (°C)               | 20   | 30  | 40  |                              |      |      |     |

(Prilagođeno iz: J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, *Chemometr. Intell. Lab.* 140 (2015) 92–101)



Slika 16. Grafički prikaz optimalne mreže, topologije: 9-5-5-1

(Prilagodeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, ChemomeTR Intell. Lab. 140 (2015) 92–101)

Optimizacija HPLC metode sadržala je tri zahteva koje je trebalo ispuniti: (i) retencioni faktor DPI kao analita koji se najkraće zadržava na koloni veći od 1, (ii) zadovoljavajuća rezolucija između svih susednih pikova i (iii) retencioni faktor analita koji se najduže zadržava na koloni (DPVI) što je moguće manji, kako bi vreme trajanja rana bilo što kraće. Pregledom hromatograma u toku celog eksperimentalnog rada uočeno je dobro razdvajanje svih parova pikova, sem para API-DPIII. Pri pH vodenog dela mobilne faze od 3,8 ova dva jedinjenja su koeluirala. Stoga je opseg pH 3,5 – 4,2 isključen iz dalje optimizacije metode. Za pronalaženje optimalnih hromatografskih uslova korišćena je metodologija površine odgovora (RSM), uz dva cilja: minimiziranje retencionog faktora DPVI ( $k(DPVI)$ ) i maksimiziranje retencionog faktora DPI ( $k(DPI)$ ). Površina odgovora-retencionog faktora DPVI koga predviđa izabrana optimalna mreže u odnosu na dva najuticajnija faktora – %ACN i pH prikazani su na Slici 18a. Vrednost  $k$  raste sa opadanjem %ACN i sa rastom pH, što je početna smernica u optimizaciji. Površina odgovora  $k(DPI)$  koju predviđa mreža u ispitivanom opsegu %ACN i pH prikazana je na Slici 18b. Kada se

bira opseg vrednosti ulaznih promenljivih modela (faktora) koji ispunjava kriterijume optimizacije, treba uvek računati na grešku modela. Stoga optimalna kombinacija faktora treba da da rešenje koje je što više iznad minimuma prihvatljivosti u pogledu navedenih zahteva. Nakon detaljnog ispitavanja površina odgovora, za optimalnu kombinaciju faktora odabrani su sledeći uslovi: mobilna faza koja se sastoji od 47 % acetonitrila i 53 % 5 mM amonijum acetata kome je podešen pH na 2,5 sirćetnom kiselinom, temperatura kolone od 20 °C i protok 1,5 mL/min. Hromatogram smeše stres uzoraka, koja sadrži API i sve degradacione proizvode koji se prate, dobijen pri optimalnim uslovima prikazan je na Slici 19. Slaganje  $k(ANN)$  i  $k(exp)$  pri ovim uslovima prikazano je na Slici 17d. Primećuje se nešto slabije predviđanje, tj. nešto više vrednosti ekperimentalno dobijenih retencionih faktora u odnosu na retencione faktore koje prediđa optimalna mreža za analite koji se duže zadržavaju na koloni. Ipak, dobijena je visoka korelacija ( $R^2 = 0,9984$ ), što obezbeđuje zadovoljavajuću rezoluciju između pikova. Dva preostala zahteva su takođe ispunjeni:  $k(DPI)$  je 1,19, uz vreme trajanja rana od 27 minuta.

U poređenju sa metodom *Mehta* i saradnika [211], vreme trajanja analitičkog rana metode razvijene u okviru ove disertacije je neznatno skraćeno – sa 28 na 27 minuta. Prednosti nove metode nalaze se u izokraskom umesto gradijentnog eluiranja i primeni acetatnog umesto fosfatnog pufera čime je omogućena primena metode sa masenim spektrometrom kao detektorom (LC-MS). Postavljeni QSRR model ima potencijal u predviđanju novog analita srodne strukture – nečistoća, degradacionih proizvoda ili metabolita.

Tabela 18. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori –  $k(exp)$ , i odgovori koje prediđa optimalna mreža –  $k(ANN)$  za kandesartan cileksetil i njegove degradacione proizvode

| Jedinjenje | Set  | %ACN | pH  | Molaritet | T<br>Kolone | POL   | NON-<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | logD | $k(exp)$ | $k(ANN)$ |
|------------|------|------|-----|-----------|-------------|-------|--------------------|-------|-------|------|----------|----------|
| DPI        | TEST | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,35 | 0,80     | 0,895    |
| DPI        | TR   | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,35 | 0,38     | 0,403    |
| DPI        | TR   | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,06     | 0,031    |
| DPI        | TR   | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,04     | 0,023    |
| DPI        | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,39     | 0,093    |
| DPI        | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,32     | 0,104    |
| DPI        | TEST | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,34     | 0,096    |
| DPI        | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,27     | 0,108    |
| DPI        | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,49     | 0,130    |
| DPI        | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,22     | 0,090    |

| Jedinjenje | Set  | %ACN | pH  | Molaritet | T<br>Kolone | POL   | NON-<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | logD | k(exp) | k(ANN) |
|------------|------|------|-----|-----------|-------------|-------|--------------------|-------|-------|------|--------|--------|
| DPI        | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,43   | 0,135  |
| DPI        | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,18   | 0,092  |
| DPI        | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,35 | 0,62   | 0,582  |
| DPI        | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 48,9  | -1,37              | 2     | 8     | 3,69 | 0,06   | 0,047  |
| DPI        | TR   | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 48,99 | -3,18              | 1     | 8     | 4,35 | 0,51   | 0,238  |
| DPI        | TR   | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,06   | 0,025  |
| DPI        | TR   | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,53   | 0,126  |
| DPI        | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,23   | 0,086  |
| DPI        | TR   | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,46   | 0,139  |
| DPI        | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,19   | 0,097  |
| DPI        | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,35 | 0,58   | 0,577  |
| DPI        | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 48,9  | -1,37              | 2     | 8     | 3,69 | 0,03   | 0,048  |
| DPI        | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 48,99 | -3,18              | 1     | 8     | 4,35 | 0,52   | 0,241  |
| DPI        | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,05   | 0,025  |
| DPI        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,29   | 0,100  |
| DPI        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,30   | 0,100  |
| DPI        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,30   | 0,100  |
| DPII       | TR   | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 4,79   | 5,461  |
| DPII       | TR   | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 1,72   | 1,576  |
| DPII       | TR   | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,64 | 1,93   | 2,845  |
| DPII       | TR   | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,64 | 0,62   | 0,866  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,70   | 2,442  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,53   | 2,315  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,36   | 2,443  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,19   | 2,334  |
| DPII       | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 4,61   | 4,520  |
| DPII       | VAL  | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 1,63   | 1,251  |
| DPII       | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 4,18   | 4,545  |
| DPII       | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 1,44   | 1,256  |
| DPII       | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 3,06   | 3,045  |
| DPII       | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,64 | 1,24   | 1,593  |
| DPII       | TR   | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 2,68   | 2,738  |
| DPII       | TR   | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,64 | 1,08   | 1,566  |
| DPII       | TR   | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 4,48   | 4,624  |
| DPII       | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 1,50   | 1,282  |
| DPII       | VAL  | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 4,21   | 4,445  |
| DPII       | VAL  | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 1,42   | 1,228  |
| DPII       | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 2,99   | 2,951  |
| DPII       | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,64 | 1,09   | 1,576  |
| DPII       | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 2,61   | 2,876  |
| DPII       | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,64 | 1,01   | 1,585  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,44   | 2,378  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,43   | 2,378  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,43   | 2,378  |
| DPII       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 2,43   | 2,378  |
| DPIII      | TR   | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 8,28   | 9,225  |
| DPIII      | VAL  | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 2,86   | 3,233  |
| DPIII      | VAL  | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 10,25  | 9,755  |
| DPIII      | TR   | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,35   | 3,153  |
| DPIII      | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,69   | 5,972  |
| DPIII      | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,47   | 5,713  |
| DPIII      | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,29   | 5,385  |
| DPIII      | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 4,85   | 5,188  |
| DPIII      | TEST | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 10,87  | 10,853 |
| DPIII      | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,54   | 3,507  |

| Jedinjenje | Set  | %ACN | pH  | Molaritet | T<br>Kolone | POL   | NON-<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | logD | k(exp) | k(ANN) |
|------------|------|------|-----|-----------|-------------|-------|--------------------|-------|-------|------|--------|--------|
| DPIII      | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 9,53   | 9,775  |
| DPIII      | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,18   | 3,195  |
| DPIII      | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,15   | 5,314  |
| DPIII      | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,81   | 5,321  |
| DPIII      | VAL  | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 4,51   | 4,904  |
| DPIII      | TR   | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,37   | 5,191  |
| DPIII      | TR   | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 9,83   | 10,521 |
| DPIII      | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,19   | 3,386  |
| DPIII      | VAL  | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 9,34   | 10,078 |
| DPIII      | TEST | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,08   | 3,314  |
| DPIII      | VAL  | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,06   | 5,428  |
| DPIII      | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,83   | 5,570  |
| DPIII      | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 4,43   | 4,876  |
| DPIII      | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,30   | 4,963  |
| DPIII      | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,37   | 5,545  |
| DPIII      | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,37   | 5,545  |
| DPIII      | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,37   | 5,545  |
| DPIV       | TR   | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 15,04  | 14,946 |
| DPIV       | TEST | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 4,77   | 5,037  |
| DPIV       | TR   | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 18,44  | 18,969 |
| DPIV       | TR   | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,55   | 5,661  |
| DPIV       | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,90   | 10,319 |
| DPIV       | VAL  | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,50   | 9,757  |
| DPIV       | VAL  | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 8,85   | 9,298  |
| DPIV       | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 8,36   | 8,844  |
| DPIV       | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 18,63  | 18,931 |
| DPIV       | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,97   | 5,809  |
| DPIV       | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 17,19  | 17,032 |
| DPIV       | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,36   | 5,305  |
| DPIV       | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 8,92   | 8,548  |
| DPIV       | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 10,03  | 10,197 |
| DPIV       | TR   | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 7,83   | 7,772  |
| DPIV       | VAL  | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,24   | 9,744  |
| DPIV       | TR   | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 17,73  | 18,397 |
| DPIV       | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,37   | 5,655  |
| DPIV       | TR   | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 16,81  | 17,531 |
| DPIV       | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,18   | 5,460  |
| DPIV       | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 8,81   | 8,716  |
| DPIV       | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 10,09  | 10,499 |
| DPIV       | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 7,62   | 7,729  |
| DPIV       | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,11   | 9,459  |
| DPIV       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,35   | 9,530  |
| DPIV       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,35   | 9,530  |
| DPIV       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,34   | 9,530  |
| DPIV       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 9,33   | 9,530  |
| DPV        | TR   | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,83 | 20,99  | 21,185 |
| DPV        | TR   | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,83 | 6,39   | 6,781  |
| DPV        | TR   | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 26,80  | 26,713 |
| DPV        | VAL  | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 7,68   | 7,558  |
| DPV        | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,66  | 14,404 |
| DPV        | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,08  | 13,549 |
| DPV        | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 12,65  | 13,100 |
| DPV        | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 11,94  | 12,381 |
| DPV        | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 26,35  | 26,718 |
| DPV        | VAL  | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 8,04   | 7,799  |



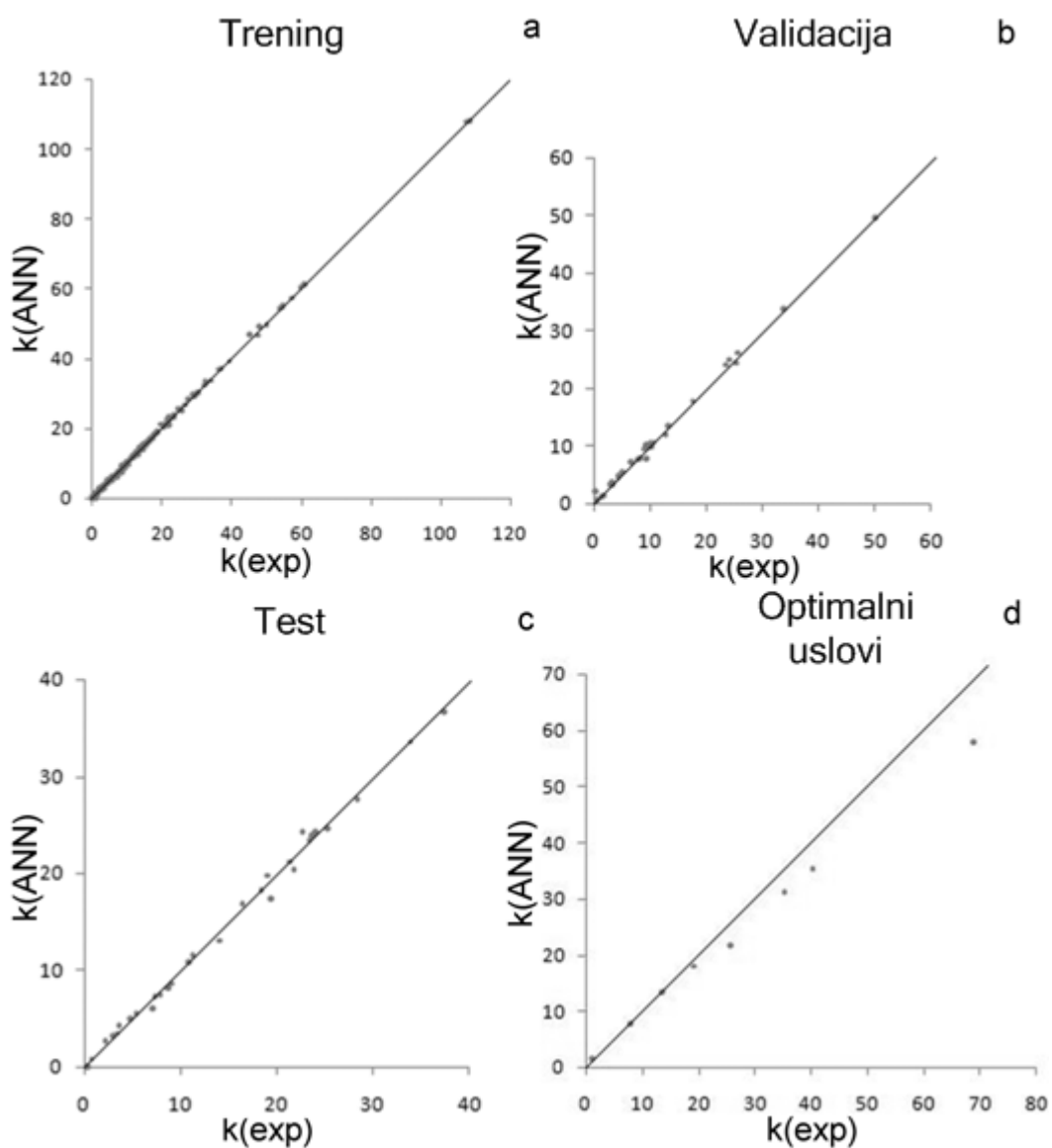
| Jedinjenje | Set  | %ACN | pH  | Molaritet | T<br>Kolone | POL   | NON-<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | logD | k(exp) | k(ANN) |
|------------|------|------|-----|-----------|-------------|-------|--------------------|-------|-------|------|--------|--------|
| DPV        | VAL  | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 25,34  | 24,283 |
| DPV        | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 7,35   | 7,180  |
| DPV        | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,83 | 12,33  | 12,067 |
| DPV        | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 14,17  | 14,185 |
| DPV        | TR   | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,83 | 10,54  | 10,713 |
| DPV        | TR   | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,06  | 13,488 |
| DPV        | VAL  | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 25,62  | 26,060 |
| DPV        | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 7,36   | 7,660  |
| DPV        | VAL  | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 24,15  | 24,903 |
| DPV        | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 7,08   | 7,325  |
| DPV        | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,83 | 11,84  | 12,204 |
| DPV        | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 14,02  | 14,464 |
| DPV        | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,83 | 10,60  | 10,747 |
| DPV        | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,08  | 13,219 |
| DPV        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,14  | 13,334 |
| DPV        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,13  | 13,334 |
| DPV        | VAL  | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,12  | 13,334 |
| DPV        | VAL  | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 13,11  | 13,334 |
| DPVI       | TR   | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,51 | 39,41  | 39,257 |
| DPVI       | TR   | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,51 | 11,11  | 11,651 |
| DPVI       | VAL  | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,55 | 50,21  | 49,573 |
| DPVI       | TR   | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,55 | 13,29  | 12,671 |
| DPVI       | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 24,52  | 25,440 |
| DPVI       | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 23,46  | 23,600 |
| DPVI       | TEST | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 22,65  | 24,310 |
| DPVI       | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 21,32  | 22,553 |
| DPVI       | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 50,08  | 49,538 |
| DPVI       | TEST | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 14     | 13,087 |
| DPVI       | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 47,41  | 46,662 |
| DPVI       | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 12,94  | 12,598 |
| DPVI       | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,51 | 22,23  | 22,159 |
| DPVI       | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,55 | 25,54  | 25,029 |
| DPVI       | TR   | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,51 | 18,98  | 19,114 |
| DPVI       | TEST | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,55 | 23,36  | 23,456 |
| DPVI       | TR   | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 47,85  | 49,095 |
| DPVI       | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 12,75  | 13,288 |
| DPVI       | TR   | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 45,16  | 46,984 |
| DPVI       | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 12,24  | 12,425 |
| DPVI       | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,51 | 21,41  | 21,681 |
| DPVI       | TEST | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,55 | 25,22  | 24,705 |
| DPVI       | TEST | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,51 | 18,97  | 19,776 |
| DPVI       | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,55 | 23,48  | 23,765 |
| DPVI       | TEST | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 23,62  | 23,966 |
| DPVI       | VAL  | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 23,59  | 23,966 |
| DPVI       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 23,63  | 23,966 |
| DPVI       | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 23,63  | 23,966 |
| DPVII      | TEST | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,21 | 24,01  | 24,299 |
| DPVII      | TR   | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,21 | 7,59   | 7,632  |
| DPVII      | TR   | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 30,44  | 30,336 |
| DPVII      | TEST | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 9,06   | 8,697  |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 16,09  | 16,766 |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 15,41  | 15,778 |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 14,52  | 15,233 |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 13,70  | 14,391 |
| DPVII      | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 30,34  | 30,416 |
| DPVII      | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 9,64   | 8,887  |

| Jedinjenje | Set  | %ACN | pH  | Molaritet | T<br>Kolone | POL   | NON-<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | logD | k(exp) | k(ANN) |
|------------|------|------|-----|-----------|-------------|-------|--------------------|-------|-------|------|--------|--------|
| DPVII      | TEST | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 28,35  | 27,706 |
| DPVII      | TEST | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 8,78   | 8,149  |
| DPVII      | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,21 | 14,39  | 13,970 |
| DPVII      | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 16,42  | 16,584 |
| DPVII      | TR   | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,21 | 12,41  | 12,457 |
| DPVII      | TR   | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 15,15  | 15,799 |
| DPVII      | TR   | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 29,05  | 29,593 |
| DPVII      | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 8,72   | 8,736  |
| DPVII      | TR   | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 27,56  | 28,481 |
| DPVII      | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 8,39   | 8,306  |
| DPVII      | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,21 | 13,98  | 14,142 |
| DPVII      | TEST | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 16,45  | 16,934 |
| DPVII      | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,21 | 12,20  | 12,472 |
| DPVII      | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 15     | 15,464 |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 15,28  | 15,517 |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 15,28  | 15,517 |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 15,25  | 15,517 |
| DPVII      | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 15,30  | 15,517 |
| CAN        | TEST | 50   | 2,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,51 | 11,30  | 11,629 |
| CAN        | TEST | 60   | 2,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,51 | 3,65   | 4,399  |
| CAN        | TR   | 50   | 4,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 4,16   | 5,119  |
| CAN        | TR   | 60   | 4,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 1,24   | 1,761  |
| CAN        | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 20          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 5,91   | 5,875  |
| CAN        | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 20          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 5,61   | 5,834  |
| CAN        | TR   | 55   | 3,8 | 5         | 40          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 5,29   | 5,362  |
| CAN        | TR   | 55   | 3,8 | 25        | 40          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 4,97   | 5,374  |
| CAN        | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 20          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 10,87  | 10,986 |
| CAN        | TR   | 60   | 3,8 | 15        | 20          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 3,44   | 3,739  |
| CAN        | TR   | 50   | 3,8 | 15        | 40          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 10,11  | 9,921  |
| CAN        | VAL  | 60   | 3,8 | 15        | 40          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 3,09   | 3,482  |
| CAN        | TR   | 55   | 2,8 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,51 | 6,91   | 6,862  |
| CAN        | TR   | 55   | 4,8 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 2,52   | 2,620  |
| CAN        | TR   | 55   | 2,8 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,51 | 5,87   | 6,172  |
| CAN        | TR   | 55   | 4,8 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 2,26   | 2,760  |
| CAN        | VAL  | 50   | 3,8 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 10,59  | 10,501 |
| CAN        | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 3,06   | 3,577  |
| CAN        | VAL  | 50   | 3,8 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 10,01  | 10,383 |
| CAN        | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 3,03   | 3,646  |
| CAN        | VAL  | 55   | 2,8 | 15        | 20          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,51 | 6,59   | 7,009  |
| CAN        | TEST | 55   | 4,8 | 15        | 20          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 2,25   | 2,815  |
| CAN        | TR   | 55   | 2,8 | 15        | 40          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,51 | 5,81   | 6,153  |
| CAN        | TR   | 55   | 4,8 | 15        | 40          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 2,10   | 2,568  |
| CAN        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 5,46   | 5,601  |
| CAN        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 5,45   | 5,601  |
| CAN        | TR   | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 5,44   | 5,601  |
| CAN        | TEST | 55   | 3,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 5,44   | 5,601  |
| DPI        | TR   | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,43 | 1,04   | 1,181  |
| DPI        | TR   | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,43 | 0,39   | 0,378  |
| DPI        | VAL  | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 48,62 | -1,056             | 0     | 9     | 1,98 | 0,12   | 2,025  |
| DPI        | TR   | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 48,62 | -1,056             | 0     | 9     | 1,98 | 0,09   | 0,294  |
| DPI        | TR   | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,95   | 0,196  |
| DPI        | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,32   | 0,086  |
| DPI        | TR   | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,75   | 0,218  |
| DPI        | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,20   | 0,097  |
| DPI        | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,43 | 0,70   | 0,730  |
| DPI        | TR   | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 48,62 | -1,056             | 0     | 9     | 1,98 | 0,04   | 0,421  |

| Jedinjenje | Set  | %ACN | pH  | Molaritet | T<br>Kolone | POL   | NON-<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | logD | k(exp) | k(ANN) |
|------------|------|------|-----|-----------|-------------|-------|--------------------|-------|-------|------|--------|--------|
| DPI        | VAL  | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 48,99 | -3,18              | 2     | 8     | 4,43 | 0,57   | 0,481  |
| DPI        | TR   | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 48,62 | -1,056             | 0     | 9     | 1,98 | 0,01   | 0,469  |
| DPI        | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,42   | 0,113  |
| DPI        | TEST | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,42   | 0,113  |
| DPI        | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 48,9  | -1,37              | 1     | 8     | 3,69 | 0,40   | 0,113  |
| DPII       | TR   | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 6,87   | 6,782  |
| DPII       | TR   | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 1,56   | 1,385  |
| DPII       | TEST | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 61,09 | 32,215             | 1     | 11    | 6,45 | 3,50   | 3,552  |
| DPII       | TR   | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 61,09 | 32,215             | 1     | 11    | 6,45 | 0,62   | 0,732  |
| DPII       | VAL  | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 9,25   | 7,649  |
| DPII       | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 1,64   | 1,282  |
| DPII       | TR   | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 8,63   | 7,548  |
| DPII       | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 1,49   | 1,228  |
| DPII       | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 3,55   | 3,805  |
| DPII       | TR   | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 61,09 | 32,215             | 1     | 11    | 6,45 | 1,09   | 1,623  |
| DPII       | TR   | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,85 | 2,71   | 2,531  |
| DPII       | TR   | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 61,09 | 32,215             | 1     | 11    | 6,45 | 1,04   | 1,671  |
| DPII       | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 3,40   | 3,310  |
| DPII       | VAL  | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 3,40   | 3,310  |
| DPII       | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 61,37 | 21,878             | 2     | 10    | 6,83 | 3,43   | 3,310  |
| DPIII      | TR   | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 11,51  | 12,326 |
| DPIII      | TR   | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 2,45   | 2,706  |
| DPIII      | TEST | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 19,38  | 17,437 |
| DPIII      | TR   | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,25   | 2,753  |
| DPIII      | TR   | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 19,67  | 21,189 |
| DPIII      | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,41   | 3,386  |
| DPIII      | TR   | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 21,92  | 20,787 |
| DPIII      | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 3,17   | 3,314  |
| DPIII      | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 5,79   | 6,064  |
| DPIII      | TEST | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 7,15   | 6,158  |
| DPIII      | TR   | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 4,51   | 4,302  |
| DPIII      | TR   | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 7,13   | 6,151  |
| DPIII      | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 7,85   | 7,494  |
| DPIII      | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 7,84   | 7,494  |
| DPIII      | TEST | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 64,97 | 496,897            | 1     | 10    | 7,14 | 7,90   | 7,494  |
| DPIV       | TEST | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 21,76  | 20,447 |
| DPIV       | TR   | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 4,08   | 4,136  |
| DPIV       | TR   | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 36,38  | 36,917 |
| DPIV       | TR   | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,39   | 5,254  |
| DPIV       | TR   | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 37,07  | 37,285 |
| DPIV       | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,38   | 5,655  |
| DPIV       | TEST | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 37,36  | 36,686 |
| DPIV       | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 5,44   | 5,460  |
| DPIV       | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 10,28  | 9,641  |
| DPIV       | TR   | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 12,52  | 13,032 |
| DPIV       | TR   | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 7,70   | 6,953  |
| DPIV       | TR   | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 12,44  | 12,670 |
| DPIV       | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 13,05  | 13,013 |
| DPIV       | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 13,04  | 13,013 |
| DPIV       | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 64,96 | 566,402            | 1     | 10    | 6,82 | 13,10  | 13,013 |
| DPV        | TR   | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,78 | 29,36  | 29,371 |
| DPV        | TR   | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,78 | 5,18   | 5,528  |
| DPV        | TR   | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 53,69  | 54,353 |
| DPV        | TR   | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 7,31   | 6,984  |
| DPV        | TR   | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 54,71  | 55,074 |
| DPV        | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 7,29   | 7,660  |

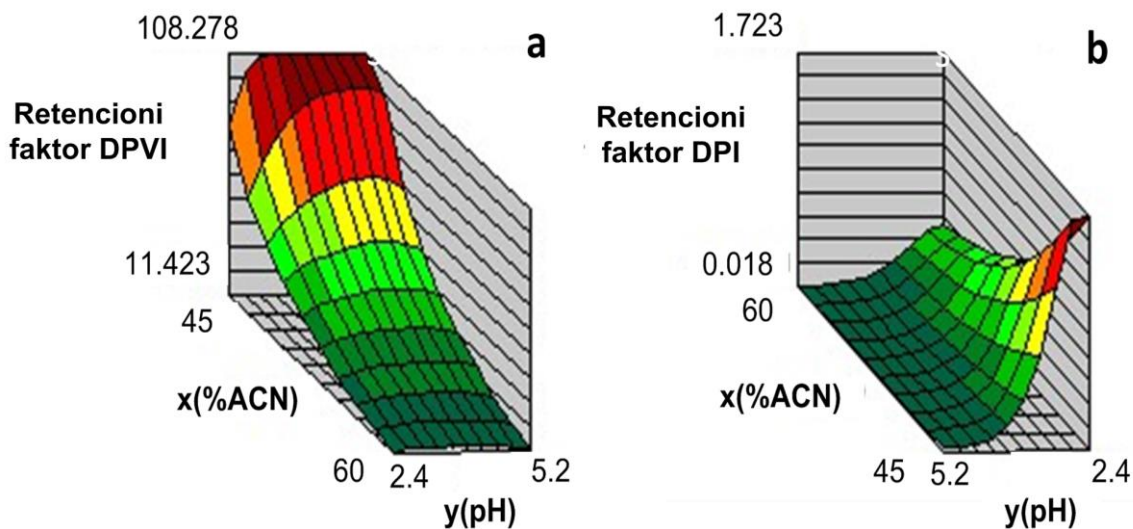
| Jedinjenje | Set  | %ACN | pH  | Molaritet | T<br>Kolone | POL   | NON-<br>1,4<br>VDW | H-don | H-acc | logD | k(exp) | k(ANN)  |
|------------|------|------|-----|-----------|-------------|-------|--------------------|-------|-------|------|--------|---------|
| DPV        | TR   | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 54,55  | 54,725  |
| DPV        | TEST | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 7,39   | 7,325   |
| DPV        | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,78 | 13,74  | 13,831  |
| DPV        | TR   | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 17,70  | 18,250  |
| DPV        | TR   | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,78 | 9,95   | 9,888   |
| DPV        | VAL  | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 17,62  | 17,712  |
| DPV        | TEST | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 18,40  | 18,362  |
| DPV        | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 18,46  | 18,362  |
| DPV        | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 167,673            | 0     | 10    | 7,86 | 18,50  | 18,362  |
| DPVI       | TR   | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,46 | 57,11  | 57,312  |
| DPVI       | TR   | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,46 | 9,06   | 9,503   |
| DPVI       | TR   | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 108,45 | 108,041 |
| DPVI       | VAL  | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 12,73  | 11,946  |
| DPVI       | TR   | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 107,35 | 107,756 |
| DPVI       | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 12,66  | 13,288  |
| DPVI       | TR   | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 108,20 | 107,784 |
| DPVI       | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 12,89  | 12,425  |
| DPVI       | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,46 | 25,41  | 25,845  |
| DPVI       | TR   | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 32,38  | 33,663  |
| DPVI       | TR   | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,46 | 18,19  | 18,854  |
| DPVI       | TR   | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 32,04  | 32,288  |
| DPVI       | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 33,97  | 33,591  |
| DPVI       | VAL  | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 33,83  | 33,591  |
| DPVI       | TEST | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 70,14 | 356,758            | 0     | 10    | 7,54 | 33,87  | 33,591  |
| DPVII      | TR   | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,16 | 32,52  | 32,863  |
| DPVII      | TR   | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,16 | 6,25   | 6,264   |
| DPVII      | TR   | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 59,83  | 60,216  |
| DPVII      | TR   | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 8,74   | 8,075   |
| DPVII      | TR   | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 60,77  | 61,188  |
| DPVII      | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 8,69   | 8,736   |
| DPVII      | TR   | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 60,84  | 61,268  |
| DPVII      | TEST | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 8,80   | 8,306   |
| DPVII      | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,16 | 15,99  | 16,138  |
| DPVII      | TR   | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 20,46  | 21,092  |
| DPVII      | TR   | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,16 | 11,64  | 11,727  |
| DPVII      | TR   | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 20,41  | 20,600  |
| DPVII      | TEST | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 21,30  | 21,236  |
| DPVII      | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 22,03  | 21,236  |
| DPVII      | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 66,48 | 61,711             | 0     | 11    | 7,24 | 20,75  | 21,236  |
| CAN        | TR   | 45   | 2,4 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,46 | 16,23  | 16,410  |
| CAN        | VAL  | 60   | 2,4 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,46 | 3,15   | 3,677   |
| CAN        | TR   | 45   | 5,2 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 7,93   | 7,732   |
| CAN        | TR   | 60   | 5,2 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 1,21   | 1,046   |
| CAN        | TR   | 45   | 3,8 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 23,41  | 22,979  |
| CAN        | TR   | 60   | 3,8 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 3,41   | 3,577   |
| CAN        | TR   | 45   | 3,8 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 21,92  | 23,213  |
| CAN        | TR   | 60   | 3,8 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 3,17   | 3,646   |
| CAN        | TR   | 52,5 | 2,4 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,46 | 7,90   | 7,821   |
| CAN        | TR   | 52,5 | 5,2 | 5         | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 2,10   | 2,111   |
| CAN        | TR   | 52,5 | 2,4 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,46 | 5,78   | 5,435   |
| CAN        | TR   | 52,5 | 5,2 | 25        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 2,10   | 2,245   |
| CAN        | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 7,85   | 7,503   |
| CAN        | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 7,84   | 7,503   |
| CAN        | TR   | 52,5 | 3,8 | 15        | 30          | 65,7  | 271,452            | 0     | 11    | 9,54 | 7,90   | 7,503   |

(Preuzeto iz: J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Chemometr. Intell. Lab. 140 (2015) 92–101)



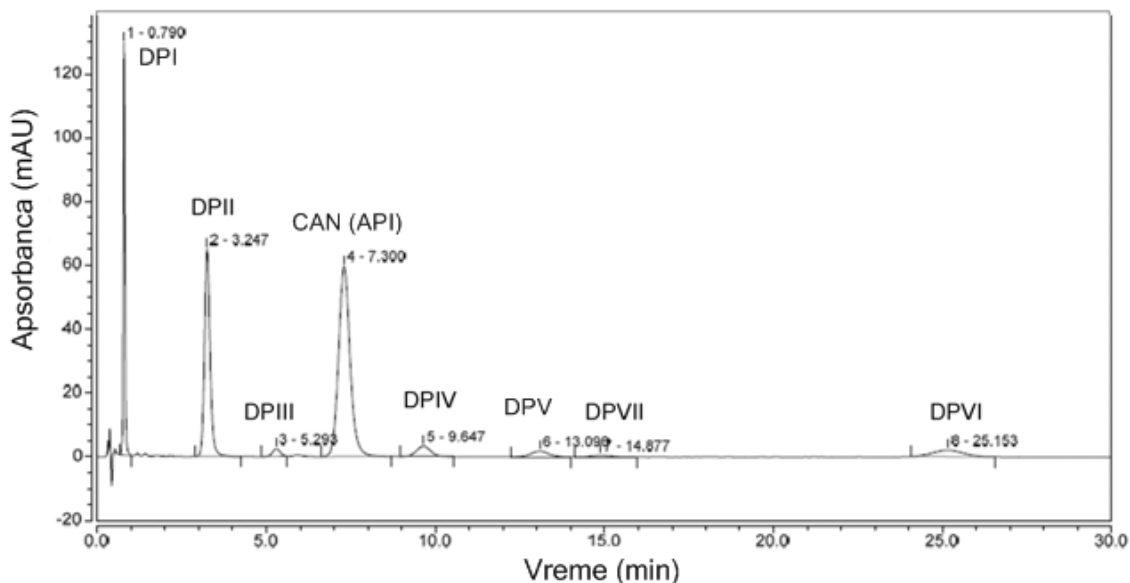
Slika 17 . Grafički prikaz slaganja eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih faktora  $k(\text{exp})$  i retencionih faktora koje predviđa mreža  $k(\text{ANN})$  kandesartan cileksetila i degradacionih proizvoda

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Chemometr. Intell. Lab. 140 (2015) 92–101)



Slika 18. Površina odgovora retencionog faktora DPVI (a) i DPI (b) koji predviđa mreža u odnosu na udeo acetonitrila u mobilnoj fazi (%ACN) i pH vodenog dela mobilne faze (pH).

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Chemometr. Intell. Lab. 140 (2015) 92–101)



Slika 19. Hromatogram smeše stres uzoraka dobijen pri optimalnim uslovima

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Chemometr. Intell. Lab. 140 (2015) 92–101)

#### 4.2.5. Analiza efekata ulaznih promenljivih na model i odgovor

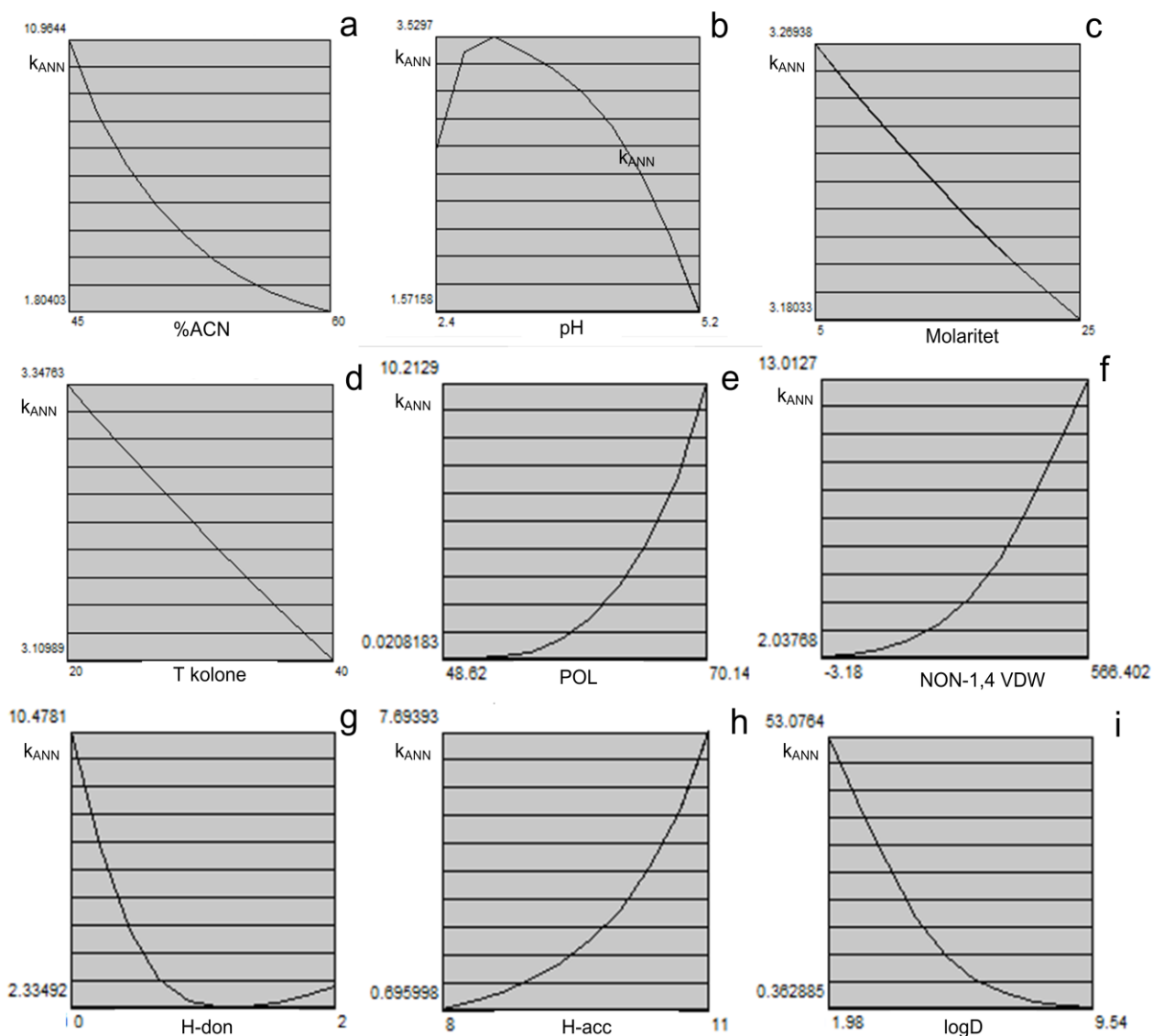
Analiza osetljivosti ukazuje na uticaj pojedinačnih ulaznih promenljivih (faktora) na ANN model. Osetljivost ulazne promenljive je definisana kao odnos greške mreže uz

izostavljane te ulazne promenljive i greške mreže kad su sve ulazne promenljive uključene. Na taj način se faktori rangiraju po redosledu važnosti. Osetljivost jedne ulazne promenljive u odnosu na ostale određena je prema sledećim kriterijumima. Greška osetljivosti promenljive (eng. *Variable Sensitivity Error*, VSE) ukazuje na efikasnost mreže kada ta promenljiva nije dostupna. Odnos osetljivosti promenljive (eng. *Variable Sensitivity Ratio*, VSR) je odnos VSE i greške modela kada su sve promenljive dostupne [215-217]. Dobijeni ANN model pokazuje veliku osetljivost prema log D (VSR = 32,4), H-don (VSR = 30,2), POL (VSR = 29,9), %ACN (VSR = 28,7), NON-1,4 VDW (VSR = 18,9) opadajućim redom. Model je manje osetljiv prema H-acc (VSR = 13,1), pH (VSR = 10,9), dok je neznatno osetljiv prema temperaturi kolone (VSR = 1,5) i molaritetu pufera (VSR = 1,2).

U cilju procene trenda odgovora u odnosu na pojedinačne parametre, napravljen je grafik zavisnosti odgovora koji predviđa mreža od datog pojedinačnog faktora u celom opsegu vrednosti datog faktora, pri čemu se svim ostalim faktorima dodeljuje konstantna, srednja vrednost u datom setu podataka. Grafici su prikazani na Slici 20. %ACN, molaritet pufera i temperatura kolone pokazuju negativnu korelaciju sa retencionim faktorom koga predviđa mreža. Acetonitril ima veću eluacionu sposobnost od vode u RP-HPLC sistemu, te se i očekuje ranije eluiranje analita sa povećanjem udela acetonitrila. Slično, pri većoj temperaturi smanjuje se viskozitet mobilne faze i povećava brzina kretanja molekula, generalno, te i molekula analita, čime se smanjuje snaga interakcija analit-stacionarna faza. Rezultat ovoga je smanjenje vremena eluiranja analita. Ipak, treba naglasiti da je uticaj temperature kolone mali, jer je razlika u  $k(ANN)$  pri promeni temperature od 20 °C svega 0,14. Prema tome, predviđanja mreže su u skladu sa teorijskim pretpostavkama.

Naravno, osnovna funkcija pufera u mobilnoj fazi je kontrola pH u sistemu, u cilju dobijanja oštih, pravilnih pikova i reproduktivne metode. Sa povećanjem koncentracije, odnosno molariteta pufera, povećava se polarnost mobilne faze. Ovo utiče na retenciju analita na različite načine, u zavisnosti od hemije: neki analiti imaju slabiju retenciju, dok drugi pokazuju jaču retenciju u HPLC sistemu. Uticaj molariteta, a time i jonske jačine pufera uglavnom je ograničen na sisteme u kojima su izražene jonske interakcije između baznih analita i kiselih silanolnih grupa na površini silike, dakle u RP kolonama pri  $pH > 3$ .

Povećanjem koncentracije pufera povećava se jonska jačina mobilne faze, što nekad dovodi do supresije jonskih interakcija i smanjuje efekat „sekundarne retencije“.



Slika 20. Zavisnost odgovora koji predviđa mreža od pojedinačnog faktora, pri čemu su ostali faktori konstantni, na nivou srednje vrednosti: (a) %ACN; (b) pH; (c) molaritet pufera; (d) temperatura kolone; (e) POL; (f) NON-1,4 VDW; (g) H-don; (h) H-acc; (i) logD.

Ovo je takođe u skladu sa dobijenim rezultatima. Naime, kao što je rečeno, grafik na Slici 20c predstavlja odgovor koji predviđa mreža, pri čemu su preostali (neispitivani) faktori imali srednje vrednosti, te je pH vodenog dela mobilne faze bila 3,8. Ukupna pH mobilne faze odstupa malo od te vrednosti, ali možemo smatrati da se pri toj pH većina analita nalazi skoro



potpuno u nejonizovanom obliku (DPH-DPVI), dok se DPI i DPVII na datoj pH nalaze dominantno u anjonskom obliku. Stoga ovaj efekat nije izražen što se vidi i prema dobijenim vrednostima  $k(ANN)$  za krajnje vrednosti molariteta pufera: 3,18 pri teorijskom molaritetu 5 mM, odnosno 3,27 za 25 mM pufer. Razlika je veoma mala, što ukazuje na to da ovaj faktor nema značajan uticaj na odgovor.

Zavisnost  $k$  koga predviđa mreža od pH ima veoma interesantan oblik, sa maksimumom na oko pH 3. Potencijalno objašnjenje ovoga leži u pomenutim interakcijama sa slobodnim silanolnim grupama („sekundarnoj retenciji“). U Tabeli 19 prikazana je zastupljenost pojedinačnih oblika na pH 2,4, 3,0 i 5,2 izračunata primenom programa *MarvinSketch*, u procentima. Svim ispitivanim analitima je zajedničko da se povećanjem pH smanjuje udeo nejonizovanog oblika, a povećava udeo anjonskog oblika. Kao što je rečeno, na pH vrednostima većim od 3 dolazi do jonizacije silanolnih grupa koje postaju negativno naelektrisane i ostvaruju odbojne interakcije sa anjonima analita, te se stoga sa povećanjem pH sekundarna interakcija smanjuje, a time i retenciono vreme. Pri pH 2,4 – 3,0 situacija je kompleksnija, s obzirom da u građenju modela učestvuju jedinjenja koja pri ovim pH pokazuju delimično kisele (DPI i DPH), odnosno bazne osobine (DPI, DPV, DPVI, DPVII, CAN). Sa druge strane, sekundarne interakcije pri ovako niskim pH nisu jake, te je veća retencija analita pri nižim pH posledica jače primarne retencije, imajući u vidu da je pri nižim pH zastupljeno više nejonizovanog oblika za one analite koji pokazuju kiselobazne osobine u datom opsegu pH. Zavisnost odgovora koga predviđa mreža od molekularskih deskriptora ima logaritamski oblik, i pozitivna je u slučaju POL, NON-1,4 VDW i H-acc, a negativna u slučaju log D i H-don. Polarizabilnost je elektrostatički deskriptor koji ukazuje na to koliko se lako distribucija molekularskog naelektrisanja poremeti pod uticajem spoljašnjeg statičkog ili oscilatornog elektromagnetnog polja. U korelaciji je sa veličinom molekula i hidrofobnošću [29], te je logična pozitivna korelacija sa retencijom. NON-1,4 VDW je takođe u korelaciji sa površinom molekula [218], te je pozitivna korelacija koju predviđa mreža u skladu sa teorijskim pretpostavkama. Acetonitril je akceptor vodonika, odnosno donor vodonične veze, analit koji je jači donor vodonika (ima višu vrednost H-don), uspostavlja jače polarne interakcije sa eluentom i brže se eluira. Stoga je razumljivo da H-

don ima negativnu, a H-acc pozitivnu korelaciju sa retencijom. Ispitivane supstance su uglavnom nejonizovane pri primenjenim pH rastvora, te povećanje H-don vrednosti usled jonizacije, ovde nema veliki značaj. LogD, neočekivano, pokazuje negativnu korelaciju sa retencijom. Ovo ukazuje na veliki uticaj interakcija, pre svega sa pH, jer je logD pH-zavisan faktor. Osetljivost odgovora prema molekulskim deskriptorima može da se proceni na osnovu razlike u retencionom faktoru za ekstremne vrednosti deskriptora na Slici 20 ( $\Delta$ ). Odgovor pokazuje najveću osetljivost prema log D ( $\Delta = 52,71$ ), NON-1,4 VDW ( $\Delta = 10,97$ ), POL ( $\Delta = 10,19$ ), H-don ( $\Delta = 8,15$ ) i H-acc ( $\Delta = 7,00$ ), redom. Ovo je u velikoj meri u skladu sa rezultatima osetljivosti modela na izostavljanje ulazne promenljive iz modela.

Tabela 19. Zastupljenost pojedinačnih oblika kandesartan cileksetila i njegovih degradacionih proizvoda na pH 2,4, 3,0 i 5,2 izračunata primenom programa *MarvinSketch*, u procentima.

| Jedinjenje | pH  | Nejonizovani oblik (%) | Katjonski oblik (%) | Anjonski oblik (%) | Zwitter jonski oblik (%) |
|------------|-----|------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| DPI        | 2,4 | 74                     | 18                  | 7                  | 1                        |
|            | 3,0 | 68                     | 4                   | 27                 | 1                        |
|            | 5,2 |                        |                     | 100                |                          |
| DPII       | 2,4 | 98                     |                     | 2                  |                          |
|            | 3,0 | 94                     |                     | 6                  |                          |
|            | 5,2 | 10                     |                     | 90                 |                          |
| DPIII      | 2,4 | 100                    |                     |                    |                          |
|            | 3,0 | 100                    |                     |                    |                          |
|            | 5,2 | 100                    |                     |                    |                          |
| DPIV       | 2,4 | 82                     | 18                  |                    |                          |
|            | 3,0 | 95                     | 5                   |                    |                          |
|            | 5,2 | 100                    |                     |                    |                          |
| DPV        | 2,4 | 100                    |                     |                    |                          |
|            | 3,0 | 100                    |                     |                    |                          |
|            | 5,2 | 100                    |                     |                    |                          |
| DPVI       | 2,4 | 82                     | 18                  |                    |                          |
|            | 3,0 | 95                     | 5                   |                    |                          |
|            | 5,2 | 100                    |                     |                    |                          |
| DPVII      | 2,4 | 82                     | 18                  |                    |                          |
|            | 3,0 | 95                     | 5                   |                    |                          |
|            | 5,2 | 100                    |                     |                    |                          |
| CAN        | 2,4 | 82                     | 17                  | 1                  |                          |
|            | 3,0 | 90                     | 5                   | 5                  |                          |
|            | 5,2 | 10                     |                     | 90                 |                          |

#### 4.2.6. Poređenje sa MLR

Kao i u prethodnom istraživanju (Poglavlje 4.1.4), trening i validacioni set upotrebljeni za ANN modelovanje su upotrebljeni za formiranje (konstrukciju) MLR modela ( $n = 312$ ), dok je test set iz ANN modela zadržan kao takav ( $n = 32$ ). Kao značajni faktori pokazali su se %ACN, POL, H-don i logD, prema opadajućoj značajnosti regresionog koeficijenta ( $p < 0,05$ ). Postupna MLR dala je loše rezultate:  $R^2$  za trening set bio je 0,584, uz  $F=107,7$ . Sposobnost predviđanja mreže proverena je kroz test set i dobijena je vrednost  $R^2$  od 0,715. Ovi rezultati ukazuju na značajnu nelinearnu zavisnost ulaznih i izlazne promenljive, gde ANN pokazuju mnogo bolje rezultate od MLR.

### 4.3. Postavljanje QSRR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem

#### 4.3.1. Izbor deskriptora i hromatografskih faktora za građenje modela

Selekcija molekulskih deskriptora izvršena je na osnovu opšte-prihvaćenih pretpostavki o intermolekulskim interakcijama koje definišu retenciono ponašanje, LSER teoriji objašnjenju ranije i rezultatima dobijenim u prethodnim istraživanjima (J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Talanta 100 (2012) 329–337, J. Golubović, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Chemometr. Intell. Lab. 140 (2015) 92–101). Stoga su ispitivani molekulski deskriptori bili: SEV, NON-1,4 VDW, log D, POL, H-don i H-acc.

Nakon preliminarnih ispitivanja hromatografskih parametara i njihovih nivoa, gradijentno eluiranje se pokazalo kao jedino moguće u cilju razdvajanja tolikog broja jedinjenja slične strukture. Gradijent se sastojao u rastu udela acetonitrila u mobilnoj fazi od 10 do 90 %, za različito vreme (vreme gradijenta), nakon čega je kolona rekvilibrisana, izokratski, mobilnom fazom koja sadrži 10 % acetonitrila (v/v) u toku 3 minuta. Amonijum formijat je korišćen za pravljenje pufera, jer je adekvatniji od amonijum acetata u opsegu pH u kom je sproveden eksperimentalni dizajn (3,0 – 4,0). Varirani parametri su: vreme gradijenta, molaritet pufera i pH vodenog dela mobilne faze. Odgovor koji je praćen je retenciono vreme analita ( $t_r$ ).

Poznato je da se stvarna pH rastvora menja kada se pufer meša sa organskim rastvaračem. pKa pufera se menja za više od jednu jedinicu kada je udeo organskog rastvarača u smeši veći od 50 %, te je greška u merenju pH prilično velika. U toku gradijenta, molaritet pufera u mobilnoj fazi konstantno opada, te se i stvarna pH mobilne faze menja [219]. Pošto su ove promene kontinuirane, nije moguće korigovati pH mobilne faze i molaritet pufera. Pravljenjem ovakvih greški „sistemski“, postiže se konzistentan tok eksperimenata, ne pravi se *bias*, i na kraju dobija pouzdan model.

### 4.3.2. ANN modelovanje

Ulazne promenljive (inpute) činili su pomenutih 6 molekulskih deskriptora: SEV, POL i NON-1,4 VDW. log D, H-don i H-acc i 3 hromatografska parametra: vreme gradijenta, molaritet pufera i pH vodenog dela mobilne faze, dok je retenciono vreme postavljeno kao odgovor koji se prati, tj. izlazna promenljiva. Eksperimentalni plan variranja značajnih hromatografskih parametara, koji je odredio slučajevne ANN modela dobijen je primenom optimizacionog tipa dizajna, *Box-Behnken* dizajna. Optimizacija topologije i parametara treninga mreže (stopa učenja, momentum, broj epoha, tip aktivacione i prenosne funkcije itd.) rađena je po principu pokušaja i pogreške u cilju minimizacije RMSE validacionog seta. Sem RMSE, kriterijum za odabir optimalne mreže bio je i koeficijent korelacije između eksperimentalno dobijenih odgovora i odgovora dobijenih predviđanjem od strane mreže. Na početku treninga, težinama i *bias*-u se nasumično dodeljuje neka vrednost između -1 i +1.

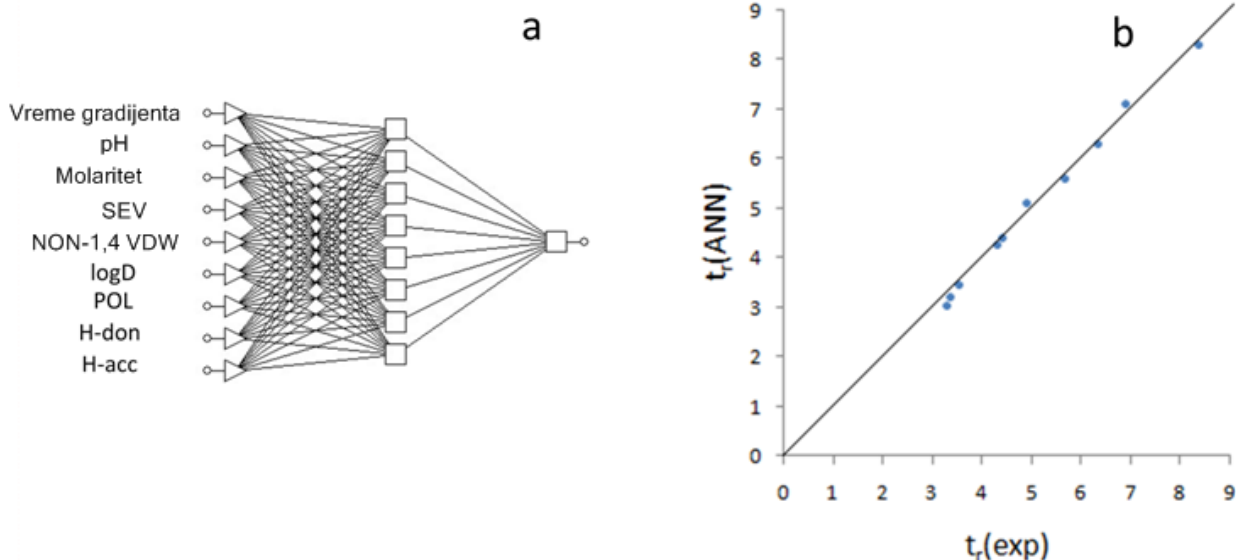
#### 4.3.2.1. Test set odabran nasumično iz ukupnog seta podataka

Za potrebe optimizacije separacije ispitivanih supstanci u što kraćem vremenskom periodu, test set podataka je odabran nasumično iz ukupnog seta podataka. Na ovaj način obuhvata se čitav opseg deskriptora, a time i svi analiti, kao i čitav opseg hromatografskih parametara, što je neophodno jer se optimalni uslovi dobijaju interpolacijom u okviru prostora podataka. Stoga je ukupan set podataka podeljen nasumično na trening (n = 70), validacioni (n = 10) i test (n = 10). Najbolje rezultate predviđanja pokazala je MLP mreža koja se sastoji od tri sloja, sa osam neurona u skrivenom sloju, topologije 9-8-1 (Slika 21a). Sigmoidalna (logistička) funkcija postavljena kao prenosna funkcija u skrivenom i izlaznom

sloju. Optimalni rezultati dobijeni su mrežom treniranom algoritmom ponovnog prolaska greške sa stopom učenja od 0,1 i momentom od 0,3. Stalni rast greške validacije je bio kriterijum za zaustavljanje procesa treniranja, te je broj epoha koji je bio potreban za treniranje mreže 20 000. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori ( $t_r(\text{exp})$ ), kao i odgovori koje predviđa optimalna mreža ( $t_r(\text{ANN})$ ) prikazani su u Tabeli 20. RMSE treninga, validacije i testa bili su 0,0906, 0,0715 i 0,1376, redom. Dobijeni koeficijent determinacije ( $R^2$ ) između  $t_r(\text{exp})$  i  $t_r(\text{ANN})$  bili su 0,997, 0,995 i 0,995 za trening, validaciju i test, redom. Visoka vrednost  $R^2$  i niska vrednost RMSE treninga i validacionog seta ukazuju na dobru deskriptivnu sposobnost mreže. Sa druge strane, visoka vrednost  $R^2$  i niska vrednost RMSE test seta ukazuju na dobru sposobnost predviđanja, kao i to da nije došlo do pretreniranja mreže. Na Slici 21b prikazan je grafik slaganja  $t_r(\text{exp})$  i  $t_r(\text{ANN})$  uz predstavljanje jednačine idealnog slaganja,  $y = x$ .

Dalje, optimalna mreža je iskorišćena za optimizaciju metode kojom se razdvajaju ispitivani sartani, predviđanjem retencionih vremena. Računanjem faktora rezolucije ( $R_s$ ) pri svim eksperimentalnim uslovima, uočena su tri kritična para. Vrednost  $R_s$  je manja od 1,5 pri određenim uslovima za parove: EPR-VAL, VAL-LOS i EPR-LOS. Strategija optimizacije zasnovana je na mapiranju faktora rezolucije izračunatih na osnovu retencionih vremena koje predviđa odabrana mreža. U celom eksperimentalnom domenu, širina pikova na polovini visine pika, koja je uzeta za računanje  $R_s$  prema jednačini (12) beznačajno varira oko 0,07 min, te je ova vrednost uzeta za računanje.

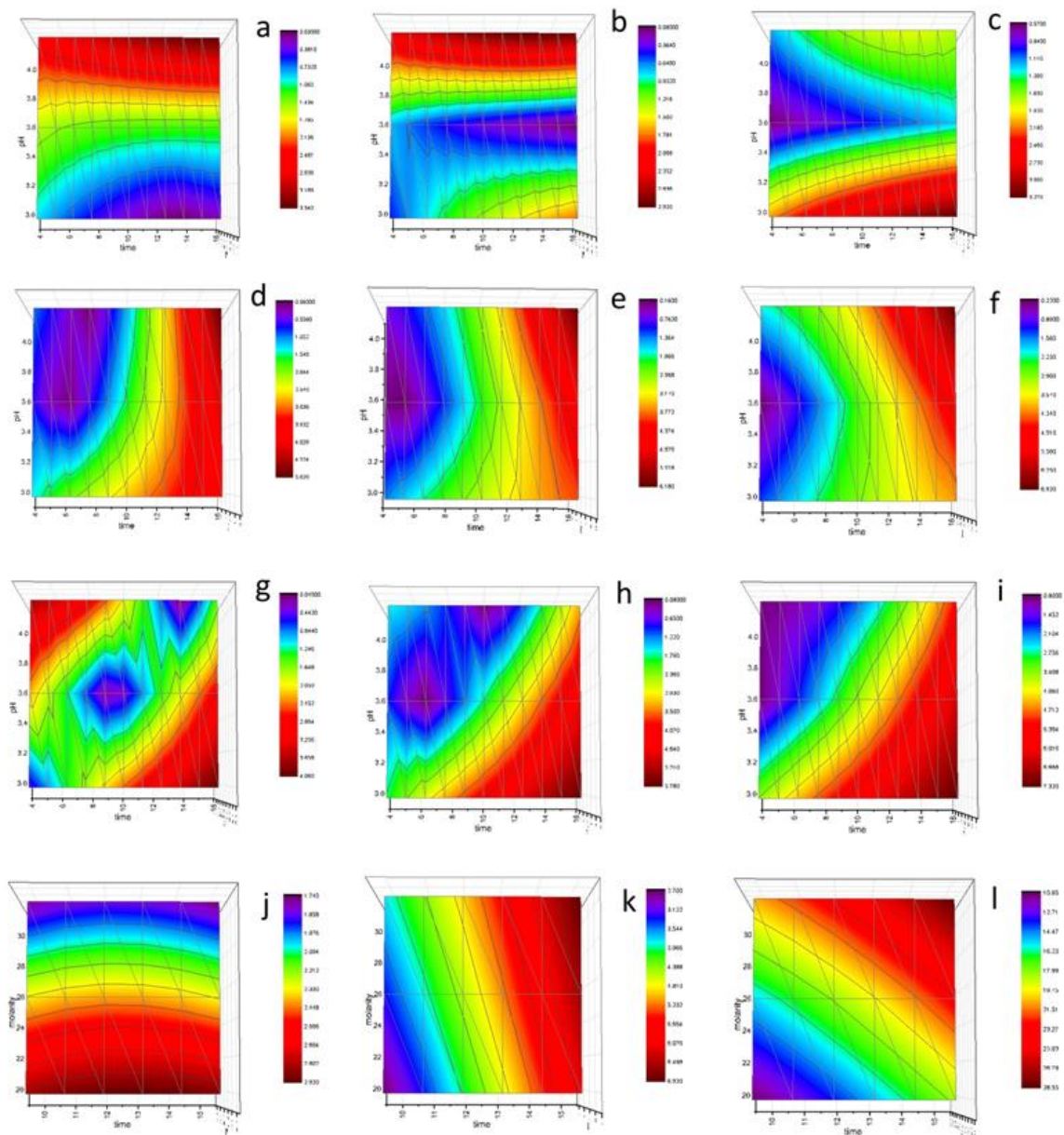
$$R_s = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{0,5h1} + W_{0,5h2})} \quad (12)$$



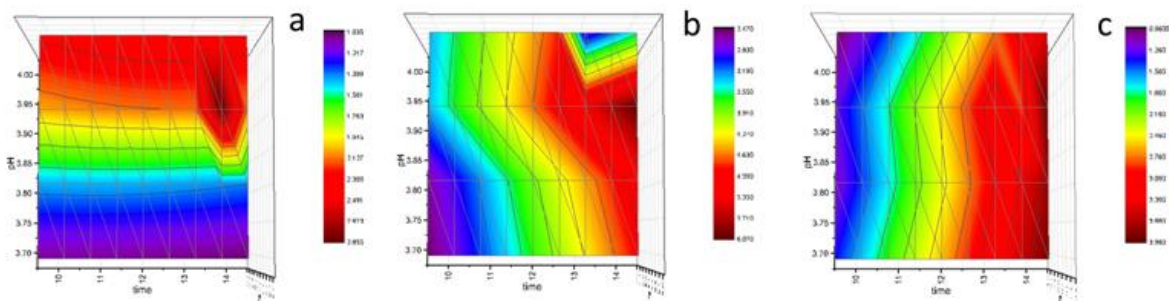
Slika 21. Optimalna mreža dobijena kad je test set odabran nasumično iz ukupnog seta podataka: (a) topologija mreže 9-8-1; (b) grafički prikaz slaganja eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih vremena  $t_r(\text{exp})$  i retencionih vremena koje predviđa mreža  $t_r(\text{ANN})$  za test set.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. Talanta 140 (2016) 190–197)

Najpre su konstruisane grube mape faktora rezolucije u celom opsegu vremena gradijenta (5-15 minuta) i pH vodenog dela mobilne faze (pH) (3,0 – 4,0) za tri nivoa molariteta pufera (10 mM, 20 mM i 30 mM). 3D grafici ove zavisnosti prikazani su na Slici 22a-i. Pri višim pH nalazimo širi prostor uslova koji ispunjavaju postavljeni kriterijum ( $R_s > 1,5$  za sve kritične parove). Nakon toga je optimizovan molaritet pufera mapiranjem faktorâ rezolucije koje predviđa mreža u odnosu na molaritet pufera i vreme gradijenta (Slika 20j-1). Vrednost koncentracije amonijum formijata odabrana kao optimalna je 25 mM. Nakon toga je urađeno fino mapiranje  $R_s$  u odnosu na vreme gradijenta (10-15 minuta, sa intervalom od 0,5 minuta) i pH (3,7– 4,0 sa intervalom od 0,1), pri koncentraciji pufera od 25 mM (Slika 23). Glavni kriterijumi pri odabiru optimalnih uslova bili su (i) skratiti vreme trajanja rana, odnosno vreme gradijenta i (ii) naći robusnu metodu, tj. naći tačku u eksperimentalnom prostoru koja je otprilike u sredini prostora prihvatljivih uslova. Neophodno je pronaći tačku u „sigurnoj zoni“, jer se na taj način tolerišu greške koje nastaju previđanjem od strane mreže ili varijacijom širine pika koja ulazi u obrazac za računanje faktora rezolucije.

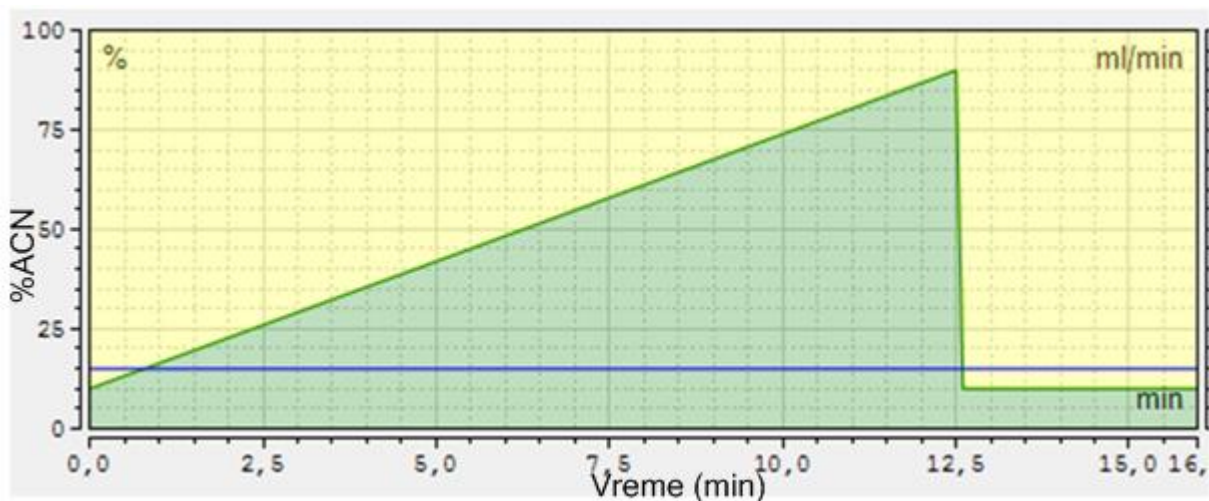


Slika 22. Grubo mapiranje faktora rezolucije koje predviđa optimalna mreža: VAL-LOS, 10 mM pufer; (b) VAL-LOS, 20 mM pufer; (c) VAL-LOS, 30 mM pufer; (d) EPR-LOS, 10 mM pufer; (e) VAL-LOS, 20 mM pufer; (f) EPR-LOS, 30 mM pufer; (g) EPR-VAL, 10 mM pufer; (h) EPR-VAL, 20 mM pufer; (i) EPR-VAL, 30 mM buffer; (j) VAL-LOS, pH 4; (k) EPR-LOS, pH 4; (l) EPR-VAL, buffer pH 4.  
(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. Talanta 140 (2016) 190–197)



Slika 23. Fino mapiranje faktora rezolucije koje predviđa optimalna mreža: (a) LOS-VAL, 25 mM pufer; (b) EPR-LOS, 25 mM pufer; (c) EPR-VAL, 25 mM pufer.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. Talanta 140 (2016) 190–197)

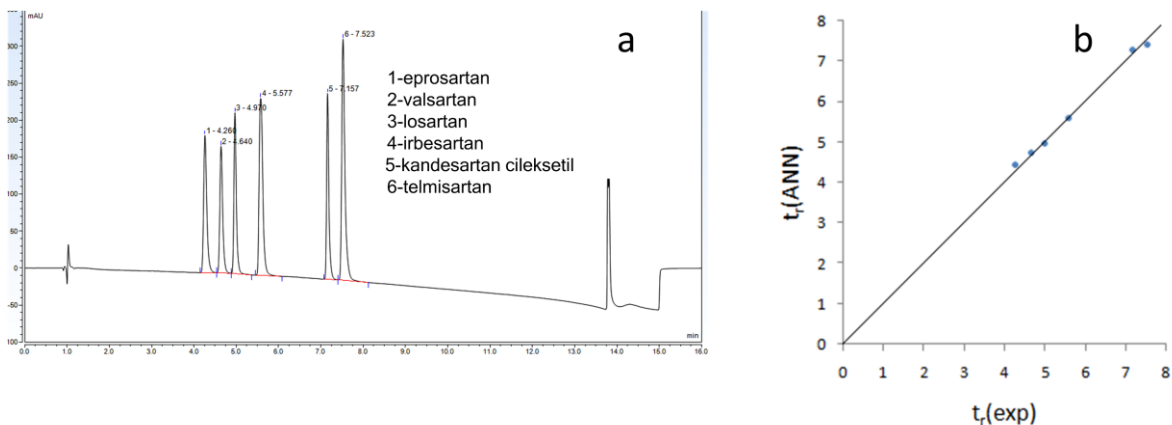


Slika 24. Gradijent dobijen kao optimalan: procenat acetonitrila raste od 10 do 90 % za 12,5 minuta, nakon čega sledi reekvilibracija kolone koja traje 3 minuta. Ukupno vreme trajanja rana je 15,5 minuta.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. Talanta 140 (2016) 190–197)

Vreme gradijenta od 12,5 minuta, pH vodenog dela mobilne faze od 3,95 i koncentracija amonijum acetata u puferu od 25 mM su odabrani kao optimalni uslovi. Gradijent je prikazan na Slici 24. Hromatogram dobijen pod optimalnim uslovima prikazan je na Slici 25a. Ispunjeni su zadati kriterijum: svi analiti su razdvojeni na baznoj liniji. Sem toga vreme trajanja rana je 15,5 minuta. Na ovaj način postignuto je razdvajanje većeg broj sartana za kraće vreme u odnosu na dosadašnje objavljene metode [192-196]. Grafik slaganja  $t_r(\text{exp})$  i  $t_r(\text{ANN})$  pod optimalnim uslovima prikazan je na Slici 25b.  $R^2$  je 0,996, dok je RMSE 0,1050, što je u nivou rezultata dobijenih pri građenju modela.





Slika 25. (a) Hromatogram dobijen pod odabranim optimalnim uslovima: vreme gradijenta 12,5 minuta, pH vodenog dela mobilne faze 3,95, 25 mM puffer; (b) grafički prikaz slaganja eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih vremena  $t_r(\text{exp})$  (hromatogram sa slike a) i retencionih vremena koje predviđa mreža  $t_r(\text{ANN})$ .

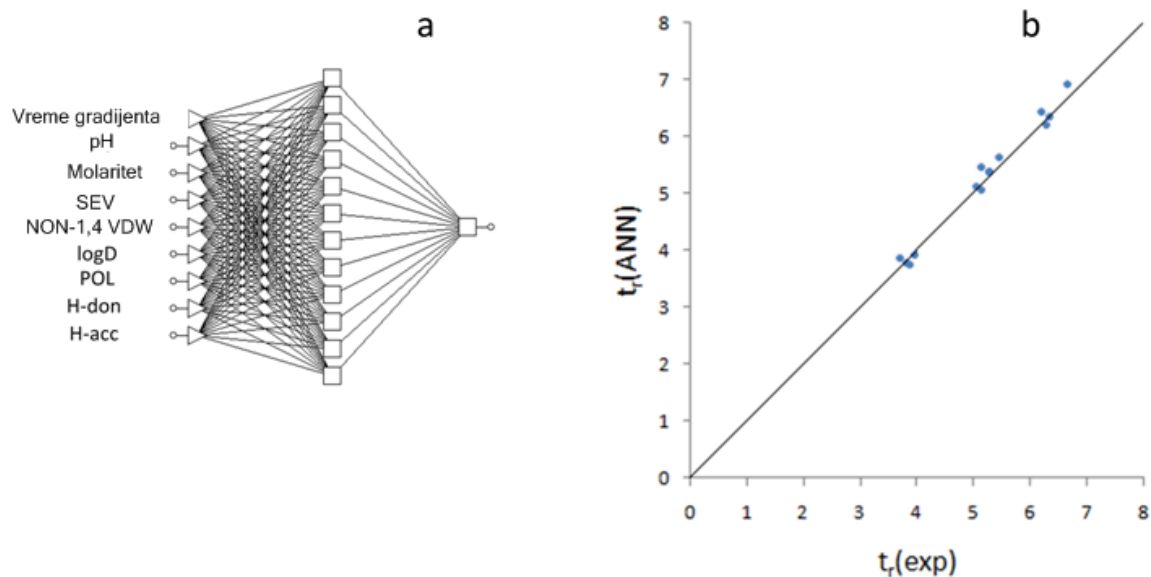
(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. Talanta 140 (2016) 190–197)

#### 4.3.2.2. Test set sastavljen od podataka koji pripadaju jednom analitu

Kada treba predvideti retenciono ponašanje novog analita, potrebno je razviti model na osnovu podataka dobijenih od analitâ srodne strukture. ANN metodologija pokazuje slabe rezultate u predviđanju odgovora za slučajeve čiji se vrednosti ulaznih promenljivih nalaze van prostora podataka koje formiraju slučajevi korišćeni za trening mreže. Imajući ovo u vidu, irbesartan je odabran kao odgovarajući analit za test, jer su svi njegovi deskriptori bili unutar prostora molekulskih deskriptora za ispitivanu grupu sartana. Dakle, podaci dobijeni za irbesartan formirali su test set ( $n = 15$ ), dok su preostali podaci nasumično podeljeni na trening ( $n = 60$ ) i validacioni set ( $n = 15$ ). Najbolje rezultate predviđanja pokazala je MLP mreža koja se sastoji od tri sloja, sa dvanaest neurona u skrivenom sloju, topologije 9-12-1 (Slika 26a). Sigmoidalna (logistička) funkcija postavljena kao prenosna funkcija u skrivenom i izlaznom sloju. Optimalni rezultati dobijeni su mrežom treniranom algoritmom ponovnog prolaska greške sa stopom učenja od 0,1 i mometumom od 0,3, za 30 000 epoha. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori ( $t_r(\text{exp})$ ), kao i odgovori koje predviđa optimalna mreža ( $t_r(\text{ANN})$ ) prikazani su u Tabeli 19. RMSE treninga, validacije i testa bili su 0,0989, 0,1765 i 0,1613, redom. Dobijeni koeficijent determinacije

( $R^2$ ) između  $t_r(\text{exp})$  i  $t_r(\text{ANN})$  bili su 0,996, 0,988 i 0,985 za trening, validaciju i test, redom. Na Slici 26b prikazan je grafik slaganja  $t_r(\text{exp})$  i  $t_r(\text{ANN})$  uz predstavljanje jednačine idealnog slaganja,  $y = x$ . Sposobnost predviđanja odgovora od strane optimalne mreže je nešto lošija od one koju pokazuje mreža u kojoj je test odabran nasumično od svih podataka (prethodno poglavlje). Razlog za ovo može biti relativno mali trening set. Naime, zbog broja ispitivanih analita, odnos veličine trening i test seta je 4, mada je optimalno 7 ili 8. Predviđanje odgovora bi se sigurno poboljšalo ako bi se veći broj jedinjenja uključio u trening.

Do sada je nekoliko autora razvilo metode za razdvajanje lekova iz grupe sartana, ali do pet supstanci, za vreme veće od 18 minuta [179, 192-196]. Primenom QSRR-ANN metodologije razvijen je model za razdvajanje šest lekova iz grupe sartana za 15,5 minuta. Primenjena metodologija se može primeniti za analizu kompleksnih smeša i kao dobra početna tačka za razvoj bioanalitičke metode.



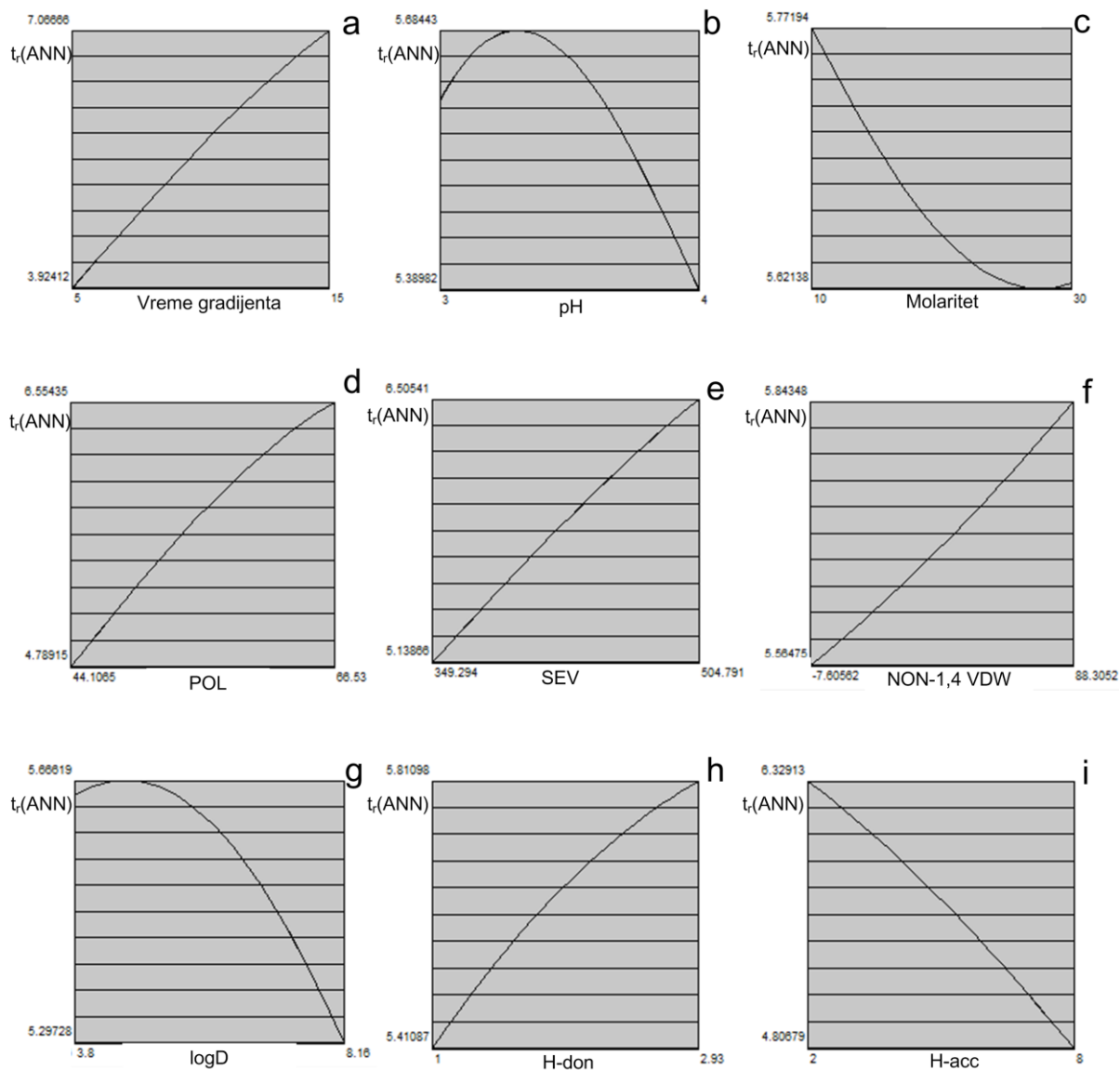
Slika 26. Optimalna mreža dobijena kad test set odgovara ibesartanu: (a) topologija mreže 9-12-1; (b) grafički prikaz slaganja eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih vremena  $t_r(\text{exp})$  i retencionih vremena koje predviđa mreža  $t_r(\text{ANN})$  za test set.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. Talanta 140 (2016) 190–197)

### **4.3.3. Analiza efekata ulaznih promenljivih na model i odgovor**

Analiza osetljivosti modela prema pojedinačnim ulaznim promenljivim pokazuje sledeće rezultate: vreme gradijenta (VSR = 11,4), POL (VSR = 6,2), SEV (VSR = 4,6), H-ACC (VSR = 3,2), pH (VSR = 2,6), NON-1,4 VDW (VSR = 2,3), logD (VSR = 2,1), molaritet pufera (VSR = 1,9) and H-don (VSR=1,7).

U cilju procene trenda odgovora u odnosu na pojedinačne parametre, napravljen je grafik zavisnosti odgovora koji predviđa mreža od datog pojedinačnog faktora u celom opsegu vrednosti datog faktora, pri čemu se svim ostalim faktorima dodeljuje konstantna, srednja vrednost u datom setu podataka. Grafici su prikazani na Slici 27.



Slika 27. Zavisnost odgovora koji predviđa mreža od pojedinačnog faktora, pri čemu su ostali faktori konstantni, na nivou srednje vrednosti: (a) vreme gradijenta; (b) pH; (c) molaritet pufera; (d) POL; (e) SEV; (f) NON-1,4 VDW; (g) logD; (h) H-don (i) H-acc.

Tabela 20. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori – (k(exp), i odgovori koje predviđa optimalna mreža – k(ANN) za ispitivane sartane

| Jedinjenje | Vreme gradijenta (min) | pH  | Molaritet pufera | SEV    | NON-1,4 VDW | log D | POL   | H-don | H-acc | t <sub>r</sub> (exp) | Set -nasumično test- | t <sub>r</sub> (ANN) -nasumično test- | Set -IRB kao test- | t <sub>r</sub> (ANN) -IRB kao test- |
|------------|------------------------|-----|------------------|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| LOS        | 10                     | 4   | 30               | 349,29 | 22,05       | 4,73  | 46,69 | 2,57  | 5,43  | 4,57                 | TR                   | 4,451                                 | TR                 | 4,516                               |
| LOS        | 10                     | 4   | 10               | 349,29 | 22,05       | 4,73  | 46,69 | 2,57  | 5,43  | 4,52                 | TR                   | 4,557                                 | TR                 | 4,498                               |
| LOS        | 15                     | 4   | 20               | 349,29 | 22,05       | 4,73  | 46,69 | 2,57  | 5,43  | 5,46                 | TR                   | 5,384                                 | TR                 | 5,394                               |
| LOS        | 15                     | 3   | 20               | 350,52 | 23,70       | 4,01  | 46,80 | 2,93  | 5,07  | 5,65                 | TR                   | 5,584                                 | TR                 | 5,526                               |
| LOS        | 10                     | 3,5 | 20               | 350,07 | 23,11       | 4,4   | 46,76 | 2,8   | 5,2   | 4,72                 | TR                   | 4,658                                 | TR                 | 4,618                               |
| LOS        | 10                     | 3,5 | 20               | 350,07 | 23,11       | 4,4   | 46,76 | 2,8   | 5,2   | 4,41                 | TR                   | 4,658                                 | TR                 | 4,618                               |
| LOS        | 5                      | 3,5 | 30               | 350,07 | 23,11       | 4,4   | 46,76 | 2,8   | 5,2   | 3,53                 | TEST                 | 3,459                                 | VAL                | 3,558                               |
| LOS        | 10                     | 3,5 | 20               | 350,07 | 23,11       | 4,4   | 46,76 | 2,8   | 5,2   | 4,72                 | VAL                  | 4,658                                 | TR                 | 4,618                               |
| LOS        | 5                      | 3   | 20               | 350,52 | 23,70       | 4,01  | 46,80 | 2,93  | 5,07  | 3,55                 | TR                   | 3,508                                 | VAL                | 3,547                               |
| LOS        | 5                      | 4   | 20               | 349,30 | 22,05       | 4,73  | 46,69 | 2,57  | 5,43  | 3,41                 | TR                   | 3,304                                 | TR                 | 3,529                               |
| LOS        | 5                      | 3,5 | 10               | 350,08 | 23,11       | 4,4   | 46,76 | 2,8   | 5,2   | 3,54                 | VAL                  | 3,597                                 | TR                 | 3,578                               |
| LOS        | 10                     | 3   | 10               | 350,52 | 23,70       | 4,01  | 46,80 | 2,93  | 5,07  | 4,78                 | TR                   | 4,848                                 | TR                 | 4,755                               |
| LOS        | 15                     | 3,5 | 10               | 350,08 | 23,11       | 4,4   | 46,76 | 2,8   | 5,2   | 5,72                 | TR                   | 5,738                                 | TR                 | 5,800                               |
| LOS        | 15                     | 3,5 | 30               | 350,07 | 23,11       | 4,4   | 46,76 | 2,8   | 5,2   | 5,68                 | VAL                  | 5,534                                 | TR                 | 5,670                               |
| LOS        | 10                     | 3   | 30               | 350,52 | 23,70       | 4,01  | 46,80 | 2,93  | 5,07  | 4,70                 | TR                   | 4,538                                 | TR                 | 4,595                               |
| VAL        | 10                     | 4   | 30               | 375,02 | 88,31       | 5,06  | 48,50 | 1,34  | 6     | 4,32                 | TR                   | 4,240                                 | TR                 | 4,273                               |
| VAL        | 10                     | 4   | 10               | 375,02 | 88,31       | 5,06  | 48,50 | 1,34  | 6     | 4,2                  | TR                   | 4,173                                 | TR                 | 4,188                               |
| VAL        | 15                     | 4   | 20               | 375,02 | 88,31       | 5,06  | 48,50 | 1,34  | 6     | 5,03                 | TR                   | 5,043                                 | TR                 | 5,017                               |
| VAL        | 15                     | 3   | 20               | 372,87 | 76,52       | 5,24  | 48,55 | 1,83  | 6     | 5,86                 | TR                   | 5,798                                 | TR                 | 5,828                               |
| VAL        | 10                     | 3,5 | 20               | 373,88 | 82,05       | 5,19  | 48,53 | 1,6   | 6     | 4,68                 | VAL                  | 4,617                                 | TR                 | 4,611                               |
| VAL        | 10                     | 3,5 | 20               | 373,88 | 82,05       | 5,19  | 48,53 | 1,6   | 6     | 4,69                 | TR                   | 4,617                                 | VAL                | 4,611                               |
| VAL        | 5                      | 3,5 | 30               | 373,88 | 82,05       | 5,19  | 48,53 | 1,6   | 6     | 3,51                 | TR                   | 3,528                                 | VAL                | 3,598                               |
| VAL        | 10                     | 3,5 | 20               | 373,88 | 82,05       | 5,19  | 48,53 | 1,6   | 6     | 4,68                 | TR                   | 4,617                                 | TR                 | 4,611                               |
| VAL        | 5                      | 3   | 20               | 372,87 | 76,52       | 5,24  | 48,55 | 1,83  | 6     | 3,51                 | TR                   | 3,566                                 | TR                 | 3,648                               |
| VAL        | 5                      | 4   | 20               | 375,02 | 88,31       | 5,06  | 48,50 | 1,34  | 6     | 3,27                 | TEST                 | 3,026                                 | TR                 | 3,420                               |
| VAL        | 5                      | 3,5 | 10               | 373,88 | 82,05       | 5,19  | 48,53 | 1,6   | 6     | 3,51                 | TR                   | 3,410                                 | VAL                | 3,546                               |

| Jedinjenje | Vreme gradijenta (min) | pH  | Molaritet pufera | SEV    | NON-1,4 VDW | log D | POL   | H-don | H-acc | t <sub>r</sub> (exp) | Set -nasumično test- | t <sub>r</sub> (ANN) -nasumično test- | Set -IRB kao test- | t <sub>r</sub> (ANN) -IRB kao test- |
|------------|------------------------|-----|------------------|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| VAL        | 10                     | 3   | 10               | 372,87 | 76,52       | 5,24  | 48,55 | 1,83  | 6     | 4,89                 | TR                   | 4,817                                 | TR                 | 4,856                               |
| VAL        | 15                     | 3,5 | 10               | 373,88 | 82,05       | 5,19  | 48,53 | 1,6   | 6     | 5,66                 | TEST                 | 5,589                                 | TR                 | 5,659                               |
| VAL        | 15                     | 3,5 | 30               | 373,88 | 82,05       | 5,19  | 48,53 | 1,6   | 6     | 5,64                 | TR                   | 5,681                                 | TR                 | 5,615                               |
| VAL        | 10                     | 3   | 30               | 372,87 | 76,52       | 5,24  | 48,55 | 1,83  | 6     | 4,85                 | TR                   | 4,873                                 | TR                 | 4,891                               |
| IRB        | 10                     | 4   | 30               | 377,12 | -4,78       | 5,14  | 49,36 | 1,56  | 4,44  | 5,04                 | TR                   | 4,939                                 | TEST               | 5,138                               |
| IRB        | 10                     | 4   | 10               | 377,12 | -4,78       | 5,14  | 49,36 | 1,56  | 4,44  | 5,14                 | TR                   | 5,065                                 | TEST               | 5,479                               |
| IRB        | 15                     | 4   | 20               | 377,12 | -4,78       | 5,14  | 49,36 | 1,56  | 4,44  | 6,18                 | TR                   | 6,143                                 | TEST               | 6,428                               |
| IRB        | 15                     | 3   | 20               | 379,55 | -4,76       | 4,38  | 49,46 | 1,93  | 4,07  | 6,26                 | TR                   | 6,342                                 | TEST               | 6,198                               |
| IRB        | 10                     | 3,5 | 20               | 378,69 | -4,77       | 4,8   | 49,42 | 1,8   | 4,2   | 5,27                 | TR                   | 5,239                                 | TEST               | 5,378                               |
| IRB        | 10                     | 3,5 | 20               | 378,69 | -4,77       | 4,8   | 49,42 | 1,8   | 4,2   | 5,28                 | TR                   | 5,239                                 | TEST               | 5,378                               |
| IRB        | 5                      | 3,5 | 30               | 378,69 | -4,77       | 4,8   | 49,42 | 1,8   | 4,2   | 3,81                 | TR                   | 3,783                                 | TEST               | 3,768                               |
| IRB        | 10                     | 3,5 | 20               | 378,69 | -4,77       | 4,8   | 49,42 | 1,8   | 4,2   | 5,26                 | VAL                  | 5,239                                 | TEST               | 5,378                               |
| IRB        | 5                      | 3   | 20               | 379,55 | -4,76       | 4,38  | 49,46 | 1,93  | 4,07  | 3,87                 | TR                   | 3,777                                 | TEST               | 3,744                               |
| IRB        | 5                      | 4   | 20               | 377,12 | -4,78       | 5,14  | 49,36 | 1,56  | 4,44  | 3,70                 | TR                   | 3,737                                 | TEST               | 3,872                               |
| IRB        | 5                      | 3,5 | 10               | 378,69 | -4,77       | 4,8   | 49,42 | 1,8   | 4,2   | 3,95                 | TR                   | 3,957                                 | TEST               | 3,923                               |
| IRB        | 10                     | 3   | 10               | 379,55 | -4,76       | 4,38  | 49,46 | 1,93  | 4,07  | 5,45                 | VAL                  | 5,457                                 | TEST               | 5,652                               |
| IRB        | 15                     | 3,5 | 10               | 378,69 | -4,77       | 4,8   | 49,42 | 1,8   | 4,2   | 6,65                 | TR                   | 6,597                                 | TEST               | 6,912                               |
| IRB        | 15                     | 3,5 | 30               | 378,69 | -4,77       | 4,8   | 49,42 | 1,8   | 4,2   | 6,32                 | TEST                 | 6,300                                 | TEST               | 6,365                               |
| IRB        | 10                     | 3   | 30               | 379,55 | -4,76       | 4,38  | 49,46 | 1,93  | 4,07  | 5,14                 | TR                   | 5,081                                 | TEST               | 5,077                               |
| TEL        | 10                     | 4   | 30               | 453,25 | -3,47       | 5,56  | 63,46 | 2,24  | 2,1   | 6,61                 | TR                   | 6,606                                 | TR                 | 6,551                               |
| TEL        | 10                     | 4   | 10               | 453,25 | -3,47       | 5,56  | 63,46 | 2,24  | 2,1   | 7,24                 | TR                   | 7,133                                 | TR                 | 7,309                               |
| TEL        | 15                     | 4   | 20               | 453,25 | -3,47       | 5,56  | 63,46 | 2,24  | 2,1   | 8,54                 | TR                   | 8,386                                 | TR                 | 8,483                               |
| TEL        | 15                     | 3   | 20               | 452,25 | -7,61       | 5,1   | 63,53 | 2,82  | 2     | 8,43                 | TR                   | 8,358                                 | TR                 | 8,415                               |
| TEL        | 10                     | 3,5 | 20               | 452,88 | -5,68       | 5,28  | 63,51 | 2,6   | 2     | 6,79                 | TR                   | 6,695                                 | TR                 | 6,743                               |
| TEL        | 10                     | 3,5 | 20               | 452,88 | -5,68       | 5,28  | 63,51 | 2,6   | 2     | 6,80                 | TR                   | 6,695                                 | TR                 | 6,743                               |
| TEL        | 5                      | 3,5 | 30               | 452,88 | -5,68       | 5,28  | 63,51 | 2,6   | 2     | 4,62                 | TR                   | 4,626                                 | TR                 | 4,670                               |
| TEL        | 10                     | 3,5 | 20               | 452,88 | -5,68       | 5,28  | 63,51 | 2,6   | 2     | 6,63                 | VAL                  | 6,695                                 | TR                 | 6,743                               |
| TEL        | 5                      | 3   | 20               | 452,25 | -7,61       | 5,1   | 63,53 | 2,82  | 2     | 4,57                 | TR                   | 4,388                                 | TR                 | 4,462                               |
| TEL        | 5                      | 4   | 20               | 453,25 | -3,47       | 5,56  | 63,46 | 2,24  | 2,1   | 6,30                 | TR                   | 6,121                                 | TR                 | 6,173                               |
| TEL        | 5                      | 3,5 | 10               | 452,88 | -5,68       | 5,28  | 63,51 | 2,6   | 2     | 5,19                 | TR                   | 5,212                                 | TR                 | 5,209                               |
| TEL        | 10                     | 3   | 10               | 452,25 | -7,61       | 5,1   | 63,53 | 2,82  | 2     | 6,88                 | TEST                 | 7,101                                 | TR                 | 6,907                               |

| Jedinjenje | Vreme gradijenta (min) | pH  | Molaritet pufera | SEV    | NON-1,4 VDW | log D | POL   | H-don | H-acc | t <sub>r</sub> (exp) | Set -nasumično test- | t <sub>r</sub> (ANN) -nasumično test- | Set -IRB kao test- | t <sub>r</sub> (ANN) -IRB kao test- |
|------------|------------------------|-----|------------------|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| TEL        | 15                     | 3,5 | 10               | 452,88 | -5,68       | 5,28  | 63,51 | 2,6   | 2     | 9,13                 | TR                   | 9,101                                 | TR                 | 8,704                               |
| TEL        | 15                     | 3,5 | 30               | 452,88 | -5,68       | 5,28  | 63,51 | 2,6   | 2     | 8,16                 | TR                   | 8,116                                 | TR                 | 8,280                               |
| TEL        | 10                     | 3   | 30               | 452,25 | -7,61       | 5,1   | 63,53 | 2,82  | 2     | 6,13                 | TR                   | 6,154                                 | TR                 | 6,042                               |
| CAN        | 10                     | 4   | 30               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 6,29                 | TR                   | 6,245                                 | TR                 | 6,269                               |
| CAN        | 10                     | 4   | 10               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 6,25                 | TR                   | 6,184                                 | VAL                | 6,660                               |
| CAN        | 15                     | 4   | 20               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 8,13                 | TR                   | 8,137                                 | TR                 | 8,148                               |
| CAN        | 15                     | 3   | 20               | 504,79 | 65,31       | 8,14  | 66,53 | 1     | 8     | 7,75                 | TR                   | 7,776                                 | TR                 | 7,651                               |
| CAN        | 10                     | 3,5 | 20               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 6,42                 | VAL                  | 6,502                                 | VAL                | 6,712                               |
| CAN        | 10                     | 3,5 | 20               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 6,43                 | TR                   | 6,502                                 | VAL                | 6,712                               |
| CAN        | 5                      | 3,5 | 30               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 4,29                 | TEST                 | 4,253                                 | TR                 | 4,111                               |
| CAN        | 10                     | 3,5 | 20               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 6,78                 | TR                   | 6,502                                 | TR                 | 6,712                               |
| CAN        | 5                      | 3   | 20               | 504,79 | 65,31       | 8,14  | 66,53 | 1     | 8     | 4,33                 | TR                   | 4,327                                 | VAL                | 4,151                               |
| CAN        | 5                      | 4   | 20               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 4,20                 | TR                   | 4,107                                 | TR                 | 4,231                               |
| CAN        | 5                      | 3,5 | 10               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 4,29                 | TR                   | 4,166                                 | VAL                | 4,308                               |
| CAN        | 10                     | 3   | 10               | 504,79 | 65,31       | 8,14  | 66,53 | 1     | 8     | 6,51                 | TR                   | 6,457                                 | TR                 | 6,514                               |
| CAN        | 15                     | 3,5 | 10               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 8,36                 | TEST                 | 8,323                                 | TR                 | 8,302                               |
| CAN        | 15                     | 3,5 | 30               | 504,79 | 65,31       | 8,16  | 66,53 | 1     | 8     | 8,36                 | TR                   | 8,161                                 | VAL                | 8,143                               |
| CAN        | 10                     | 3   | 30               | 504,79 | 65,31       | 8,14  | 66,53 | 1     | 8     | 6,47                 | VAL                  | 6,387                                 | TR                 | 6,531                               |
| EPR        | 10                     | 4   | 30               | 353,33 | 15,07       | 3,8   | 44,11 | 1,19  | 5,25  | 4,03                 | TR                   | 3,998                                 | TR                 | 4,080                               |
| EPR        | 10                     | 4   | 10               | 353,33 | 15,07       | 3,8   | 44,11 | 1,19  | 5,25  | 4,38                 | TR                   | 4,412                                 | TR                 | 4,383                               |
| EPR        | 15                     | 4   | 20               | 353,33 | 15,07       | 3,8   | 44,11 | 1,19  | 5,25  | 4,66                 | TR                   | 4,651                                 | TR                 | 4,626                               |
| EPR        | 15                     | 3   | 20               | 354,55 | -1,60       | 4,03  | 44,28 | 2,6   | 5     | 4,90                 | TEST                 | 5,112                                 | TR                 | 5,027                               |
| EPR        | 10                     | 3,5 | 20               | 354,60 | 3,31        | 3,96  | 44,23 | 2,1   | 5     | 4,40                 | TR                   | 4,403                                 | TR                 | 4,376                               |
| EPR        | 10                     | 3,5 | 20               | 354,60 | 3,31        | 3,96  | 44,23 | 2,1   | 5     | 4,41                 | TEST                 | 4,403                                 | TR                 | 4,376                               |
| EPR        | 5                      | 3,5 | 30               | 354,60 | 3,31        | 3,96  | 44,23 | 2,1   | 5     | 3,42                 | TR                   | 3,431                                 | TR                 | 3,524                               |
| EPR        | 10                     | 3,5 | 20               | 354,60 | 3,31        | 3,96  | 44,23 | 2,1   | 5     | 4,39                 | VAL                  | 4,403                                 | TR                 | 4,376                               |
| EPR        | 5                      | 3   | 20               | 354,55 | -1,60       | 4,03  | 44,28 | 2,6   | 5     | 3,43                 | TR                   | 3,348                                 | VAL                | 3,499                               |
| EPR        | 5                      | 4   | 20               | 353,33 | 15,07       | 3,8   | 44,11 | 1,19  | 5,25  | 3,36                 | TEST                 | 3,221                                 | VAL                | 3,454                               |
| EPR        | 5                      | 3,5 | 10               | 354,60 | 3,31        | 3,96  | 44,23 | 2,1   | 5     | 3,78                 | TR                   | 3,681                                 | TR                 | 3,584                               |
| EPR        | 10                     | 3   | 10               | 354,55 | -1,60       | 4,03  | 44,28 | 2,6   | 5     | 4,56                 | TR                   | 4,522                                 | TR                 | 4,503                               |
| EPR        | 15                     | 3,5 | 10               | 354,60 | 3,31        | 3,96  | 44,23 | 2,1   | 5     | 5,48                 | TR                   | 5,244                                 | TR                 | 5,376                               |

| Jedinjenje | Vreme<br>gradijenta<br>(min) | pH  | Molaritet<br>pufera | SEV    | NON-1,4<br>VDW | log D | POL   | H-don | H-acc | t <sub>r</sub> (exp) | Set<br>-nasumično<br>test- | t <sub>r</sub> (ANN)<br>-nasumično<br>test- | Set<br>-IRB<br>kao test- | t <sub>r</sub> (ANN)<br>-IRB<br>kao test- |
|------------|------------------------------|-----|---------------------|--------|----------------|-------|-------|-------|-------|----------------------|----------------------------|---|--------------------------|---|
| EPR        | 15                           | 3,5 | 30                  | 354,60 | 3,31           | 3,96  | 44,23 | 2,1   | 5     | 4,87                 | TR                         | 4,930                                       | VAL                      | 5,008                                     |
| EPR        | 10                           | 3   | 30                  | 354,55 | -1,60          | 4,03  | 44,28 | 2,6   | 5     | 4,18                 | TR                         | 4,199                                       | VAL                      | 4,272                                     |

(Prilagodeno iz: **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. Talanta 140 (2016) 190–197)



Tabela 21. Zastupljenost pojedinačnih oblika ispitivanih sartana na pH 3,0, 3,3 i 4,0 izračunata primenom programa *MarvinSketch*, u procentima.

| Jedinjenje | pH  | Nejonizovani oblik (%) | Katjonski oblik (%) | Anjonski oblik (%) | Zwitter jonski oblik (%) |
|------------|-----|------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| LOS        | 3,0 | 7                      | 92                  |                    | 1                        |
|            | 3,3 | 13                     | 84                  | 2                  | 1                        |
|            | 4,0 | 34                     | 45                  | 17                 | 4                        |
| VAL        | 3,0 | 90                     |                     | 10                 |                          |
|            | 3,3 | 80                     |                     | 20                 |                          |
|            | 4,0 | 41                     |                     | 59                 |                          |
| IRB        | 3,0 | 7                      | 92                  |                    | 1                        |
|            | 3,3 | 13                     | 84                  | 2                  | 1                        |
|            | 4,0 | 34                     | 45                  | 17                 | 4                        |
| TEL        | 3,0 |                        | 82                  |                    | 18                       |
|            | 3,3 |                        | 68                  |                    | 32                       |
|            | 4,0 |                        | 33                  |                    | 67                       |
| CAN        | 3,0 | 90                     | 5                   | 5                  |                          |
|            | 3,3 | 88                     |                     | 12                 |                          |
|            | 4,0 | 63                     |                     | 37                 |                          |
| EPR        | 3,0 |                        | 80                  |                    | 20                       |
|            | 3,3 |                        | 65                  |                    | 35                       |
|            | 4,0 |                        | 22                  |                    | 78                       |

Vreme gradijenta pokazuje pozitivnu, dok molaritet pufera pokazuje negativnu korelaciju sa retencionim vremenom koje predviđa mreža. Ovo je u skladu sa teorijskim pretpostavkama. Početni i krajnji udeo organskog rastvarača je konstantan (10 i 90 %, redom), te se produžavanjem vremena sporije povećava udeo organskog rastvarača koji ima veću eluacionu sposobnost od vode, a time i produžava vreme eluiranja sa kolone. Uticaj molariteta pufera objašnjen je u poglavlju 4.2.5. Pri pH 3,5, veliki broj ispitivanih analita je protonovano u velikoj meri, te ostvaruju privlačne interakcije sa slobodnim silanolnim grupama. Povećanjem koncentracije pufera povećava se jonska jačina mobilne faze, što nekad dovodi do supresije jonskih interakcija i smanjuje efekat „sekundarne retencije“. Na oko 27, dostiže se neka vrsta platoa minimuma. Međutim, treba naglasiti da je ovaj uticaj mali, te je razlika  $t_r(ANN)$  pri promeni molariteta od 20 mM svega 0,15.

Pri porastu pH  $t_r(ANN)$  najpre raste, do 3,3 a onda opada. Potencijalno objašnjenje ovoga leži u pomenutim interakcijama sa slobodnim silanolnim grupama („sekundarno retenciji“). U Tabeli 21 prikazana je zastupljenost pojedinačnih oblika na pH 3,0, 3,3 i 4,0 izračunata primenom programa *MarvinSketch*, u procentima. Svim ispitivanim analitima je

zajedničko da se sa povećanjem pH smanjuje udeo nejonizovanog, odnosno katjonskog oblika (onog koji je dominantan pri pH 3), a povećava udeo anjonskog ili zwitter jonskog oblika. Kao što je rečeno, na pH vrednostima većim od 3 dolazi do jonizacije silanolnih grupa koje postaju negativno naelektrisane i ostvaruju odbojne interakcije sa anjonima analita, te se stoga sa povećanjem pH sekundarna interakcija smanjuje, a time i retenciono vreme. Pri pH 3,0 – 3,3 situacija je kompleksnija. Sekundarne interakcije pri ovako niskim pH nisu jake, te je veća retencija analita pri nižim pH posledica jače primarne retencije, imajući u vidu da je pri nižim pH zastupljeno više nejonizovanog oblika za one analite koji se nalaze u tom obliku (CAN, VAL), te primarne interakcije nadmašuju sekundarne.

Zavisnost odgovora koga predviđa mreža od molekulskih deskriptora ima skoro linearan oblik, i pozitivna je u slučaju POL, SEV, NON-1,4 VDW i H-don, a negativna u slučaju H-acc. U slučaju  $\log D_{t(ANN)}$  raste sa porastom  $\log D$  do 4,4 a posle opada. Polarizabilnost je elektrostatički deskriptor koji ukazuje na to koliko se lako distribucija molekuskog naelektrisanja poremeti pod uticajem spoljašnjeg statičkog ili oscilatornog elektromagnetnog polja. U korelaciji je sa veličinom molekula i hidrofobnošću [29], te je logična pozitivna korelacija sa retencijom. Acetonitril je akceptor vodonika, odnosno donor vodonične veze, analit koji je jači donator vodonika (ima višu vrednost H-don), uspostavlja jače polarne interakcije sa eluentom i brže se eluira. Međutim, dobijena je pozitivna korelacija između H-don i retencije, odnosno negativna korelacija između H-acc i retencije ispitivanih sartana. Moguće objašnjenje ovog rezultata je činjenica da su ispitivane supstance (sem CAN i VAL) u ispitivanoj oblasti pH rastvora dominantno u katjonskom obliku, što je zapravo posledica prisustva baznih grupa koji se ponašaju kao akceptori protona. Jonizovani oblici analita se slabije vezuju za stacionarnu fazu, te brže eluiraju. Sem toga, u pitanju je gradijent, te se odnos acetonitrila kao izrazitog akceptora protona i vode kao amfifilnog eluenta konstantno menja, što dodatno komplikuje polarne interakcije sa analitima.  $\log D$ , kao i u prethodnom istraživanju (Poglavlje 4.2.5), pokazuje negativnu korelaciju sa retencijom. Ovo ukazuje na veliki uticaj interakcija, pre svega sa pH, jer je  $\log D$  pH-zavisan faktor. NON-1,4 VDW, kao i u prethodnom istraživanju (Poglavlje 4.2.5) pokazuje pozitivnu korelaciju sa retencijom. Teorijski, ovaj parametar je u korelaciji sa površinom molekula

[218], te je pozitivna korelacija koju predviđa mreža u skladu sa teorijskim pretpostavkama. SEV je geometrijski deskriptor, povezan sa lipofilnim osobinama. U korelaciji je sa SAS, i takođe odražava sposobnost analita da učestvuju u disperznim, interakcijama. Ove interakcije analita su jače sa ugljovodonicima stacionarne faze u odnosu na polarne molekule eluenta, te je koeficijent ispred ovog parametra u prethodnim studijama imao pozitivan predznak [32, 71]. Optimizovana mreža takođe pokazuje pozitivnu korelaciju retencije koju predviđa mreža i ovog parametra.

Osetljivost odgovora prema molekulskim deskriptorima može da se proceni na osnovu razlike u retencionom faktoru za ekstremne vrednosti deskriptora na Slici 19. Ova razlika biće označena sa  $\Delta$ . Odgovor pokazuje najveću osetljivost prema POL ( $\Delta = 1,65$ ), H-acc ( $\Delta = 1,51$ ) i SEV ( $\Delta = 1,36$ ), značajno veću nego prema H-don ( $\Delta = 0,4$ ), log D ( $\Delta = 0,36$ ) i NON-1,4 VDW ( $\Delta = 0,18$ ). Ovo je u skladu sa rezultatima osetljivosti modela na izostavljanje ulazne promenljive iz modela.

#### **4.4. Uspostavljanje QSPR modela uz primenu veštačkih neuronskih mreža u cilju predviđanja odgovora masenog spektrometra**

##### **4.4.1. Optimizacija instrumentalnih uslova**

U preliminarnim ispitivanjima su se efekti supresije jonizacije pokazali zanemarljivim. Veoma često je cilj rada istovremena analiza većeg broja analita. Stoga potpuna optimizacija parametara za svaki analit pojedinačno nije neophodna, a ni poželjna. Jedno od rešenja problema je optimizacija parametara na osnovu rezultata za analit koji daje najslabiji odgovor – u našem slučaju valsartan [86]. Kao rezultat toga, podešeni su kao optimalni: napon jonskog izvora od 5500 V, pritisak *curtain* gasa od 20 psi, *declustering* potencijal od 120 V i *focusing* potencijal od 400 V. Pošto se RSD odgovora nakon 6 i 3 ponavljanja (replikata) neznatno razlikovala i bila manja od 6 %, centralni eksperimenti su izvedeni sa 3 ponavljanja.

Dinamički opseg je ispitivan u opsegu koncentracija od 5–500  $\mu\text{M}$ . Svi analiti su pokazali linearno ponašanje u opsegu koncentracija 5–100  $\mu\text{M}$  sa  $R^2$  većim od 0,995

( $p < 0,05$ ). Stoga su analiti analizirani protočnim injektovanjem (eng. *flow injection analysis*) u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$ .

#### 4.4.2. Izbor deskriptora i hromatografskih faktora za građenje modela

Odabir molekulskih deskriptora se zasnivao na pomenutim publikovanim istraživanjima [74-80], opšteprihvaćenih pretpostavki o procesima ESI jonizacije [220, 221]. Imajući u vidu da bi naelektrisavanje i površinska aktivnost, definisana polarnošću i hidrofobnošću, trebalo da igraju glavnu ulogu u formiranju odgovora analita, odabrani su molekulski deskriptori: konstanta disocijacije konjugovane kiseline (bazna  $pK_a$ ) [74, 76],  $\log P$  [74, 76, 79, 80], SEV [78, 79] i H-acc [78].

Imajući u vidu bazne  $pK_a$  vrednosti sartana (-1,2 do 6) i  $pK_a$  vrednosti mravlje kiseline (3,75) i amonijaka (3,75), ova dva modifikatora su odabrana za podešavanje pH mobilne faze. Takođe, postoje podaci da se kiselost metanolnog rastvora ne razlikuje značajno od kiselosti vodenog rastvora kome je dodata ista količina kiseline ili baze [222]. Jonska jačina je značajan faktor koji treba držati konstantnim, ili uzeti u obzir kada se radi o ESI masenoj spektrometriji. 2,5 i 8,5 su odabrani kao  $-\alpha$  i  $+\alpha$  nivoi pH mobilne faze u okviru CCD dizajna. Molaritet pufera je definisan prema najvećem molaritetu čistog modifikatora dodatog u vodu kako bi se dobio jedan od ekstrema pH. Molaritet mravlje kiseline od 60 mM je potreban da se dobije vodeni rastvor čiji je pH 2,5. Količina soli amonijum formijata i modifikatora potrebnih da bi se dobio rastvor zahtevane pH i ukupnog molariteta od 60 mM su izračunati primenom *Henderson–Hasselbalch* jednačine, što je i praktično pokazano dosta tačnim. Podaci o potrebnim količinama modifikatora su navedeni u Tabeli 22. Organski deo mobilne faze je pripremljen dodatkom analogne količine amonijum formijata i modifikatora metanolu umesto vode. Nivoi protoka su odabrani u skladu sa ograničenjima instrumenta (maksimalni protok 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Nivoi udela organske faze u mobilnoj fazi (%MeOH) odabrani su tako da se ispune neophodni uslovi za pravilnu desolvataciju pri jonizacionom procesu. Šema eksperimentalnog plana na osnovu koje su varirani hromatografski uslovi je prikazana u Tabeli 23.

Tabela 22. Priprema 100 mL rastvora pufera

| pH  | Molaritet amonijum formijata | Modifikator                                       |
|-----|------------------------------|---|
| 2.5 | 0 mM                         | 215 $\mu$ L 98% HCOOH                             |
| 3.7 | 30 mM                        | 105 $\mu$ L 98% HCOOH                             |
| 5.5 | 60 mM                        | 3 $\mu$ L 1:10 razblaženog 98% HCOOH              |
| 7.3 | 60 mM                        | 6 $\mu$ L 1:10 razblaženog 28-30% NH <sub>3</sub> |
| 8.5 | 45mM                         | 115 $\mu$ L 28-30% NH <sub>3</sub>                |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

Tabela 23. Vrednosti faktora na različitim nivoima CCD eksperimentalnog dizajna: %MeOH, pH i protok mobilne faze

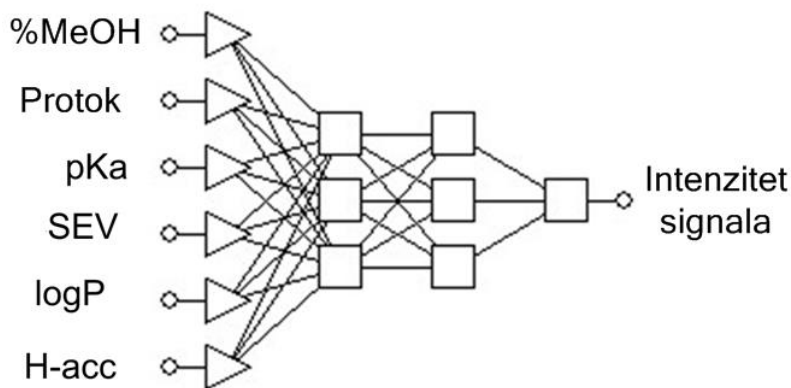
| Parametar       | - $\alpha$ | -1    | 0    | +1    | + $\alpha$ |
|-----------------|------------|-------|------|-------|------------|
| %MeOH           | 30         | 42    | 60   | 78    | 90         |
| pH              | 2,5        | 3,7   | 5,5  | 7,3   | 8,5        |
| protok (mL/min) | 0,04       | 0,125 | 0,25 | 0,375 | 0,46       |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

#### 4.4.3. ANN modelovanje

Ulazne promenljive (inpute) činili su, na početku modelovanja, pomenuta četiri molekulska deskriptora bazna pKa, log P, SEV i H-acc, kao i tri hromatografska parametra: udeo metanola u mobilnoj fazi, protok i pH mobilne faze, dok je intenzitet signala bio odgovor koji se prati, tj. izlazna promenljiva. Eksperimentalni plan variranja značajnih hromatografskih parametara, koji je odredio slučajeve ANN modela dobijen je primenom optimizacionog tipa dizajna, CCD dizajna. Optimizacija topologije i parametara treninga mreže (stopa učenja, momentum, broj epoha, tip aktivacione i prenosne funkcije itd.) rađena je po principu pokušaja i pogreške u cilju minimizacije RMSE validacionog seta. Sem RMSE, kriterijum za odabir optimalne mreže bio je i koeficijent korelacije između eksperimentalno dobijenih odgovora i odgovora dobijenih predviđanjem od strane mreže. Na

početku treninga, težinama i *bias*-u se nasumično dodeljuje neka vrednost između -1 i +1. Set podataka je nasumično podeljen na trening (n = 75), validacioni (n = 15) i test set (n = 15).

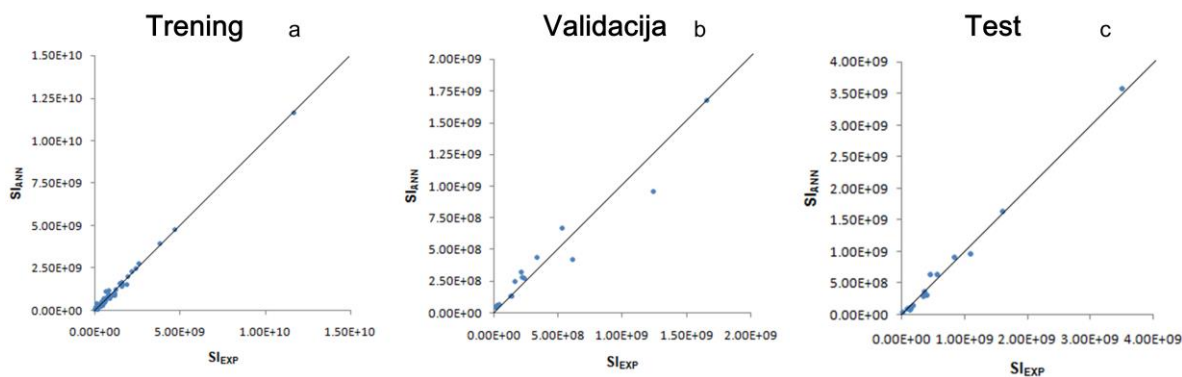


Slika 28. Grafički prikaz optimalne mreže, topologije: 6-3-3-1

(Prilagodeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

Preliminarne mreže pokazivale su malu sposobnost predviđanja odgovora, što je ukazalo na problem sa odabirom ulaznih promenljivih. Analiza osetljivosti je ukazala da su preliminarne mreže najmanje osetljive na pH mobilne faze, te je ovaj parametar isključen iz daljeg modelovanja. Ovo ima smisla imajući u vidu da je većina deskriptora pH-zavisna i izračunata za određenu pH mobilne faze primenjenu u datom eksperimentu. Prilikom optimizacije najbolje rezultate predviđanja pokazala je MLP mreža koja se sastoji od četiri sloja, sa po tri neurona u skrivenim slojevima, topologije 6-3-3-1 (Slika 28). Sigmoidalna (logistička) funkcija postavljena kao prenosna funkcija u oba skrivena i izlaznom sloju. Optimalni rezultati dobijeni su mrežom treniranom algoritmom ponovnog prolaska greške sa stopom učenja od 0,3 i momentumom od 0,1 za 30 000 epoha. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori ( $SI_{EXP}$ ), kao i odgovori koje predviđa optimalna mreža ( $SI_{ANN}$ ), prikazani su u Tabeli 24. RMSE treninga, validacije i testa bili su  $1,22 \times 10^8$ ,  $1,075 \times 10^8$  i  $7,278 \times 10^7$ , redom. Dobijeni koeficijent determinacije ( $R^2$ ) između  $SI_{EXP}$  i  $SI_{ANN}$  bili su 0.994, 0.950 i 0.994 za trening, validaciju i test, redom. Na Slici 29 prikazan je grafik slaganja  $SI_{EXP}$  i  $SI_{ANN}$  uz predstavljanje jednačine idealnog

slaganja,  $y = x$ . Što su tačke na grafiku bliže pravoj, to je bolji model. Kao što se vidi, postoji visok nivo slaganja između eksperimentalno dobijenih intenziteta signala i odgovarajućih intenziteta signala koje predviđa mreža u celom opsegu vrednosti.



Slika 29. Grafički prikaz slaganja eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih vremena intenziteta signala  $SI_{EXP}$  i retencionih vremena koje predviđa mreža  $SI_{ANN}$ .

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

#### 4.4.3. Analiza efekata ulaznih promenljivih na model i odgovor

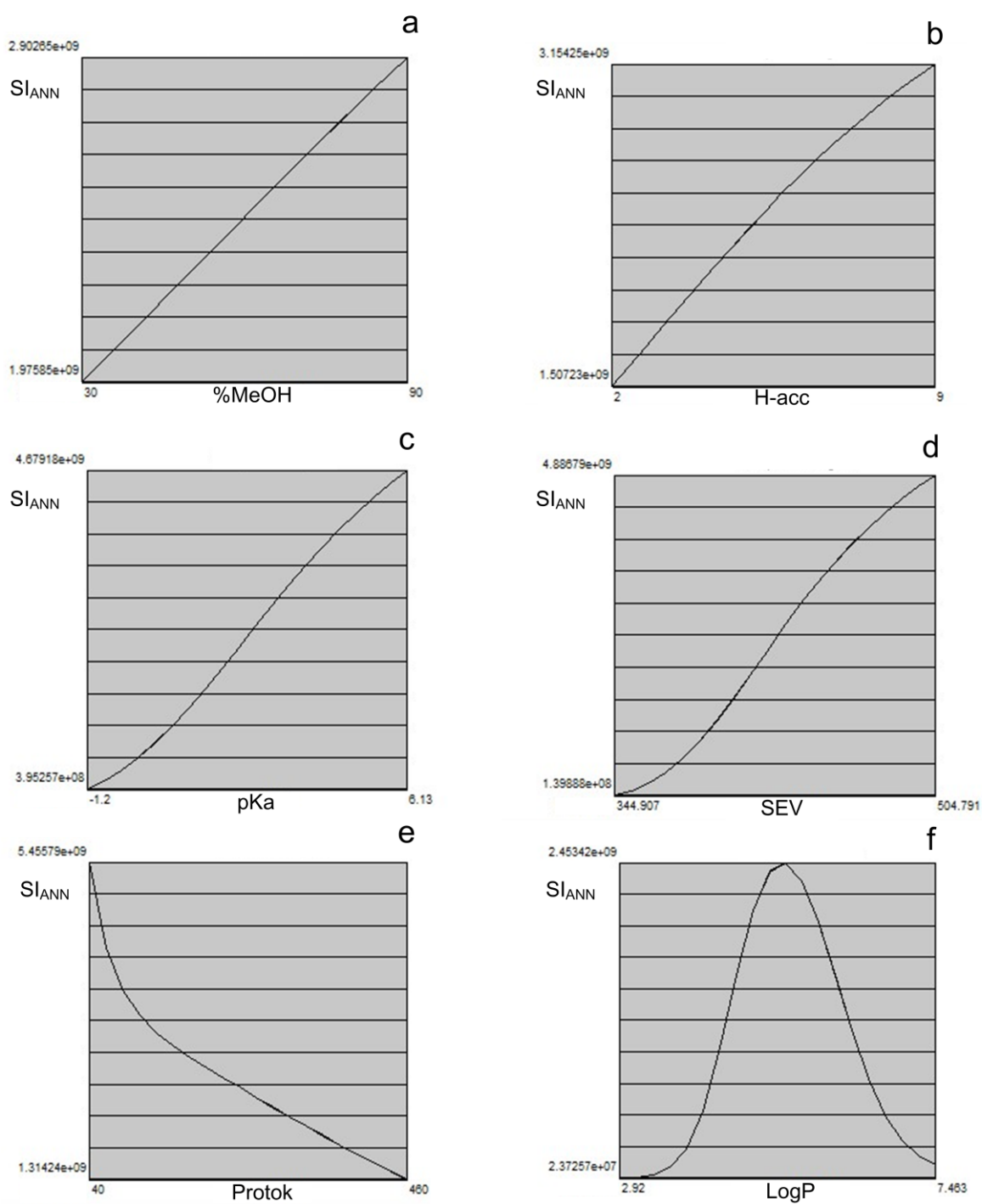
Prema analizi osetljivosti, dobijeni ANN model je najosetljiviji prema  $\log P$  (VSR = 23,0),  $pK_a$  (VSR = 13,5), protok (VSR = 11,0) i SEV (VSR = 10,7), značajno više nego prema %MeOH (VSR = 1,8) i H-acc (VSR = 1,6). U cilju procene trenda odgovora u odnosu na pojedinačne parametre, napravljen je grafik zavisnosti odgovora koji predviđa mreža od pojedinačnog faktora u celom opsegu vrednosti ispitivanog faktora, pri čemu se svim ostalim faktorima dodeljuje konstantna, srednja vrednost u setu podataka. Grafici su prikazani na Slici 30. Udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi (%MeOH, Slika 30a) i H-acc pokazuju linearno ponašanje (Slika 30b), dok  $pK_a$  (Slika 30c) i SEV (Slika 30d) pokazuju ponašanje koje prati sigmoidalnu krivu. Udeo organskog rastvarača koreliše pozitivno sa intenzitetom MS signala, što je u skladu sa teorijskim pretpostavkama. Naime, udeo organskog rastvarača utiče na brzinu „sušenja“ ESI kapljice. *Girod* i saradnici [223] su pokazali da brže isparavanje rastvarača sa ESI kapljice dovodi do bržeg smanjenja veličine kapljice. Kada se prečnik kapljice smanjuje brže, kritična tačka (*Rayleigh* limit) se postiže brže i joni imaju više vremena da rastvarač otvari. Ovo sve dovodi do veće efikasnosti jonizacije [76, 89]. Protok

(Slika 30e) koreliše negativno sa SI na sledeći način: logaritamski do oko 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a potom linearno, što je važno s obzirom da je protok veći od 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  u najvećem broju klasičnih LC-MS i LC-MS/MS metoda za analizu malih molekula. Ovo je takođe u skladu sa teorijskim pretpostavkama. Zapravo, uticaj protoka na odgovor u ESI-MS sistemu je kompleksan, jer utiče kako na efikasnost jonizacije, tako i na ponašanje ESI-MS kao detektora. Jedan od kritičnih faktora koji određuje efikasnost jonizacije je početna veličina ESI kapljice. Pri višem protoku nastaju veće kapljice. One zahtevaju duže vreme za isparavanje rastvarača i veći broj događaja isparavanje-dezintegracija. Joni formirani u rastvoru brže prelaze u gasovitu fazu iz manjih kapljica. Manje kapljice imaju i povoljniji odnos površina:zapremina. Kao rezultat ovoga, bolja efikasnost jonizacije postiže se pri manjem protoku [224, 225]. Zavisnost intenziteta signala od  $\log P$  (Slika 30f) ima oblik nalik Gausovoj krivoj koja je pomerena ka višim vrednostima, sa maksimumom na oko 5,2.

Osetljivost odgovora prema pojedinačnim molekulskim deskriptorima procenjena je poređenjem odnosa ekstremnih vrednosti odgovora u Slici 30. Odgovor pokazuje najveću osetljivost prema  $\log P$  (odnos = 103,5), SEV (odnos = 35,1), pKa (odnos = 11,8) i H-acc (odnos = 2,1). Preostale dve ulazne promenljive, %MeOH i protok, nisu uključene u ovu analizu, jer su njihovi opsezi arbitrarno određeni, a ne zavisni od analita, te se ne mogu upotrebiti za poređenje.

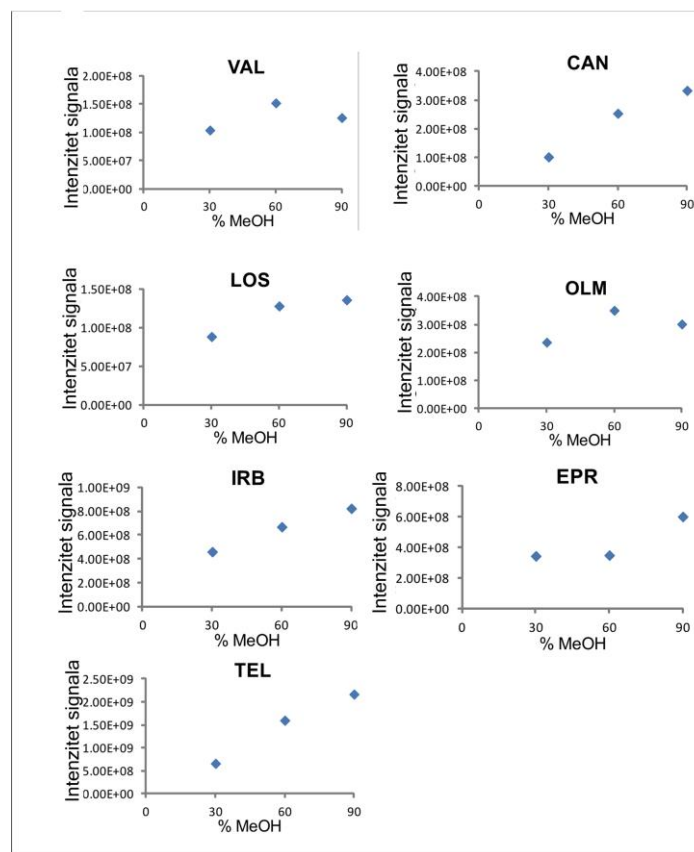
U cilju analize dobijenih rezultata, analizirani su i eksperimentalno dobijeni rezultati, kako bi se pronašla eventualna pravilnost i stekao uvid u uticaj eksperimentalnih uslova na  $SI_{\text{EXP}}$ . Prikazana je zavisnost  $SI_{\text{EXP}}$  od %MeOH (Slika 31), pH mobilne faze (Slika 32) i protoka (Slika 33) za grupe od po tri eksperimenta, u kojima je variran dati parametar, dok su preostala dva bila na srednjem (0) nivou (60 % MeOH u mobilnoj fazi, pH mobilne faze 5,5 i protok 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Ovo je veoma gruba analiza, pošto je urađena na samo tri tačke za svaki parametar. Grafici prikazani na Slici 31 ukazuju na pozitivan uticaj %MeOH na  $SI_{\text{EXP}}$ . Trend ima logaritamski oblik za IRB, TEL i CAN sa  $R^2$  logaritamske regresije većim od 0,995. VAL i OLM odstupaju od ove pravilnosti, jer imaju najveći intenzitet signala pri 60 % (v/v) metanola u mobilnoj fazi. Pozitivan trend je u skladu sa trendom prikazanim na Slici 30a.





Slika 30. Zavisnost odgovora koji predviđa mreža od pojedinačnog faktora, pri čemu su ostali faktori konstantni, na nivou srednje vrednosti: (a) %MeOH; (b) H-acc; (c) pKa; (d) SEV (e) protok; (f) logP.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević, J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)



Slika 31. Grafik zavisnosti eksperimentalno dobijenog intenziteta signala od udela metanola u mobilnoj fazi pri pH mobilne faze od 5,5 i protoku od 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

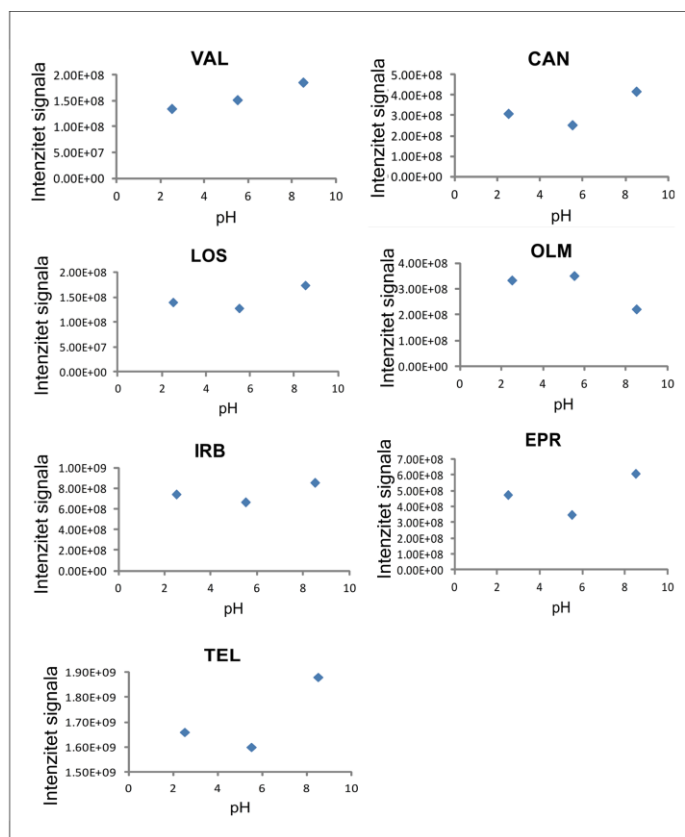
(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević, J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

Na Slici 32 se vidi da većina analita daje najveći odgovor pri pH 8,5, a najmanji pri pH 5,5. Ovo je u suprotnosti sa zaključcima nekih prethodnih istraživanja [74] u kojima se zaključuje da ESI-MS signal u pozitivnom modu raste pri povećanju pH. U studiji prikazanoj u ovoj disertaciji većina analita je na pH 5,5 prisutna dominantno u protonovanoj formi (IRB, CAN, LOS i OLM) dok su EPR i TEL dominantno u obliku zwitter jonâ. Sa najvišim intenzitetom signala na pH 8,5, većina sartana se ponaša suprotno teorijskim pretpostavkama o efikasnosti ESI procesa. Da bi se analit protonovao mora biti bazan u rastvoru ili u gasnoj fazi, te je potrebno da je pH manje od pKa. Kada je pozitivna ESI jonizacija, očekivao bi se veći signal u kiselijem rastvoru, i obrnuto pri negativnoj ESI jonizaciji. Međutim, poznato je da se detektuju protonovani analiti i kada se ESI-MS izvodi u baznom rastvoru (pH veće od

pKa). Ima nekoliko objašnjenja ovog fenomena. Naime, na površini kapljica se stvara određeni višak naelektrisanja koju određuje protok i napon. U pozitivnoj ESI u protičnom rastvaraču, ovo naelektrisanje je u formi protona, a koncentracija naelektrisanja ne zavisi od pH rastvora nego od protoka i napona. Analit se odvajaju na površini kapljice i protonovaće se iako ima pKa niži od pH rastvora. Naelektrisanje koje ne učestvuje u protonovanju analita, protonovaće molekule ili klastere rastvarača. Dalje, molekuli analita se mogu protonovati i pošto napuste rastvor. Reakcije prenosa protona u gasnoj fazi pomoću jakih kiselina u gasnoj fazi kao što je amonijak ili molekuli protonovanog rastvarača omogućavaju protonovanje neutralnih molekula koji se oslobađaju sa kapljica [221]. Ovo predstavlja tzv. „jonizaciju u suprotnom smeru“ (eng. “*Wrong-Way-Round Ionization*”) [191] tj. transfer protona sa  $\text{NH}_4^+$  na molekul u gasovitoj fazi, pod pretpostavkom da neprotonovani sarkani lakše prelaze u gasovitu fazu od protonovanih oblika pri niskim pH i da je njihova baznost u gasnoj fazi veća od baznosti u gasnoj fazi  $\text{NH}_3$ . Dalje komplikacije u pokušaju da se uspostavi korelacija između pH rastvora i pKa analita nastaju zbog toga što se pH ESI kapljica može značajno razlikovati od pH okolnog rastvora. U nekim situacijama, formiranje protona elektrolitičkom oksidacijom vode u pozitivnom ESI može da snizi pH kapljice do 4 pH jedinice [221]. Na kraju, moguće objašnjenje je i lakši prelaz  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  jonâ u gasovitu fazu nakon čega dolazi do disocijacije u jonskom izvoru (eng. *In Source Collision-Induced Dissociation, In Source CID*). Ipak, nije uočen značajan nivo  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  jonâ da bi ova pretpostavka bila potvrđena. I u literaturi se mogu naći rezultati suprotno teorijskim očekivanjima: viši signal u baznoj u odnosu na kiselu sredinu u pozitivnoj [81], odnosno obrnuto u negativnom ESI modu [83].

Odstupanje od ponašanja većine sarkana uočeno je za VAL, kod koga je signal nešto viši pri pH 5,5 nego pri pH 2,5, a onda dosta niži na pH 8,5. Ponašanje VAL je u skladu sa prethodnom interpretacijom rezultata. VAL ima najniži pH među ispitivanim analitima, te je dominantno u neutralnom obliku pri pH 2,5, negativno jonizovan pri pH 5,5 i dvostruko negativno jonizovan pri pH 8,5. Stoga se pretpostavlja da je jonizacija neutralnih molekula valsarkana pod uslovima ESI (snižena pH nakon elektro-oksidacije rastvarača) stimulisana već na pH 5,5. OLM je jedini među ispitivanim analitima koji se ponaša prema teorijskim pretpostavkama, intenzitet signala opada sa porastom pH.

Na Slici 33 uočava se smanjenje intenziteta signala sa povećanjem protoka mobilne faze, što je očekivano i u skladu sa trendom dobijenim ANN modelovanjem (Slika 29e). Ovaj trend ima logaritamski oblik sa izuzetkom VAL, pri čemu je  $R^2$  logaritamske regresije veći od 0,995 za LOS i OLM, veći od 0,95 za IRB, TEL, CAN i EPR. Ovo je takođe u skladu sa trendom dobijenim ANN modelovanjem (Slika 30e).

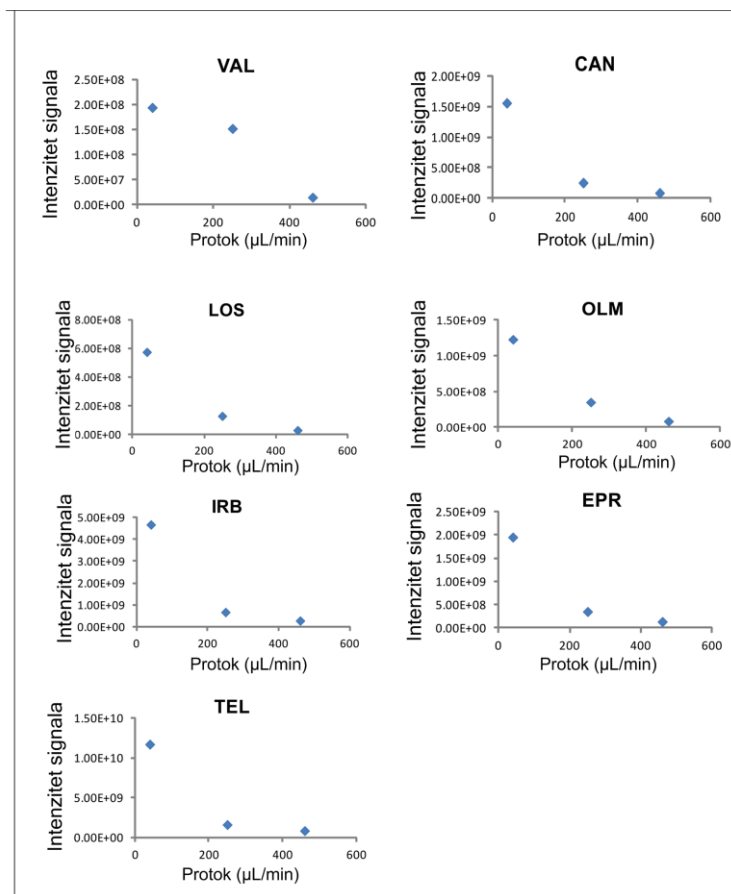


Slika 32. Grafik zavisnosti eksperimentalno dobijenog intenziteta signala od pH mobilne faze pri udelu metanola u mobilnoj fazi od 60 % i protoku od 250 µL/min.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

Za potrebe analize interakcija konstruisane su površine odgovora koga predviđa mreža ( $SI_{ANN}$ ) u zavisnosti od  $\log P$  kao faktora sa najvećim uticajem na odgovor i preostalim pojedinačnim odgovorima redom, pri čemu su ostali faktori bili konstantni, na srednjem nivou (Slika 34). Svi faktori pokazuju sličan trend u celom opsegu  $\log P$ , uz razlike u nagibu krive. Takođe, variranje udela metanola između 30 i 90 % (v/v) ne pravi veliku razliku u

$SI_{ANN}$  – odgovor analita sa poželjnim osobinama (tj. deskriptorima) je visok, čak i uz mali procenat metanola u mobilnoj fazi. Ovaj zaključak je veoma važan za razvoj LC-MS metoda za analizu sartana, sa gradijentnim eluiranjem, pri kome se menja udeo organskog rastvarača. Sa druge strane, protok značajno utiče na  $SI_{ANN}$ , posebno pri optimalnim vrednostima logP (oko 5,2). Sa druge strane, pri niskim vrednostima logP, ni nizak protok ne može obezbediti visoke odgovore. Ovo je takođe značajno za razvoj LC-MS metoda za analizu sartana, ukoliko se razmatra gradijent protoka. Slično ovome, ako su SEV i pKa previše niski, pretpostavlja se da intenzitet signala analita neće biti visok, bez obzira na logP analita.



Slika 33. Grafik zavisnosti eksperimentalno dobijenog intenziteta signala od protoka mobilne faze pri udelu metanola u mobilnoj fazi od 60 % i pH mobilne faze od 5,5.

(Prilagodeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević, J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

Tabela 24. Vrednosti ulaznih promenljivih, setovi podataka, eksperimentalno dobijeni odgovori – ( $SI_{EXP}$ ), i odgovori koje predviđa optimalna mreža –  $SI_{ANN}$ ) za ispitivane sartane.  $SI_{EXP}$  predstavlja srednju vrednost tri ponovljena injektovan

| Jedinjenje | Set  | %MeOH | pH  | Protok<br>( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) | pKa  | SEV    | logP | H-acc | $SI_{EXP}$ | $SI_{ANN}$ |
|------------|------|-------|-----|--|------|--------|------|-------|------------|------------|
| VAL        | TEST | 60    | 2,5 | 250                                    | -1,2 | 372,34 | 5,47 | 6     | 1,35e+08   | 6,99e+07   |
| VAL        | VAL  | 78    | 3,7 | 375                                    | -1,2 | 374,32 | 5,47 | 6     | 1,93e+07   | 5,38e+07   |
| VAL        | TR   | 42    | 3,7 | 125                                    | -1,2 | 374,32 | 5,47 | 6     | 9,85e+07   | 1,04e+08   |
| VAL        | VAL  | 42    | 3,7 | 375                                    | -1,2 | 374,32 | 5,47 | 6     | 1,18e+07   | 3,84e+07   |
| VAL        | TR   | 78    | 3,7 | 125                                    | -1,2 | 374,32 | 5,47 | 6     | 1,59e+08   | 1,77e+08   |
| VAL        | TR   | 60    | 5,5 | 460                                    | -1,2 | 376,51 | 5,47 | 6     | 1,47e+07   | 3,59e+07   |
| VAL        | TR   | 60    | 5,5 | 250                                    | -1,2 | 376,51 | 5,47 | 6     | 1,52e+08   | 7,99e+07   |
| VAL        | TR   | 60    | 5,5 | 40                                     | -1,2 | 376,51 | 5,47 | 6     | 1,94e+08   | 2,35e+08   |
| VAL        | TR   | 30    | 5,5 | 250                                    | -1,2 | 376,51 | 5,47 | 6     | 1,04e+08   | 5,59e+07   |
| VAL        | TEST | 90    | 5,5 | 250                                    | -1,2 | 376,51 | 5,47 | 6     | 1,26e+08   | 1,20e+08   |
| VAL        | TR   | 42    | 7,3 | 125                                    | -1,2 | 376,31 | 5,47 | 6,1   | 1,34e+08   | 1,13e+08   |
| VAL        | TR   | 78    | 7,3 | 125                                    | -1,2 | 376,31 | 5,47 | 6,1   | 1,63e+08   | 1,94e+08   |
| VAL        | TEST | 42    | 7,3 | 375                                    | -1,2 | 376,31 | 5,47 | 6,1   | 1,56e+07   | 4,08e+07   |
| VAL        | VAL  | 78    | 7,3 | 375                                    | -1,2 | 376,31 | 5,47 | 6,1   | 2,02e+07   | 5,82e+07   |
| VAL        | TR   | 60    | 8,5 | 250                                    | -1,2 | 375,17 | 5,47 | 6,65  | 1,86e+08   | 8,59e+07   |
| LOS        | TEST | 60    | 2,5 | 250                                    | 4,12 | 350,75 | 4,71 | 5     | 1,4e+08    | 1,04e+08   |
| LOS        | TR   | 78    | 3,7 | 375                                    | 4,12 | 349,73 | 4,71 | 5,3   | 5,2e+07    | 6,51e+07   |
| LOS        | TR   | 42    | 3,7 | 125                                    | 4,12 | 349,73 | 4,71 | 5,3   | 1,54e+08   | 2,06e+08   |
| LOS        | TR   | 42    | 3,7 | 375                                    | 4,12 | 349,73 | 4,71 | 5,3   | 3,89e+07   | 5,38e+07   |
| LOS        | TR   | 78    | 3,7 | 125                                    | 4,12 | 349,73 | 4,71 | 5,3   | 2,24e+08   | 2,57e+08   |
| LOS        | TR   | 60    | 5,5 | 460                                    | 4,12 | 347,53 | 4,71 | 5,95  | 2,88e+07   | 4,61e+07   |
| LOS        | VAL  | 60    | 5,5 | 250                                    | 4,12 | 347,53 | 4,71 | 5,95  | 1,28e+08   | 1,29e+08   |
| LOS        | TEST | 60    | 5,5 | 40                                     | 4,12 | 347,53 | 4,71 | 5,95  | 5,74e+08   | 6,33e+08   |
| LOS        | TR   | 30    | 5,5 | 250                                    | 4,12 | 347,53 | 4,71 | 5,95  | 8,84e+07   | 1,05e+08   |
| LOS        | TR   | 90    | 5,5 | 250                                    | 4,12 | 347,53 | 4,71 | 5,95  | 1,36e+08   | 1,54e+08   |
| LOS        | VAL  | 42    | 7,3 | 125                                    | 4,12 | 347,14 | 4,71 | 6,05  | 1,62e+08   | 2,45e+08   |
| LOS        | TR   | 78    | 7,3 | 125                                    | 4,12 | 347,14 | 4,71 | 6,05  | 2,28e+08   | 3,07e+08   |
| LOS        | VAL  | 42    | 7,3 | 375                                    | 4,12 | 347,14 | 4,71 | 6,05  | 4,21e+07   | 6,13e+07   |
| LOS        | TR   | 78    | 7,3 | 375                                    | 4,12 | 347,14 | 4,71 | 6,05  | 5,21e+07   | 7,53e+07   |
| LOS        | TR   | 60    | 8,5 | 250                                    | 4,12 | 344,91 | 4,71 | 6,65  | 1,74e+08   | 1,50e+08   |

| Jedinjenje | Set  | %MeOH | pH  | Protok<br>( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) | pKa  | SEV    | logP | H-acc | SI <sub>EXP</sub> | SI <sub>ANN</sub> |
|------------|------|-------|-----|--|------|--------|------|-------|-------------------|-------------------|
| IRB        | TR   | 60    | 2,5 | 250                                    | 4,12 | 380,00 | 6,65 | 4     | 7,45e+08          | 8,23e+08          |
| IRB        | TR   | 78    | 3,7 | 375                                    | 4,12 | 378,17 | 6,65 | 4,28  | 4,99e+08          | 6,80e+08          |
| IRB        | TR   | 42    | 3,7 | 125                                    | 4,12 | 378,17 | 6,65 | 4,28  | 1,14e+09          | 1,02e+09          |
| IRB        | TR   | 42    | 3,7 | 375                                    | 4,12 | 378,17 | 6,65 | 4,28  | 4,15e+08          | 3,86e+08          |
| IRB        | TEST | 78    | 3,7 | 125                                    | 4,12 | 378,17 | 6,65 | 4,28  | 1,61e+09          | 1,64e+09          |
| IRB        | TR   | 60    | 5,5 | 460                                    | 4,12 | 373,79 | 6,65 | 4,95  | 2,79e+08          | 3,52e+08          |
| IRB        | TR   | 60    | 5,5 | 250                                    | 4,12 | 373,79 | 6,65 | 4,95  | 6,69e+08          | 7,67e+08          |
| IRB        | TR   | 60    | 5,5 | 40                                     | 4,12 | 373,79 | 6,65 | 4,95  | 4,67e+09          | 4,77e+09          |
| IRB        | TR   | 30    | 5,5 | 250                                    | 4,12 | 373,79 | 6,65 | 4,95  | 4,6e+08           | 4,82e+08          |
| IRB        | TR   | 90    | 5,5 | 250                                    | 4,12 | 373,79 | 6,65 | 4,95  | 8,23e+08          | 1,17e+09          |
| IRB        | TEST | 42    | 7,3 | 125                                    | 4,12 | 373,46 | 6,65 | 5,1   | 1,1e+09           | 9,67e+08          |
| IRB        | TR   | 78    | 7,3 | 125                                    | 4,12 | 373,46 | 6,65 | 5,1   | 1,45e+09          | 1,57e+09          |
| IRB        | TEST | 42    | 7,3 | 375                                    | 4,12 | 373,46 | 6,65 | 5,1   | 3,66e+08          | 3,66e+08          |
| IRB        | TEST | 78    | 7,3 | 375                                    | 4,12 | 373,46 | 6,65 | 5,1   | 4,64e+08          | 6,47e+08          |
| IRB        | TR   | 60    | 8,5 | 250                                    | 4,12 | 373,46 | 6,65 | 5,65  | 8,58e+08          | 7,81e+08          |
| TEL        | VAL  | 60    | 2,5 | 250                                    | 6,13 | 451,88 | 7,46 | 2     | 1,66e+09          | 1,68e+09          |
| TEL        | TR   | 78    | 3,7 | 375                                    | 6,13 | 453,16 | 7,46 | 2     | 1,63e+09          | 1,54e+09          |
| TEL        | TR   | 42    | 3,7 | 125                                    | 6,13 | 453,16 | 7,46 | 2     | 2,58e+09          | 2,78e+09          |
| TEL        | VAL  | 42    | 3,7 | 375                                    | 6,13 | 453,16 | 7,46 | 2     | 1,24e+09          | 9,55e+08          |
| TEL        | TR   | 78    | 3,7 | 125                                    | 6,13 | 453,16 | 7,46 | 2     | 3,83e+09          | 3,91e+09          |
| TEL        | TR   | 60    | 5,5 | 460                                    | 6,13 | 449,86 | 7,46 | 3,1   | 8,37e+08          | 9,24e+08          |
| TEL        | TR   | 60    | 5,5 | 250                                    | 6,13 | 449,86 | 7,46 | 3,1   | 1,6e+09           | 1,64e+09          |
| TEL        | TR   | 60    | 5,5 | 40                                     | 6,13 | 449,86 | 7,46 | 3,1   | 1,17e+10          | 1,17e+10          |
| TEL        | TR   | 30    | 5,5 | 250                                    | 6,13 | 449,86 | 7,46 | 3,1   | 6,6e+08           | 1,12e+09          |
| TEL        | TR   | 90    | 5,5 | 250                                    | 6,13 | 449,86 | 7,46 | 3,1   | 2,17e+09          | 2,26e+09          |
| TEL        | TR   | 42    | 7,3 | 125                                    | 6,13 | 444,23 | 7,46 | 3,93  | 2,4e+09           | 2,48e+09          |
| TEL        | TEST | 78    | 7,3 | 125                                    | 6,13 | 444,23 | 7,46 | 3,93  | 3,52e+09          | 3,58e+09          |
| TEL        | TR   | 42    | 7,3 | 375                                    | 6,13 | 444,23 | 7,46 | 3,93  | 1,14e+09          | 8,51e+08          |
| TEL        | TR   | 78    | 7,3 | 375                                    | 6,13 | 444,23 | 7,46 | 3,93  | 1,56e+09          | 1,40e+09          |
| TEL        | TR   | 60    | 8,5 | 250                                    | 6,13 | 443,73 | 7,46 | 4     | 1,88e+09          | 1,54e+09          |
| CAN        | TR   | 60    | 2,5 | 250                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 3,1e+08           | 2,66e+08          |
| CAN        | TR   | 78    | 3,7 | 375                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 1,53e+08          | 2,38e+08          |
| CAN        | VAL  | 42    | 3,7 | 125                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 2,11e+08          | 3,18e+08          |
| CAN        | TR   | 42    | 3,7 | 375                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 8,26e+07          | 1,38e+08          |
| CAN        | TR   | 78    | 3,7 | 125                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 6,09e+08          | 5,76e+08          |
| CAN        | TR   | 60    | 5,5 | 460                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 8,67e+07          | 1,40e+08          |
| CAN        | TR   | 60    | 5,5 | 250                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 2,54e+08          | 2,66e+08          |
| CAN        | TR   | 60    | 5,5 | 40                                     | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 1,56e+09          | 1,62e+09          |
| CAN        | TR   | 30    | 5,5 | 250                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 1,02e+08          | 1,67e+08          |
| CAN        | VAL  | 90    | 5,5 | 250                                    | 1,72 | 504,79 | 7,34 | 8     | 3,34e+08          | 4,34e+08          |
| CAN        | TR   | 42    | 7,3 | 125                                    | 1,72 | 504,67 | 7,34 | 8,1   | 3,95e+08          | 3,18e+08          |

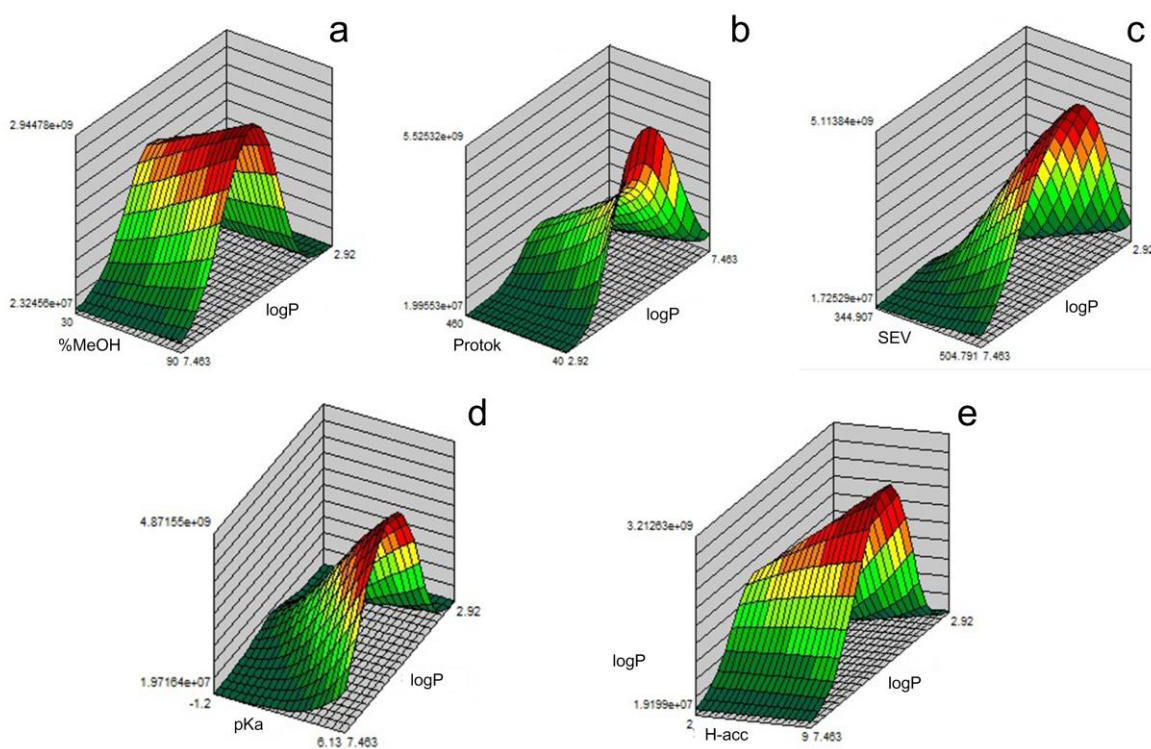
| Jedinjenje | Set  | %MeOH | pH  | Protok<br>( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) | pKa  | SEV    | logP | H-acc | SI <sub>EXP</sub> | SI <sub>ANN</sub> |
|------------|------|-------|-----|--|------|--------|------|-------|-------------------|-------------------|
| CAN        | TR   | 78    | 7,3 | 125                                    | 1,72 | 504,67 | 7,34 | 8,1   | 5,61e+08          | 5,74e+08          |
| CAN        | TR   | 42    | 7,3 | 375                                    | 1,72 | 504,67 | 7,34 | 8,1   | 7,64e+07          | 1,38e+08          |
| CAN        | TEST | 78    | 7,3 | 375                                    | 1,72 | 504,67 | 7,34 | 8,1   | 1,42e+08          | 2,37e+08          |
| CAN        | TR   | 60    | 8,5 | 250                                    | 1,72 | 503,94 | 7,34 | 8,7   | 4,19e+08          | 2,62e+08          |
| OLM        | TR   | 60    | 2,5 | 250                                    | 3,93 | 467,51 | 2,92 | 7     | 3,34e+08          | 2,16e+08          |
| OLM        | VAL  | 78    | 3,7 | 375                                    | 3,93 | 464,42 | 2,92 | 7,56  | 1,41e+08          | 1,28e+08          |
| OLM        | TR   | 42    | 3,7 | 125                                    | 3,93 | 464,42 | 2,92 | 7,56  | 4,13e+08          | 4,45e+08          |
| OLM        | TR   | 42    | 3,7 | 375                                    | 3,93 | 464,42 | 2,92 | 7,56  | 1,14e+08          | 1,17e+08          |
| OLM        | TR   | 78    | 3,7 | 125                                    | 3,93 | 464,42 | 2,92 | 7,56  | 5,3e+08           | 4,87e+08          |
| OLM        | TEST | 60    | 5,5 | 460                                    | 3,93 | 456,48 | 2,92 | 9     | 8,44e+07          | 9,81e+07          |
| OLM        | TR   | 60    | 5,5 | 250                                    | 3,93 | 456,48 | 2,92 | 9     | 3,51e+08          | 2,92e+08          |
| OLM        | TR   | 60    | 5,5 | 40                                     | 3,93 | 456,48 | 2,92 | 9     | 1,23e+09          | 1,24e+09          |
| OLM        | VAL  | 30    | 5,5 | 250                                    | 3,93 | 456,48 | 2,92 | 9     | 2,37e+08          | 2,70e+08          |
| OLM        | TR   | 90    | 5,5 | 250                                    | 3,93 | 456,48 | 2,92 | 9     | 3,02e+08          | 3,16e+08          |
| OLM        | TR   | 42    | 7,3 | 125                                    | 3,93 | 456,99 | 2,92 | 8,87  | 3,94e+08          | 5,32e+08          |
| OLM        | TR   | 78    | 7,3 | 125                                    | 3,93 | 456,99 | 2,92 | 8,87  | 4,89e+08          | 5,80e+08          |
| OLM        | TR   | 42    | 7,3 | 375                                    | 3,93 | 456,99 | 2,92 | 8,87  | 4,85e+07          | 1,39e+08          |
| OLM        | TR   | 78    | 7,3 | 375                                    | 3,93 | 456,99 | 2,92 | 8,87  | 3,73e+07          | 1,53e+08          |
| OLM        | VAL  | 60    | 8,5 | 250                                    | 3,93 | 456,99 | 2,92 | 8,87  | 2,22e+08          | 2,83e+08          |
| EPR        | TR   | 60    | 2,5 | 250                                    | 4,31 | 354,50 | 5,05 | 5     | 4,76e+08          | 3,75e+08          |
| EPR        | TR   | 78    | 3,7 | 375                                    | 4,31 | 354,64 | 5,05 | 5     | 2,85e+08          | 2,11e+08          |
| EPR        | VAL  | 42    | 3,7 | 125                                    | 4,31 | 354,64 | 5,05 | 5     | 5,31e+08          | 6,69e+08          |
| EPR        | TEST | 42    | 3,7 | 375                                    | 4,31 | 354,64 | 5,05 | 5     | 1,83e+08          | 1,56e+08          |
| EPR        | TR   | 78    | 3,7 | 125                                    | 4,31 | 354,64 | 5,05 | 5     | 1,04e+09          | 8,55e+08          |
| EPR        | TR   | 60    | 5,5 | 460                                    | 4,31 | 354,73 | 5,05 | 5     | 1,34e+08          | 1,12e+08          |
| EPR        | TR   | 60    | 5,5 | 250                                    | 4,31 | 354,73 | 5,05 | 5     | 3,5e+08           | 3,79e+08          |
| EPR        | TR   | 60    | 5,5 | 40                                     | 4,31 | 354,73 | 5,05 | 5     | 1,95e+09          | 1,99e+09          |
| EPR        | TEST | 30    | 5,5 | 250                                    | 4,31 | 354,73 | 5,05 | 5     | 3,45e+08          | 2,95e+08          |
| EPR        | TR   | 90    | 5,5 | 250                                    | 4,31 | 354,73 | 5,05 | 5     | 6,02e+08          | 4,73e+08          |
| EPR        | TR   | 42    | 7,3 | 125                                    | 4,31 | 350,96 | 5,05 | 5,7   | 8,94e+08          | 7,16e+08          |
| EPR        | TEST | 78    | 7,3 | 125                                    | 4,31 | 350,96 | 5,05 | 5,7   | 8,48e+08          | 9,16e+08          |
| EPR        | TR   | 42    | 7,3 | 375                                    | 4,31 | 350,96 | 5,05 | 5,7   | 2,08e+08          | 1,68e+08          |
| EPR        | TR   | 78    | 7,3 | 375                                    | 4,31 | 350,96 | 5,05 | 5,7   | 1,83e+08          | 2,30e+08          |
| EPR        | VAL  | 60    | 8,5 | 250                                    | 4,31 | 349,62 | 5,05 | 5,95  | 6,1e+08           | 4,19e+08          |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević, J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)



#### 4.4.4. Poređenje sa MLR

Kao i u prethodnim istraživanjima, trening i validacioni set upotrebljeni za ANN modelovanje su upotrebljeni za formiranje (konstrukciju) MLR modela ( $n = 90$ ), dok je test set iz ANN modela zadržan kao takav ( $n = 15$ ). Kao značajni faktori pokazali su se SEV, protok i H-acc, prema opadajućoj značajnosti regresionog koeficijenta ( $p < 0,05$ ). Postupna MLR analiza dala je loše rezultate:  $R^2$  za trening set bio je 0,419, uz vrednost  $F = 20,7$ . Sposobnost predviđanja mreže proverena je kroz test set i dobijena je vrednost  $R^2$  od 0,632. Ovi rezultati ukazuju na značajnu nelinearnu zavisnost ulaznih i izlazne promenljive, gde ANN pokazuju mnogo bolje rezultate od MLR.



Slika 34. Dijagrami površine odgovora koje predviđa optimalna mreža u zavisnosti od log P i drugog faktora, dok su preostali faktori konstantni, na sredjem nivou: (a) %MeOH; (b) protok; (c) SEV; (d) pKa; (e) H-acc.

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

#### 4.4.5. Uticaj variranih instrumentalnih faktora na intenzitet signala MS/MS tranzicija

Određene su dve najdominantnije MS/MS tranzicije za svaki analit, nakon čega su optimizovani CE i CXP za svaku tranziciju (Tabela 25). Iako je u literaturi pronađena studija u kojoj je dobijen različit odnos intenziteta signala dominantnih tranzicija pri različitim hromatografskim uslovima (pH mobilne faze, koncentracija pufera i udeo organskog rastvarača) za tri leka iz grupe fluorohinolona [226], sličan efekat nije uočen na primeru sartana. Dobijena je mala varijacija odnosa signala dve najdominantnije tranzicije pri različitim uslovima (izražene preko RSD vrednosti u Tabeli 25), što ukazuje na zanemarljiv uticaj ispitivanih LC uslova na proces fragmentacije. Nešto viša vrednost RSD za kandesartan cileksetil, verovatnije je dobijena usled jako malog intenziteta tranzicije 611,53→395,1 nego zbog uticaja testiranih uslova. Intenziteti tranzicija i njihovi odnosi pri različitim uslovima prikazani su u Tabeli 26.

Tabela 25. MRM eksperimentalni podaci: dve najdominantnije tranzicije (T1 i T2), optimizovana koliziona energija (CE) potencijal na izlazu iz koliziono ćelije (CXP), relativna standardna devijacija odnosa intenziteta signala dve najdominantnije tranzicije pod različitim uslovima (RSD).

| Analit                 | T1          | CE (T1) | CXP (T1) | T2          | CE (T2) | CXP (T2) | RSD (%) |
|------------------------|-------------|---------|----------|-------------|---------|----------|---------|
| Valsartan              | 436,1→235,0 | 26      | 4,5      | 436,1→235,0 | 26      | 4,5      | 9,57    |
| Losartan               | 423,2→207,0 | 35      | 3,5      | 423,2→207,0 | 35      | 3,5      | 9,82    |
| Irbesartan             | 429,3→207,0 | 35      | 4        | 429,3→207,0 | 35      | 4        | 4,44    |
| Telmisartan            | 515,3→276,0 | 60      | 6        | 515,3→276,0 | 60      | 6        | 7,96    |
| Kandesartan cileksetil | 611,5→423,2 | 20      | 4,5      | 611,5→423,2 | 20      | 4,5      | 18,32   |
| Olmesartan medoksomil  | 559,3→207,0 | 45      | 4        | 559,3→207,0 | 45      | 4        | 7,6     |
| Eprosartan             | 425,2→135,1 | 45      | 2        | 425,2→135,1 | 45      | 2        | 2,82    |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

Tabela 26. Intenzitet signala MRM tranzicija i njihovi odnosi

| Jedinjenje | %MeOH | pH  | Protok<br>( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) | SI <sub>T1</sub> | SI <sub>T2</sub> | Odnos<br>SI <sub>T1</sub> /SI <sub>T2</sub> |
|------------|-------|-----|--|------------------|------------------|---|
| VAL        | 60    | 5,5 | 460                                    | 7,39E+04         | 3,77E+04         | 1,96  |
| VAL        | 60    | 5,5 | 250                                    | 6,95E+05         | 4,24E+05         | 1,64  |
| VAL        | 60    | 5,5 | 40                                     | 9,37E+05         | 4,77E+05         | 1,96  |
| VAL        | 30    | 5,5 | 250                                    | 4,74E+05         | 3,04E+05         | 1,56  |
| VAL        | 60    | 2,5 | 250                                    | 6,70E+05         | 4,23E+05         | 1,58  |
| VAL        | 90    | 5,5 | 250                                    | 6,14E+05         | 3,81E+05         | 1,61  |
| VAL        | 42    | 7,3 | 125                                    | 5,90E+05         | 3,57E+05         | 1,65  |
| VAL        | 60    | 8,5 | 250                                    | 8,34E+05         | 5,28E+05         | 1,58  |
| VAL        | 78    | 7,3 | 125                                    | 7,97E+05         | 4,69E+05         | 1,70  |
| VAL        | 42    | 7,3 | 375                                    | 6,87E+04         | 3,58E+04         | 1,92  |
| VAL        | 78    | 3,7 | 375                                    | 9,32E+04         | 4,75E+04         | 1,96  |
| VAL        | 78    | 7,3 | 375                                    | 9,07E+04         | 4,58E+04         | 1,98  |
| VAL        | 42    | 3,7 | 125                                    | 4,68E+05         | 2,76E+05         | 1,70  |
| VAL        | 42    | 3,7 | 375                                    | 5,68E+04         | 2,95E+04         | 1,93  |
| VAL        | 78    | 3,7 | 125                                    | 7,64E+05         | 4,64E+05         | 1,65  |
| LOS        | 60    | 5,5 | 460                                    | 4,20E+05         | 5,58E+04         | 7,53  |
| LOS        | 60    | 5,5 | 250                                    | 1,71E+06         | 2,84E+05         | 6,02  |
| LOS        | 60    | 5,5 | 40                                     | 7,13E+06         | 1,10E+06         | 6,48  |
| LOS        | 30    | 5,5 | 250                                    | 1,18E+06         | 2,21E+05         | 5,34  |
| LOS        | 60    | 2,5 | 250                                    | 1,87E+06         | 3,46E+05         | 5,40  |
| LOS        | 90    | 5,5 | 250                                    | 1,78E+06         | 3,21E+05         | 5,55  |
| LOS        | 42    | 7,3 | 125                                    | 2,03E+06         | 3,50E+05         | 5,80  |
| LOS        | 60    | 8,5 | 250                                    | 2,19E+06         | 4,23E+05         | 5,18  |
| LOS        | 78    | 7,3 | 125                                    | 2,85E+06         | 4,78E+05         | 5,96  |
| LOS        | 42    | 7,3 | 375                                    | 4,47E+05         | 7,11E+04         | 6,29  |
| LOS        | 78    | 3,7 | 375                                    | 6,11E+05         | 9,52E+04         | 6,42  |
| LOS        | 78    | 7,3 | 375                                    | 5,98E+05         | 9,30E+04         | 6,43  |
| LOS        | 42    | 3,7 | 125                                    | 1,92E+06         | 3,38E+05         | 5,68  |
| LOS        | 42    | 3,7 | 375                                    | 4,47E+05         | 7,15E+04         | 6,25  |
| LOS        | 78    | 3,7 | 125                                    | 2,92E+06         | 4,93E+05         | 5,92  |
| IRB        | 60    | 5,5 | 460                                    | 5,12E+06         | 6,50E+05         | 7,88  |
| IRB        | 60    | 5,5 | 250                                    | 1,04E+07         | 1,47E+06         | 7,07  |
| IRB        | 60    | 5,5 | 40                                     | 7,95E+07         | 9,88E+06         | 8,05  |
| IRB        | 30    | 5,5 | 250                                    | 7,96E+06         | 1,09E+06         | 7,30  |
| IRB        | 60    | 2,5 | 250                                    | 1,27E+07         | 1,77E+06         | 7,18  |
| IRB        | 90    | 5,5 | 250                                    | 1,38E+07         | 1,85E+06         | 7,46  |
| IRB        | 42    | 7,3 | 125                                    | 1,77E+07         | 2,35E+06         | 7,53  |
| IRB        | 60    | 8,5 | 250                                    | 1,39E+07         | 1,90E+06         | 7,32  |
| IRB        | 78    | 7,3 | 125                                    | 2,43E+07         | 3,14E+06         | 7,74  |
| IRB        | 42    | 7,3 | 375                                    | 5,57E+06         | 7,18E+05         | 7,76  |
| IRB        | 78    | 3,7 | 375                                    | 7,94E+06         | 1,00E+06         | 7,94  |
| IRB        | 78    | 7,3 | 375                                    | 7,41E+06         | 9,44E+05         | 7,85  |
| IRB        | 42    | 3,7 | 125                                    | 1,81E+07         | 2,37E+06         | 7,64  |

| Jedinjenje | %MeOH | pH  | Protok<br>( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) | SI <sub>T1</sub> | SI <sub>T2</sub> | Odnos<br>SI <sub>T1</sub> /SI <sub>T2</sub> |
|------------|-------|-----|--|------------------|------------------|---|
| IRB        | 42    | 3,7 | 375                                    | 6,26E+06         | 7,54E+05         | 8,30  |
| IRB        | 78    | 3,7 | 125                                    | 2,63E+07         | 3,45E+06         | 7,62  |
| TEL        | 60    | 5,5 | 250                                    | 7,86E+06         | 3,21E+06         | 2,45  |
| TEL        | 60    | 5,5 | 40                                     | 1,11E+07         | 4,46E+06         | 2,49  |
| TEL        | 30    | 5,5 | 250                                    | 1,16E+08         | 5,57E+07         | 2,08  |
| TEL        | 60    | 2,5 | 250                                    | 5,31E+06         | 2,66E+06         | 2,00  |
| TEL        | 90    | 5,5 | 250                                    | 1,50E+07         | 7,14E+06         | 2,10  |
| TEL        | 42    | 7,3 | 125                                    | 1,89E+07         | 9,25E+06         | 2,04  |
| TEL        | 60    | 8,5 | 250                                    | 1,78E+07         | 8,77E+06         | 2,03  |
| TEL        | 78    | 7,3 | 125                                    | 1,42E+07         | 7,37E+06         | 1,93  |
| TEL        | 42    | 7,3 | 375                                    | 2,84E+07         | 1,43E+07         | 1,99  |
| TEL        | 78    | 3,7 | 375                                    | 7,78E+06         | 3,91E+06         | 1,99  |
| TEL        | 78    | 7,3 | 375                                    | 1,35E+07         | 6,52E+06         | 2,07  |
| TEL        | 42    | 3,7 | 125                                    | 1,23E+07         | 6,08E+06         | 2,02  |
| TEL        | 42    | 3,7 | 375                                    | 1,89E+07         | 9,48E+06         | 1,99  |
| TEL        | 78    | 3,7 | 125                                    | 9,20E+06         | 4,70E+06         | 1,96  |
| TEL        | 60    | 5,5 | 250                                    | 3,17E+07         | 1,56E+07         | 2,03  |
| CAN        | 60    | 5,5 | 250                                    | 8,34E+05         | 5,27E+04         | 15,83                                       |
| CAN        | 60    | 5,5 | 40                                     | 1,92E+06         | 6,65E+04         | 28,87                                       |
| CAN        | 30    | 5,5 | 250                                    | 1,04E+07         | 4,42E+05         | 23,53                                       |
| CAN        | 60    | 2,5 | 250                                    | 6,71E+05         | 2,19E+04         | 30,64                                       |
| CAN        | 90    | 5,5 | 250                                    | 2,33E+06         | 8,66E+04         | 26,91                                       |
| CAN        | 42    | 7,3 | 125                                    | 2,43E+06         | 8,92E+04         | 27,24                                       |
| CAN        | 60    | 8,5 | 250                                    | 2,23E+06         | 8,23E+04         | 27,10                                       |
| CAN        | 78    | 7,3 | 125                                    | 3,22E+06         | 1,09E+05         | 29,54                                       |
| CAN        | 42    | 7,3 | 375                                    | 4,22E+06         | 1,54E+05         | 27,40                                       |
| CAN        | 78    | 3,7 | 375                                    | 4,98E+05         | 1,89E+04         | 26,35                                       |
| CAN        | 78    | 7,3 | 375                                    | 9,32E+05         | 3,79E+04         | 24,59                                       |
| CAN        | 42    | 3,7 | 125                                    | 8,79E+05         | 3,59E+04         | 24,48                                       |
| CAN        | 42    | 3,7 | 375                                    | 1,26E+06         | 4,60E+04         | 27,39                                       |
| CAN        | 78    | 3,7 | 125                                    | 5,44E+05         | 2,08E+04         | 26,15                                       |
| CAN        | 60    | 5,5 | 250                                    | 4,35E+06         | 1,65E+05         | 26,36                                       |
| OLM        | 60    | 5,5 | 250                                    | 1,48E+06         | 3,06E+05         | 4,84  |
| OLM        | 60    | 5,5 | 40                                     | 4,93E+06         | 1,02E+06         | 4,83  |
| OLM        | 30    | 5,5 | 250                                    | 1,72E+07         | 4,16E+06         | 4,13  |
| OLM        | 60    | 2,5 | 250                                    | 3,52E+06         | 8,68E+05         | 4,06  |
| OLM        | 90    | 5,5 | 250                                    | 4,87E+06         | 1,24E+06         | 3,93  |
| OLM        | 42    | 7,3 | 125                                    | 4,30E+06         | 1,07E+06         | 4,02  |
| OLM        | 60    | 8,5 | 250                                    | 5,37E+06         | 1,36E+06         | 3,95  |
| OLM        | 78    | 7,3 | 125                                    | 2,91E+06         | 7,23E+05         | 4,02  |
| OLM        | 42    | 7,3 | 375                                    | 6,41E+06         | 1,65E+06         | 3,88  |
| OLM        | 78    | 3,7 | 375                                    | 6,31E+05         | 1,59E+05         | 3,97  |
| OLM        | 78    | 7,3 | 375                                    | 1,93E+06         | 4,92E+05         | 3,92  |
| OLM        | 42    | 3,7 | 125                                    | 1,50E+06         | 3,74E+05         | 4,01  |

| Jedinjenje | %MeOH | pH  | Protok<br>( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) | SI <sub>T1</sub> | SI <sub>T2</sub> | Odnos<br>SI <sub>T1</sub> /SI <sub>T2</sub> |
|------------|-------|-----|--|------------------|------------------|---|
| OLM        | 42    | 3,7 | 375                                    | 5,72E+06         | 1,40E+06         | 4,09  |
| OLM        | 78    | 3,7 | 125                                    | 1,52E+06         | 3,93E+05         | 3,87  |
| OLM        | 60    | 5,5 | 250                                    | 7,21E+06         | 1,86E+06         | 3,88  |
| EPR        | 60    | 5,5 | 250                                    | 9,49E+05         | 7,96E+05         | 1,19  |
| EPR        | 60    | 5,5 | 40                                     | 3,52E+06         | 2,83E+06         | 1,24  |
| EPR        | 30    | 5,5 | 250                                    | 1,58E+07         | 1,32E+07         | 1,20  |
| EPR        | 60    | 2,5 | 250                                    | 2,76E+06         | 2,27E+06         | 1,22  |
| EPR        | 90    | 5,5 | 250                                    | 3,88E+06         | 3,19E+06         | 1,22  |
| EPR        | 42    | 7,3 | 125                                    | 4,09E+06         | 3,29E+06         | 1,24  |
| EPR        | 60    | 8,5 | 250                                    | 7,03E+06         | 5,89E+06         | 1,19  |
| EPR        | 78    | 7,3 | 125                                    | 4,87E+06         | 4,06E+06         | 1,20  |
| EPR        | 42    | 7,3 | 375                                    | 7,86E+06         | 6,45E+06         | 1,22  |
| EPR        | 78    | 3,7 | 375                                    | 1,33E+06         | 1,13E+06         | 1,18  |
| EPR        | 78    | 7,3 | 375                                    | 1,99E+06         | 1,66E+06         | 1,20  |
| EPR        | 42    | 3,7 | 125                                    | 1,28E+06         | 1,03E+06         | 1,24  |
| EPR        | 42    | 3,7 | 375                                    | 5,74E+06         | 4,87E+06         | 1,18  |
| EPR        | 78    | 3,7 | 125                                    | 1,20E+06         | 1,04E+06         | 1,15  |
| EPR        | 60    | 5,5 | 250                                    | 1,01E+07         | 8,13E+06         | 1,24  |

(Prilagođeno iz: **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević. J. Chrom. A 1438 (2016) 123–132)

## **5. ZAKLJUČAK**

1. Uspostavljen je QSRR model retencionog ponašanja antimikotika azola uz primenu veštačkih neuronskih mreža u UHPLC sistemu

Odabrani su deskriptori koji u dobroj meri opisuju retenciono ponašanje na osnovu teorijskih pretpostavki i ispitivanja međusobne korelacije – logD, MA, MR, DEN, NON-1,4 VDW, H-don i H-acc. Odabrani su hromatografski parametri koji pokazuju značajan uticaj na retenciono ponašanje primenom eksperimentalnog dizajna – udeo acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vodenog dela mobilne faze. Odabrani molekularni deskriptori i hromatografski parametri činili su ulazne promenljive, dok je retencioni faktor predstavljao izlaznu promenljivu (odgovor) pri optimizaciji veštačke neuronske mreže, u cilju dobijanja mreže koja najbolje predviđa odgovor. Dobijena optimalna mreža pokazala je visok stepen tačnosti u predviđanju retencionog faktora analita koje nije učestvovalo u formiranju modela – ekonazola. Visoka tačnost se ogleda kroz visok koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,9871$ ) i malu grešku u predviđanju odgovora (RMSE = 2,777). Veštačke neuronske mreže pokazale su značajno bolje rezultate predviđanja odgovora u odnosu na MLR analizu za ispitivane faktore.

2. Uspostavljen je QSRR model retencionog ponašanja kandesartan cileksetila kao aktivne farmaceutske supstance i njegovih degradacionih uz primenu veštačkih neuronskih mreža, u cilju razvoja *stability indicating* metode

Izvedena je studija forsirane degradacije i identifikovano je osam degradacionih proizvoda na osnovu masenih spektara, poređenjem sa spektrima standarda ili literaturnim podacima. Jedan od dva fotolitička degradaciona proizvoda isključen je iz daljeg ispitivanja jer se ne očekuje u studijama formalne stabilnosti. Odabrani su deskriptori koji u dobroj meri opisuju retenciono ponašanje na osnovu teorijskih pretpostavki i ispitivanja međusobne korelacije – POL, NON-1,4 VDW, H-don i H-acc i logD. Odabrani su hromatografski parametri koji pokazuju značajan uticaj na retenciono ponašanje primenom eksperimentalnog dizajna – procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodenog dela mobilne faze i molaritet acetatnog pufera. Odabrani molekularni deskriptori i hromatografski parametri činili su ulazne promenljive, dok je retencioni faktor predstavljao izlaznu promenljivu

(odgovor) pri optimizaciji veštačke neuronske mreže, u cilju dobijanja mreže koja najbolje predviđa odgovor. Dobijena optimalna mreža pokazala je visok stepen tačnosti u predviđanju retencionog faktora za test set ( $R^2 = 0,996$ ,  $RMSE = 0,6763$ ). Veštačke neuronske mreže pokazale su značajno bolje rezultate predviđanja odgovora u odnosu na MLR analizu za date ispitivane faktore. Izvršena je optimizacija HPLC metode primenom metodologije površine odgovora, pri čemu je dobijena kompletna separacija svih ispitivanih supstanci, zadovoljavajuće retenciono ponašanje analita koji se prvi eluira i vreme trajanja analitičkog rana od 27 minuta. Kao optimalni hromatografski uslovi odabrani su: mobilna faza koja se sastoji od 47 % (v/v) acetonitrila i 53 % 5mM amonijum acetata kome je podešen pH na 2,5 glacijalnom sirćetnom kiselinom, temperatura kolone od 20 °C i protok 1,5 mL/min. Izvršena je analiza uticaja ulaznih promenljivih na model, odnosno molekulskih deskriptora na odgovor.

3. Uspostavljen je QSRR model retencionog ponašanja antagonista angiotenzin II receptora - sartana uz primenu veštačkih neuronskih mreža u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem

Molekulski deskriptori za modelovanje su odabrani na osnovu teorijskih pretpostavki i prethodnih istraživanja: SEV, NON-1,4 VDW, log D, POL, H-don i H-acc. Odabrani molekularni deskriptori i hromatografski parametri (vreme gradijenta, molaritet pufera i pH vodenog dela mobilne faze) činili su ulazne promenljive, dok je retenciono vreme postavljeno kao odgovor koji se prati, tj. izlazna promenljiva pri optimizaciji veštačke neuronske mreže, u cilju dobijanja mreže koja najbolje predviđa odgovor. Za potrebe optimizacije HPLC metode za razdvajanje sartana što kraćem vremenskom periodu, test set podataka je odabran nasumično iz ukupnog seta podataka. Dobijena optimalna mreža pokazala je visok stepen tačnosti u predviđanju retencionog faktora za test set ( $R^2 = 0,995$ ,  $RMSE = 0,1376$ ). Kriterijumi za optimizaciju metode bili su kompletna separacija analita uz što kraće trajanje analitičkog rana. Optimalni hromatografski uslovi odabrani su nakon mapiranja faktora rezolucije u ispitivanom opsegu hromatografskih uslova bili su: vreme gradijenta od 12,5 minuta, pH vodenog dela mobilne faze od 3,95 i koncentracija amonijum acetata u puferu od 25 mM, uz temperaturu kolone od 25 °C i protok od 1,5 mL/min. Za potrebe predviđanja



retencije novog analita, test set su činili podaci koji pripadaju irbesartanu. Dobijena optimalna mreža pokazala je visok stepen tačnosti u predviđanju retencionog faktora za test set ( $R^2 = 0,985$ ,  $RMSE = 0,1613$ ). Izvršena je analiza uticaja ulaznih promenljivih na model, odnosno molekulskih deskriptora na odogovor.

4. Uspostavljen je QSPR model intenziteta signala u masenom spektrometru antagonista angiotenzin II receptora - sartana uz primenu veštačkih neuronskih mreža

Instrumentalni parametri optimizovani u cilju dobijanja pouzdanog i reproduktivnog sistema. Primenjena je pozitivna, elektrosprej jonizacija. Odabir molekulskih deskriptora se zasnivao na prethodno publikovanim istraživanjima i opšteprihvaćenim pretpostavkama o procesima ESI jonizacije – bazna pKa, log P, SEV i H-acc. Hromatografski faktori – pH mobilne faze, koncentracija pufera i udeo organskog rastvarača su varirani u skladu sa ograničenjima hromatografskog sistema i masene spektrometrije, a prema eksperimentalnom dizajnu. Odabrani molekulski deskriptori i hromatografski parametri činili su ulazne promenljive, dok je intenzitet signala predstavljao izlaznu promenljivu (odgovor) pri optimizaciji veštačke neuronske mreže, u cilju dobijanja mreže koja najbolje predviđa odgovor. Dobijena optimalna mreža pokazala je visok stepen tačnosti u predviđanju intenziteta signala za test set ( $R^2 = 0,994$ ,  $RMSE = 7,278 \times 10^7$ ). Veštačke neuronske mreže pokazale su značajno bolje rezultate predviđanja odgovora u odnosu na MLR analizu za date ispitivane faktore. Izvršena je analiza uticaja ulaznih promenljivih na model, odnosno molekulskih deskriptora na odgovor, kao i poređenje trendova koje predviđa optimalna mreža i eksperimentalno dobijenih trendova za date faktore. Ispitan je uticaj hromatografskih uslova na odnos intenziteta signala dominantnih tranzicija, ali nije uočen značajan uticaj.

## **6. LITERATURA**

- [1] L.P. Hammett, Some Relations between Reaction Rates and Equilibrium Constants, *Chemical Reviews*, 17 (1935) 125-136.
- [2] A. Cherkasov, E.N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I.I. Baskin, M. Cronin, J. Dearden, P. Gramatica, Y.C. Martin, R. Todeschini, V. Consonni, V.E. Kuz'min, R. Cramer, R. Benigni, C. Yang, J. Rathman, L. Terfloth, J. Gasteiger, A. Richard, A. Tropsha, QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To?, *Journal of Medicinal Chemistry*, 57 (2014) 4977-5010.
- [3] K. Bodzioch, A. Durand, R. Kaliszan, T. Baczek, Y. Vander Heyden, Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC, *Talanta*, 81 (2010) 1711-1718.
- [4] W.J. Spillane, C.A. Ryder, M.R. Walsh, P.J. Curran, D.G. Concagh, S.N. Wall, Sulfamate sweeteners, *Food Chemistry*, 56 (1996) 255-261.
- [5] M.G.B. Drew, G.R.H. Wilden, W.J. Spillane, R.M. Walsh, C.A. Ryder, J.M. Simmie, Quantitative Structure–Activity Relationship Studies of Sulfamates RNHSO<sub>3</sub>Na: Distinction between Sweet, Sweet-Bitter, and Bitter Molecules, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 3016-3026.
- [6] F. Yoshii, S. Hirono, Construction of a Quantitative Three-dimensional Model for Odor Quality using Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA), *Chemical Senses*, 21 (1996) 201-210.
- [7] B.E. Mitchell, P.C. Jurs, Prediction of Aqueous Solubility of Organic Compounds from Molecular Structure, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38 (1998) 489-496.
- [8] J. Huuskonen, M. Salo, J. Taskinen, Aqueous Solubility Prediction of Drugs Based on Molecular Topology and Neural Network Modeling, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38 (1998) 450-456.
- [9] O. Wong, R.H. McKeown, Substituent effects on partition coefficients of barbituric acids, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77 (1988) 926-932.
- [10] M. Akamatsu, T. Katayama, D. Kishimoto, Y. Kurokawa, H. Shibata, T. Ueno, T. Fujita, Quantitative analyses of the structure-hydrophobicity relationship for N-acetyl di- and tripeptide amides, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83 (1994) 1026-1033.

- [11] C. Altomare, A. Carotti, S. Cellamare, A. Carrieri, R. Ciabatti, A. Malabarba, Lipophilicity of Teicoplanin Antibiotics as Assessed by Reversed Phase High-performance Liquid Chromatography: Quantitative Structure-property and Structure-activity Relationships, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46 (1994) 994-999.
- [12] J.J. Huuskonen, A.E.P. Villa, I.V. Tetko, Prediction of partition coefficient based on atom-type electrotopological state indices, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (1999) 229-233.
- [13] J. de Bruijn, J. Hermens, Relationships Between Octanol/Water Partition Coefficients and Total Molecular Surface Area and Total Molecular Volume of Hydrophobic Organic Chemicals, *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 9 (1990) 11-21.
- [14] J. Nishikawa, K. Tori, 3-Substituent effect and 3-methylene substituent effect on the structure-reactivity relationship of 7.beta.-(acylamino)-3-cephem-4-carboxylic acid derivatives studied by carbon-13 and IR spectroscopy, *Journal of Medicinal Chemistry*, 27 (1984) 1657-1663.
- [15] W.-C. Gia Nghi, J.M. Mayer, T.-K. Anna, B. Testa, Structure-reactivity relationships in the chemical hydrolysis of prodrug esters of nicotinic acid, *International Journal of Pharmaceutics*, 63 (1990) 129-134.
- [16] M. Brunner-Guenat, P.-A. Carrupt, G. Lisa, B. Testa, S. Rose, K. Thomas, P. Jenner, P. Ventura, Esters of L-Dopa: Structure-hydrolysis Relationships and Ability to Induce Circling Behaviour in an Experimental Model of Hemiparkinsonism, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47 (1995) 861-869.
- [17] M.T.D. Cronin, J.C. Dearden, G.P. Moss, G. Murray-Dickson, Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7 (1999) 325-330.
- [18] N.E. Tayar, R.-S. Tsai, B. Testa, P.-A. Carrupt, C. Hansch, A. Leo, Percutaneous penetration of drugs: A quantitative structure-permeability relationship study, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80 (1991) 744-749.
- [19] P. Singh, M.S. Roberts, Local deep tissue penetration of compounds after dermal application: structure-tissue penetration relationships, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279 (1996) 908-917.

- [20] A.P. Worth, M.T.D. Cronin, Structure-permeability relationships for transcorneal penetration, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28 (2000) 403-413.
- [21] R.H. Guy, R.O. Potts, Structure-permeability relationships in percutaneous penetration, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81 (1992) 603-604.
- [22] R.A. Herman, P. Veng-Pedersen, Quantitative structure–pharmacokinetic relationships for systemic drug distribution kinetics not confined to a congeneric series, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83 (1994) 423-428.
- [23] P.H. van der Graaf, J. Nilsson, E.A. van Schaick, M. Danhof, Multivariate quantitative structure–pharmacokinetic relationships (QSPKR) analysis of adenosine A1 receptor agonists in rat, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (1999) 306-312.
- [24] G.E. Blakey, I.A. Nestorov, P.A. Arundel, L.J. Aarons, M. Rowland, Quantitative Structure-Pharmacokinetics Relationships: I. Development of a Whole-Body Physiologically Based Model to Characterize Changes in Pharmacokinetics Across a Homologous Series of Barbiturates in the Rat, *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 25 (1997) 277-312.
- [25] J.M. Mayer, H. van de Waterbeemd, Development of quantitative structure-pharmacokinetic relationships, *Environmental Health Perspectives*, 61 (1985) 295-306.
- [26] M.D. Barratt, Integration of QSAR and in vitro toxicology, *Environmental Health Perspectives*, 106 (1998) 459-465.
- [27] R. Benigni, A.M. Richard, QSARS of mutagens and carcinogens: Two case studies illustrating problems in the construction of models for noncongeneric chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 371 (1996) 29-46.
- [28] M.T.D. Cronin, J.C. Dearden, QSAR in Toxicology. 3. Prediction of Chronic Toxicities, *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 14 (1995) 329-334.
- [29] M. Karelson, V.S. Lobanov, A.R. Katritzky, Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies, *Chemical Reviews*, 96 (1996) 1027-1043.
- [30] R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley–VCH Verlag, Weinheim, 2000, 2000.
- [31] R. Kaliszan, T. Bączek, A. Buciński, B. Buszewski, M. Sztupecka, Prediction of gradient retention from the linear solvent strength (LSS) model, quantitative structure-retention

relationships (QSRR), and artificial neural networks (ANN), *Journal of Separation Science*, 26 (2003) 271-282.

[32] R. Kaliszan, M.A. van Straten, M. Markuszewski, C.A. Cramers, H.A. Claessens, Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships, *Journal of Chromatography A*, 855 (1999) 455-486.

[33] K. Goryński, B. Bojko, A. Nowaczyk, A. Buciński, J. Pawliszyn, R. Kaliszan, Quantitative structure-retention relationships models for prediction of high performance liquid chromatography retention time of small molecules: Endogenous metabolites and banned compounds, *Analytica Chimica Acta*, 797 (2013) 13-19.

[34] T. Hancock, R. Put, D. Coomans, Y. Vander Heyden, Y. Everingham, A performance comparison of modern statistical techniques for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic QSRR studies, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 76 (2005) 185-196.

[35] R. Put, Q.S. Xu, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, Multivariate adaptive regression splines (MARS) in chromatographic quantitative structure-retention relationship studies, *Journal of Chromatography A*, 1055 (2004) 11-19.

[36] R. Put, M. Daszykowski, T. Baczek, Y. Vander Heyden, Retention Prediction of Peptides Based on Uninformative Variable Elimination by Partial Least Squares, *Journal of Proteome Research*, 5 (2006) 1618-1625.

[37] C. Hansch, A. Leo, Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology, Wiley, New York, 1979.

[38] P.C. Sadek, Study of retention processes in reversed-phase high-performance liquid chromatography by the use of the solvatochromic comparison method, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 2971-2978.

[39] M.H. Abraham, J.C. McGowan, The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography, *Chromatographia*, 23 (1987) 243-246.

[40] M.M. Hsieh, J.G. Dorsey, Accurate determination of log  $k'_w$  in reversed-phase liquid chromatography. Implications for quantitative structure-retention relationships, *Journal of Chromatography A*, 631 (1993) 63-78.

- [41] A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, F. Ruggieri, Artificial neural network prediction of multilinear gradient retention in reversed-phase HPLC: comprehensive QSRR-based models combining categorical or structural solute descriptors and gradient profile parameters, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 1181-1190.
- [42] A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, F. Ruggieri, Prediction of the retention of s-triazines in reversed-phase high-performance liquid chromatography under linear gradient-elution conditions, *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 1930-1936.
- [43] T.H. Miller, A. Musenga, D.A. Cowan, L.P. Barron, Prediction of chromatographic retention time in high-resolution anti-doping screening data using artificial neural networks, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 10330-10337.
- [44] K. Munro, T.H. Miller, C.P.B. Martins, A.M. Edge, D.A. Cowan, L.P. Barron, Artificial neural network modelling of pharmaceutical residue retention times in wastewater extracts using gradient liquid chromatography-high resolution mass spectrometry data, *Journal of Chromatography A*, 1396 (2015) 34-44.
- [45] T. Baczek, K. Bodzioch, E. Michalska, R. Kaliszan, Predictions of reversed-phase gradient elution LC separations supported by QSRR, *Chromatographia*, 68 (2008) 161-166.
- [46] T. Baczek, R. Kaliszan, Combination of linear solvent strength model and quantitative structure-retention relationships as a comprehensive procedure of approximate prediction of retention in gradient liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 962 (2002) 41-55.
- [47] M. Jalali-Heravi, Z. Garkani-Nejad, A. Kyani, Quantitative structure - Retention Relationship study of a variety of compounds in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A PLS-MLR-STANN approach, *QSAR and Combinatorial Science*, 27 (2008) 137-146.
- [48] R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography. A Chemometric Approach*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997.
- [49] A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, F. Ruggieri, Modelling of UPLC behaviour of acylcarnitines by quantitative structure-retention relationships, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 96 (2014) 224-230.
- [50] J. Stasiak, M. Koba, T. Baczek, Quantitative structure-retention relationships studies of selected groups of compounds characterized by different pharmacological activity using

multiple linear regression procedure, *Letters in Drug Design and Discovery*, 11 (2014) 1017-1039.

[51] V.K. Gupta, H. Khani, B. Ahmadi-Roudi, S. Mirakhorli, E. Fereyduni, S. Agarwal, Prediction of capillary gas chromatographic retention times of fatty acid methyl esters in human blood using MLR, PLS and back-propagation artificial neural networks, *Talanta*, 83 (2011) 1014-1022.

[52] M.P. Montaña, N.B. Pappano, N.B. Debattista, J. Raba, J.M. Luco, High-performance liquid chromatography of chalcones: Quantitative structure-retention relationships using partial least-squares (PLS) modeling, *Chromatographia*, 51 (2000) 727-735.

[53] R. Put, C. Perrin, F. Questier, D. Coomans, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure-retention relationship studies, *Journal of Chromatography A*, 988 (2003) 261-276.

[54] G. Carlucci, A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, P. Mazzeo, F. Ruggieri, Investigation of retention behaviour of non-steroidal anti-inflammatory drugs in high-performance liquid chromatography by using quantitative structure-retention relationships, *Analytica Chimica Acta*, 601 (2007) 68-76.

[55] A.A. D'Archivio, A. Incani, F. Ruggieri, Cross-column prediction of gas-chromatographic retention of polychlorinated biphenyls by artificial neural networks, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 8679-8690.

[56] Y.X. Zhang, Artificial neural networks based on principal component analysis input selection for clinical pattern recognition analysis, *Talanta*, 73 (2007) 68-75.

[57] Ł. Kubik, W. Struck-Lewicka, R. Kaliszan, P. Wiczling, Simultaneous determination of hydrophobicity and dissociation constant for a large set of compounds by gradient reverse phase high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique, *Journal of Chromatography A*, 1416 (2015) 31-37.

[58] P. Wiczling, W. Struck-Lewicka, Ł. Kubik, D. Siluk, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, The simultaneous determination of hydrophobicity and dissociation constant by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94 (2014) 180-187.



- [59] N. Perisic-Janjic, R. Kaliszan, N. Milosevic, G. Uscumlic, N. Banjac, Chromatographic retention parameters in correlation analysis with in silico biological descriptors of a novel series of N-phenyl-3-methyl succinimide derivatives, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72 (2013) 65-73.
- [60] M. Cuenca-Benito, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camañas, M.J. Medina-Hernández, Quantitative retention-structure and retention-activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 814 (1998) 121-132.
- [61] A. Detroyer, Y. Vander Heyden, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, D.L. Massart, Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of  $\beta$ -blocking agents by micellar liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 912 (2001) 211-221.
- [62] S. Šegan, J. Trifković, T. Verbić, D. Opsenica, M. Zlatović, J. Burnett, B. Šolaja, D. Milojković-Opsenica, Correlation between structure, retention, property, and activity of biologically relevant 1,7-bis(aminoalkyl)diazachrysene derivatives, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72 (2013) 231-239.
- [63] M. Aschi, A.A. D'Archivio, M.A. Maggi, P. Mazzeo, F. Ruggieri, Quantitative structure-retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 582 (2007) 235-242.
- [64] F. Ruggieri, A.A. D'Archivio, G. Carlucci, P. Mazzeo, Application of artificial neural networks for prediction of retention factors of triazine herbicides in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1076 (2005) 163-169.
- [65] E. Grimvall, A. Colmsjö, K. Wrangskog, C. Östman, M. Eriksson, Quantitative Structure-Retention Relationships for Polychlorinated Biphenyls and Chlorobenzenes on Selected Normal-Phase Liquid Chromatographic Stationary Phases, *Journal of Chromatographic Science*, 35 (1997) 63-70.
- [66] E. Dagher-Wojtkowiak, P. Wiczling, S. Bocian, Ł. Kubik, P. Kośliński, B. Buszewski, R. Kaliszan, M.J. Markuszewski, Least absolute shrinkage and selection operator and dimensionality reduction techniques in quantitative structure retention relationship modeling of retention in hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1403 (2015) 54-62.

- [67] N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, K. Jinno, Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on unmodified silica phase in hydrophilic interaction chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 1693-1706.
- [68] S. Studzińska, M. Molíková, P. Kosobucki, P. Jandera, B. Buszewski, Study of the interactions of ionic liquids in IC by QSRR, *Chromatographia*, 73 (2011) S35-S44.
- [69] Š. Ukić, M. Novak, A. Vlahović, N. Avdalović, Y. Liu, B. Buszewski, T. Bolanča, Development of gradient retention model in ion chromatography. Part II: Artificial intelligence QSRR approach, *Chromatographia*, 77 (2014) 997-1007.
- [70] Š. Ukić, M. Novak, P. Žuvela, N. Avdalović, Y. Liu, B. Buszewski, T. Bolanča, Development of gradient retention model in ion chromatography. Part I: Conventional QSRR approach, *Chromatographia*, 77 (2014) 985-996.
- [71] R. Kaliszan, *Encyclopedia of Separation Science III*, Academic Press, San Diego, 2000.
- [72] R. Kaliszan, QSRR: Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships, *Chemical Reviews*, 107 (2007) 3212-3246.
- [73] S. Caetano, T. Decaestecker, R. Put, M. Daszykowski, J. Van Bocxlaer, Y. Vander Heyden, Exploring and modelling the responses of electrospray and atmospheric pressure chemical ionization techniques based on molecular descriptors, *Analytica Chimica Acta*, 550 (2005) 92-106.
- [74] B.M. Ehrmann, T. Henriksen, N.B. Cech, Relative Importance of Basicity in the Gas Phase and in Solution for Determining Selectivity in Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19 (2008) 719-728.
- [75] N.B. Cech, C.G. Enke, Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 2717-2723.
- [76] T. Henriksen, R.K. Juhler, B. Svensmark, N.B. Cech, The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16 (2005) 446-455.
- [77] M.A. Raji, P. Fryčák, C. Temiyasathit, S.B. Kim, G. Mavromaras, J.M. Ahn, K.A. Schug, Using multivariate statistical methods to model the electrospray ionization response

of GXG tripeptides based on multiple physicochemical parameters, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23 (2009) 2221-2232.

[78] B.A. Huffman, M.L. Poltash, C.A. Hughey, Effect of polar protic and polar aprotic solvents on negative-ion electrospray ionization and chromatographic separation of small acidic molecules, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 9942-9950.

[79] K.R. Chalcraft, R. Lee, C. Mills, P. Britz-McKibbin, Virtual quantification of metabolites by capillary electrophoresis- electrospray ionization-mass spectrometry: Predicting ionization efficiency without chemical standards, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 2506-2515.

[80] M. Oss, A. Kruve, K. Herodes, I. Leito, Electrospray ionization efficiency scale of organic compound, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 2865-2872.

[81] P.D. Rainville, N.W. Smith, D. Cowan, R.S. Plumb, Comprehensive investigation of the influence of acidic, basic, and organic mobile phase compositions on bioanalytical assay sensitivity in positive ESI mode LC/MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59 (2012) 138-150.

[82] J.J. Zhao, A.Y. Yang, J.D. Rogers, Effects of liquid chromatography mobile phase buffer contents on the ionization and fragmentation of analytes in liquid chromatographic/ion spray tandem mass spectrometric determination, *Journal of Mass Spectrometry*, 37 (2002) 421-433.

[83] Y. Liang, T. Guan, Y. Zhou, Y. Liu, L. Xing, X. Zheng, C. Dai, P. Du, T. Rao, L. Zhou, X. Yu, K. Hao, L. Xie, G. Wang, Effect of mobile phase additives on qualitative and quantitative analysis of ginsenosides by liquid chromatography hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1297 (2013) 29-36.

[84] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, On the signal response of various pesticides in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization depending on the flow-rate of eluent applied in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 937 (2001) 65-72.

[85] G.M. Titato, R.C. Bicudo, F.M. Lanças, Optimization of the ESI and APCI experimental variables for the LC/MS determination of s-triazines, methylcarbamates,

organophosphorous, benzimidazoles, carboxamide and phenylurea compounds in orange samples, *Journal of Mass Spectrometry*, 42 (2007) 1348-1357.

[86] A. Krueve, K. Herodes, I. Leito, Optimization of electrospray interface and quadrupole ion trap mass spectrometer parameters in pesticide liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (2010) 919-926.

[87] M.A. Raji, K.A. Schug, Chemometric study of the influence of instrumental parameters on ESI-MS analyte response using full factorial design, *International Journal of Mass Spectrometry*, 279 (2009) 100-106.

[88] X. Jin Yang, Y. Qu, Q. Yuan, P. Wan, Z. Du, D. Chen, C. Wong, Effect of ammonium on liquid- and gas-phase protonation and deprotonation in electrospray ionization mass spectrometry, *Analyst*, 138 (2013) 659-665.

[89] J. Liigand, A. Krueve, I. Leito, M. Girod, R. Antoine, Effect of mobile phase on electrospray ionization efficiency, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 25 (2014) 1853-1861.

[90] J.R.M. Smits, W.J. Melssen, L.M.C. Buydens, G. Kateman, Using artificial neural networks for solving chemical problems. Part I. Multi-layer feed-forward networks, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 22 (1994) 165-189.

[91] S. Agatonovic-Kustrin, R. Beresford, Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22 (2000) 717-727.

[92] W.S. McCulloch, W. Pitts, A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity, *The Bulletin of Mathematical Biophysics*, 5 (1943) 115-133.

[93] D.O. Hebb, *The organization of behavior; a neuropsychological theory*, Wiley, New York., 1949.

[94] F. Rosenblatt, The perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain, *Psychological Review*, 65 (1958) 386-408.

[95] M.L. Minsky, S.A. Papert, *Perceptrons, An Introduction to Computational Geometry (Expanded Edition)*, MIT Press, Cambridge, 1988.

- [96] G. Hanrahan, Computational neural networks driving complex analytical problem solving, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 4307-4313.
- [97] A. Tropsha, Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation, *Molecular Informatics*, 29 (2010) 476-488.
- [98] X. Mi, Y. Zou, W. Wei, K. Ma, Testing the generalization of artificial neural networks with cross-validation and independent-validation in modelling rice tillering dynamics, *Ecological Modelling*, 181 (2005) 493-508.
- [99] J.J. Hopfield, Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (1982) 2554-2558.
- [100] L.J. Lancashire, C. Lemetre, G.R. Ball, An introduction to artificial neural networks in bioinformatics - Application to complex microarray and mass spectrometry datasets in cancer studies, *Briefings in Bioinformatics*, 10 (2009) 315-329.
- [101] A.S. Achanta, J.G. Kowalski, C.T. Rhodes, Artificial neural networks: Implications for pharmaceutical sciences, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21 (1995) 119-155.
- [102] S. Agatonovic-Kustrin, V. Wu, T. Rades, D. Saville, I.G. Tucker, Powder diffractometric assay of two polymorphic forms of ranitidine hydrochloride, *International Journal of Pharmaceutics*, 184 (1999) 107-114.
- [103] L. Duponchel, C. Ruckebusch, J.P. Huvenne, P. Legrand, Standardisation of near-IR spectrometers using artificial neural networks, *Journal of Molecular Structure*, 480-481 (1999) 551-556.
- [104] M. Nie, W.Q. Zhang, M. Xiao, J.L. Luo, K. Bao, J.K. Chen, B. Li, FT-IR Spectroscopy and Artificial Neural Network Identification of Fusarium Species, *Journal of Phytopathology*, 155 (2007) 364-367.
- [105] S. Agatonovic-Kustrin, C.M. Loescher, R. Singh, Quantification of phenylpropanoids in commercial echinacea products using TLC with video densitometry as detection technique and ANN for data modelling, *Phytochemical Analysis*, 24 (2013) 303-308.
- [106] M. Hosseini, D.J. Maddalena, I. Spence, Using artificial neural networks to classify the activity of capsaicin and its analogues, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 37 (1997) 1129-1137.

- [107] M. Koba, Application of artificial neural networks for the prediction of antitumor activity of a series of acridinone derivatives, *Medicinal Chemistry*, 8 (2012) 309-319.
- [108] J. Jaén-Oltra, M.T. Salabert-Salvador, F.J. García-March, F. Pérez-Giménez, F. Tomás-Vert, Artificial neural network applied to prediction of fluorquinolone antibacterial activity by topological methods, *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (2000) 1143-1148.
- [109] J. Bourquin, H. Schmidli, P. Van Hoogevest, H. Leuenberger, Advantages of Artificial Neural Networks (ANNs) as alternative modelling technique for data sets showing non-linear relationships using data from a galenical study on a solid dosage form, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7 (1998) 5-16.
- [110] J. Bourquin, H. Schmidli, P. Van Hoogevest, H. Leuenberger, Pitfalls of artificial neural networks (ANN) modelling technique for data sets containing outlier measurements using a study on mixture properties of a direct compressed dosage form, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7 (1998) 17-28.
- [111] P. Barmapalexis, F.I. Kanaze, K. Kachrimanis, E. Georgarakis, Artificial neural networks in the optimization of a nimodipine controlled release tablet formulation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74 (2010) 316-323.
- [112] J. Takahara, K. Takayama, T. Nagai, Multi-objective simultaneous optimization technique based on an artificial neural network in sustained release formulations, *Journal of Controlled Release*, 49 (1997) 11-20.
- [113] H.H. Chow, K.M. Tolle, D.J. Roe, V. Elsberry, H. Chen, Application of neural networks to population pharmacokinetic data analysis, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (1997) 840-845.
- [114] A.S. Hussain, R.D. Johnson, N.N. Vachharajani, W.A. Ritschel, Feasibility of developing a neural network for prediction of human pharmacokinetic parameters from animal data, *Pharmaceutical Research*, 10 (1993) 466-469.
- [115] J.V. Turner, D.J. Maddalena, D.J. Cutler, Pharmacokinetic parameter prediction from drug structure using artificial neural networks, *International Journal of Pharmaceutics*, 270 (2004) 209-219.

- [116] J.A. Dowell, A. Hussain, J. Devane, D. Young, Artificial neural networks applied to the in vitro-in vivo correlation of an extended-release formulation: Initial trials and experience, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (1999) 154-160.
- [117] M. de Matas, Q. Shao, C.H. Richardson, H. Chrystyn, Evaluation of in vitro in vivo correlations for dry powder inhaler delivery using artificial neural networks, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33 (2008) 80-90.
- [118] H. Miao, M. Yu, S. Hu, Artificial neural networks aided deconvolving overlapped peaks in chromatograms, *Journal of Chromatography A*, 749 (1996) 5-11.
- [119] Y. Hu, G. Zhou, J. Kang, Y. Du, F. Huang, J. Ge, Assessment of chromatographic peak purity by means of artificial neural networks, *Journal of Chromatography A*, 734 (1996) 259-270.
- [120] J.L. Glajch, J.J. Kirkland, Method development in high-performance liquid chromatography using retention mapping and experimental design techniques, *Journal of Chromatography A*, 485 (1989) 51-63.
- [121] S. Agatonovic-Kustrin, M. Zecevic, L. Zivanovic, I.G. Tucker, Application of neural networks for response surface modeling in HPLC optimization, *Analytica Chimica Acta*, 364 (1998) 265-273.
- [122] E. Cirera-Domènech, R. Estrada-Tejedor, F. Broto-Puig, J. Teixidó, M. Gassiot-Matas, L. Comellas, J.L. Lliberia, A. Méndez, S. Paz-Estivill, M.R. Delgado-Ortiz, Quantitative structure-retention relationships applied to liquid chromatography gradient elution method for the determination of carbonyl-2,4-dinitrophenylhydrazone compounds, *Journal of Chromatography A*, 1276 (2013) 65-77.
- [123] M.H. Fatemi, M.H. Abraham, C.F. Poole, Combination of artificial neural network technique and linear free energy relationship parameters in the prediction of gradient retention times in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1190 (2008) 241-252.
- [124] Y. Shan, R. Zhao, Y. Zhang, W. Zhang, Y. Tian, Retention modeling and simultaneous optimization of pH value and gradient steepness in RP-HPLC using feed-forward neural networks, *Journal of Separation Science*, 26 (2003) 1541-1546.

- [125] R. Webb, P. Doble, M. Dawson, Optimisation of HPLC gradient separations using artificial neural networks (ANNs): Application to benzodiazepines in post-mortem samples, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877 (2009) 615-620.
- [126] A.T.K. Tran, R.V. Hyne, F. Pablo, W.R. Day, P. Doble, Optimisation of the separation of herbicides by linear gradient high performance liquid chromatography utilising artificial neural networks, *Talanta*, 71 (2007) 1268-1275.
- [127] ICH topic Q1A(R2) stability testing on new drug substances and products, *Fed. Regist.*, 68 (2003) 65717–65718.
- [128] M. Blessy, R.D. Patel, P.N. Prajapati, Y.K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4 (2014) 159-165.
- [129] S. Tadić, K. Nikolić, D. Agbaba, Development and optimization of an HPLC analysis of citalopram and its four nonchiral impurities using experimental design methodology, *Journal of AOAC International*, 95 (2012) 733-743.
- [130] K. Nikolic, M. Pavlovic, A. Smoliński, D. Agbaba, The chemometric study and Quantitative Structure Retention Relationship modeling of liquid chromatography separation of ziprasidone components, *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 15 (2012) 730-744.
- [131] H.M. Maher, Development and validation of a stability-indicating HPLC-dad method with ANN optimization for the determination of diflunisal and naproxen in pharmaceutical tablets, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37 (2014) 634-652.
- [132] C.H. Zhou, Y. Wang, Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs, *Current Medicinal Chemistry*, 19 (2012) 239-280.
- [133] L.V. Myznikov, A. Hrabalek, G.I. Koldobskii, Drugs in the tetrazole series. (Review), *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 43 (2007) 1-9.
- [134] C.O. Wilson, O. Gisvold, J.H. Block, J.M. Beale, Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004.



- [135] S. Kokil, M. Bhatia, Antifungal azole metabolites: Significance in pharmaceutical and biomedical analysis, *Journal of Medical Biochemistry*, 28 (2009) 1-10.
- [136] O.V. Mushik, V.I. Tkach, N.I. Karandeeva, O.I. Glukhova, L.P. Tsyganok, Electrochemical and analytical properties of solid-contact ion-selective electrodes reversible to the imidazole derivatives clotrimazole and bifonazole, *Journal of Analytical Chemistry*, 53 (1998) 1110-1112.
- [137] M. Shamsipur, K. Farhadi, Electrochemical behavior and determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations, *Electroanalysis*, 12 (2000) 429-433.
- [138] D.W. Hoffman, K.L. Jones-King, C.L. Ravaris, R.D. Edkins, Electrochemical detection for high-performance liquid chromatography of ketoconazole in plasma and saliva, *Analytical Biochemistry*, 172 (1988) 495-498.
- [139] T.Z. Peng, Q. Cheng, C.F. Yang, Adsorptive behavior and electrochemical determination of the anti-fungal agent ketoconazole, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 370 (2001) 1082-1086.
- [140] H. Knoth, T. Petry, P. Gärtner, Differential pulse polarographic investigation of the antifungal drugs itraconazole, ketoconazole, fluconazole and voriconazole using a dropping mercury electrode, *Pharmazie*, 67 (2012) 987-990.
- [141] P. Arranz, A. Arranz, J.M. Moreda, A. Cid, J.F. Arranz, Stripping voltammetric and polarographic techniques for the determination of anti-fungal ketoconazole on the mercury electrode, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 589-596.
- [142] F.C. Pereira, M.V.B. Zanoni, C.C.I. Guaratini, A.G. Fogg, Differential pulse polarographic determination of clotrimazole after derivatization with Procion Red HE-3B, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27 (2002) 201-208.
- [143] M.M. Bedair, M.A. Korany, M.A. Elsayed, O.T. Fahmy, Derivative spectrophotometric determination of clotrimazole in single formulations and in combination with other drugs, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72 (1989) 432-435.
- [144] P.Y. Khashaba, S.R. El-Shabouri, K.M. Emara, A.M. Mohamed, Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different

pharmaceutical dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22 (2000) 363-376.

[145] U. Roychowdhury, S.K. Das, Rapid Identification and Quantitation of Clotrimazole, Miconazole, and Ketokonazole in Pharmaceutical Creams and Ointments by Thin-Layer Chromatography-Densitometry, *Journal of AOAC International*, 79 (1996) 656-659.

[146] R.J. Ekiert, J. Krzek, W. Rzeszutko, Evaluation of a TLC densitometric method for analysis of azole antifungal agents, *Chromatographia*, 67 (2008) 995-998.

[147] G. Genete, A. Hymete, A.A. Bekhit, Development and validation of HPTLC assay method for simultaneous quantification of hydrocortisone and clotrimazole in cream and applying for stability indicating test, *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57 (2012) 1199-1203.

[148] M.G. Dewani, T.C. Borole, S.P. Gandhi, A.R. Madgulkar, M.C. Damle, Development and validation of HPTLC method for determination of voriconazole in human plasma, *Der Pharma Chemica*, 3 (2011) 201-209.

[149] R. Ekiert, J. Krzek, J. Czekaj, U. Hubicka, Evaluation of a CGC-FID method for qualitative and quantitative analysis of azole antifungal drugs, *Acta Chromatographica*, 21 (2009) 273-282.

[150] D.M. Lima, G.P. Nunes Jr, P.H. Ferri, S.C. Santos, Determination of fluconazole in serum and amniotic fluid of rats by gas-chromatography/mass spectrometry (GC/MS), *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 (2005) 223-227.

[151] L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, C. Alonso, J.J. Jiménez, Enantiomeric separation of several antimycotic azole drugs using supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1144 (2007) 255-261.

[152] J.R. Dean, I.A. Fowles, S.M. Hitchen, S. Khundker, E. Ludkin, F. Normand, P. Jones, Determination of Antifungals in Rodent Diet by Supercritical Fluid Extraction Followed by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography with Ultraviolet Detection, *Journal of AOAC International*, 80 (1997) 7-13.

- [153] V. Cavrini, A.M. Di Pietra, R. Gatti, Analysis of miconazole and econazole in pharmaceutical formulations by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7 (1989) 1535-1543.
- [154] M.M. De Zan, M.S. Cámara, J.C. Robles, S.V. Kergaravat, H.C. Goicoechea, Development and validation of a simple stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole nitrate in bulk and cream formulations, *Talanta*, 79 (2009) 762-767.
- [155] Y.L. Chen, L. Felder, X. Jiang, W. Naidong, Determination of ketoconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 774 (2002) 67-78.
- [156] V.K. Venishetty, N. Parikh, R. Sistla, F.J. Ahmed, P.V. Diwan, Application of validated RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and ketoconazole in solid lipid nanoparticles, *Journal of Chromatographic Science*, 49 (2011) 136-141.
- [157] M.G. Quaglia, E. Donati, E. Bossù, N. Desideri, F. Campana, Determination of fenticonazole and its impurities by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 24 (2001) 392-396.
- [158] Q. Huang, G.J. Wang, J.G. Sun, X.L. Hu, Y.H. Lu, Q. Zhang, Simultaneous determination of docetaxel and ketoconazole in rat plasma by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21 (2007) 1009-1018.
- [159] A.S. Low, J. Wangboonskul, An HPLC assay for the determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations, *Analyst*, 124 (1999) 1589-1593.
- [160] A. Von Ahn, J.H.Z. Dos Santos, Study of the forced degradation of isoconazole nitrate in bulk drug and cream formulations, *Analytical Methods*, 4 (2012) 2404-2411.
- [161] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, Application of dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-MS/MS for the trace determination of clotrimazole in environmental water samples, *Journal of Separation Science*, 36 (2013) 2514-2521.
- [162] B. Wen, Y. Long, Z.M. Mao, Determination of the content and the related substances of tioconazole by HPLC, *Chinese Journal of Antibiotics*, 32 (2007) 163-165.

- [163] O.A. Čudina, M.I. Čomor, I.A. Janković, Simultaneous determination of bifonazole and benzyl alcohol in pharmaceutical formulations by reverse-phase HPLC, *Chromatographia*, 61 (2005) 415-418.
- [164] Q. Huang, Y. Yu, C. Tang, X. Peng, Determination of commonly used azole antifungals in various waters and sewage sludge using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3481-3488.
- [165] R. Hájková, H. Sklenářová, L. Matysová, P. Švecová, P. Solich, Development and validation of HPLC method for determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation, *Talanta*, 73 (2007) 483-489.
- [166] V.G. Dongre, P.P. Karmuse, P.D. Ghugre, S.M. Salunke, N. Panda, A. Kumar, Preparative isolation and structural elucidation of impurities in fluconazole by LC/MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42 (2006) 334-340.
- [167] S.S. Kim, H.T. Im, I.M. Kang, H.S. Lee, H.W. Lee, S.H. Cho, J.B. Kim, K.T. Lee, An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852 (2007) 174-179.
- [168] P.A. Majcherczyk, P. Moreillon, L.A. Decosterd, D. Sanglard, J. Bille, M.P. Glauser, O. Marchetti, Single-step extraction of fluconazole from plasma by ultra-filtration for the measurement of its free concentration by high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002) 645-651.
- [169] H. Egle, R. Trittler, K. Kümmerer, A new, rapid, fully automated method for determination of fluconazole in serum by column-switching liquid chromatography, *Therapeutic Drug Monitoring*, 26 (2004) 425-431.
- [170] J. Dharuman, M. Vsudhevan, T. Ajithlal, K.N. Somasekaran, HPLC-MS/MS method for the pharmacokinetic study of itraconazole a low UV absorbable drug involving Wistar rats, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34 (2011) 2565-2582.
- [171] W.C. Young, D. Nam, H.K. Kyoung, W.H. Kyung, H.H. In, K.C. Byung, M. Yoon, J. Lee, High-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of

itraconazole in human plasma for bioavailability and bioequivalence studies, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 27 (2006) 291-294.

[172] G. Srinubabu, C.A.I. Raju, N. Sarath, P.K. Kumar, J.V.L.N.S. Rao, Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceutical formulation using an experimental design, *Talanta*, 71 (2007) 1424-1429.

[173] A.M. Prajapati, S.A. Patel, N.J. Patel, D.B. Patel, S.K. Patel, Development and validation of reversed-phase column high-performance liquid chromatographic and first-derivative UV spectrophotometric methods for estimation of voriconazole in oral suspension powder, *Journal of AOAC International*, 91 (2008) 1070-1074.

[174] S. Pauwels, P. Vermeersch, J. Van Eldere, K. Desmet, Fast and simple LC-MS/MS method for quantifying plasma voriconazole, *Clinica Chimica Acta*, 413 (2012) 740-743.

[175] P. Krieter, B. Flannery, T. Musick, M. Gohdes, M. Martinho, R. Courtney, Disposition of posaconazole following single-dose oral administration in healthy subjects, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (2004) 3543-3551.

[176] J.M. Cunliffe, C.F. Noren, R.N. Hayes, R.P. Clement, J.X. Shen, A high-throughput LC-MS/MS method for the quantitation of posaconazole in human plasma: Implementing fused core silica liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (2009) 46-52.

[177] A.H. Groll, D. Mickiene, V. Petraitis, R. Petraitiene, A. Kelaher, A. Sarafandi, G. Wuerthwein, J. Bacher, T.J. Walsh, Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal triazole ravuconazole following intravenous administration of its di-lysine phosphoester prodrug (BMS-379224) in rabbits, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (2005) 899-907.

[178] W.O. Foye, T.L. Lemke, *Foye's principles of medicinal chemistry*, 6th ed., Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008.

[179] I. Muszalska, A. Sobczak, A. Dołhań, A. Jelińska, Analysis of sartans: A review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103 (2014) 2-28.

[180] Z. Qin, W. Niu, R. Tan, Spectrophotometric method for the determination of telmisartan with congo red, *Journal of Analytical Chemistry*, 64 (2009) 449-454.

- [181] S. Çağlar, A. Önal, Two simple and rapid spectrophotometric methods for the determination of a new antihypertensive drug olmesartan in tablets, *Journal of Analytical Chemistry*, 65 (2010) 239-243.
- [182] N.A. Charoo, M. Bashir, E. Abdalla, K.I.H. Ali, Determination of candesartan cilexetil in tablet dosage forms and dissolution testing samples by first derivative uv spectrophotometric method, *Analytical Letters*, 42 (2009) 2232-2243.
- [183] N. Erk, Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (2001) 603-611.
- [184] S. Tatar, S. Salk, Comparison of UV- and second derivative-spectrophotometric and LC methods for the determination of valsartan in pharmaceutical formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30 (2002) 371-375.
- [185] J. Joseph-Charles, S. Brault, C. Boyer, M.H. Langlois, L. Cabrero, J.P. Dubost, Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometry, *Analytical Letters*, 36 (2003) 2485-2495.
- [186] B.H. Mehta, S.B. Morge, HPTLC-densitometric analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in tablets, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 21 (2008) 173-176.
- [187] A. Shrivastava, C. Barhate, C. Kapadia, Stress degradation studies on Valsartan using validated stability-indicating high-performance thin-layer chromatography, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 22 (2009) 411-416.
- [188] B. Dogan, B. Uslu, S.A. Özkan, Anodic adsorptive stripping voltammetry of the antihypertensive drug candesartan cilexetil at a glassy carbon electrode, *Pharmazie*, 59 (2004) 840-844.
- [189] J. Yan, W. Wang, L. Chen, S. Chen, Electrochemical behavior of valsartan and its determination in capsules, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67 (2008) 205-209.
- [190] E. Cagigal, L. González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, Experimental design methodologies to optimise the spectrofluorimetric determination of Losartan and Valsartan in human urine, *Talanta*, 54 (2001) 1121-1133.

- [191] S. Zhou, K.D. Cook, Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-way-round or right-way-round?, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11 (2000) 961-966.
- [192] L. González, J.A. López, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *Journal of Chromatography A*, 949 (2002) 49-60.
- [193] N. Ferreirós, G. Iriarte, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, Development of a solid phase extraction procedure for HPLC-DAD determination of several angiotensin II receptor antagonists in human urine using mixture design, *Talanta*, 73 (2007) 748-756.
- [194] J. Nie, M. Zhang, Y. Fan, Y. Wen, B. Xiang, Y.Q. Feng, Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 828 (2005) 62-69.
- [195] N. Ferreirós, G. Iriarte, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, E. Ortíz, Separation and quantitation of several angiotensin II receptor antagonist drugs in human urine by a SPE-HPLC-DAD method, *Journal of Separation Science*, 31 (2008) 667-676.
- [196] L. Kristoffersen, E.L. Øiestad, M.S. Opdal, M. Krogh, E. Lundanes, A.S. Christophersen, Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 850 (2007) 147-160.
- [197] R. Bonfilio, C.R.T. Tarley, G.R. Pereira, H.R.N. Salgado, M.B. de Araújo, Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules, *Talanta*, 80 (2009) 236-241.
- [198] M. Polinko, K. Riffel, H. Song, M.W. Lo, Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 73-84.

- [199] S.K. Patro, S.K. Kanungo, V.J. Patro, N.S.K. Choudhury, Stability indicating RP-HPLC method for determination of valsartan in pure and pharmaceutical formulation, *E-Journal of Chemistry*, 7 (2010) 246-252.
- [200] H. Li, Y. Wang, Y. Jiang, Y. Tang, J. Wang, L. Zhao, J. Gu, A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of valsartan and hydrochlorothiazide in human plasma, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852 (2007) 436-442.
- [201] V.P. Rane, J.N. Sangshetti, D.B. Shinde, Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparation, *Journal of Chromatographic Science*, 46 (2008) 887-891.
- [202] P. Li, Y. Wang, Y. Tang, J.P. Fawcett, Y. Cui, J. Gu, Determination of telmisartan in human plasma by liquid chromatography- tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 828 (2005) 126-129.
- [203] N. Erk, Simultaneous analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in human plasma and dosage forms using HPLC with a photodiode array detector, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 26 (2003) 2581-2591.
- [204] V.P. Rane, K.R. Patil, J.N. Sangshetti, R.D. Yeole, D.B. Shinde, Stability indicating LC method for simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations, *Journal of Chromatographic Science*, 48 (2010) 595-600.
- [205] L.F. Tutunji, M.F. Tutunji, M.I. Alzoubi, M.H. Khabbas, A.I. Arida, Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (2010) 985-990.
- [206] R. Sharma, S. Pancholi, RP-HPLC-DAD method for determination of olmesartan medoxomil in bulk and tablets exposed to forced conditions, *Acta Pharmaceutica*, 60 (2010) 13-24.
- [207] D. Liu, P. Hu, N. Matsushima, X. Li, L. Li, J. Jiang, Quantitative determination of olmesartan in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass



spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 856 (2007) 190-197.

[208] V.K. Kumar, N.A. Raju, J.S. Rao, T. Satyanarayana, The estimation of Eprosartan mesylate in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC, *Oriental Journal of Chemistry*, 25 (2009) 711-714.

[209] M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods - Critical review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002) 1011-1040.

[210] ICH topic Q1B stability testing: photostability testing of new drug substances and products, *Fed. Regist.*, 62 (2005) 27115–27122.

[211] S. Mehta, R.P. Shah, R. Priyadarshi, S. Singh, LC and LC-MS/TOF studies on stress degradation behaviour of candesartan cilexetil, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (2010) 345-354.

[212] N. Ferreirós, S. Dresen, R.M. Alonso, W. Weinmann, Hydrolysis and transesterification reactions of candesartan cilexetil observed during the solid phase extraction procedure, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 855 (2007) 134-138.

[213] D.V.S. Rao, P. Radhakrishnanand, M.V. Suryanarayana, V. Himabindu, A stability-indicating LC method for candesartan cilexetil, *Chromatographia*, 66 (2007) 499-507.

[214] A. Mohan, S. Shanmugavel, A. Goyal, B.R. Venkataraman, D. Saravanan, Identification, isolation, and characterization of five potential degradation impurities in candesartan cilexetil tablets, *Chromatographia*, 69 (2009) 1211-1220.

[215] M. Tahmoorespur, H. Ahmadi, A neural network model to describe weight gain of sheep from genes polymorphism, birth weight and birth type, *Livestock Science*, 148 (2012) 221-226.

[216] J.D. Olden, M.K. Joy, R.G. Death, An accurate comparison of methods for quantifying variable importance in artificial neural networks using simulated data, *Ecological Modelling*, 178 (2004) 389-397.

[217] M. Gevrey, I. Dimopoulos, S. Lek, Review and comparison of methods to study the contribution of variables in artificial neural network models, *Ecological Modelling*, 160 (2003) 249-264.

- [218] C. Panayiotou, Partial solvation parameters and LSER molecular descriptors, *Journal of Chemical Thermodynamics*, 51 (2012) 172-189.
- [219] J. Dolan, Mobile-phase buffers, Part I — the interpretation of pH in partially aqueous mobile phases, *LCGC N. Am.*, 20 (2002) 1028–1032.
- [220] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 35 (2000) 804-817.
- [221] N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrometry Reviews*, 20 (2001) 362-387.
- [222] I. Canals, F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, Retention of ionizable compounds on HPLC. 6. pH measurements with the glass electrode in methanol-water mixtures, *Journal of Chromatography A*, 911 (2001) 191-202.
- [223] M. Girod, X. Dagany, V. Boutou, M. Broyer, R. Antoine, P. Dugourd, A. Mordehai, C. Love, M. Werlich, J. Fjeldsted, G. Stafford, Profiling an electrospray plume by laser-induced fluorescence and Fraunhofer diffraction combined to mass spectrometry: Influence of size and composition of droplets on charge-state distributions of electrosprayed proteins, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14 (2012) 9389-9396.
- [224] W.M.A. Niessen, *Liquid chromatography-mass spectrometry*, 2nd ed., M. Dekker, New York, 1999.
- [225] R.E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry : an introduction*, J. Wiley, New York, 2003.
- [226] J. Wang, A. Aubry, M.S. Bolgar, H. Gu, T.V. Olah, M. Arnold, M. Jemal, Effect of mobile phase pH, aqueous-organic ratio, and buffer concentration on electrospray ionization tandem mass spectrometric fragmentation patterns: Implications in liquid chromatography/tandem mass spectrometric bioanalysis, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (2010) 3221-3229.

## **7. PRILOZI**

## **OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima**

1. **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević, Structure – response relationship in electrospray ionization - mass spectrometry of sartans by artificial neural networks. *Journal of Chromatography A* (2016) 1438, 123–132 **M21a**
2. **J. Golubović**, A. Protić, B. Otašević, M. Zečević, Quantitative structure–retention relationships applied to development of liquid chromatography gradient-elution method for the separation of sartans, *Talanta* (2016) 150, 190–197 **M21**
3. **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, Quantitative structure retention relationship modeling in liquid chromatography method for separation of candesartan cilexetil and its degradation products, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (2015) 140, 92–101 **M21a**
4. **J. Golubović**, A. Protić, M. Zečević, B. Otašević, M. Mikić, Lj. Živanović, Quantitative structure–retention relationships of azole antifungal agents in reversed-phase high performance liquid chromatography, *Talanta* (2012) 100, 329–337 **M21**

### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

1. **J. Golubović**, C. Birkemeyer, A. Protić, Otašević, M. Zečević. Structure-response relationships in electrospray ionization – mass spectrometry of sartans by artificial neural network. 9th Summer School „Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine“, Dubrovnik, Hrvatska, jul 2015.
2. **J. Golubović**, B. Otašević, , A. Protić, M. Zečević. Application of the artificial neural network in quantitative structure retention relationship modeling of liquid chromatography

separation of candesartan cilexetil and its degradation products. *39th* International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, Amsterdam, Holandija, jun 2013.

## **8. BIOGRAFIJA**

Jelena Golubović je rođena 14.09.1984. godine u Jagodini. Završila je osnovnu školu u Batočini i Prvu kragujevačku gimnaziju. Studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je akademske 2003/2004. godine i diplomirala 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Od 2005. do kraja studija bila sam stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. 2006. dobila je stipendiju Nemačke službe za akademsku razmenu (DAAD) za kurs nemačkog jezika na Univerzitetu u Hajdelbergu. U okviru programa studentske razmene boravila je 2009. na Univerzitetu u Frajburgu. Po završetku studija obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za farmaceute.

Doktorske studije, modul Farmaceutska hemija, upisala je akademske 2009/2010. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od septembra 2010. do jula 2011. bila je zaposlena kao saradnik u nastavi na Katedri za analitiku lekova. U julu 2011. zaposlena je kao istraživač - pripravnik, a u maju 2013. birana u zvanje istraživač – saradnik. Od januara 2011. angažovana je na projektu OI172033 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

2014. godine boravila je na Institutu za analitičku hemiju Fakulteta za hemiju i mineralogiju, Univerzitet u Lajpcigu, Nemačka, u okviru istraživačkog programa pod nazivom *Structure – response relationship in electrospray ionization - mass spectrometry of sartans by artificial neural networks*, kao stipendista DAAD. 2015. godine boravila je na Kliničkom institutu za laboratorijsku medicinu, Medicinski univerzitet u Beču, Austrija u okviru istraživačkog projekta pod nazivom *Phosphorylated proteins in urinary proteome - method development for extraction and analysis*, kao stipendista Austrijske službe za akademsku razmenu (OeAD). Od 2016. godine radi na bilateralnom projektu pod nazivom *Novel antibiotics from endophytic fungi* sa Univerzitetom u Ljubljani, Slovenija. Objavila je 8 radova u časopisima međunarodnog značaja i 3 rada u časopisima nacionalnog značaja.

U maju 2016. dobila je priznanje *Humanity in Science Award – Silver Certificate* koje dodeljuju *The Analytical Scientist* i *Phenomenex*.

Tokom osnovnih i doktorskih studija osvojila je preko 20 medalja u sportu takmičeći se za fakultet.

Fakultät für Chemie und Mineralogie  
Institut für Analytische Chemie  
Linnéstraße 3, 04103 Leipzig  
Dr. Claudia Birkemeyer/ AK Massenspektrometrie  
E-mail: birkemeyer@chemie.uni-leipzig.de

Board of Postgraduate Studies – Doctoral Studies  
University of Belgrade–Faculty of Pharmacy



Your code, Your message from

My code, My message from

Telephone (+49-341)  
97 36092

Fax (+49-341)  
97 36115

Leipzig,  
02.05.2016

## Agreement

I hereby wish to confirm that Jelena Golubović finished her research project titled Structure – response relationship in electrospray ionization – mass spectrometry of sartans by artificial neural networks at the Faculty of Chemistry and Mineralogy, University of Leipzig, Germany, granted by German Academic Exchange Service (Deutscher Akademischer Austauschdienst, DAAD). As a supervisor of the project, I wish to express my approval for inclusion of the results of the project in Jelena Golubović's doctoral thesis.

I wish Miss Golubović all the best for her prospective professional career.

Best regards,

Dr. C. Birkemeyer  
Universität Leipzig  
Institut für  
Analytische Chemie  
Linnéstraße 3  
04103 Leipzig



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Голубовић

број уписа 33/09

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

*Примена вештачких неуронских мрежа у грађењу модела за предвиђање ретенционог понашања и интензитета одговора масеног спектрометра у анализи одабраних азола и сартана методом течне хроматографије под високим притиском*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена 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 интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 05.09.2016.

Јелена Голубовић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора    Јелена Голубовић  
Број уписа                    33/09  
Студијски програм        Фармацеутска хемија  
Наслов рада                Примена вештачких неуронских мрежа у грађењу модела  
за предвиђање ретенционог понашања и интензитета  
одговора масеног спектрометра у анализи одабраних  
азола и сартана методом течне хроматографије под  
високим притиском  
Ментор                        Др Мира Зечевић, редовни професор  
Потписани                    Јелена Голубовић

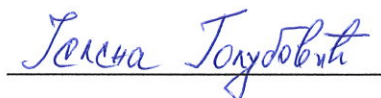
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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 докторанда

У Београду, 05.09.2016.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

*Примена вештачких неуронских мрежа у грађењу модела за предвиђање ретенционог понашања и интензитета одговора масеног спектрометра у анализи одабраних азола и сартана методом течне хроматографије под високим притиском*

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 05.09.2016.

