

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 28.04.2016. godine, imenovana je komisija u sastavu:

1. Dr sc. Mira Zečević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor, predsednik komisije
2. Dr sc. Ana Protić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Biljana Otašević, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Marina Radišić, naučni saradnik, Inovacioni centar Tehnološko-Metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom **„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“**, kandidata dipl. farm. Jelene Golubović, istraživača saradnika na Katedri za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dipl. farm. Jelene Golubović pod nazivom **„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“ napisana je na 165 strana, sadrži 34 slike i 26 tabela. Sastoji se od sledećih poglavlja: Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura, Prilozi i Biografija. U doktorskoj disertaciji citirano je 226 literaturnih referenci.

2. Opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji veštačke neuronske mreže (ANN) su upotrebljene kao tehnika modelovanja za predviđanje retencionog ponašanja (građenje QSRR modela) odnosno intenziteta odgovora masenog spektrometra (građenje QSPR modela) odabranih lekova.

Model supstance pripadaju grupama antimikotika – azoli i antagonista angiotenzin II receptora – sartani. Fizičko-hemijske osobine analita su predstavljene pomoću molekulskih deskriptora. Varirani hromatografski faktori i molekulski deskriptori činili su ulazne promenljive, dok je praćeni odgovor predstavljao izlaznu promenljivu modela. Hromatografski faktori koji su učestvovali u građenju modela i njihovi nivoi variranja odabrani su na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih ispitivanja. Hromatografski faktori su ispitivani variranjem prema eksperimentalnom planu nekih vrsta optimizacionih eksperimentalnih dizajna (Box-Behnken ili centralni kompozicioni dizajn). Podaci dobijeni primenom optimizacionog dizajna su uključeni u ANN modelovanje. Pri optimizaciji mreža podaci su podeljeni na 3 seta: trening, validaciju i test. Trening podaci su služili za treniranje mreže, validacija za proveru uspešnosti u predviđanju nakon svakog ciklusa treniranja, dok je test set primenjen za procenu sposobnosti predviđanja odabrane mreže. Rast greške na validacionom setu je predstavljao kriterijum za zaustavljanje treniranja mreže. Greška na validacionom setu i koeficijent korelacije eksperimentalno dobijenih odgovora sa odgovorom koji predviđa mreža su parametri na osnovu kojih je odabrana optimalna mreža. Metode koje su korišćene u ispitivanju retencionog ponašanja ovih supstanci su separacione, tipa reverzno-fazne HPLC ili UHPLC.

U **prvom delu disertacije** postavljeni su modeli za opisivanje i predviđanje retencionog ponašanja:

1. u UHPLC sistemu,

2. u cilju razvoja *stability-indicating* metode HPLC metode i
3. u cilju razvoja metode za separaciju analita u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem.

1. U delu istraživanja posvećenom predviđanju retencionog ponašanja u UHPLC sistemu, izabrano je da model supstance budu sedam lekova iz grupe azola: mikonazol, ekonazol, ketokonazol, klotrimazol, itrakonazol, vorikonazol i posakonazol. Za svaku supstancu izračunato je 14 molekulskih deskriptora na osnovu 2D strukture, odnosno 3D strukture nakon minimizacije energije primenom MOPAC/AM₁ kvantum-hemijske metode. Nakon ispitivanja korelacije između deskriptora, u ANN modelovanje uključeni su površina molekula (MA), refraktivnost (MR), van der Waals energija između atoma udaljenih najmanje tri atoma (NON-1,4 VDW), dipol-dipol energija (DEN), oktanol-voda distribicioni koeficijent (logD), broj vodonikovih atoma koji mogu graditi vodonične veze (H-don) i broj slobodnih elektronskih parova koji mogu graditi vodonične veze (H-acc). Hromatografski faktori koji su uključeni u modelovanje bili su oni koji su pokazali značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ovih supstanci što je ispitano primenom fracionog faktorskog dizajna (FFD). Značajnim su se pokazali udeo acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vodenog dela mobilne faze. Dakle, optimizovana je mreža sa 9 ulaznih promenljivih i retencionim faktorom kao izlaznom promenljivom. Podaci dobijeni za ekonazol korišćeni su za testiranje mreže, dok su preostali podaci podeljeni na trening i validaciju nasumično. Odabrana mreža imala je arhitekturu 9-5-1 i koeficijent determinacije za test set podataka (R^2) od 0,987.

2. U delu istraživanja posvećenom predviđanju retencionog ponašanja kandesartan cileksetila i njegovih degradacionih proizvoda u cilju razvoja *stability-indicating* metode najpre je sprovedena studija forsirane degradacije u skladu sa ICH smernicama. Degradacioni proizvodi su identifikovani primenom masene spektrometrije. Među njima je izdvojeno 7 degradacionih proizvoda koji se očekuju i u studijama formalne stabilnosti i njihova smeša je korišćena tokom optimizacije HPLC metode. Za svaku supstancu izračunato je 13 molekulskih deskriptora na osnovu 2D strukture, odnosno 3D strukture

nakon minimizacije energije primenom MOPAC/AM₁ kvantum-hemijske metode. Nakon ispitivanja korelacije između deskriptora, u ANN modelovanje uključeni su polarizabilnost (POL), NON-1,4 VDW, H-don i H-acc i logD. Značajni hromatografski faktori koji su uključeni u modelovanje odabrani su nakon izvođenja FFD. Značajnim su se pokazali procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodenog dela mobilne faze i molaritet acetatnog pufera. Dakle, optimizovana je mreža sa 9 ulaznih promenljivih i retencionim faktorim kao izlaznom promenljivom. Podaci su nasumično podeljeni na trening, validaciju i test. Odabrana mreža imala je arhitekturu 9-5-5-1 i R² za test set podataka od 0,996. Potom je dobijena mreža upotrebljena za optimizaciju HPLC metode i dobijena je zadovoljavajuća separacija ispitivanih supstanci, zadovoljavajuće retenciono ponašanje analita koji se prvi eluira i vreme trajanja analitičkog rana od 27 minuta. Mobilna faza se sastoji od 47 % (v/v) acetonitrila i 53 % 5 mM amonijum acetata, pH 2,5 i protoka od 1,5 mL/min, dok je temperatura kolone bila 20 °C. Izvršena je analiza uticaja ulaznih promenljivih na model, odnosno molekulskih deskriptora na odgovor koji predviđa mreža. Najveći uticaj među deskriptorima pokazali su log D, NON-1,4 VDW, POL i H-don, dok je uticaj hromatografskih faktora analiziran u odnosu na teorijska očekivanja.

3. U delu istraživanja posvećenom predviđanju retencionog ponašanja u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem, analizirano je 6 lekova iz grupe sartana: losartan, valsartan, irbesartan, telmisartan, kandesartan cileksetil i eprosartan. Ulazne promenljive za optimizaciju QSRR modela bili su: molekulski deskriptori - zapremina nedostupna rastvaraču (SEV), NON-1,4 VDW, log D, POL, H-don i H-acc i hromatografski parametri - vreme gradijenta, molaritet pufera i pH vodenog dela mobilne faze, dok je kao odgovor praćeno retenciono vreme. Za potrebe optimizacije HPLC metode za razdvajanje sartana u što kraćem vremenskom periodu, podaci su nasumično podeljeni na trening, validaciju i test. Odabrana mreža imala je arhitekturu 9-8-1 i R² od 0,995. Izvršeno je mapiranje faktora rezolucije radi postizanja potpune separacije analita, uz minimizaciju trajanja analitičkog rana. Kao optimalni, odabrani su uslovi: 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, protok mobilne faze od 1,5 mL/min i uz vreme reekvilibracije od 3

minuta. Za potrebe predviđanja retencije novog analita, test set su činili podaci koji pripadaju irbesartanu, dok su trening i validacioni test set dobijeni nasumičnom podelom preostalih podataka. Odabrana mreža imala je arhitekturu 9-8-1 i R^2 od 0,985. Izvršena je analiza uticaja ulaznih promenljivih na model, odnosno molekulskih deskriptora na odgovor koji predviđa mreža. Najveći uticaj među deskriptorima pokazali su POL, SEV i H-acc, dok je uticaj hromatografskih faktora analiziran u odnosu na teorijska očekivanja.

U **drugom delu disertacije** postavljeni su modeli za opisivanje i predviđanje intenziteta odgovora masenog spektrometra. Model supstance bile su sedam lekova iz grupe sartana: losartan, valsartan, irbesartan, telmisartan, kandesartan cileksetil, olmesartan medoksomil i eprosartan. Najpre su instrumentalni parametri pozitivne ESI-MS u pozitivnom modu optimizovani kako bi se osigurali pouzdani i reproduktivni rezultati analize. Odgovor je predstavljala površina pika m/z signala protonovanog molekula pri *full scan* detekciji. Ulazne promenljive za optimizaciju QSPR modela bili su: molekulski deskriptori - bazna pKa, oktanol-voda particioni koeficijent ($\log P$), SEV i H-acc i hromatografski parametri - pH vodenog dela mobilne faze, koncentracija pufera i udeo organskog rastvarača. Podaci su nasumično podeljeni na trening, validaciju i test. Odabrana mreža imala je arhitekturu 6-3-3-1 i R^2 od 0,994. Izvršena je analiza uticaja ulaznih promenljivih na model, odnosno molekulskih deskriptora na odgovor, kao i analiza trendova koje predviđa optimalna mreža i eksperimentalno dobijenih trendova za date faktore. Najznačajnijim deskriptorima pokazali su se $\log P$, pKa i SEV, po opadajućoj značajnosti. Ispitan je uticaj hromatografskih uslova na odnos intenziteta signala dve dominantne MRM tranzicije za svaki od analita, ali nije uočen značajan uticaj.

3. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature

Prvi deo istraživanja - QSRR

1. U literaturi se može naći svega nekoliko članaka koji se bave postavljanjem QSRR modela uz primenu ANN za predviđanje retencionog ponašanja analita u UHPLC sistemu

[1-3]. U prvom članku [1] je izračunato 13 deskriptora primenom genetskog algoritma i PLS iz velikog broja deskriptora. *Levenberg–Marquardt* mreža dala je R^2 predviđanja od 0,91 i nešto bolju efikasnost predviđanja od PLS tehnike. Članak [3] predstavlja nastavak istraživanja istih autora na drugim lekovima, te je primenjena ista metodologija i dobijeni slični rezultati predviđanja ($R^2 = 0,92$). Primenom 8 molekulskih deskriptora među kojima su LSER deskriptori, polarna površina molekula, broj rotabilnih veza, log P i molekulska masa optimizovana je MLP mreža sa retencionim vremenom kao odgovorom, trenirana *Levenberg–Marquardt* algoritmom. Dobijen je R^2 predviđanja od 0,92 i slična uspešnost predviđanja kao i pomoću PLS tehnike [2]. Citirani radovi kao ulazne promenljive imaju samo molekulske deskriptore, te služe isključivo za opisivanje odnosa između fizičko-hemijskih osobina. Sa druge strane, u ovoj disertaciji kao ulazne promenljive uključeni su i hromatografski parametri čime se omogućuje i predviđanje retencije pri različitim hromatografskim uslovima kao i optimizacija metode. Takođe, postignuta je i veća efikasnost predviđanja ($R^2 = 0,987$). Publikovan rad koji je proizašao iz ovog istraživanja (*Talanta* (2012) 100, 329–337) je prvi koji se bavi istovremenim modelovanjem molekulskih deskriptora i hromatografskih uslova u cilju predviđanja retencije u UHPLC sistemu.

2. Takođe se u literaturi može naći nekoliko članaka sa ciljem ispitivanja stabilnosti kandesartan cileksetila [4-7]. Razlike u dobijenim degradacionim proizvodima posledica su različitih uslova izvođenja studija forsirane degradacije. *Mehta* i saradnici [7] su sprovedi sveobuhvatnu studiju forsirane degradacije i identifikovali degradacione proizvode primenom HPLC spregnute sa TOF masenim spektrometrom koji meri vreme preleta jona. Oni su dobili i identifikovali degradacione proizvode koji su dobijeni u okviru ove disertacije. Hromatografske metode obuhvatale su primenu C18 ili cijano kolone, acetonitrila kao organskog rastvarača, fosfatnog i acetatnog pufera kisele pH. S obzirom da su samo *Mehta* i saradnici [7] razvijali metodu za procenu stabilnosti kandesartan cileksetila uz separaciju istih degradacionih proizvoda, dok je u preostalim radovima praćeno manje degradacionih proizvoda, ovaj rad je jedini relevantan u pogledu napretka u analitičkoj metodi. U poređenju sa pomenutom metodom [7], kod metode razvijene u okviru ove doktorske disertacije, vreme trajanja analitičkog rada je neznatno skraćeno – sa

28 na 27 minuta, ali je gradijentno eluiranje [7] zamenjeno izokraskim, a acetatni pufer se može koristiti umesto fosfatnog, što je velika prednost ukoliko se metoda primenjuje sa masenom spektrometrijom za detekciju (razlika u odnosu na metodu razvijenu od strane *Mehta* i saradnika) [7]. Na kraju, postavljeni QSRR-ANN model ima potencijal za predviđanje retencionog ponašanja analita srodne strukture – nečistoće, degradacionog proizvoda ili metabolita kandesartan cileksetila. Članak objavljen u okviru ove doktorske disertacije (*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (2015) 140, 92–101) predstavlja prvi članak koji se bavi predviđanjem retencionog ponašanja aktivne farmaceutske supstance i degradacionih proizvoda koji nastaju tokom studija forsirane degradacije u cilju razvoja *stability-indicating* metode.

3. U literaturi se može naći priličan broj objavljenih članaka u kojima su ANN korišćene za predviđanje retencionog ponašanja u HPLC sistemu sa gradijentnim eluiranjem, na osnovu fizičko-hemijskih osobina izraženih preko molekulskih deskriptora [8-13]. Optimizovane mreže su MLP tipa, trenirane algoritmom ponovnog prolaska greške gde je R^2 bio do 0,99. Pristup koji je korišćen u ovoj disertaciji – istovremeno uključivanje molekulskih deskriptora i parametara gradijenta, nalazi se u nekoliko članaka, ali bez separacije kao cilja [14-16]. 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 [17-19]. Posmatrani molekulski deskriptori su odabrani prema LSER ili LSS teoriji ili selektovani primenom genetskog algoritma ili PLS iz većeg broja deskriptora. Varirani parametri gradijenta predstavljali su neku od kombinacija sledećih parametara: početni udeo organskog rastvarača, krajni udeo organskog rastvarača, nagib gradijenta i pH vodenog dela mobilne faze. Dobijena korelacija odgovora koje predviđa mreža i eksperimentalno dobijenih odgovora izražena preko R^2 bila je u rasponu 0,9 – 0,99, retko preko 0,99 [14, 18, 19]. Nerekurentna mreža trenirana algoritmom povratnog prolaska mreže je ubedljivo najviše primenjivan tip mreže. U ovoj doktorskoj disertaciji molekulski deskriptori su u kombinaciji sa hromatografskim parametrima predstavljali ulazne promenljive. Podelom podataka na dva načina (test nasumično odabran, odnosno test sastavljen od podataka koji pripadaju jednom analitu) dobija se mreža koja ima potencijal kako za optimizaciju metode, tako i za predviđanje retencije analita srodne

strukture. Parametri efikasnosti predviđanja su u rangu literaturnih (R^2 je 9,995 odnosno 0,985). Članak objavljen u okviru ove doktorske disertacije (*Talanta* (2016) 150, 190–197) predstavlja prvi članak sa istovremenim praćenjem uticaja molekulskih deskriptora i parametara gradijenta sa ciljem optimizacije metode za separaciju ispitivanih analita. Sem toga, ovim pristupom može da se predvidi retenciono ponašanje „novog“ analita slične strukture. Uključivanjem molekulskih deskriptora omogućeno je dobijanje informacija o vezi između molekulskih deskriptora i retencionog ponašanja. Analizu osetljivosti modela na ispitivane faktore uradili su *Fatemi* i saradnici [15]. Oni su dobili sledeći niz faktora po opadajućoj značajnosti: zapremina molekula, H-acc, POL, refraktarnost, H-don. Ovo se u velikoj meri podudara sa rezultatima analize osetljivosti dobijenoj u ovoj disertaciji POL, SEV, H-ACC, NON-1,4 VDW, logD, H-don, po opadajućem uticaju.

Optimizacijom metode postiguto je razdvajanje 6 sartana za 15,5 min što je efikasnije u odnosu na metode iz literature (do 5 sartana za 18-25 minuta) [20-24]. U svim prethodnim metodama korišćena je C18 kolona, mobilna faza se sastojala od acetonitrila i vodene faze pH 2 – 4 (acetatnog ili formijatnog pufera ili rastvora trifluoro sirćetne kiseline). U svim pomenutim metodama primenjeno je gradijentnim eluiranje, izuzev metode *Nie* i saradnika [22]. Metoda dobijena optimizacijom primenom QSRR-ANN u ovoj disertaciji obuhvata primenu cijano kolone i gradijentnog eluiranja mobilne faze koja se sastoji od acetonitrila i 25 mM amonijum acetata pH 3,95.

Drugi deo istraživanja - QSPR

U literaturi se može naći nekoliko pristupa istraživanju veze između molekulskih deskriptora i intenziteta odgovora elektrosprej masenog spektrometra (ESI-MS), primenom različitih tehnika modelovanja, odnosno praćenjem uticaja bez kvantitativnih odnosa. *Ehrmann* i saradnici [25] su ispitivali korelaciju između baznosti u rastvoru, baznosti u gasu i površinske aktivnosti, kroz oktanol-voda particioni koeficijent (logP), 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* [26] 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 ESI-MS

odgovora ($R = 0,98$). *Raji* i saradnici su korelisali uticaj nekoliko parametara na ESI-MS odgovor: nepolarne površine, ukupne površine, baznosti u gasnoj fazi i $\log D$. Uočena je izvesna pozitivna korelacija između obe površine molekula i odgovora ali ne i ostalih parametara. Autori su zaključili da je uspostavljanje sveobuhvatnog modela koji potpuno opisuje uticaj svih relevantnih fizičko-hemijskih parametara na ESI-MS odgovor gotovo nemoguće [27]. *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 [28]. *Chalcraft* i saradnici [29] su razvili QSRR model pomoću multiple linearne regresije (MLR), proučavajući zavisnost efikasnosti jonizacije od zapremine molekula izražene preko SEV, $\log D$, apsolutne pokretljivosti i efektivnog naelektrisanja i uočili Jonizaciona efikasnost koju je model predviđao je bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa molekulskom zapreminom i $\log D$. *Oss* i saradnici [30] su uspostavili MLR model zavisnosti efikasnosti jonizacije od zapremine molekula. U pomenutim studijama [25, 26, 28-32] 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 vodenog dela mobilne faze, protok mobilne faze) [33-36] na ESI-MS signal u grupi analita i/ili optimizacijom 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 [36]. U studiji uticaja 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 [35]. *Rainville* i saradnici [33] 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.

Istovremeni uticaj sastava rastvarača i molekulskih deskriptora nalazimo u dva objavljena rada, u kojima se autori bave samo pK_a vrednošću kao deskriptorom [37, 38]. *Yang* i saradnici [37] 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 $pK_a < 3$. *Liigand* i saradnici [38] 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 pK_a 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 rastavača daje veći MS signal [38].

Publikacija u okviru ove doktorske disertacije (*Journal of Chromatography A* (2016) 1438, 123–132) predstavlja prvi objavljeni članak u okviru koga se uspostavljaju kvantitativni odnosi između fizičko-hemijskih parametara i hromatografskih faktora sa jedne strane, i intenziteta ESI-MS signala sa druge strane. Uočen je pozitivan uticaj udela organskog rastavarača, H-acc, pK_a i SEV, negativan uticaj protoka mobilne faze dok je uticaj $\log P$ do određene vrednosti pozitivan, a potom negativan. Zaključci izneseni u ovoj disertaciji u vezi sa uticajem ispitivanih faktora na intenzitet signala koji predviđa model u velikoj meri su u skladu sa literaturnim podacima: pozitivan uticaj udela organskog rastvarača [38], H-acc [28], pK_a [25], SEV [26, 27, 29, 30], odnosno negativan uticaj protoka [36]. Pri pH 8,5 dobijen je najviši eksperimentalno dobijen intenzitet signala što je u suprotnosti sa teorijskim očekivanjem, po kom kisela sredina stimuliše protonovanje analita. Postoji nekoliko objašnjenja ovog fenomena, koja su i navedena u disertaciji a koja se odnose pre svega na razlike u baznosti analita u rastvoru i gasu, prenosu protona od strane medijatora iz rastvora poput amonijaka ili metanola, razlike u pH elektrosprej kapljice i okolnog rastvora [39, 40]. Već pomenuti članci takođe pokazuju slične rezultate, odnosno viši signal u baznoj u odnosu na kiselu sredinu u pozitivnoj [33], odnosno suprotno u negativnoj ESI-MS [35]. Ispitan je uticaj hromatografskih uslova na odnos intenzitetâ signala dominantnih tranzicija, ali nije uočen značajniji uticaj. Iako je u literaturi pronađena studija u kojoj je dobijen različit odnos intenzitetâ signala dominantnih tranzicija pri različitim hromatografskim uslovima (pH vodenog dela mobilne faze, koncentracija pufera i udeo organskog rastvarača) za tri leka iz grupe fluorohinolona [41], sličan efekat nije uočen na primeru sartana.

U svim fazama istraživanja urađena je i postupna MLR analiza sa istim ispitivanim faktorima. Modeli bazirani na ANN su pokazali mnogo bolje rezultate predviđanja.

4. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni 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.

5. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

QSRR i QSPR (odgovor je intenzitet signala masenog spektrometra) modeli predstavljaju veoma značajan naučni koncept u istraživanju i razvoju metoda u analitici lekova, ali i drugih hemijskih supstanci. Njihov cilj je analiza uticaja fizičko-hemijskih parametara na odgovor sistema koji se posmatra, kao i predviđanje ponašanja novog analita. Ukoliko se u ispitivane faktore uključe i instrumentalni (hromatografski) faktori, uspostavljen model se može upotrebiti za optimizaciju uslova metode za analizu odabrane grupe lekova. Veštačke neuronske mreže kao nelinearna matematička tehnika pokazuju odlične rezultate u situacijama kompleksnih uticaja ispitivanih faktora na odgovor, kao i interakcija među ispitivanim faktorima. Iako se za veštačke neuronske mreže kaže da funkcionišu kao „crna kutija“, jer se ne dobija mnogo informacijama o njihovom radu, da bi se postavio adekvatan model i potom upotrebili i analizirali dobijeni rezultati potrebno je iskustvo i znanje o fizičko-hemijskim procesima, u ovom slučaju retencije i elektrosprej jonizacije. Naučni doprinos ove doktorske disertacije je metodološki, praktičan i fundamentalan. Metodološki doprinos ogleda se u primeni naučnog koncepta u određenim analitičkim sistemima po prvi put, metodologiji izbora ulaznih promenljivih, kao i metodologiji optimizacije hromatografske metode. Postignuta je visoka korelacija i mala greška u predviđanju odgovora, čime je dokazana opravdanost metodološke postavke. Praktičan doprinos ogleda se u uspostavljanju modela koji se mogu primeniti za predviđanje retencionog, odnosno ESI-jonizacionog ponašanja „novih“ analita srodne strukture, kao i ispitivanih analita pod novim uslovima i razvoju konkretnih analitičkih metoda (*stability-indicating* metoda za analizu kandesartan cileksetila i degradacionih proizvoda, odnosno metoda za analizu šest lekova iz grupe sartana). Fundamentalni doprinos ogleda se u analizi ispitivanih faktora na praćeni odgovor i time analizu fizičko-hemijskih procesa.

Zaključak:

Doktorska disertacija, koja je obuhvatila razvoj modela za predviđanje retencionog ponašanja i intenziteta odgovora masenog spektrometra u analizi odabranih azola i sartana primenom veštačkih neuronskih mreža predstavlja značajan naučni doprinos za oblast Analitika lekova. Rezultati doktorske disertacije publikovani su u **4 naučna rada** u časopisima od međunarodnog značaja (2 u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti **M21a** i 2 u vrhunskim međunarodnim časopisima **M21**) i **2 saopštenja** sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (**M34**).

Uzimajući u obzir sve što je izloženo, predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Jelene Golubović pod nazivom:

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

1. _____
Dr sc. Mira Zečević (mentor, predsednik komisije),
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski
fakultet
2. _____
Dr sc. Ana Protić Marković, docent, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. _____
Dr sc. Biljana Otašević, docent, Univerzitet u Beogradu
– Farmaceutski fakultet
4. _____
Dr sc. Marina Radišić, naučni saradnik, Inovacioni
centar Tehnološko-Metalurškog fakulteta, Univerziteta
u Beogradu

U Beogradu, 04.06.2016.

Reference:

- [1] H. Noorizadeh, M. Noorizadeh, A. Farmany, Advanced QSRR models of toxicological screening of basic drugs in whole blood by UPLC-TOF-MS, *Medicinal Chemistry Research*, (2012) 1-12.
- [2] P.J. Eugster, J. Boccard, B. Debrus, L. Bréant, J.L. Wolfender, S. Martel, P.A. Carrupt, Retention time prediction for dereplication of natural products (C_xH_yO_z) in LC-MS metabolite profiling, *Phytochemistry*, 108 (2014) 196-207.
- [3] H. Noorizadeh, A. Farmany, H. Narimani, M. Noorizadeh, QSRR using evolved artificial neural network for 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair from UPLC-TOF-MS, *Drug Testing and Analysis*, 5 (2013) 320-324.
- [4] 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.
- [5] D.V.S. Rao, P. Radhakrishnanand, M.V. Suryanarayana, V. Himabindu, A stability-indicating LC method for candesartan cilexetil, *Chromatographia*, 66 (2007) 499-507.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] T. Baczek, K. Bodzioch, E. Michalska, R. Kaliszan, Predictions of reversed-phase gradient elution LC separations supported by QSRR, *Chromatographia*, 68 (2008) 161-166.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.

- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.

- [25] 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.
- [26] N.B. Cech, C.G. Enke, Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 2717-2723.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] M. Oss, A. Krueve, K. Herodes, I. Leito, Electrospray ionization efficiency scale of organic compound, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 2865-2872.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.

- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] J. Liigand, A. Kruve, 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.
- [39] N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrometry Reviews*, 20 (2001) 362-387.
- [40] 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.
- [41] 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.