

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Nevena M. Đajić

Hemometrijski podržana karakterizacija
hromatografskih sistema modifikovanih β -
ciklodekstrinom sa odabranim model supstancama

Doktorska Disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Nevena M. Djajić

Chemometrically assisted characterization of β -
cyclodextrin modified chromatographic systems
with selected model substances

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

MENTOR

Dr sc. Ana Protić (mentor, predsednik komisije), vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
Katedra za analitiku lekova

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Biljana Otašević, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
Katedra za analitiku lekova

Prof. dr Mira Zečević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
Katedra za analitiku lekova

Dr sc. Jelena Golubović, naučni saradnik,
Viši naučnik – bioanalitičar, Fidelta Ltd.

Datum odbrane: _____

Zahvalnost na prilici i mogućnošću za zajednički rad prvenstveno dugujem mentoru ove disertacije, dr sc. Ani Protić. Draga Ana, veoma sam zahvalna na prenesenom znanju, smernicama, strpljenju, kao i nepokolebljivoj volji, koja me je uvek gurala napred.

Hvala na slobodi, koja je omogućila moj lični razvoj kao istraživača i na svim diskusijama, bilo profesionalne ili lične prirode, koje su uvek predstavljale snažan vetar u leđa.

Zahvaljujem se dr sc. Biljani Otašević na pomoći u svim fazama izrade disertacije, plodonosnoj saradnji, podršci i kolegijalnosti.

Zahvaljujem se prof. dr Miri Zečević na korisnim sugestijama prilikom pisanja ove disertacije, kao i na dugogodišnjoj saradnji.

Veliku zahvalnost dugujem dr sc. Jeleni Golubović, koja je bila uz mene od prvog dana upoznavanja sa radom u laboratoriji, nesebično mi pružala znanje i bodrila moj istraživački rad.

Jelena, hvala na savetima, idejama i prijateljstvu, koje je najvrednije od svega.

Zahvaljujem se kolegi dr. sc Milošu Petkoviću sa Katedre za organsku hemiju na značajnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja iz oblasti nuklearne magnetno-rezonantne spektroskopije.

Hvala prof. dr Danici Agbabi, rukovodiocu projekta u okviru koga je izrađena ova disertacija na mudrosti i podršci.

Veliko hvala kolegama sa Katedre za analitiku lekova na prijatnoj radnoj atmosferi i spremnosti na timski rad.

Hvala mojoj sestri Marini na ljubavi i podršci. Najviše joj hvala na osmehu u svim lakim i teškim vremenima i saznanju da kada imamo jedna drugu možemo sve.

Hvala Zoranu što je uvek verovao u mene više nego ja sama, što je moj uspeh i sreću uvek neopravdano stavljao ispred svog.

Hvala ti što si mi izabravši me za životnog saputnika darovao neraskidivu vezu i prijateljstvo iznad svega.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima Nadi i Mladenu na čvrstom osloncu, koji je utemeljenje za sve moje uspehe i beskompromisnoj podršci.

Mama i tata, hvala vam na bezgraničnoj ljubavi, koja je uvek bila i ostaće moja zvezda vodilja.

HEMOMETRIJSKI PODRŽANA KARAKTERIZACIJA HROMATOGRAFSKIH SISTEMA MODIFIKOVANIH β-CIKLODEKSTRINOM SA ODABRANIM MODEL SUPSTANCAMA

SAŽETAK

Ciklodekstrini (eng. *Cyclodextrins* – CDs) su poznati po svojoj sposobnosti da grade inkluzione komplekse sa različitim molekulima. Ova osobina je odgovorna za njihovu primenu kao aditiva mobilne faze u razvoju ekološki prihvatljivih metoda reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC). Sprovedena je karakterizacija inkluzionih kompleksa koji se formiraju između β-CD-a i odabrane model smeše, koju čine risperidon, olanzapin i njihove srodne supstance. Stehiometrija kompleksa 1:1 je potvrđena masenom spektrometrijom sa elektrosprej jonizacijom. Molekulskom doking studijom predviđene su termodinamički najstabilnije strukture inkluzionih kompleksa, koje su potvrđene nuklearnom magnetno-rezonantnom spektroskopijom. Uspostavljen je kvantitativni odnos strukture i retencije (eng. *Quantitative Structure-Retention Relationship* – QSRR) uključivanjem deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse, molekulskih deskriptora i eksperimentalnih parametara. QSRR model razvijen uz pomoć veštačkih neuronskih mreža (eng. *Artificial Neural Network* – ANN) je primenjen u razvoju ekološki prihvatljivih RP-HPLC metoda. i izračunavanju konstanti stabilnosti i termodinamičkih parametara kompleksiranja. Otkriveno je da HPLC metoda nije univerzalno primenljiva u izračunavanju navedenih parametara. U sistemu gde β-CD nije prisutan u mobilnoj fazi, uočeno je razdvajanje pika srodne supstance B od pika inkluzionog kompleksa, a detekcija je sprovedena detektorom naelektrisanja u aerosolu. Kod supstanci gde nije došlo do navedenog razdvajanja, predložen je novi metodološki pristup izračunavanju konstanti stabilnosti. Razvijen je i QSRR-ANN model sa opsežnim setom molekulskih deskriptora, koji je omogućio identifikaciju strukturnih karakteristika od značaja za formiranje inkluzionih kompleksa i retenciono ponašanje model supstanci. Utvrđeno je da retenciono ponašanje u velikoj meri zavisi od molekulskih dimenzija i oblika, lipofilnosti i udaljenosti od geometrijskog centra grupa koje ostvaruju interakcije sa β-CD-om.

Ključne reči: Ciklodekstrin; Inkluzioni kompleks; RP-HPLC; Konstanta stabilnosti; QSRR; ANN; Ekološki prihvatljiva metoda; Molekulski deskriptor; Molekulska doking studija; Deskriptori inkluzionih kompleksa;

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Analitika lekova

CHEMOMETRICALLY ASSISTED CHARACTERIZATION OF β -CYCLODEXTRIN CHROMATOGRAPHIC SYSTEMS WITH SELECTED MODEL SUBSTANCES

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) are known for their ability to form inclusion complexes with wide variety of organic molecules. This characteristic is responsible for its role as mobile phase additives in development of eco-friendly reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods. Characterization of inclusion complexed formed between β -CD and risperidone, olanzapine and their related compounds, selected as model substances, was undertaken. The 1:1 complex stoichiometry was confirmed with electrospray ionization mass spectrometry. Molecular docking study predicted thermodynamically favourable structures of inclusion complexes, which were confirmed with nuclear magnetic resonance spectroscopy. Quantitative structure-retention relationship (QSRR) model including descriptors describing inclusion complexes, molecular descriptors and experimental parameters was established. QSRR model developed with an aid of artificial neural networks (ANN) was utilized in development of ecologically acceptable RP-HPLC methods and calculation of complex stability constants and accompanying thermodynamic parameters. Study results revealed that HPLC is not universally applicable for calculation of the aforementioned parameters. In a system lacking β -CD in the mobile phase, the separation of related compound B peak and peak corresponding to the formed inclusion complex was achieved, while the detection was performed with Corona charged aerosol detector. For substances where the separation of the previously mentioned peaks was not observed, the novel methodological approach in calculating stability constants was proposed. Moreover, QSRR-ANN model with large pool of molecular descriptors was developed and enabled the identification of structural characteristics, which are significantly contributing to inclusion complex formation and retention of model substances. Retention behaviour is affected to a great extent by molecular dimension and shape, lipophilicity and distance of groups forming interaction with β -CD from the geometrical center of the molecule.

Keywords: Cyclodextrin; Inclusion complex; RP-HPLC; Stability constant; QSRR; ANN; Ecologically acceptable method; Molecular descriptor; Molecular docking study; Descriptors describing inclusion complexes;

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Drug analysis

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Ciklodekstrini – karakteristike, značaj i primena.....	2
1.2 CD-modifikovani RP-HPLC sistemi.....	6
1.2.1 Ispitivanje adsorpcije aditiva na površinu stacionarne faze u RP-HPLC.....	6
1.2.1.1 Frontalna analiza.....	7
1.3 Karakterizacija inkluzionih kompleksa sa CD-om u rastvoru.....	8
1.3.1 Stehiometrija.....	8
1.3.2 Analitičke tehnike za karakterizaciju CD-skih kompleksa u rastvoru.....	9
1.3.3. Hromatografsko određivanje konstante stabilnosti kompleksa.....	9
1.3.4 Termodinamički parametri kompleksiranja.....	10
1.4 Kvantitativni odnos strukture i retencionog ponašanja.....	11
1.4.1 Molekulski deskriptori.....	13
1.4.2 Studija molekuskog dokinga.....	14
1.4.3 Tehnike za građenje QSRR modela.....	15
1.5 Veštačke neuronske mreže.....	15
1.5.1 Višeslojne nerekurventne mreže.....	16
1.5.1.2 Treniranje i testiranje mreže.....	17
1.5.1.3 Pogodnosti i mane ANN i njihova aplikacija u farmaceutskim istraživanjima.....	19
1.6 Procena ekološke prihvatljivosti RP-HPLC metode.....	20
1.7 Model supstance.....	22
1.7.1 Risperidon i srodne supstance.....	22
1.7.1.1 Fizičko-hemijske osobine.....	25
1.7.1.2 Analitika risperidona.....	25
1.7.1.2.1 Literaturni pregled hromatografskih metoda za određivanje risperidona i srodnih supstanci.....	25
1.7.2 Olanzapin i srodne supstance.....	30
1.7.2.1. Fizičko-hemijske osobine.....	32
1.7.2.2 Analitika olanzapina.....	32
1.7.2.2.1 Literaturni pregled hromatografskih metoda za određivanje olanzapina i srodnih supstanci.....	32
2. CILJEVI	36
3. EKSPERIMENTALNI DEO	38
3.1 Opšti deo.....	39

3.1.1 Referentne standardne supstance, rastvarači i reagensi	39
3.1.2 Oprema	39
3.1.3 Računarski programi.....	40
3.2 Karakterizacija inkluzionih kompleksa formiranih između odabranih model supstanci i β -CD-a	40
3.2.1 Određivanje stehiometrije – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi	40
3.2.2 <i>In silico</i> predviđanje strukture inkluzionih kompleksa – studija molekuskog dokinga	41
3.2.3 NMR analiza – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi	41
3.3 QSRR-ANN u β -CD-modifikovanom RP-HPLC – opisivanje retencionog ponašanja i razvoj metoda za razdvajanje model supstanci	42
3.3.1 Priprema uzoraka	42
3.3.2 Hromatografski uslovi	42
3.3.3 QSRR-ANN – izračunavanje ulaznih i izlazne promenljive modela	42
3.3.4 Priprema rastvora za validaciju metoda.....	44
3.3.4.1 Rastvori za procenu selektivnosti metoda.....	44
3.3.4.2 Rastvori za određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije	45
3.3.4.3 Rastvori za procenu linearnosti metoda	45
3.3.4.4 Rastvori za procenu tačnosti i preciznosti metoda.....	45
3.4 QSRR-ANN u predviđanju retencije i izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa i termodinamskih parametara kompleksiranja	46
3.4.1 Hromatografsko određivanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi.....	46
3.4.2 Spektrofotometrijsko određivanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi.....	46
3.5 Primena CAD-a u ispitivanju retencije u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu i izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa.....	47
3.5.1 Hromatografski uslovi	47
3.5.2 Priprema uzoraka za ispitivanje retencije	47
3.5.3 ESI-MS analiza – eksperimentalni uslovi.....	48
3.5.4 Konstruisanje kalibracionih krivih za izračunavanje konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa.....	48
3.6 Prošireni QSRR-ANN model u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu.....	49
3.6.1 Određivanje adsorpcionih izoterma β -CD-a.....	49
3.6.2 QSRR-ANN – ulazne promenljive, set podataka za modelovanje i formiranje mreže.....	50
4. REZULTATI I DISKUSIJA	51

4.1 Karakterizacija inkluzionih kompleksa koji se formiraju između odabranih model supstanci i β -CD	52
4.1.1 Formiranje inkluzionih kompleksa i određivanje stehiometrije	52
4.1.2 Predviđanje struktura formiranih inkluzionih kompleksa molekulskom doking studijom	54
4.1.3 ^1H NMR spektroskopija u tumačenju struktura inkluzionih kompleksa	57
4.2 QSRR-ANN u β -CD-modifikovanom RP-HPLC – opisivanje retencionog ponašanja i razvoj metoda za razdvajanje model supstanci	60
4.2.1 Izbor molekulskih deskriptora i deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse za građenje QSRR-ANN modela	60
4.2.2 CCD u definisanju eksperimentalnog prostora.....	62
4.2.3 QSRR-ANN modelovanje	64
4.2.4 Razvoj ekološki prihvatljivih metoda tačne hromatografije za razdvajanje odabranih model supstanci	74
4.2.4.1 Validacija razvijenih ekološki prihvatljivih β -CD-modifikovanih RP-HPLC metoda za razdvajanje risperidona i srodnih supstanci, kao i olanzapina i srodnih supstanci.....	79
4.2.4.2 Procena ekološke prihvatljivosti razvijenih metoda	81
4.3 Primena QSRR-ANN modela u izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa i termodinamičkih parametara kompleksiranja.....	83
4.4 Primena CAD-a u ispitivanju retencije u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu i izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa.....	92
4.4.1 Ispitivanje retencije odabranih supstanci i njihovih inkluzionih kompleksa sa β -CD-om uz pomoć CAD-a	92
4.4.2 Određivanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa sa β -CD-om korišćenjem CAD-a.....	96
4.5 Prošireni QSRR-ANN model u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu.....	102
4.5.1 Selekcija ulaznih promenljivih za potrebe QSRR-ANN modelovanja.....	102
4.5.2 QSRR-ANN modelovanje	103
5. ZAKLJUČAK.....	117
6. LITERATURA	121
7. PRILOZI.....	132
8. BIOGRAFIJA.....	138

1. UVOD

1.1 Ciklodekstrini – karakteristike, značaj i primena

Ciklodekstrini (eng. *Cyclodextrins* – CDs) su makrociklični oligosaharidi, koji se dobijaju enzimskom degradacijom skroba pod uticajem ciklodekstrin-glukotransferaze. Sačinjeni su od 6 – 12 glukopiranoznih jedinica međusobno povezanih α -(1,4) glikozidnim vezama. Najčešće korišćeni prirodni CD-i su α -, β - i γ -CD koji se redom sastoje od 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica (Slika 1) [1-3]. CD-i su prstenasti molekuli, ali zbog manjka slobodne rotacije na nivou veza između glukopiranoznih jedinica nemaju cilindričnu strukturu. Glukopiranozne jedinice u strukturi CD-a zauzimaju takve položaje da se formira struktura obrnute kupe, koja se sastoji iz unutrašnje hidrofobne šupljine okružene primarnim i sekundarnim alkoholnim grupama, što omogućava dobru rastvorljivost CD-a u vodi.

Potencijal CD-a za građenje inkluzionih kompleksa sa velikim brojem relativno hidrofobnih organskih molekula postoji upravo zbog sposobnosti CD-ske šupljine da u svoju unutrašnjost inkorporira ove molekule. α -CD i β -CD su prvi put izolovani krajem 19. veka, dok su prvi podaci o njihovim kompleksima objavljeni krajem 20. veka. Ideja o sposobnosti CD-a za molekularno kompleksiranje nije oduvek bila opšteprihvaćena [4]. Danas je poznato da je proces kompleksiranja najčešće predvođen kompatibilnošću veličine molekula koji ulazi u šupljinu CD-a sa njenim dimenzijama, kao i stepenom uklapanja čitavog ili dela molekula u šupljinu. Između molekula koji formira inkluzioni kompleks sa CD-om i CD-ske šupljine kao domaćina dolazi do formiranja van der Valsovih, hidrofobnih i dipol-dipol interakcija, ali ne i kovalentnih veza [5, 6]. Primarna sila koja vodi ka formiranju kompleksa je oslobađanje molekula vode iz šupljine CD-a i njihova izmena sa hidrofobnijim molekulima, usled čega dolazi do uspostavljanja nepolarnih interakcija koje su energetski povoljnije [6]. Vezivanje molekula za CD-sku šupljinu nije konstantan ni trajan proces, već predstavlja dinamičku ravnotežu. Snaga vezivanja zavisi od toga koliko se dobro „gost“ i „domaćin“ uklapaju, kao i od specifičnih interakcija između atoma na površini [7]. Postoji mogućnost formiranja kompleksa u rastvoru, i u čvrstom stanju, ali je voda u najvećem broju slučajeva rastvarač izbora. Takođe, do formiranja kompleksa može doći i u sistemu ko-rastvarača, kao i u prisustvu bilo kog nevodene rastvarača.

Ulaskom u šupljinu CD-a dolazi do značajnih promena u fizičko-hemijskim i biološkim osobinama inkorporiranih molekula. Kako oni bivaju trenutno „zaključani“ unutar šupljine uspostavljaju se uslovi za stvaranje povoljne mikrosredine za modifikovanje različitih molekularskih karakteristika. Formiranjem inkluzionih kompleksa dolazi do poboljšanja rastvorljivosti inače nerastvornih molekula, povećanja biološke raspoloživosti, hemijske stabilnosti, stepena otpuštanja, kao i smanjenja neželjenih efekata [8-11]. Prema tome, CD-i se koriste u različitim granama industrije, kao što su prehrambena, kozmetička, farmaceutska, tekstilna, itd [12-16]. U prehrambenoj industriji CD-i se primenjuju kao stabilizatori ukusa, za smanjenje neprijatnog mirisa ili ukusa. Zatim, u kozmetičkoj industriji CD-i su stabilizatori hemijski nestabilnih jedinjenja, omogućavaju produženo delovanje, smanjuju lokalnu iritaciju i redukuju neprijatne mirise [17]. CD-i mogu da poboljšaju penetraciju lekova kroz biološke membrane, koje se sastoje iz vodene spoljašnjosti i lipofilne membrane. Lekovi najčešće prolaze kroz biološke membrane pasivnom difuzijom, dok su CD-i sposobni da solubilizuju

inače nerastvorne lekove i dostave molekule leka lipofilnoj membrani, povećavajući na ovaj način gradijent koncentracije leka iznad lipofilne membrane. CD-i mogu da poboljšaju oralnu bioraspoloživost lekova i koriste se kao solubilizatori u čvrstim doziranim oblicima. Takođe, kao komponente parenteralnih doziranih oblika omogućavaju brže mešanje sa krvnom plazmom sa posledičnim formiranjem kompleksa lek-proteini plazme mehanizmom kompeticije. Od prirodnih CD-a, samo je upotreba α -CD-a dozvoljena u preparatima za parenteralnu upotrebu [18].

Prirodni α -CD, β -CD i γ -CD imaju ograničenu rastvorljivost u vodi koja može da limitira njihovu primenu kao solubilizujućih agenasa. Međutim, reakcijama sa različitim reagensima mogu se dobiti derivati CD-a koji su rastvorljivi u vodi, kao što je hidroksipropilovani CD dobijen tretiranjem CD-a sa propilen-oksikom ili karboksimetilovani CD, dobijen tretiranjem prirodnog CD-a sa monohlor-sirćetnom kiselinom. Supstitucija hidroksilne grupe je nasumična, a čak i supstitucija sa lipofilnijom metoksi grupom rezultuje poboljšanjem rastvorljivosti [18].

Pored značajne uloge u industriji, zapažena je i uloga CD-a u hromatografiji, kao aditiva mobilne ili stacionarne faze. CD-i se primenjuju kao hiralni selektori u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom (eng. *reversed-phase high-performance liquid chromatography* – RP-HPLC), zbog enantioselektivnosti do koje dolazi usled hidrofobnih interakcija i sternih efekata pri ulasku molekula u šupljinu [19]. Pored primene u hiralnoj hromatografiji, CD-i se koriste kao aditivi mobilne faze u cilju razvoja ekološki prihvatljivih metoda tečne hromatografije, kao velikog izazova analitičkih tehnika u današnje vreme [20, 21]. Kao aditivi mobilne faze, CD-i omogućavaju primenu većeg udela vodene faze, bez gubitka rezolucije ili efikasnosti razdvajanja [22]. Posledično, smanjuje se upotreba organskog rastvarača, na prvom mestu acetonitrila, kao najčešće korišćenog rastvarača u RP-HPLC sistemima, što ima dvostruku korist, kako u pogledu ekološke prihvatljivosti metode, tako i njene ekonomske isplativosti.

Proces formiranja inkluzionih kompleksa sa CD-om

Sposobnost formiranja inkluzionih kompleksa se izdvaja kao jedna od najznačajnijih osobina CD-a, jer na njoj počiva značajnost primene CD-a u različitim oblastima. U toku procesa kompleksiranja molekula “gost” je trenutno zarobljen unutar CD-ske šupljine, i delimično zaštićen od okoline, što dovodi do promena njegovih fizičko-hemijskih osobina. Na ovaj način se hidrofobnim molekulima može poboljšati rastvorljivost u vodi, zatim dolazi do povećanja stabilnosti na oksidaciju, svetlost i/ili toplotu, maskiranja neprijatnih mirisa i ukusa, kao i omogućavanja separacije i izolacije analita. Iz svih navedenih razloga, nije iznenađujuće što proces formiranja inkluzionih kompleksa sa CD-inima intrigira naučnike širom sveta da produbljuju istraživanja u ovoj oblasti [1, 6, 23, 24].

Molekul “gost” može biti delimično ili u potpunosti inkorporiran u CD-sku šupljinu. Inkluzionih kompleksi mogu da se formiraju u čvrstom stanju ili u rastvoru, s tim što u rastvoru dominira brz ekvilibrijum između slobodnog molekula CD-a i molekula “gosta”. U većini slučajeva, pretpostavlja se da jedan molekul CD-a formira kompleks sa jednim molekulom

„gosta”. Međutim, stehiometrija kompleksa formiranog između CD-a i molekula „gosta” može da se razlikuje, i uključuje odnose 1:1, 1:n ili n:1. Ilustrovano, CD-i sa većim dimenzijama šupljine, kao što je γ -CD mogu da „ugoste” više od jednog molekula u isto vreme, dok nekoliko CD-a mogu biti povezani na različitim mestima sa velikim molekulom „gostom”. U dostupnoj literaturi, najčešće se sreće stehiometrijski odnos 1:1. Međutim, bez eksperimentalne potvrde, nije poželjno pretpostavljati stehiometrijske odnose u formiranom kompleksu [23, 25].

Pokretačke sile koje upravljaju procesom formiranja inkluzionih kompleksa još uvek nisu u potpunosti objašnjene, iako su im posvećene godine istraživanja. Poznato je da je potrebno podstaći pomeranje ekvilibrijuma u pravcu formiranja inkluzionog kompleksa, kako bi došlo do ostvarenja ovog procesa. Do pomeranja ekvilibrijuma u pravcu formiranja kompleksa može doći usled nekih od navedenih interakcija :

- Istiskivanje molekula vode iz nepolarne šupljine CD-a
- Povećano formiranje vodoničnih veza sa istisnutim molekulima vode
- Smanjenje odbojnih interakcija između hidrofobnog molekula „gosta“ i vodenog okruženja
- Povećanje hidrofobnih interakcija po ulasku molekula „gosta“ u hidrofobnu CD-sku šupljinu [8, 26, 27].

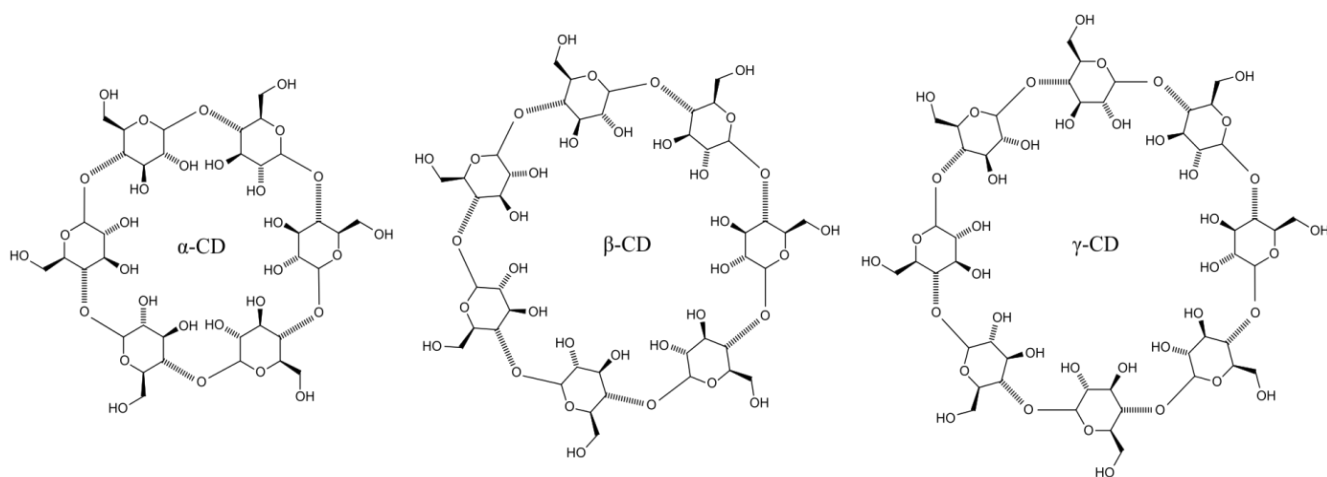
Posledično, faktori koji mogu da utiču na formiranje kompleksa su vrsta CD-a i dimenzije njegove šupljine, način pripreme i temperatura, kao i pH vrednost rastvora koja utiče na jonizaciju ispitivanih molekula [28]. Iako je inicijalni ekvilibrijum za formiranje inkluzionih kompleksa veoma brz, za postizanje finalnog ekvilibrijuma je najčešće potrebno mnogo više vremena, zbog konformacionih prilagođavanja molekula „gosta”. Sa druge strane, disocijacija kompleksa predvođena povećanjem broja molekula vode u okruženju je veoma brza. U veoma dinamičnim sistemima postoje poteškoće da molekul „gost” pronađe drugi CD i obnovi kompleks, pa ostaje slobodan u rastvoru [8]. Ekvilibrijum se smatra jednom od najznačajnijih osobina kada je u pitanju vezivanje različitih molekula za CD, i postoji jednostavno pravilo koje kaže da je brzo kompleksiranje uvek praćeno brzom disocijacijom kompleksa [18].

Prilikom procesa formiranja inkluzionog kompleksa između CD-a i molekula „gosta” dolazi do formiranja različitih vrsta nekovalentnih interakcija, poput van der Valsovih sila, vodoničnih veza, dipol-dipol interakcija i Londonovih disperzionih sila. Većina ima hidrofobni karakter i odgovorna je za formiranje stabilnih inkluzionih kompleksa. Različite interakcije mogu biti uključene u proces kompleksiranja, ali njihov broj i vrsta ne mogu jednostavno da se predvide. Prema tome, veoma je teško proceniti koliko dobro će se određeni molekul prilagoditi CD-skoj šupljini, iako bi ova informacija bila od velikog značaja prilikom izbora odgovarajućeg CD-a (prirodni ili hemijski modifikovan) [1, 24].

Efikasnost kompleksiranja u mnogome zavisi od strukturnih karakteristika, kako CD-a, tako i molekula „gosta”, kao i njihove geometrijske komplementarnosti. Poznato je da je struktura β -CD-a najrigidnija u poređenju sa ostalim prirodnim CD-inima, ali se njemu ipak daje prednost nad ostalim CD-inima kada je u pitanju upotreba u farmaceutskim formulacijama. Šupljina

CD-a je okarakterisana visinom i unutrašnjim dijametrom, koje određuje broj glukopiranoznih jedinica u njegovoj strukturi. Prema tome, unutrašnji dijametar α -CD-a je manji od unutrašnjeg dijametra β -CD-a i γ -CD-a. Iz tog razloga, šupljina α -CD-a je kompatibilna sa jedinjenjima male molekulske mase, koja u svojoj strukturi sadrže alifatične lance. β -CD je odgovarajući “domaćin” za heterociklična i aromatična jedinjenja, čime je pokriven širok opseg aktivnih farmaceutskih supstanci, dok se γ -CD kompleksira sa makrocikličnim i jedinjenjima steroidne strukture [8]. Još jedan od razloga za veću upotrebu β -CD-a u RP-HPLC sistemima je njegova slaba adsorpcija za C18 stacionarne faze [29].

Strukturne karakteristike molekula koji formiraju komplekse sa CD-om, kao što su polarnost i/ili naelektrisanje, imaju takođe značajnu ulogu u procesu kompleksiranja. Jonizovane supstance su manje podložne kompleksiranju i dekompoziciji. Sa druge strane, supstance u nejonizovanoj formi su spremniji za kompleksiranje u poređenju sa njihovim jonizovanim formama. Da bi došlo do formiranja kompleksa, molekul „gost“ mora biti manje polaran od vode, jer je potvrđeno da molekuli sa izraženijim hidrofobnim osobinama formiraju stabilnije komplekse. Efikasnost procesa kompleksiranja dodatno zavisi od medijuma u kome se ovaj proces odvija. U teoriji, ne postoji potreba za specifičnim rastvaračem da bi se odigralo kompleksiranje, već je dovoljna mala količina vode da bi se podstakao favorizovani termodinamički proces. Uopšteno, proces kompleksiranja je uslovljen entalpijom i entropijom, pri čemu obe zavise od uklapanja CD-a i molekula „gosta“, korišćenih rastvarača i drugih faktora uključenih u ovaj složeni proces [1, 6].



Slika 1. Strukture α -CD-a, β -CD-a i γ -CD-a

1.2 CD-modifikovani RP-HPLC sistemi

RP-HPLC sistemi modifikovani dodatkom CD-a u mobilnu fazu se smatraju dinamičnim i složenim, jer se ispitivana supstanca raspodeljuje između mobilne faze, CD-a rastvorenog u mobilnoj fazi i stacionarne faze [25]. Pod određenim uslovima može doći do formiranja tzv. pseudo-stacionarne faze adsorpcijom CD-a na površinu stacionarne faze. Na primer, metilovani β -CD dovodi do razdvajanja hiralnih analita zahvaljujući svojoj jakoj adsorpciji na površinu hidrofobne stacionarne faze [7].

U zavisnosti od karakteristika ispitivanog jedinjenja, bilo koji od dostupnih, prirodnih ili modifikovanih CD-a, može biti upotrebljen kao aditiv mobilne faze u RP-HPLC. Međutim, kada je reč o farmaceutskim supstancama, primena β -CD-a je dominantna nad ostalim CD-inima, jer je on kompatibilan sa heterocikličnim i aromatičnim jedinjenjima. Pretragom literature, pronađeni su podaci o primeni prirodnog i modifikovanog β -CD-a prilikom određivanja konstante stabilnosti kompleksa, koji se formira sa različitim molekulima leka [30-32]. Kompleksnost RP-HPLC sistema koji je modifikovan dodatkom CD-a u mobilnu fazu potiče od mogućnosti formiranja različitih interakcija, dok rezolucija i efikasnost razdvajanja zavise od brojnih eksperimentalnih uslova, među kojima su tip i koncentracija upotrebljenog CD-a, karakteristike mobilne i stacionarne faze, kao i temperature kolone. Do sada je mnogo rada posvećeno otkrivanju strukture inkluzionih kompleksa, kao i retencionog ponašanja u ovakvim hromatografskim sistemima [29, 33, 34]. Uprkos saznanjima o načinu na koji se analit distribuira između različitih komponenata ovog modifikovanog hromatografskog sistema, istraživači nisu u potpunosti spoznali uticaj strukture analita i eksperimentalnih parametara na retencione mehanizme koji se dešavaju u ovakvom tipu RP-HPLC sistema [35]. CD-modifikovani RP-HPLC sistemi nisu u tolikoj meri razjašnjeni da bismo sa sigurnošću mogli da tvrdimo koji retencioni mehanizmi će dominirati i predvoditi retenciju.

1.2.1 Ispitivanje adsorpcije aditiva na površinu stacionarne faze u RP-HPLC

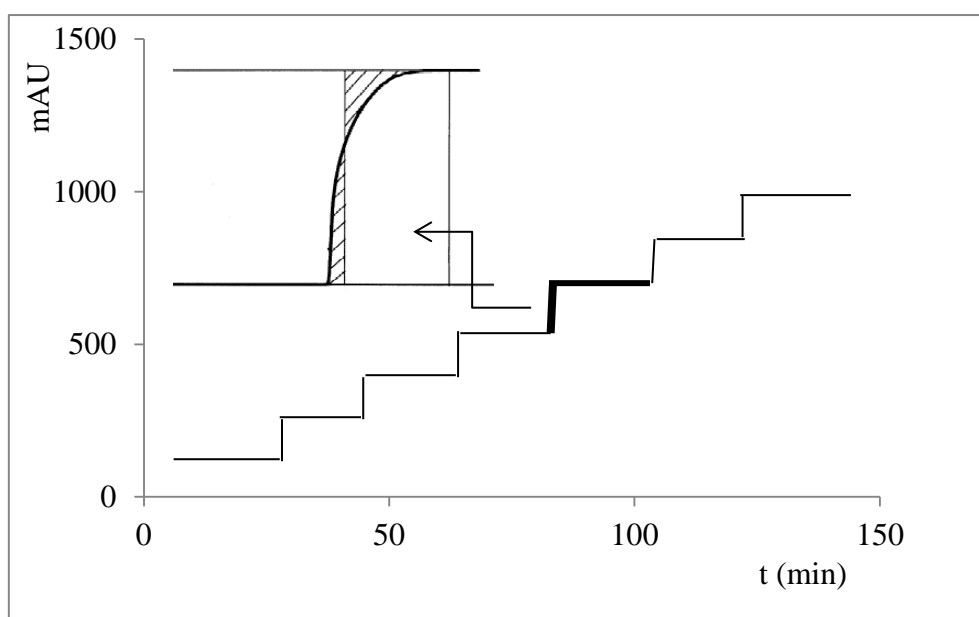
Eksperimentalne metode za određivanje adsorpcionih izoterma zasnovane su na analizi primarnih podataka o klasičnoj teoriji ekvilibrijuma u hromatografiji. Klasična teorija ekvilibrijuma u hromatografiji opisuje postojanje ekvilibrijuma distribucije između stacionarne i mobilne faze, zanemarujući kinetički efekat. Osnovna jednačina teorije ekvilibrijuma prati balans mase za komponentu i , kao i element zapremine, u definisanom opsegu (1):

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \times \frac{\partial q_i}{\partial t}(\bar{c}) + u \times \frac{\partial c_i}{\partial x} = 0; i = 1, N \quad (1)$$

U predstavljenoj jednačini (1), c označava koncentraciju u tečnoj fazi, q koncentraciju u čvrstoj fazi, ε poroznost kolone, u linearnu brzinu, a t i x redom predstavljaju vremenske i prostorne koordinate. U jednačini se pretpostavlja da je efikasnost kolone beskonačna i da su dve faze stalno u ekvilibrijumu, što je predstavljeno izotermom [36] $q_i = q_i(\bar{c})$.

1.2.1.1 Frontalna analiza

Adsorpcione izoterme mogu se određivati metodom frontalne analize. Frontalna analiza se izvodi tako što se koncentracija supstance čiju adsorpciju želimo da ispitamo naglo sukcesivno povećava na ulazu u kolonu, kako bi se uspostavio odnos njene koncentracije u mobilnoj i koncentracije na površini stacionarne faze u određenom, tačno zadanom koncentracionom opsegu. Sukcesivnim povećanjem koncentracije date supstance pri ulasku u kolonu snimaju se tzv. probojne krive (eng. *Breakthrough curves*) [37]. Svakoј nagloј promeni koncentracije i posledičnom transferu mase na stacionarnu fazu odgovora jedna tačka probojne krive (Slika 2).



Slika 2: Probajna kriva dobijena frontalnom analizom primenom programa gradijenta sa prikazom određivanja probajnog retencionog vremena

Količina aditiva koja se adsorbuje na površinu stacionarne faze se izračunava uz pomoć jednačine (2):

$$[\beta - CD_A] = \text{protok mobilne faze} \times (t_r - t_0) \times \frac{[\beta - CD]}{A} \quad (2)$$

gde je t_r probajno retenciono vreme korigovano za vreme kašnjenja usled mrtve zapremine sistema, t_0 je retenciono vreme pika mobilne faze, $[\beta - CD]$ koncentracija aditiva u eluentu, dok je A površina stacionarne faze korišćene hromatografske kolone [38].

Kako bi se količina aditiva koja se adsorbuje na stacionarnu fazu izračunala primenom jednačine (2), potrebno je očitati probajna retencionna vremena sa dobijenih probajnih krivih. Za probajno retenciono vreme ne može se smatrati tačka infleksije krive, niti polovina visine platoa, jer probajne krive često nisu simetrične, naročito pri visokim koncentracijama.

Probojnim retencionim vremenom se smatra ona tačka u kojoj normala povučena u odnosu na gornji i donji plato krive preseca probojnu krivu tako da i sa leve i sa desne strane normale ostaju trouglovi jednakih površina (Slika 2).

Primenom frontalne analize i snimanjem probojnih krivih izračunata je količina adsorbovanog aditiva, u ovom slučaju CD-a na stacionarnu fazu. Frontalna analiza ima prednost nad drugim hromatografskim metodama za određivanje adsorpcionih izoterma, jer tačka infleksije probojne krive zavisi samo od termodinamskih osobina sistema [36].

Zatim se konstruišu Frojndlihoove adsorpcione izoterme (3):

$$[\beta - CD_A] = a \times [\beta - CD]^b \quad (3)$$

gde su a i b konstante, $[\beta - CD]$ koncentracija aditiva (CD) u mobilnoj fazi, a $[\beta - CD_A]$ specifična površinska koncentracija aditiva (CD) izražena u $\mu\text{mol m}^{-2}$ [39, 40].

Adsorpcione izoterme opisuju adsorpciju aditiva iz mobilne faze na stacionarnu koristeći algebarski odnos koji povezuje količinu adsorbovanog aditiva i njegovu koncentraciju u mobilnoj fazi u momentu kada je uspostavljena ravnoteža.

1.3 Karakterizacija inkluzionih kompleksa sa CD-om u rastvoru

Postoje različite tehnike koje omogućavaju formiranje inkluzionih kompleksa, kao što je između ostalog i jednostavno mešanje, ali svaka od njih zahteva bar malu količinu vode [8, 41]. Zbog evidentne široke upotrebe CD-skih kompleksa, koja je detaljno predstavljena u poglavlju 1.1, potrebno je izvršiti njihovu karakterizaciju, koja podrazumeva utvrđivanje interakcija do kojih dolazi između molekula „gosta“ i „domaćina“, stehiometrijskog odnosa u kom se kompleks formira, kao i stabilnosti kompleksa, kao jedne od njihovih najznačajnijih osobina.

1.3.1 Stehiometrija

Kako bi se otpočela analiza kompleksa koji se formiraju između različitih organskih molekula i CD-a prvi korak je uvek usmeren ka određivanju stehiometrije. Pretragom literature se dolazi do podataka da autori neretko pretpostavljaju 1:1 stehiometriju između molekula „gosta“ i CD-a. Međutim, ovakve pretpostavke mogu da dovedu do netačnih zaključaka o stehiometriji, koji posledično utiču na tačnost određivanja stabilnosti formiranih kompleksa [42, 43]. Prema tome, stehiometrija kompleksa treba da bude potvrđena adekvatnim eksperimentalnim rezultatima. U određivanju stehiometrije inkluzionih kompleksa najčešće se koristi ^1H nuklearna magnetno-rezonantna spektroskopija (eng. *Nuclear Magnetic Resonance* – NMR), odnosno njena metoda kontinuiranih varijacija (eng. *Continuous variation method*) [30, 44]. Takođe, ista metoda korišćenjem fluorescentne spektroskopije može da se pronađe u literaturi [45, 46]. Iako se karakterišu kao pouzdane, ove metode ne predstavljaju prvi izbor prilikom određivanja stehiometrije, jer zahtevaju velike količine supstance za pripremu uzorka, a njihova dugotrajnost izvođenja je takođe jedan od nedostataka. Masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom (eng. *Electrospray Ionization – Mass Spectrometry* – ESI-MS) predstavlja metodu izbora za određivanje stehiometrije kompleksa, jer omogućava

transfer jona iz rastvora u gasnu fazu, uz očuvanje nekovalentnih interakcija kao vodećih interakcija koje učestvuju u kompleksiranju [41, 47]. *McLafferty* je predstavio prednosti MS metode kroz tri *S* koja označavaju specifičnost, senzitivnost i brzinu (eng. *Specificity, Sensitivity and Speed*) [48]. Ovim značajnim prednostima može se dodati i četvrto *S*, koje označava stehiometriju, i otvara jedno novo polje primene MS, u određivanju broja molekula koji formiraju komplekse, što je značajna karakteristika u brojnim sistemima. Razvoj tzv. mekih tehnika jonizacije, kao što je ESI, doveo je do revolucionarnog napretka u primeni MS metoda na biomolekule velikih molekulskih težina, sintetske polimere, kao i druge klase jedinjenja, kod kojih primena MS prethodno nije bila moguća [49]. *Ganem* i saradnici su prvi opisali primenu MS sa jonskim sprejem u identifikaciji nekovalentnih interakcija između molekula „domaćina“ i „gosta“ [50], ali je zatim jonski sprej zamenjen ESI tehnikom, koja je danas dominantna u MS ispitivanjima nekovalentnih kompleksa.

1.3.2 Analitičke tehnike za karakterizaciju CD-skih kompleksa u rastvoru

Potpuna karakterizacija CD-skih inkluzionih kompleksa nije jednostavan postupak i najčešće zahteva kombinovanu primenu više analitičkih tehnika, koja omogućava bolje razumevanje interakcija koje se ostvaruju između molekula „gosta“ i CD-a kao „domaćina“. Na ovaj način se omogućava i pravilan izbor odgovarajućeg CD-a za dati ispitivani molekul.

Analitičke metode su zasnovane na praćenju promene u odgovarajućem fizičkom ili hemijskom parametru molekula „gosta“, do koje dolazi kao posledice formiranja inkluzionog kompleksa sa CD-om. Neophodno je da posmatrana promena bude dovoljno velika da se može detektovati i odrediti sa odgovarajućom preciznošću. Za karakterizaciju CD-skih kompleksa u rastvoru najčešće se koriste spektroskopske, elektroanalitičke i/ili separacione tehnike. Kada razmatramo spektroskopske tehnike, UV/Vis spektrofotometrija je najčešće korišćena, jer je jednostavna i isplativa u poređenju sa ostalim tehnikama. Međutim, mana joj je to što se koristi nepromenljiva koncentracija molekula „gosta“, dok se koncentracija CD-a menja, što rezultuje potrebom za pripremu velikog broja uzoraka, i zahteva više vremena i potrošnje materijala. Takođe, pokazatelj formiranja kompleksa je promena u UV spektru molekula „gosta“, ali metoda nije specifična i zbog prisustva interferirajućih supstanci nekada ne može da bude direktan dokaz formiranja inkluzionog kompleksa. Pored uloge u određivanju stehiometrije kompleksa, masena spektrometrija može da se koristi i za određivanje konstante stabilnosti kompleksa [51]. Popularne tehnike za određivanje konstante stabilnosti kompleksa su i separacione tehnike kao što je kapilarna elektroforeza i /ili afinitetna kapilarna elektroforeza [52, 53], kao i HPLC. Separacione tehnike su korisne za ispitivanje molekulskih interakcija i validne u određivanju konstanti stabilnosti kompleksa. Nedostatak i kapilarne elektroforeze i HPLC je u tome što ne mogu da obezbede direktne strukturne informacije o formiranom inkluzionom kompleksu [51].

1.3.3. Hromatografsko određivanje konstante stabilnosti kompleksa

HPLC je veoma moćna tehnika za ispitivanje interakcija CD-a i CD-skih kompleksa sa stacionarnom fazom, kao i za određivanje stehiometrije i konstante stabilnosti kompleksa u rastvoru. Sa druge strane, HPLC može zahtevati dugotrajnu pripremu uzorka, kao i strogu

kontrolu eksperimentalnih uslova kako bi se obezbedila reproduktivnost metode. Takođe, HPLC eksperimenti za određivanje konstanti stabilnosti mogu biti dugotrajni i praćeni nezadovoljavajućom osetljivošću.

Kada se HPLC koristi za određivanje konstante stabilnosti prati se promena u retencionom faktoru molekula „gosta“ do koje dolazi usled kompleksiranja. Konstanta stabilnosti kompleksa se izračunava iz sledeće jednačine [31] (4):

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_0} + \frac{K [CD]^x}{k_0} \quad (4)$$

gde je k retencioni faktor molekula koji formira kompleks sa CD-om, k_0 je retencioni faktor molekula kada CD nije prisutan u mobilnoj fazi, $[CD]$ je koncentracija CD-a u mobilnoj fazi, x je stehiometrija formiranog kompleksa, a K je konstanta stabilnosti kompleksa. Predstavljena jednačina (4) je razvijena za hromatografsko određivanje konstante stabilnosti, a njena primena se može naći u literaturi [30, 31]. Kako bi se odredila konstanta stabilnosti kompleksa konstruišu se grafici zavisnosti $1/k$ i $[CD]$. Ukoliko su dobijeni grafici linearni, K se izračunava iz nagiba i odsečka na ordinati. Ovaj pristup je poželjan i iz razloga što omogućava istovremeno određivanje termodinamičkih parametara kompleksiranja, ukoliko se eksperimenti izvode sa variranjem temperature.

Kako bi se ostvarili benefiti od potencijala CD-a da grade inkluzione komplekse, neophodne su tehnike koje će tačno i u kratkom vremenskom roku odrediti konstante stabilnosti kompleksa, kao indikatore jačine vezivanja molekula „gosta“ i CD-ske šupljine. Iako se različite spektroskopske, elektroanalitičke i/ili separacione tehnike koriste u cilju ispitivanja kompleksa i određivanja konstanti stabilnosti, i dalje postoji potreba za razvojem brzih i ekonomski isplativih metoda, pogotovo metoda koje će koristiti *in silico* pristupe.

1.3.4 Termodinamički parametri kompleksiranja

Hidrofobne i van der Valsove i interakcije se smatraju dominantnim načinom vezivanja kada su u pitanju CD-ski kompleksi, iako vodonične veze i sterni efekti mogu takođe imati određenu ulogu [54]. Termodinamički parametri kompleksiranja su posledica ponderisanih doprinosa gore pomenutih interakcija. Termodinamički parametri kao što su Gibsova slobodna energija (ΔG°), standardna molarna entalpija (ΔH°) i standardna molarna entropija (ΔS°) pružaju više informacija o dinamici mehanizma vezivanja do koga dolazi u mikrosredini CD-ske šupljine [5]. U literaturi se mogu pronaći različite metode koje se koriste za određivanje termodinamičkih parametara kompleksiranja sa CD-om. U ove metode spadaju različite vrste mikrokolorimetrije [55, 56], UV/Vis i fluorescentna spektroskopija [57, 58], NMR spektroskopija [44], gasna i tečna hromatografija, kapilarna elektroforeza, pH potencimetrija, kao i mnoge druge [54].

Hromatografski se termodinamički parametri određuju na isti način kao i konstanta stabilnosti kompleksa, ali se retencioni faktor određuje pri različitim temperaturama. ΔH° i ΔS° se relativno jednostavno mogu odrediti uz pomoć sledeće jednačine (5):

$$\ln K = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (5)$$

gde je R univerzalna gasna konstanta ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), a T (K) je temperatura kolone. Konstruiše se grafik zavisnosti $\ln K$ od $1/T$, čiji je nagib $-\Delta H^\circ/R$, a odsečak na ordinati $\Delta S^\circ/R$.

ΔG° se izračunava iz vrednosti entalpije i entropije, na sledeći način [31, 59, 60] (6):

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (6)$$

Kada je CD dodat u mobilnu fazu dolazi do porasta vrednosti entalpije i entropije što ukazuje na to da je transfer ispitivanog molekula „gosta“ iz mobilne u stacionarnu fazu manje verovatan, zbog procesa formiranja inkluzionog kompleksa. Porast vrednosti termodinamičkih parametara povezan je sa formiranjem kompleksa između molekula „gosta“ i CD-a u mobilnoj fazi. U literaturi je pronađeno da je uticaj stacionarne faze zanemarljiv ukoliko je koncentracija CD-a u mobilnoj fazi niža od 1mM [61].

Poznato je da klasične hidrofobne interakcije dovode do pozitivnih promena entalpije i entropije. Negativne vrednosti entalpije objašnjavaju se time što pri dubljoj inserciji u CD-sku šupljinu karboksilna grupa može da štrči van šupljine i formira vodoničnu vezu sa funkcionalnim grupama na obodu šupljine CD-a [61].

1.4 Kvantitativni odnos strukture i retencionog ponašanja

Ispitivanje retencije analita, kao i njihovog razdvajanja u određenom RP-HPLC sistemu najčešće podrazumeva eksperimentalni pristup, koji je zahtevan u pogledu vremena i resursa. Ukoliko bi postojao teorijski pristup sa sposobnošću da u određenoj meri predviđa retenciju, razvoj RP-HPLC metode bi bio znatno brži i efikasniji [62]. Ideja o predviđanju hromatografskog ponašanja na osnovu strukture molekula dovela je do razvoja metodologije uspostavljanja kvantitativnog odnosa strukture i retencije (eng. *Quantitative Structure-Retention Relationships* – QSRRs).

QSRR predstavlja matematičku vezu između hromatografskih parametara određenih za izabranu seriju analita u datom hromatografskom sistemu i numeričkih vrednosti (deskriptora), koje prikazuju strukturne razlike između ispitivanih analita [63]. U većini slučajeva prilikom primene QSRR ciljani retencioni parametar je zavisna promenljiva linearne jednačine koja se dobija kao rezultat multivarijantne regresije posmatranih retencionih podataka u zavisnosti od deskriptora koji opisuju ispitivane analite [64].

QSRR metodologija pronalazi primenu u:

- Karakterizaciji hromatografskih kolona kvantitativnim upoređivanjem separacionih osobina
- Identifikaciji strukturnih deskriptora koji nose informacije od najvećeg značaja
- Ispitivanju mehanizama razdvajanja na molekulskom nivou pri određenim hromatografskim uslovima
- Predviđanju retencije novog jedinjenja, ili identifikaciji nepoznatih jedinjenja [65].

Prvi i najjednostavniji pristup prilikom građenja QSRR modela je onaj koji uspostavlja vezu između logaritma retencionih faktora i logaritma oktanol-voda particionog koeficijenta ($\log P$) [63]. $\log P$ vrednosti se izračunavaju na osnovu strukture analita korišćenjem komercijalno dostupnih kompjuterskih programa [63, 66].

Drugi tip QSRR modela je zasnovan na Abrahamovoj teoriji linearne korelacije solvatohromnih energija solvatacije [67, 68] (eng. *Linear Solvation Energy Relationship – LSER*), čija jednačina glasi (7):

$$\log k = \log k_0 + rR^2 + vV_x + s\pi_2^H + a\sum\alpha_2^H + b\sum\beta_2^H \quad (7)$$

gde je R^2 molarna refraktivnost analita, V_x molekulska zapremina računata prema Mek Govanovom algoritmu, π_2^H dipolarnost/polarizabilnost, $\sum\alpha_2^H$ mera sposobnosti analita da donira vodonik, a $\sum\beta_2^H$ predstavlja komplementarnu sposobnost primanja vodonika, $\log k_0$ je konstantna, dok su r , v , s , a i b regresioni koeficijenti, koji pre svega zavise od osobina stacionarne i mobilne faze [69]. Ova fundamentalna teorija tečne hromatografije polazi od toga da je retencija predvođena intermolekulskim interakcijama, a retenciono ponašanje se objašnjava mehanizmima koji mu doprinose, a označeni su kao šupljina, dipol i formiranje vodoničnih veza.

Treći tip QSRR modela povezuje vrednosti retencionog faktora sa strukturnim deskriptorima dobijenim kompjuterskom hemijom [63]. QSRR jednačina zasnovana na deskriptorima dobijenim molekulskim modelovanjem ima sledeću formu (8):

$$t_R = k'_1 + k'_{2\mu} + k'_{3\delta_{Min}} + k'_4 A_{WAS} \quad (8)$$

gde su k'_1 - k'_4 regresioni koeficijenti, μ označava dipol-dipol ili dipol-indukovani dipol interakcije analita sa komponentama mobilne ili stacionarne faze, δ_{Min} predstavlja polarnost fragmenata analita i posledično sposobnost da učestvuje u polarnim interakcijama sa fazama kao što su submolekularni dipol-dipol, transfer naelektrisanja i vodonične veze, dok A_{WAS} opisuje jačinu Londonovih disperzivnih sila koje analit ostvaruje sa molekulima koji formiraju hromatografske faze [66].

Klasičan QSRR pristup povezuje isključivo molekulske deskriptore sa posmatranim odgovorom, dok se eksperimenti izvode pri istim definisanim uslovima. Ovakav pristup značajno ograničava buduću praktičnu upotrebu razvijenih modela, jer je svodi samo na konkretne vrednosti eksperimentalnih uslova [70]. Iz navedenih razloga pojavilo se interesovanje za razvijanjem QSRR modela, koji pored molekulskih deskriptora uzimaju u obzir i eksperimentalne uslove, kao nezavisne promenljive jednog modela (eng. *Mixed modelling*) [71].

Modelovanje retencije u CD-modifikovanim RP-HPLC sistemima zahteva malo drugačiji pristup zbog toga što je retencija pod sinergističkim uticajem kompleksirajućeg i adsorpcionog ekvilibrijuma. Prema tome, u ovom istraživanju je prvi put predložen QSRR model, koji pored molekulskih deskriptora i eksperimentalnih parametara sadrži i deskriptore koji opisuju formirane inkluzione komplekse, kao ulazne promenljive modela. Uključivanje

deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse omogućava adekvatno razumevanje retencionog ponašanja analita u ovakvim RP-HPLC sistemima [29].

1.4.1 Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptor predstavlja rezultat logičke i matematičke procedure, koja transformiše hemijske informacije kodirane simboličnom reprezentacijom molekula u koristan broj ili rezultat nekog standardizovanog eksperimenta [72]. Molekulski deskriptori doprinose boljem razumevanju različitih karakteristika molekula. Njihova definicija može da se zasniva na različitim teorijama, dok je njihovo jednostavno izračunavanje omogućeno razvojem i primenom različitih algoritama. Podeljeni su u nekoliko kategorija, od kojih svaka ima svoje prednosti i mane. Fizičko-hemijski deskriptori imaju jasnu i očiglednu vezu sa retencijom, ali je njihova dostupnost često ograničena, dok je slaba korelacija sa retencijom mana kvantno-hemijskih deskriptora. Sa druge strane, kvantno-hemijski deskriptori obezbeđuju detaljne informacije o retencionim mehanizmima u hromatografiji na molekularnom ili submolekularnom nivou, što je jedna od njihovih značajnih odlika. Postoje deskriptori koje je jednostavno izračunati, kao što su teorijski deskriptori. Međutim, njihova korelacija sa određenim retencionim fenomenom nije uvek očigledna [73, 74].

Deskriptori se mogu podeliti na nula- (0D), jedno- (1D), dvo- (2D), tro- (3D) i četvorodimenzione (4D). 0D deskriptori se izvode iz molekulske formule, a neki od primera ove grupe deskriptora su vrsta i broj atoma, molekulska masa, itd. U slučaju 1D deskriptora u obzir se uzimaju i funkcionalne grupe molekula ili njihovi supstituenti. 2D deskriptori uzimaju u obzir topologiju molekula, dok 3D deskriptori ne zavise samo od načina vezivanja atoma, već i od njihove prostorne konformacije. 4D deskriptori se izračunavaju na osnovu molekuskog prikaza osobina koje ukazuju na elektronsku raspodelu interakcija molekula sa okolnim prostorom [73]. Molekulski deskriptori se relativno jednostavno izračunavaju uz pomoć različitih softvera, od koji *Dragon software* pruža mogućnost izračunavanja ne samo najčešće korišćenih deskriptora koji odslikavaju veličinu ili oblik molekula, već i geometrijskih 3D deskriptora. U ovu grupu spadaju WHIM deskriptori (eng. *Weighted Holistic Invariant Molecular descriptors*), koji predstavljaju geometrijske deskriptore, zasnovane na statističkim indeksima izračunatim na projekcijama atoma duž glavne ose. Oni nose odgovarajuću 3D informaciju koja se odnosi na veličinu molekula, oblik, simetriju, distribuciju atoma u odnosu na nepromenljivi referentni okvir [75]. Zatim, tu su i GETAWAY deskriptori (eng. *GEometry, Topology and Atom-Weights Assembly*) koji predstavljaju 3D molekulska geometriju obezbeđenu od strane molekuskog matriksa (eng. *Molecular Influence Matrix – MIM*). Pored informacija o geometriji, koje su dobijene od strane molekuskog matriksa, ovi deskriptori pružaju i topološke informacije obezbeđene uz pomoć molekulskih grafika, ponderisanih hemijskim informacijama koje su kodirane odgovarajućim atomskim težinama [76]. 3D-MoRSE deskriptori (eng. *3D-Molecular Representation of Structures based on Electron diffraction*) su zasnovani na ideji dobijanja informacija od strane 3D atomskih koordinata korišćenjem transformacije, koja se koristi u elektron difrakcionim studijama za pripremu teorijskih krivi rasipanja [77]. Poznato je da se ova grupa deskriptora uspešno koristi u modelovanju različitih bioloških i/ili fizičko-hemijskih osobina, i može biti primenjena u simulacijama infracrvenog spektra [78].

Broj strukturnih deskriptora koji može biti dodeljen jednom analitu je praktično neograničen, pa je jedan od najvećih izazova prilikom građenja QSRR modela upravo pravilan izbor deskriptora. Iz tog razloga, da bi se pravilno upotrebili molekularni deskriptori potrebno je poznavanje statistike, hemometrije, QSRR principa, kao i specifične oblasti iz koje problem potiče, što ukazuje na veliku interdisciplinarnost u polju istraživanja i primene molekularnih deskriptora [72, 74].

1.4.2 Studija molekularnog dokinga

Oblast molekularnog dokinga razvijala se uporedo sa razvojem kompjuterskih tehnologija i porastom pristupa bazama podataka o malim molekulima i proteinima. Cilj molekularnog dokinga, kao automatizovanog procesa, jeste razumevanje i predviđanje molekularnog prepoznavanja. Sa jedne strane dolazi do strukturnog prepoznavanja i pronalaze se najverovatniji načini povezivanja dva ili više molekula, dok se sa druge strane predviđa afinitet vezivanja na osnovu utroška energije potrebne da dođe do uspostavljanja interakcija. Studija molekularnog dokinga se najčešće sprovodi između malog molekula, koji predstavlja ligand i ciljanog makromolekula, koji ima ulogu receptora. Kako doking podrazumeva pronalaženje energetski najpovoljnijeg načina vezivanja liganda za receptor od interesa, potrebno je odrediti varijable liganda, koje će jedinstveno definisati način vezivanja. Ove promenljive podrazumevaju poziciju liganda (x-, y-, z-), orijentaciju, kao i konformaciju, ako je ligand fleksibilan. Svaka od ovih varijabli opisuje jedan stepen slobode u multidimenzionalnom prostoru u kom se vrši pronalaženje najverovatnijih struktura, a njihove granice određuju obim pretrage. Sve doking metode zahtevaju određene funkcije uz pomoć kojih će rangirati različite kandidate načina vezivanja. Sa druge strane, doking metode zahtevaju i određene funkcije pretrage, koje se dele na dve osnovne grupe: sistematične i stohastičke. Takođe, metode pretrage mogu dalje da se podele na lokalne i globalne u zavisnosti od toga u kom obimu istražuju prostor pretrage. Lokalne metode pretrage teže pronalaženju najbliže minimalne energije trenutnoj konformaciji liganda, dok globalne metode traže najbolju ili globalnu minimalnu energiju u okviru definisanog prostora. Postoje i hibridne tzv. globalno-lokalne metode pretrage, koje su se pokazale efikasnijim od samih globalnih metoda. Takođe, one imaju sposobnost pronalaženja manjih energija u poređenju sa globalnim metodama. Jedna od hibridnih lokalno-globalnih metoda je *Lamarckian*-ov genetski algoritam. *Lamarckian*-ov genetski algoritam omogućava predviđanje slobodnih energija vezivanja i posledično konstanti vezivanja za uklopljene molekule liganda. Od doking studija se generalno očekuje da pruže informacije o strukturi nastalog kompleksa između ispitivanog liganda i ciljanog makromolekula, kao i stabilnosti nastalog kompleksa, a koja može da se izrazi putem izračunate energije vezivanja [79, 80].

Energija vezivanja se sastoji iz sledećih energija:

- ΔE_{rast} – energija rastvarača
- ΔE_{konf} – energija konformacione promene
- ΔE_{int} – energija nastala tokom interakcije molekula
- ΔE_{rot} – energija interne rotacije
- ΔE_{vib} – energija vibracije molekula [81].

U procesu formiranja inkluzionih kompleksa sa CD-inima, studija molekuskog dokinga omogućava predviđanje najverovatnije strukture formiranih inkluzionih kompleksa sa različitim molekulskim vrstama. Na osnovu dokingom predviđenih struktura izračunavaju se parametri, koji opisuju formirane komplekse i mogu da se upotrebe kao nova grupa deskriptora, koji nose informaciju o formiranim kompleksima [29].

1.4.3 Tehnike za građenje QSRR modela

Prilikom građenja QSRR modela neophodno je izabrati odgovarajuću tehniku za uspostavljanje veze između deskriptora i/ili eksperimentalnih parametara, koji predstavljaju ulazne promenljive, i retencije, kao izlazne promenljive, odnosno odgovora sistema [82]. Strategije za građenje QSRR modela baziraju se na regresiji ili klasifikaciji, u zavisnosti od posmatranog problema. Multipla linearna regresija (eng. *Multiple Linear Regression* – MLR) predstavlja najčešće korišćenu tehniku regresione analize kojom su se povezivali molekularni deskriptori sa hromatografskom retencijom u prvim QSRR modelima. Međutim, ukoliko se posmatra veliki broj molekularnih deskriptora, metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Squares* – PLS) se primenjuje češće nego MLR [75]. MLR je metoda poznata po jednostavnoj interpretaciji, međutim nije mogla da prati napredak u teoriji molekularnih deskriptora, koja je zahtevala upotrebu metoda sposobnih da rade sa velikim brojem ulaznih promenljivih, kao i nelinearnom zavisnošću između ulaznih i izlazne promenljive modela [83].

Algoritmi mašinskog učenja (eng. *Machine Learning Algorithms* – MLAs) preuzeli su primat nad jednostavnijim metodama za modelovanje, zahvaljujući svojoj sposobnosti kombinacije atributa na napredan način. MLAs uspešno rade sa velikim brojem *input*-a modela. U paleti dostupnih MLAs, veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Network* – ANN) i metoda regresije potpornih vektora (eng. *Support Vector Regression* – SVR) izdvojile su se kao najpogodnije za razvoj QSRR modela, namenjenih predviđanju retencije [82, 83].

1.5 Veštačke neuronske mreže

Hemometrija predstavlja primenu skupa matematičkih i statističkih metoda sa ciljem dobijanja što većeg broja informacija prilikom rešavanja problema hemijske prirode [84]. Primena hemometrije omogućava dizajn eksperimenata, kao i selekciju optimalnih procedura merenja, kako bi se iz dostupnih hemijskih podataka iscrpelo što više relevantnih informacija [85]. ANN predstavljaju hemometrijski alat za rešavanje multivarijantnih hemijskih problema. Mogu da se definišu i kao sistem učenja zasnovan na kompjuterskoj tehnici inspirisanoj simulacijom neuroloških procesa humanog mozga [86].

Sposobnost ANN da generalizuje matematičke modele na sličan način kao ljudski mozak zasnovana je na sledećim pretpostavkama:

- (i) procesuiranje informacija se događa na mnogo jednostavnih procesnih elemenata, koji se nazivaju neuroni
- (ii) signali se prenose između neurona putem određenih veza

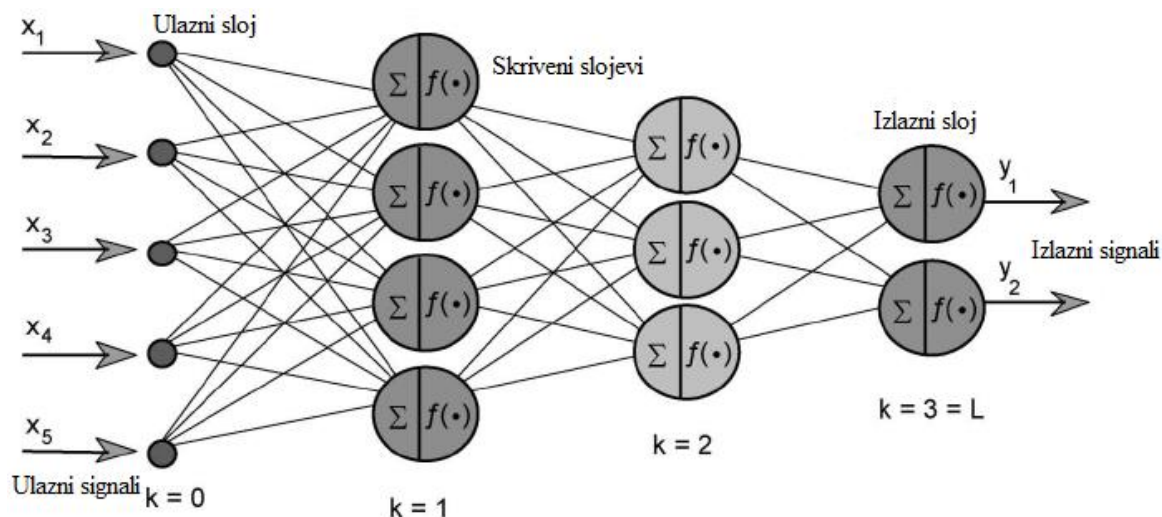
(iii) svakoj vezi između neurona je dodeljena težina, koja se kod tipične neuronske mreže množi sa signalom koji se prenosi
(iiii) svaki neuron se primenjuje kao aktivaciona funkcija (najčešće nelinearna) svog ulaznog signala (eng. *Input*), kako bi se odredio izlazni signal (eng. *Output*).

Objašnjenja ANN su brojna, sa različitim nivoima kompleksnosti, a jedno od najjednostavnijih predstavlja ANN kao „crnu kutiju“ u koju ulaze mnogobrojni *inputi*, a koja je sposobna da proizvede raznovrsne *output-e* [87]. Snaga ANN se ogleda u korišćenju veoma jednostavnih matematičkih operacija za rešavanje kompleksnih, matematički loše definisanih, nelinearnih ili stohastičkih problema [86]. Još jedna od prednosti ANN nad klasičnim statističkim metodama je u tome što ne zahteva prethodno poznavanje matematičke veze između ispitivanih promenljivih [88]. ANN može da koristi prethodno nepoznate informacije skrivene u podacima i ovaj proces se naziva učenje ili treniranje neuronske mreže. Proces učenja u matematičkom smislu podrazumeva prilagođavanje koeficijenata težina veza tako da se ispune prethodno zadati uslovi. Postoje dve osnovne vrste učenja, odnosno treniranja neuronske mreže, a to su nadgledano (eng. *Supervised*) i nenadgledano (eng. *Unsupervised*) treniranje. Kod nadgledanog treniranja ciljani *output* je poznat mreži i ona prilagođava koeficijente težina tako da su vrednosti željenog i izračunatog *output-a* što sličnije. Višeslojne nerekurentne mreže (eng. *Multi-layer feed-forward neural network*) su vrsta ANN koja koristi metode nadgledanog treniranja. Sa druge strane, kod nenadgledanog treniranja (npr. *Kohonen* mreže) ciljani *output* nije poznat, sistemu su obezbeđene grupe obrazaca i ostavljeno je da se sama mreža postavi u najstabilnije stanje kroz određeni broj ciklusa ponavljanja [89].

Razvojem kompjuterske tehnologije razvijala se i oblast ANN, pa danas postoje različite vrste mreža, koje se definišu prema prenosnoj funkciji, pravilu učenja, kao i načinu povezivanja neurona.

1.5.1 Višeslojne nerekurentne mreže

Višeslojne nerekurentne mreže su tip ANN koji se najviše primenjuje u farmaceutskoj analizi, zahvaljujući svojoj jasnoj arhitekturi i jednostavnom algoritmu povratnog prolaska greške (eng. *Back propagation*), kojim se najčešće treniraju [90]. Višeslojna nerekurentna mreža se sastoji od neurona, koji su organizovani u slojeve (Slika 3). Broj neurona u prvom sloju, koji se naziva ulazni sloj, odgovara broju ulaznih promenljivih, a pripada mu i uticaj *bias-a*, koji predstavlja vrednost koja se dodaje (ili oduzima) sumi ulaza u neuron pod težinama. Na isti način, poslednji izlazni sloj odgovara *output-u* mreže. Ulazni i izlazni sloj su povezani skrivenim slojevima (eng. *Hidden layers*), kojih može biti više [91]. Zbog uticaja na uspešnost mreže, broj skrivenih slojeva, kao i broj neurona u skrivenim slojevima je potrebno optimizovati, kako ne bi došlo do pretreniranosti mreže ako skriveni sloj sadrži previše neurona ili nemogućnosti završetka procesa treniranja ukoliko se premalo neurona nalazi u skrivenom sloju.



Slika 3: Primer ANN sa dva skrivena sloja i 5-4-3-2 topologijom [92]

Pre započinjanja procesa učenja, uvek je potrebno podeliti set podataka na tri zasebna seta, od kojih će prvi biti namenjen za trening, drugi za validaciju, odnosno fina podešavanja, a treći za test. Svaki od ovih setova podataka treba da sadrži otprilike jednu trećinu podataka, sa tendencijom da test set bude najobimniji. Validacioni set, koji često biva ignorisan, pruža povratne informacije na osnovu kojih se može korigovati inicijalno određena arhitektura mreže, u slučajevima kada su rezultati treninga zadovoljavajući, a rezultati validacionog seta loši. Ovakva situacija se nažalost često sreće u procesima učenja. Ovaj zadatak najčešće biva prepušten test setu, međutim ovakav pristup je pogrešan, jer podaci ostavljeni za test ne bi trebalo da budu uključeni u kreiranje modela [88].

1.5.1.2 Treniranje i testiranje mreže

Treniranje mreže podrazumeva prilagođavanje težina do postizanja nekih optimalnih vrednosti. Na početku treninga težine se dodeljuju nasumično, a zatim dolazi do prikazivanja parova ulaz-izlaz mreži koja pre toga nije trenirana. Izlaz predviđen mrežom se poredi sa željenom vrednošću izlaza i upravo ta razlika služi za podešavanja težina. Ovi ciklusi, koji se nazivaju epohe, se ponavljaju do postizanja željene vrednosti greške. Optimalno trajanje treninga se definiše na osnovu minimuma greške za validacioni set podataka, kroz definisan broj epoha.

Algoritam povratnog prolaska greške predstavlja učestalo prilagođavanje težina na osnovu kriterijuma najstrmijeg smanjenja (eng. *Steepest descent criterion*). U matematičkom smislu, prilikom treniranja svaka težina se varira prema sledećoj formuli (9):

$$\Delta w_{ji}(t) = -\eta \frac{\partial E}{\partial w_{ji}} + \mu \Delta w_{ji}(t-1) \quad (9)$$

gde je η stopa učenja (eng. *Learning rate*), a μ parametar koji se naziva momentum. Članovi jednačine koji su označeni sa t i $t-1$ predstavljaju t i $t-1$ iteraciju i ubačeni su u jednačinu kako bi sprečili algoritam da se zaglavi u lokalnom minimumu. Da bi se izračunao parcijalni izvod

greške E u odnosu na težine veza sa skrivenim slojevima, potrebno je da se greška predviđanja pomera unazad, što čega ovaj algoritam i nosi naziv algoritam povratnog prolaska greške. Dolazi do raspodele greške između neurona skrivenih slojeva, kako bi se primenila iterativna prilagođavanja težina, neophodna za učenje mreže [87].

Stopa učenja predstavlja veličinu koraka kojim algoritam menja težine, i veoma je značajna u određivanju napretka procesa treniranja. Ukoliko se zada isuviše niska vrednost stope učenja postoji rizik od zaglavljivanja mreže u lokalnom minimumu, jer težine sporo konvergiraju ka optimalnim vrednostima. Sa druge strane, i postavljanje previsokih vrednosti stope učenja može da ima nedostatke, u pogledu oscilovanja sistema, zbog čega se uvodi momentum. Momentum daje stabilnost algoritmu i sprečava da algoritam ostane zaglavljen u lokalnom minimumu [91]. Da bi treniranje mreže bilo uspešno potrebno je pronaći balans između zadate vrednosti stope učenja i momentuma (ako se jedna smanjuje, druga se povećava).

Kako bi se procenila uspešnost modelovanja u pogledu sposobnosti predviđanja mreže, potrebno je odrediti sledeće parametre:

- koeficijent determinacije između vrednosti odgovora koje su dobijene eksperimentalno i predviđene mrežom (R^2)
- kvadratni koren srednje vrednosti sume kvadrata greške (eng. *Root Mean Square Error* – RMSE), koja se izračunava u cilju prikazivanja greške između srednje vrednosti eksperimentalno dobijenih i mrežom predviđenih vrednosti odgovora
- korelacija između eksperimentalno dobijenih i mrežom predviđenih vrednosti odgovora, koja se predstavlja grafički ($y = x$), i poželjno je da koeficijent korelacije (r) bude što bliže 1.

R^2 se izračunava prema sledećoj formuli (10):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (10)$$

gde je y_i eksperimentalno dobijen odgovor, \hat{y}_i odgovor izračunat uz pomoć modela, a \bar{y} srednja vrednost eksperimentalno dobijenih odgovora.

Formula za izračunavanje RMSE je sledeća (11).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (11)$$

gde je y_i eksperimentalno dobijen odgovor, \hat{y}_i odgovor izračunat modelom, a n broj uzoraka.

Sposobnost predviđanja mreže se procenjuje nakon svakog prilagođavanja težina na odvojenom setu podataka (validacioni set), kako bi se izbegla pretreniranost mreže. Optimalna dužina trajanja treninga se definiše na osnovu minimalne vrednosti greške za validacioni set, koja predstavlja kriterijum za zaustavljanje treninga.

Nakon optimizacije mreže, njena stvarna sposobnost predviđanja se procenjuje na novom setu podataka (test set podataka ili eksterna validacija) [90, 93].

Validacija je ključni korak prilikom QSRR modelovanja. Razvijeni QSRR model je neophodno validirati kako bi se proverila njegova sposobnost predviđanja na novim netestiranim molekulima. Dva osnovna pristupa testiranja modela su: interna ili ukrštena validacija (eng. *Cross-Validation* - CV) i eksterna ili nezavisna validacija, koja se još naziva i *hold-out* validacija. Ukrštena validacija je vid interne validacije, pa se za njeno izvođenje koriste podaci sa kojim se gradi model. Proces ukrštene validacije započinje uklanjanjem jedinjenja ili grupe jedinjenja iz trening seta, kako bi oni postali privremeni test set, a regresija se mnogo puta ponavlja na izdvojenom delu podataka. Postoje dve osnovne strategije za izvođenje ukrštene validacije:

- „ostavi jedan van“ ukrštena validacija (eng. *Leave-One-Out Cross-Validation* – LOOCV)
- „ostavi mnogo van“ ukrštena validacija (eng. *Leave-Many-Out Cross-Validation* – LMOCV).

Ukoliko se primenjuje LOOCV strategija, jedan eksperiment se izostavlja iz trening seta i koristi za testiranje mreže. QSRR model se gradi sa preostalim podacima, a na osnovu izdvojenog eksperimenta se testira sposobnost predviđanja modela. Ovaj princip se ponavlja sa svakim pojedinačnim slučajem iz trening seta, a podaci koji se dobijaju služe za izračunavanje različitih internih validacionih parametara. LMOCV je pristup sličan LOOCV, s tim da se odvaja više od jednog pojedinačnog slučaja iz trening seta. Prediktivna sposobnost modela se izražava na osnovu predviđene sume kvadrata rezidua (PRESS) i koeficijenta determinacije ukrštene validacije (Q^2), koji se izračunava prema sledećoj formuli (12):

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum(y_{exp} - y_{LOO})^2}{\sum(y_{exp} - \bar{y}_{exp})^2} \quad (12)$$

gde je y_{LOO} odgovor koji je predviđen modelom, y_{exp} odgovor koji je dobijen eksperimentalno, a \bar{y}_{exp} srednja vrednost posmatranih eksperimentalno dobijenih odgovora. Q^2 se koristi istovremeno kao kriterijum robusnosti i sposobnosti predviđanja modela. Njegova vrednost je manja od vrednosti R^2 QSRR modela, ali njihova međusobna razlika ne bi trebalo da je veća od 0,3.

Eksterna validacija osigurava sposobnost predviđanja QSRR modela, kao i njegovu primenu za predviđanje ponašanja netestiranih molekula, ali postoje situacije u kojima eksterna validacija nije moguća, ili ne predstavlja metodu izbora. Ukoliko je količina podataka mala, ne postoje značajni benefiti u odvajanju čitavog seta podataka za test. U tim slučajevima je bolje primeniti ukrštenu validaciju. Različiti autori tvrde da model može imati visoku moć predviđanja, čak i kada validacija nije sprovedena na eksternom setu podataka. Ukoliko poredimo dva pristupa ukrštenoj validaciji, LMOCV se smatra pouzdanijom od LOOCV, ali je potrebno uzeti u obzir njenu dugotrajnost [94-98].

1.5.1.3 Pogodnosti i mane ANN i njihova aplikacija u farmaceutskim istraživanjima

Brojne prednosti u izvođenju zaključaka iz opsežnih baza podataka se pripisuju ANN, zbog imitiranja načina na koji neuron organizuje i obrađuje informacije. Verovatno jedna od

najpoznatijih prednosti primene ANN je njihova sposobnost rada sa podacima koji nemaju normalnu distribuciju, već poseduju kompleksne nelinearne veze, koje je teško interpretirati konvencionalnih linearnim statističkim metodama. Dodatno, mogu da rade sa nepotpunim podacima ili nedostajućim vrednostima. Kao i druge metode mašinskog učenja, ANN imaju sposobnost generalizacije, nudeći stvarna rešenja za određene probleme zahvaljujući mogućnosti predviđanja budućih slučajeva ili trendova na osnovu prethodno viđenog. Prema tome, ANN mogu da se koriste kao samostalni sistemi za predviđanje ponašanja nepoznatih slučajeva od interesa. Pored nabrojanih prednosti, ANN imaju i određena ograničenja. Prvenstveno treba obratiti pažnju na vremensko trajanje treninga, koje zavisi od kompleksnosti podataka koji se modeluju i povećava se sa povećanjem broja skrivenih slojeva u arhitekturi mreže. Zatim, problemi kod ANN mogu da nastanu od pretreniranosti mreže, koja predstavlja pamćenje slučajeva koji su dodeljeni treningu, što dovodi do lošijeg predviđanja za buduće slučajeve, koji su mreži nepoznati. Međutim, jedna od najvećih barijera na koju istraživači nailaze prilikom rada sa ANN je upravo u tome što se ANN smatraju tzv. „crnom kutijom“ i nije jasno vidljivo na koji način one dolaze do rešenja [99].

Različite vrste primene ANN mogu biti predstavljene kao klasifikacija ili prepoznavanje šeme, predviđanje i modelovanje. U farmaceutskim istraživanjima, mreže sa nadgledanim učenjem mogu da se koriste kao alternativa metodologiji površine odgovora (eng. *Response surface methodology*), dok su mreže sa nenadgledanim učenjem, koje mogu da projektuju multidimenzionalne setove podataka u dvodimenzionalne prostore, alternativa analizi glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis – PCA*). Primena ANN u farmaceutskim istraživanjima je raznolika, počevši od interpretacije analitičkih podataka, preko dizajna leka i doziranog oblika, do primene u kliničkoj farmaciji (farmakokinetičko i farmakodinamsko modelovanje, *in vitro/in vivo* korelacije).

1.6 Procena ekološke prihvatljivosti RP-HPLC metode

Koncept takozvane zelene hemije (eng. *Green chemistry*) prvi je uveo *Anastas* i predstavio kroz 12 principa, koji se odnose na prevenciju generisanja otpada, ekonomičnu upotrebu materijala, korišćenje i dizajniranje manje toksičnih hemikalija i rastvarača, izbegavanje derivatizacije i korišćenje energetski efikasnih i obnovljivih izvora [21, 100, 101]. U osnovi koncepta zelene hemije je održivi razvoj, kao jedna od oblasti koja se poslednjih decenija nalazi u fokusu.

Hromatografske tehnike se u velikoj meri koriste kako u istraživanju, tako i u rutinskim analizama, što globalno rezultuje velikim brojem analiza na dnevnom nivou. Samo jedan tečni hromatograf može da generiše 1 – 1,5 l tečnog otpada svakodnevno, pa štetan uticaj organskih rastvarača koji se intenzivno koriste pogotovo u tečnoj hromatografiji ne sme biti zanemaren. Sa druge strane uvek treba uzeti u obzir potrebu za efikasnim izvođenjem analiza. Uopšteno, koncept zelene hemije obuhvata i razvoj ekološki prihvatljivih hromatografskih metoda, čime se promovise smanjenja potrošnje organskih rastvarača [21, 102, 103]. Prilikom razvoja ekološki prihvatljivih hromatografskih metoda veoma važan aspekt je priprema uzorka. Priprema uzorka predstavlja jedan od najkritičnijih segmenata u pogledu ekološke prihvatljivosti, jer najčešće zahteva korišćenje rastvarača, a izlaganje toksičnim hemikalijama

prilikom pripreme može uticati na životnu sredinu i zdravlje analitičara. Prema tome, prednost se uvek daje direktnim hromatografskim metodama, čiji nedostatak je ograničena primena na uzorke sa čistim matriksima, koji neće skratiti životni vek hromatografske kolone [104]. Gasna hromatografija se smatra ekološki prihvatljivijom od tečne, jer se lakše prilagođava izbacivanju koraka pripreme uzorka. Sa druge strane, ovo pruža metodama tečne hromatografije više mogućnosti za prevođenje u ekološki prihvatljivije alternative [21, 105]. Dostupne su različite strategije kojima se hromatografskoj metodi može dodeliti ekološki prihvatljiv karakter. Najčešće je kod tečne hromatografije generalni cilj redukcija potrošnje organskih rastvarača, koja se može postići na različite načine. Jedan od načina jeste smanjenje unutrašnjeg dijametra i skraćenje dužine hromatografske kolone, redukcija veličine čestica stacionarne faze i/ili povećanje temperature. Kako smanjenje veličine čestica stacionarne faze i dijametra kolone uzrokuje značajno povećanje pritiska u sistemu, očigledno je da ovakve modifikacije moraju biti praćene modifikacijama instrumenata, uvođenjem instrumenata za izvođenje tečne hromatografije pod veoma visokim pritiskom (eng. *Ultra High-Performance Liquid Chromatography* – UHPLC). Iako se postižu brze i efikasne separacije analita, ova tehnika je skupa i dostupna u visoko-budžetnim laboratorijama [106]. Pored modifikacija stacionarne faze, određene modifikacije mobilne faze takođe omogućavaju razvoj ekološki prihvatljivih metoda tečne hromatografije. U tom pogledu, fluidi u superkritičnom stanju kao komponente mobilne imaju pozitivan uticaj na životnu sredinu i nisku toksičnost [107]. Sledeći pristup je zamena organskih rastvarača alternativnim, manje štetnim rastvaračima. Poznato je da acetonitril zbog svojih fizičko-hemijskih osobina predstavlja zlatni standard u farmaceutskoj analizi, ali usled toksičnosti i zapaljivosti uspešno se zamenjuje etanolom i/ili acetonom [106, 108]. Modifikacije mobilne faze u cilju postizanja ekološke prihvatljivosti metode podrazumevaju i primenu određenih aditiva, kao što su CD-i. Dodatkom CD-a u mobilnu fazu povećava se udeo vodenog dela mobine faze, i ujedno smanjuje utrošak organskog rastvarača, ali bez uticaja na efikasnost razdvajanja [22].

Nakon razvoja metode postavlja se pitanje kako na pravi način evaluirati različite procedure sa ciljem izbora najbolje u pogledu ekološke prihvatljivosti. Najveći izazov predstavlja sagledavanje svih aspekata jedne analitičke metode. Veoma zanimljiv pristup za procenu ekološke prihvatljivost organske sinteze nazvan ekološki skor (eng. *Eco-scale score*) predložen je od strane *Van-Aken* i saradnika [109], koji su pretpostavili da idealna reakcija koja ima skor 100 koristi pristupačna jedinjenja, izvodi se na sobnoj temperaturi i bezbedna je za onoga koji je izvodi, kao i za okolinu. Svaki parametar koji se razlikuje od idealnog snižava ukupan skor za vrednost kaznenih poena koje su mu dodeljene. Ovaj koncept je prilagođen i upotrebljava se i za procenu ekološke prihvatljivosti analitičkih metoda. Analitičku proceduru čini nekoliko segmenata, čiji broj najviše zavisi od osobine supstance i primenjene metode. Broj koraka je u negativnoj korelaciji sa ekološkom prihvatljivošću analitičke procedure, zbog utrošene energije i količine generisanog otpada. Prvi korak se uvek odnosi na prikupljanje uzorka, njegov transport, čuvanje i skladištenje. Ukoliko se analiza može izvršiti direktno, bez transporta uzorka do instrumenta, ovakav način uzorkovanja se naziva *in-line* i smatra se najpovoljnijim u pogledu ekološke prihvatljivosti. Određeni uzorci zbog svojih fizičko-hemijskih osobina zahtevaju primenu određenih procedura za čuvanje, međutim ovaj korak se ne smatra ekološki prihvatljivim, jer zahteva energiju i upotrebu

hemikalija. Poželjno je da se ovaj korak izbegava ukoliko priroda uzorka to dozvoljava. Naredni preliminarni korak u analitičkoj proceduri je transport uzorka, za koji je takođe poželjno da se izbegne. Međutim, ukoliko je neizbežan poželjno je da distanca između mesta uzorkovanja i analitičke laboratorije bude što manja. Skladištenje uzorka je korak koji najčešće zavisi od kapaciteta laboratorije koja izvodi analize. Kao što je spomenuto, priprema uzorka je kritičan korak u pogledu ekološke prihvatljivosti analitičke metode. Postoje analitičke procedure koje ne zahtevaju pripremu uzorka ili je ona svedena na minimum, dok sa druge strane određene procedure zahtevaju ekstrakciju, post-ekstrakciju ili derivatizaciju. Osnov koncepta analitičkog ekološkog skora (eng. *Analytical eco-scale*) je da idealno ekološki prihvatljiva analiza ima vrednost 100. Procenjuje se svaki parametar analitičke metode i dodeljuju se kazneni poeni na osnovu opasnosti i količine utrošenih reagenasa, produkcije opasnog otpada, potrošnje energije i neobnovljivih materijala. Uticaj štetnih supstanci zavisi od njihove količine, pa se ukupni kazneni poeni izračunavaju tako što se broj kaznenih poena dodeljen svakoj hemikaliji množi sa njenom količinom. Kazneni poeni za korišćene reagense se dodeljuju prema tzv. rečima upozorenja i broju piktograma. Za veoma opasne hemikalije *Globally Harmonized System of Classification And Labelling Of Chemicals* (GHS) dodeljuje reč upozorenja „opasnost“, a za manje opasne hemikalije reč upozorenja „upozorenje“. Bodovanje se vrši tako što se broj piktograma množi sa 1 za manje opasne, ili sa 2 za veoma opasne hemikalije. Kazneni poeni za upotrebljenu energiju dodeljuju se na osnovu vrednosti predloženih od strane *Raynie* i *Driver* [110]. Instrumenti i tehnike koje troše najmanje energije (<0,1 kWh po uzorku) su npr. titracija, UV-Vis spektrofotometrija, itd. Tehnike koje troše najviše energije su NMR, gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (eng. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry – GC-MS*), tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (eng. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry – LC-MS*), itd. Na kraju, kazneni poeni se dodeljuju i na osnovu količine generisanog otpada. Ekološka prihvatljivost se određuje tako što se od vrednosti 100, koja predstavlja metodu koja zadovoljava u potpunosti sve principe tzv. zelenih analitičkih procedura, oduzimaju kazneni poeni dodeljeni parametrima metode. Ukoliko je vrednost analitičkog ekološkog skora veća od 75, metoda je poželjna u pogledu ekološke prihvatljivosti. Ukoliko je vrednost analitičkog ekološkog skora između 50 i 75, metoda se smatra ekološki prihvatljivom, dok se vrednosti manje od 50 smatraju neprihvatljivim [111].

1.7 Model supstance

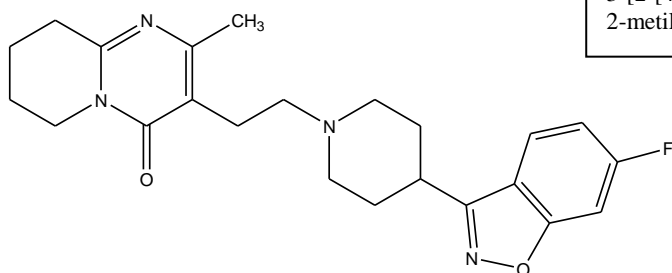
1.7.1 Risperidon i srodne supstance

Risperidon (Slika 4) je derivat benzizoksazola, koji spada u antipsihotike druge generacije. Mehanizam delovanja risperidona podrazumeva snažnu inhibiciju serotoninskih 5-HT₂ i dopaminskih D₂ receptora u mozgu [112]. Risperidon je razvijen od strane *Janssen Pharmaceutica Inc.*, a Svetska agencija za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Agency – FDA*) je 1993. odobrila primenu risperidona za terapiju šizofrenije i srodnih psihijatrijskih oboljenja. Slobodna forma leka se naširoko koristi u farmaceutskim formulacijama. Risperidon se nalazi u formi oralnih čvrstih doziranih oblika sa trenutnim ili postepenim oslobađanjem, oralnim rastvorima i intramuskularnim injekcijama. Dnevne doze risperidona se kreću između 4 i 8 mg na dan za terapiju šizofrenije, a od 1 do 6 mg na dan za terapiju

manije. Bezbednost primene ukupnih dnevnih doza većih od 16 mg za dozirane oblike koji se primenjuju oralno još uvek nije utvrđena [112, 113].

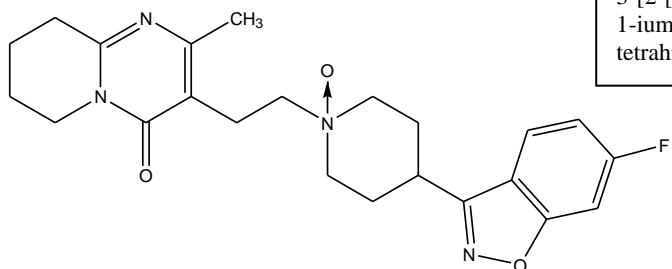
Risperidonu srodne supstance su u farmakopeji predstavljene oznakama A-E. Evropska farmakopeja (eng. *European Pharmacopeia* – EP) navodi i desfluoro-risperidon (srodna supstanca K). Srodne supstance F, H, I, J, L i M su uključene u monografije EP kao druge srodne supstance koje se detektuju. Za sve druge srodne supstance se smatra da potiču iz procesa proizvodnje. Srodna supstanca C je degradacioni proizvod nastao pod uticajem oksidativnih uslova, a istovremeno predstavlja i aktivni metabolit risperidona – paliperidon. Srodne supstance P (biciklo-risperidon) i Q su specificirane monografijom američke farmakopeje (eng. *United States Pharmacopeia* – USP) za tablete i oralne rastvore risperidona. Srodna supstanca Q je risperidon N-oksid koji predstavlja potencijalni degradacioni proizvod, čiji je jedino *cis* izomer farmakopejski specificiran. Srodna supstanca R (9-metilen risperidon) nastaje u procesu sinteze, prilikom prvog koraka, gde se dihlormetan koristi kao rastvarač [114]. Srodna supstanca S je izomer risperidona, koji se pojavljuje kao potencijalni degradacioni proizvod [115], dok srodna supstanca T nastaje kao posledica raspadanja aktivne supstance do kojeg dolazi ukoliko se dozirani oblik ne čuva pod propisanim uslovima [116]. Od predstavljenih srodnih supstanci risperidona, u ovom istraživanju korišćeni su:

1. risperidon N-oksid (srodna supstanca Q), kao najčešći degradacioni proizvod risperidona, koji je u daljem tekstu naveden kao srodna supstanca 1
2. sintetska nečistoća risperidona, EP srodna supstanca B (srodna supstanca 2)
3. biciklo-risperidon ili EP srodna supstanca Q, specificirana od strane USP kao nečistoća prisutna u tabletama i/ili oralnim rastvorima risperidona, u daljem tekstu navedena kao srodna supstanca 3 (Slika 4).



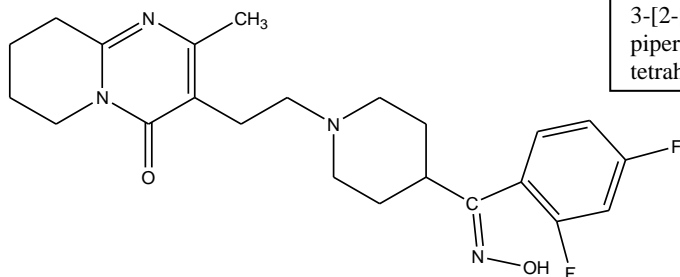
3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzoksazol-3-il)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]pirimidin-4-on

Risperidon



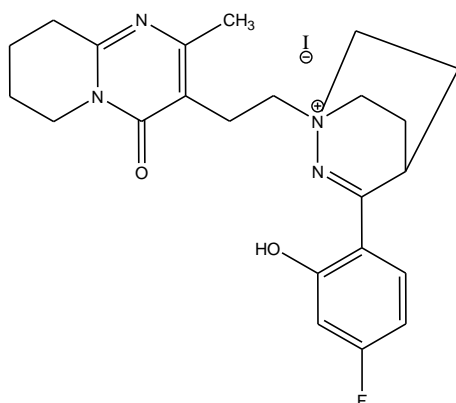
3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzoksazol-3-il)-1-oksidopiperidin-1-ium-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2a]pirimidin-4-on

Srodna supstanca 1



3-[2-[4-[(Z)-(2,4-difluorofenil)(hidroksiimino)metil]piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-on

Srodna supstanca 2



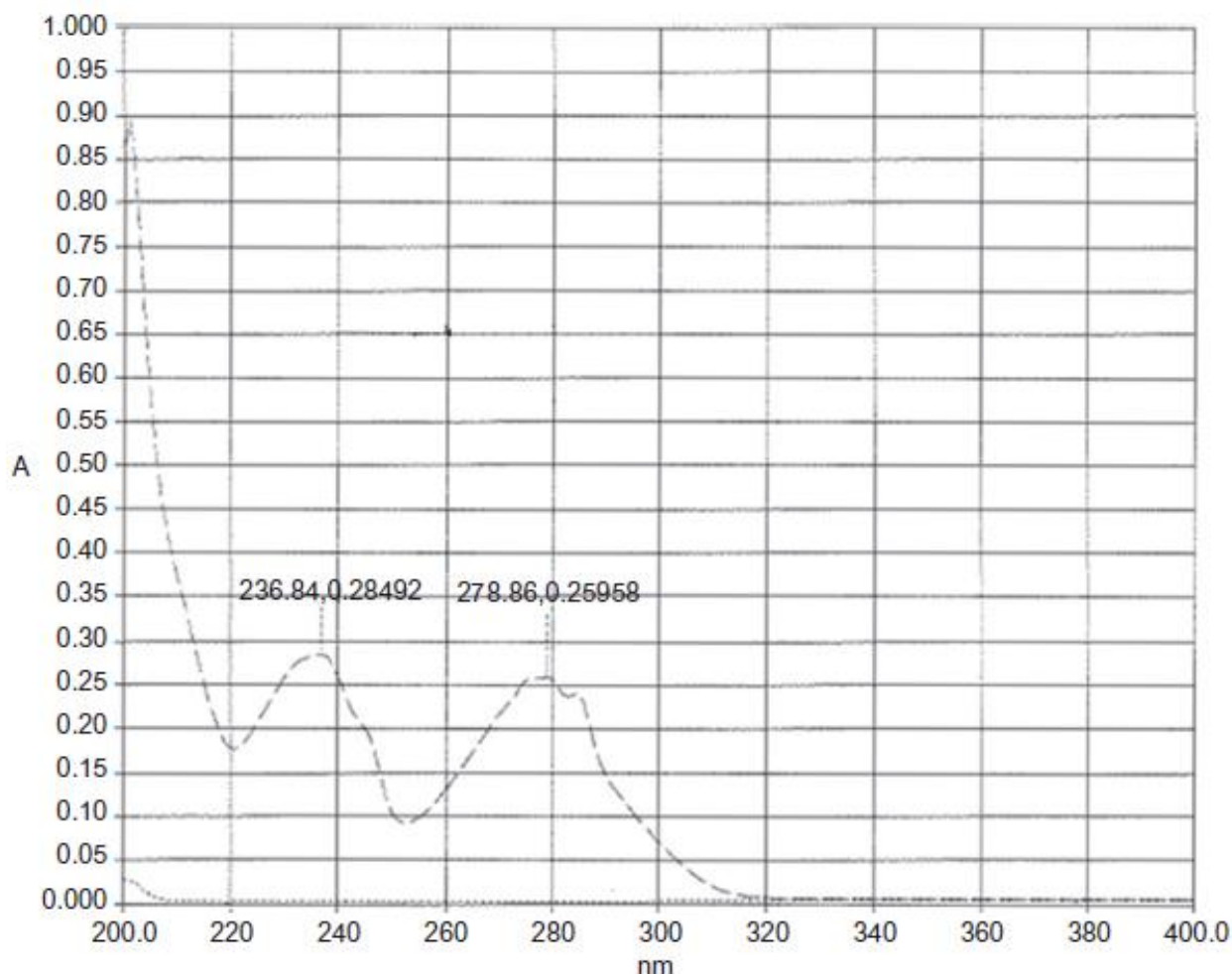
3-(4-fluoro-2-hidroksifenil)-1-(2-(2-metil-4-okso-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)-1,2-diazabicyklo[2.2.2]okt-2-en-1-ium jodid

Srodna supstanca 3

Slika 4: Strukture risperidona i odabranih srodnih supstanci sa nazivima po IUPAC-u

1.7.1.1 Fizičko-hemijske osobine

Risperidon je bela praškasta supstanca, praktično nerastvorna u vodi, delimično rastvorna u etanolu i dobro rastvorna u metilen-hloridu. Takođe se rastvara i u razblaženim kiselinama. Log P vrednost risperidona je 2,89. Ima dve konstante jonizacije, $pK_{a1} = 8,24$ i $pK_{a2} = 3,11$ [112]. Što se tiče spektroskopskih osobina, risperidon pokazuje dva apsorpciona maksimuma (λ_{max}) u UV oblasti i to na 237 nm i 279 nm u metanolu (Slika 5).



Slika 5: UV/Vis spektar risperidona rastvorenog u metanolu [112]

1.7.1.2 Analitika risperidona

1.7.1.2.1 Literaturni pregled hromatografskih metoda za određivanje risperidona i srodnih supstanci

HPLC metoda je jedna od najčešće primenjivanih metoda za određivanje risperidona kao aktivne supstance i srodnih supstanci u farmaceutskim doziranim oblicima. Pregled HPLC metoda razvijenih za određivanje risperidona i srodnih supstanci u farmaceutskim doziranim oblicima dat je u Tabeli 1.

Tabela 1: Pregled dostupnih HPLC metoda sa različitim vidovima detekcije za određivanje risperidona i srodnih supstanci u farmaceutskim doziranim oblicima

Kolona	Mobilna faza	T kolone (°C)	λ (nm)	Rastvarač	Uzorak/vrsta analize	Ref.
Lichrosorb RP C18 (10 μ m) (25cm x 4mm)	Metanol:0,05M kalijum dihidrogen fosfat, pH 7 (65:35)	25	280	Metanol	Aktivna supstanca i tableta/ određivanje sadržaja	[116]
Symmetry C18 (5 μ m) (25cm x 4,6mm)	10mM amonijum-acetat:acetonitril (75:25)	Nije definisana	260	Metanol	Aktivna supstanca i tableta/srodne supstance	[117]
Hypersil BDS C18 (3 μ m) (10cm x 4,6mm)	Mobilna faza A: 5,9 g/L amonijum-acetata u vodi Mobilna faza B: metanol:acetonitril (80:20) Mobilna faza A i B se mešaju prema definisanom programu gradijenta u trajanju od 51 min. Pufer:metanol:acetonitril (65:15:20)	45	260	Nije definisan	Tablete/srodne supstance	[115]
XTerra RP8 (5 μ m) (25cm x 4,6mm)	Pufer: 10mM kalijum dihidrogen fosfat i 0,1% trietilamin, pH podešen na 3,5 sa razblaženom ortofosfornom kiselinom	25	276	Voda:acetonitril (50:50)	Tablete/određivanje sadržaja	[118]
Lichrosorb RP-18 (5 μ m) (25cm x 4mm)	Acetonitril:0,05M kalijum dihidrogen fosfat (45:55)	Nije definisana	278	Nije definisan	Tablete/određivanje sadržaja i rastvaranje	[119]
Hypersil ODS C18 (5 μ m) (25cm x 4,6mm)	Metanol:acetonitril:fosfatni pufer (0,02M) (65:20:15), pH 3,0	Nije definisana	238	Metanol	Tablete i gel/određivanje sadržaja	[120]

Istraživanja i razvoj lekova zahtevaju efikasne, tačne, selektivne i visoko osetljive analitičke metode za određivanje prisustva lekova u biološkim tečnostima, kao i tkivima ljudi i životinja. Pored navedenog, potreba za analitičkim metodama za određivanje lekova u biološkim uzorcima postoji i zbog pacijenata koji su na terapiji antipsihoticima, a koji zahtevaju kontinuirani monitoring, jer su neželjena dejstva posledica visoke koncentracije leka u plazmi. Većina analitičkih metoda, koje se razvijaju za potrebe određivanja risperidona u biološkim tečnostima ili tkivima, podrazumevaju simultano određivanje i 9-hidroksi-risperidona, kao najznačajnijeg aktivnog metabolita, koji je zajedno sa risperidonom odgovoran za terapijski efekat. Većina metoda za određivanje risperidona i njegovog aktivnog metabolita uključuju HPLC razdvajanje sa različitim vrstama detekcije, od UV, fotodioda, elektrohemijske

detekcije, do masene spektrometrije, koja može koristiti jonski sprej, ESI ili hemijsku jonizaciju pod atmosferskim pritiskom (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI*). Uzorak se priprema primenom tehnika tečno-tečne ekstrakcije sa organskim rastvaračima, denaturacije i precipitacije proteina sa acetonitrilom, ekstrakcije na čvrstoj fazi, ili mikroekstrakcije sa pakovanim sorbentima [112]. Pregled bioanalitičkih metoda za određivanje risperidona u biološkim uzorcima dat je u Tabeli 2.

Tabela 2: Pregled dostupnih metoda tečne hromatografije sa različitim vidovima detekcije za određivanje risperidona i aktivnog metabolita u biološkim uzorcima

Metoda	Način detekcije	Uzorak	Metoda prečišćavanja	Analit(i)	Ref.
UPLC-MS/MS	MS ESI+, MRM	Plazma pacova	LLE	Risp., 9-OH-Risp.	[121]
UPLC-MS/MS	MS ESI+, MRM	Plazma pacova	Precipitacija proteina (ACN)	Risp., 9-OH-Risp., Fluoksetin	[122]
RP-HPLC	UV 238nm	Humana plazma, urin i saliva	MEPS	Risp., 9-OH-Risp.	[123]
RP-HPLC	ECD, dvostruki protok kroz elektrode (1) 0.500V (2) +0.700V	Humana plazma i saliva	MEPS	Risp., 9-OH-Risp.	[124]
Hiralna HPLC	ECD analitička ćelija sa 4 senzora (1) +500mV; (2) +650mV; (3) +950mV; (4) +950mM	Humana krv i plazma	SPE	Risp., (+)-9-OH-Risp., (-)-9-OH-Risp.	[125]
LC-MS/MS	ESI +, SRM	Humana dlaka	LLE	Risp., 9-OH-Risp.	[126]
RP-HPLC	UV 285nm	Humani serum	SPE sa <i>on-line</i> zamenom kolone	Risp., 9-OH-Risp.	[127]

Metoda	Način detekcije	Uzorak	Metoda prečišćavanja	Analit(i)	Ref.
Hiralna LC-MS/MS	Turbo jonski sprej, + mod, MRM mod	Humana plazma	SPE	Risp., (+)-9-OH-Risp., (-)-9-OH-Risp.	[128]
Hiralna LC-MS/MS	ESI+, MRM	Humana plazma	LLE	Risp., (+)-9-OH-Risp., (-)-9-OH-Risp.	[129]
LC-MS/MS	Turbo jonski sprej, + mode, MRM	Humana plazma	Precipitacija proteina (ACN), ekstrakcija sa turbulentnim protokom na temperaturama ispod nule, dvostruka on-line ekstrakcija sa procesom zamene kolone	Risp., 9-OH-Risp.	[130]
RP-HPLC	UV 280nm	Humana plazma	Precipitacija proteina (ACN)	Risp.	[131]
LC-MS/MS	ESI+, SRM	Humana plazma	Precipitacija proteina (ACN)	Risp., 9-OH-Risp.	[132]
LC-MS	ESI+, SIM	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH-Risp.	[133]
RP-HPLC	DAD-UV 240nm	Humana plazma	SPE	Risp., 9-OH-Risp.	[134]
LC-MS/MS	PE Sciex API-III+ trostruki kvadrupol sa turbo jon sprej jonskim izvorom	Humana plazma i saliva	Precipitacija proteina, zamena kolona	Risp., 9-OH-Risp.	[135]

Metoda	Način detekcije	Uzorak	Metoda prečišćavanja	Analit(i)	Ref.
LC-MS/MS	APCI, SRM	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[136]
LC-MS/MS	Turbo jonski sprej, + mode, MRM	Humana plazma	SPE	Risp., 9-OH- Risp.	[137]
RP-HPLC	UV 278nm	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[138]
RP-HPLC	UV 280nm	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[139]
LC-MS/MS	ESI+ pod atmosferskim pritiskom, MRM	Humana i plazma pacova	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[140]
RP-HPLC	UV 278nm	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[141]
RP-HPLC	ECD, dva protoka kroz elektrode (1)+0.55V; (2)+0.80V	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[142]
RP-HPLC	UV 280nm	Humana plazma	SPE	Risp., 9-OH- Risp.	[143]
RP-HPLC	UV 280nm	Humani serum	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[144]
RP-HPLC	ECD, dvostruki protok – kroz elektrode (1)+0.5V; (2)+0.96V	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[145]
RP-HPLC	ECD, dvostruki protok – kroz elektrode (1)+0.6V; (2)+0.92V	Humana plazma	LLE	Risp.	[146]

Metoda	Način detekcije	Uzorak	Metoda prečišćavanja	Analit(i)	Ref.
RP-HPLC	ECD, dvostruki protok – kroz elektrode (1)+0.55V; (2)+0.80V	Humana plazma	LLE	Risp., 9-OH- Risp.	[147]

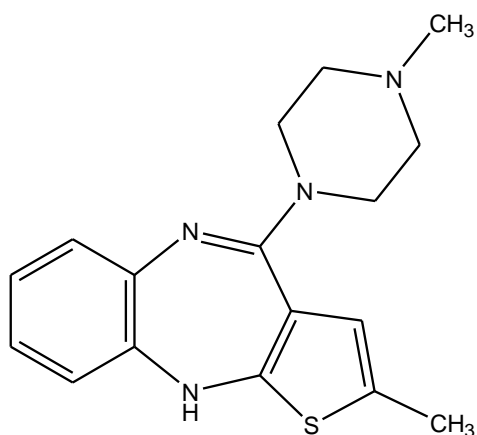
LC-MS/MS – tečna hromatografija spregnuta sa tandem masenom spektrometrijom; MRM – praćenje više reakcija; SRM - praćenje odabranih reakcija; SIM – praćenje odabranih jona; LLE – tečno-tečna ekstrakcija; SPE – čvrsto-tečna ekstrakcija; MEPS – mikroekstrakcija na punjenom sorbentu; Risp. – risperidon; 9-OH-Risp. – 9-hidroksi-risperidon

1.7.2 Olanzapin i srodne supstance

Olanzapin je derivat tienobenzodiazepina (Slika 6). Pripada drugoj generaciji antipsihotika (atipičnih) čija efikasnost je potvrđena u terapiji šizofrenije i akutne manije, a koristi se i kao terapija održavanja kod bipolarnih poremećaja i srodnih psihijatrijskih oboljenja [148]. Pokazuje značajnu *in vitro* multireceptorsku inhibitornu aktivnost na dopaminskim D₂, D₃ i D₄, serotoninским 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} i 5-HT₆, histaminskim H₁, α₁ adrenergičkim i muskarinskim receptorima. U poređenju sa tradicionalnim antipsihoticima, olanzapin ima veći afinitet prema serotoninским 5-HT_{2A} nego prema dopaminskim D₂ receptorima [149].

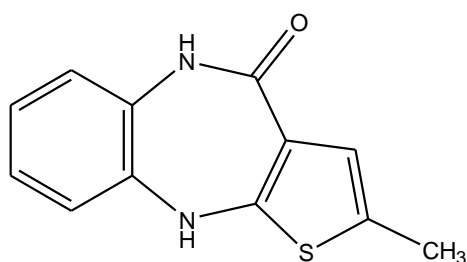
Preporučena početna dnevna doza olanzapina je 5 do 10 mg (1 – 5 mg kod starijih pacijenata) jednom na dan. Ukoliko je indikovano, povećanja ili smanjenja doze za 5 mg u intervalima od nedelju dana do maksimalne doze od 15 mg na dan su opravdana. Dnevna doza u opsegu od 10 do 20 mg olanzapina je u kliničkim studijama potvrđena kao efektivna doza za većinu pacijenata. Kod pacijenata koji dobro reaguju na olanzapin, terapija održavanja treba da se sprovodi sa najmanjom efektivnom dozom, i periodičnom proverom odgovora na terapiju [149].

Olanzapinu srodne supstance su definisane od strane EP i/ili USP, mogu poticati iz procesa proizvodnje ili predstavljati degradacione proizvode, koji su nastali pod uticajem različitih stres uslova [150, 151]. *Hiriyanna* i saradnici su opisali sve potencijalne srodne supstance, koje mogu da nastanu kao posledica oksidativne degradacije [152]. EP monografijom je definisana srodna supstanca B (u ovom radu označena kao srodna supstanca B), srodna supstanca C i srodna supstanca D (u ovom radu označena kao srodna supstanca C) [153] (Slika 6).



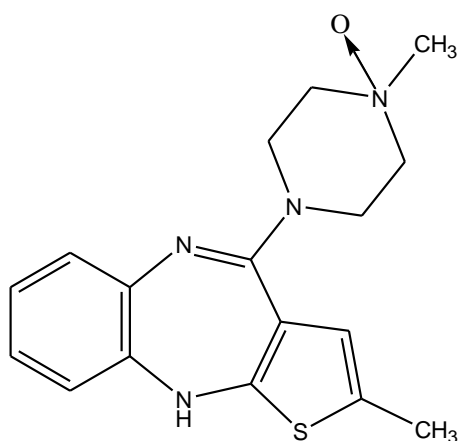
2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-
10H-tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepin

Olanzapin



2-metil-5,10-dihidro-4H-
benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-
on

Srodna supstanca B



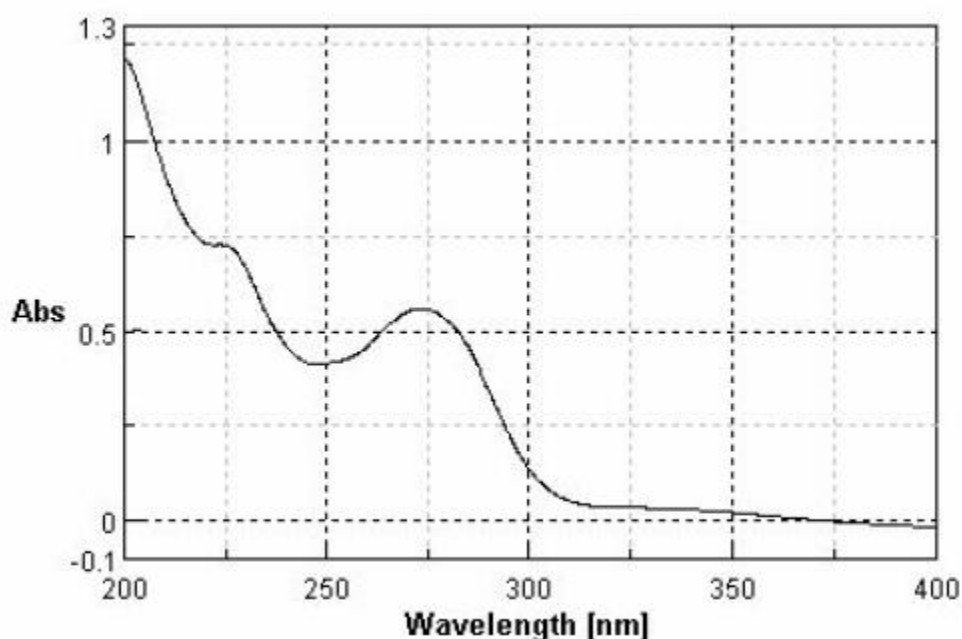
2-metil-4-(4-metil-4-
oksidopiperazin-4-ium-1-il)-10H-
tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepin

Srodna supstanca C

Slika 6: Strukture olanzapina i odabranih srodnih supstanci sa nazivima po IUPAC-u

1.7.2.1. Fizičko-hemijske osobine

Olanzapin je čvrsta kristalna supstanca, žute boje, praktično nerastvorna u vodi (43 mg/L). Delimično je rastvorljiva u acetonitrilu, etanolu i etil-acetatu, a dobro rastvorljiva u metilen hloridu. Supstanca je otporna na vlagu i stabilna na sobnoj temperaturi, a njena tačka topljenja je na 190-195 °C. Olanzapin je relativno lipofilno jedinjenje, sa logP vrednošću od 3,09. Olanzapin je slaba baza sa dve pK_a vrednosti 7,37 i 4,69, koje redom odgovaraju N_3 piperazinskog i N_1 diazepinskog prstena. Prema tome, može da formira soli sa kiselinama čija je pK_a vrednost manja od 5 [154]. Posmatranjem UV/Vis spektra olanzapina uočavaju se maksimumi apsorpcije na 226 nm i 275 nm u metanolu (Slika 7).



Slika 7: UV/Vis spektar olanzapina rastvorenog u metanolu [155]

1.7.2.2 Analitika olanzapina

1.7.2.2.1 Literaturni pregled hromatografskih metoda za određivanje olanzapina i srodnih supstanci

HPLC metode sa različitim vrstama detekcije se u literaturi nalaze kao najčešće primenjivane za određivanje olanzapina kao aktivne supstance, te za određivanje olanzapina i srodnih supstanci u farmaceutskim doziranim oblicima. Tabela 3 prikazuje dostupne HPLC metode, razvijene za određivanje olanzapina kao aktivne supstance, kao i određivanje olanzapina i srodnih supstanci u farmaceutskim doziranim oblicima.

Tabela 3: Pregled dostupnih HPLC i UHPLC metoda sa različitim vidovima detekcije za određivanje olanzapina i srodnih supstanci u farmaceutskim doziranim oblicima

Kolona	Mobilna faza	T kolone (°C)	λ (nm)	Rastvarač	Uzorak/vrsta analize	Ref.
RP-YMC pack ODS A-132 C18 (5 μ m) (15cm x 6,0mm)	Fosfatni pufer (pH 5,5):acetonitril (70:30)	25	295	Metanol	Tablete/ aktivna supstanca	[156]
Intertsil ODS 3V (5 μ m) (25cm x 4,6mm)	0,2M amonijum acetat (pH 4,5):acetonitril (prema programu gradijenta u trajanju od 45 min.)	27	254	Metanol Voda:metanol (30:70)	Aktivna supstanca/Tablete/ aktivna i srodne supstance	[157]
Agilent oktadecil silika TC-C18 (5 μ m) (25cm x 4,6mm)	0,3% TEA u vodi (pH 3,73 podešen sirčetnom kiselinom):metanol (prema programu gradijenta u trajanju od 50 min.)	30	254	Metanol Metanol:0,3% TEA (36:64)	Aktivna supstanca/ Aktivna i srodne supstance	[158]
Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μ m) (10cm x 2,1mm)	Komponenta A: 20mM NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O i 2,0 mL TEA pufer (pH 6,8):acetonitril:metanol (50:20:30) Komponente A i B se mešaju prema definisanom programu gradijenta u trajanju od 10 min. Komponenta A: 20mM amonijum formijat (pH 3,0):acetonitril (90:10)	27	250	Acetonitril:vo da (20:80)	API/Tablete/ određivanje sadržaja/ srodne supstance	[151]
Betasil Diol (5 μ m) (10cm x 4,6mm)	Komponenta B: acetonitril Komponente A i B se mešaju prema definisanom programu gradijenta u trajanju od 13 min.	41	235	Metanol	Tablete/ određivanje sadržaja/ srodne supstance	[150]

TEA – trietilamin;

Značaj primene olanzapina u terapiji šizofrenije uzrokovao je stavljanje akcenta na razvoj robusnih i pouzdanih metoda za njegovu kvantifikaciju [159]. Razvoj metoda za određivanje olanzapina u biološkim tečnostima i tkivima posebno je značajno sa stanovišta terapijskog praćenja leka i kontrole neželjenih dejstava. Ranije razvijene metode su koristile GC [160], međutim u današnje vreme većina metoda za određivanje olanzapina je zasnovana na HPLC tehnici sa različitim vidovima detekcije.

Pregled metoda dostupnih u literaturi je dat u Tabeli 4.

Tabela 4: Pregled dostupnih metoda tečne hromatografije sa različitim vidovima detekcije za određivanje olanzapina u biološkim uzorcima

Metoda	Način detekcije	Uzorak	Metoda prečišćavanja	Analit(i)	Ref.
RP-HPLC	UV 254nm	Serum	Adsorpcija na cijanopropil kolonama za prečišćavanje i ispiranje interferirajućih komponenti	Klozapin, olanzapin i demetilovani metaboliti	[161]
RP-HPLC	UV 214nm	Humana plazma i urin	LLE	Olanzapin	[162]
RP-HPLC	ECD; dualna analitička ćelija (1) -0,2V; (2) +0,2V	Tkivo mozga pacova	LLE	Olanzapin	[163]
RP-HPLC	ECD; (1) ćelija +350mV; (2) ćelija -200mV	Humana plazma	SPE	Olanzapin; N-desmetilolanzapin	[164]
RP-HPLC	UV 254nm	Humana plazma	LLE	Olanzapin	[165]
RP-HPLC	ECD; dvostruki protok kroz elektrode; (1) +0,350V; (2) -0,200V	Tkivo mozga pacova	SPE	Olanzapin	[166]
UHPLC-MS/MS	MS, MRM	Humana plazma	Precipitacija proteina sa acetonitrilom	10 psihotropnih lekova i metabolita uključujući olanzapin	[167]
UHPLC-MS/MS	MS ESI+, MRM	Humani serum	Precipitacija serumskih proteina	5 antidepresiva i 4 atipična antipsihotika (uključujući olanzapin) i njihovi metaboliti	[168]

Metoda	Način detekcije	Uzorak	Metoda prečišćavanja	Analit(i)	Ref.
LC-MS	MS + jonski elektrosprej, SIM	Humana plazma	LLE	Olanzapin	[169]
RP-HPLC	UV 255nm	Humana plazma	Precipitacija proteina plazme sa acetonitrilom	Olanzapin; Aripiprazol	[170]
LC-MS/MS	MS+, MRM	Humana plazma	SPE	Hlorpormazin; Haloperidol; Levopromazin; Olanzapin; Risperidon; Sulpirid	[171]
LC-MS/MS	MS ESI+, MRM	Humana plazma	LLE	Olanzapin; Fluoksetin; Norfluoksetin	[172]
UPLC- MS/MS	MS ESI+, MRM	Humana plazma	Precipitacija proteina	Olanzapin	[159]
LC-MS/MS	MS ESI+, MRM	Saliva	SPE	Olanzapin	[173]

MRM – praćenje više reakcija; SIM – praćenje odabranih jona; LLE – tečno-tečna ekstrakcija; SPE – čvrsto-tečna ekstrakcija;

2. CILJEVI

Ciljevi doktorske disertacije su:

- 1) Karakterizacija inkluzionih kompleksa koji se formiraju između odabranih model supstanci i β -CD-a u smislu određivanja stehiometrijskog odnosa, *in silico* predviđanja i NMR potvrde struktura formiranih inkluzionih kompleksa
- 2) Uspostavljanje QSRR modela uz primenu ANN kao algoritma mašinskog učenja u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu u cilju:
 - Predviđanja retencionog ponašanja risperidona i srodnih supstanci, kao i olanzapina i srodnih supstanci
 - Primene razvijenog QSRR-ANN modela u razvoju ekološki prihvatljivih metoda tačne hromatografije za razdvajanje ispitivanih model supstanci
 - Primene razvijenog QSRR-ANN modela u predviđanju retencije odabranih model supstanci i posledičnom izračunavanju konstanti stabilnosti formiranih inkluzionih kompleksa i termodinamičkih parametara kompleksiranja
- 3) Ispitivanje potencijala primene detektora naelektrisanja u aerosolu (eng. *Charged Aerosol Detector – CAD*) u analiziranju retencije odabranih model supstanci i formiranih inkluzionih kompleksa i izračunavanju konstanti stabilnosti nastalih inkluzionih kompleksa
- 4) Uspostavljanje proširenog QSRR-ANN modela u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu, koji će omogućiti:
 - Identifikaciju strukturnih karakteristika model supstanci, koje su od značaja za formiranje inkluzionih kompleksa i retenciono ponašanje u ovoj vrsti hromatografskih sistema kroz korišćenje opsežnog seta molekulskih deskriptora
 - Procenu doprinosa parametra koji predstavlja količinu adsorbovanog β -CD-a na stacionarnu fazu prediktivnim performansama QSRR-ANN modela

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Opšti deo

3.1.1 Referentne standardne supstance, rastvarači i reagensi

Standardne supstance

Risperidon (*Janssen Pharmaceutica NV*, Beerse, Belgija)

Srodna supstanca 1 risperidona (*Janssen Pharmaceutica NV*, Beerse, Belgija)

Srodna supstanca 2 risperidona (*Janssen Pharmaceutica NV*, Beerse, Belgija)

Srodna supstanca 3 risperidona (*Janssen Pharmaceutica NV*, Beerse, Belgija)

Olanzapin (*USP-U.S.*, Rokvil, SAD)

Srodna supstanca B olanzapina (*USP-U.S.*, Rokvil, SAD)

Srodna supstanca C olanzapina (*USP-U.S.*, Rokvil, SAD)

Farmaceutski dozirani oblici

Rissar® tablete 2 mg (Alkaloid AD, Skoplje, Severna Makedonija)

Sizap® tablete 10 mg (Alkaloid AD, Skoplje, Severna Makedonija)

Rastvarači

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

Acetonitril LC-MS čistoće (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Deuterijum oksid (99,9%) (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Dejonizovana voda

Reagensi

β-CD (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Mravlja kiselina (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka)

Hlorovodonična kiselina (*Zorka Pharma*, Hemija d.o.o., Šabac, Srbija)

3.1.2 Oprema

Millipore Simplicity 185 sistem za prečišćavanje vode (*Billerica*, Masačusets, SAD)

PHM210 Standard pH-metar (*Radiometer Analytical SAS*, Lion, Francuska)

0,45 mm najlonski membranski filteri (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD)

Analitička vaga *Sartorius* (*Sartorius Werke GmbH*, Getingen, Nemačka)

Vodeno kupatilo *Bandelin Sonorex* (*Bandelin electronic GmbH*, Berlin, Nemačka)

Vortex – Genie 2T mikser (*Scientific Industries, Inc*, Njujork, SAD)

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

- *Dionex Ultimate 3000* tečni hromatograf
- Detektor fotodioda (eng. *Photo Diode Array – PDA*) i CAD
- Program za obradu podataka *Chromeleon 7*

UHPLC-PDA-MS/MS sistem (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Voltam, Masačusets, SAD)

- UHPLC tečni hromatograf *ACELLA*

- PDA detektor
- trostruki kvadrupol *TSQ Quantum Access MAX*
- program *TSQ EZ Tune 2.3.0.1206 SPI*
- program *Xcalibur 2.1.0.1139*

Bruker Ascend 400 (400 MHz) spektrometar

- Program za obradu podataka *TopSpin 3.6.2*

UV/Vis spektrofotometar *Cintra 101* (*GBC Scientific Equipment, Krug International Ltd.*, Beograd, Srbija)

Kolona *Chromolith RP-18e*, 100 mm × 4,6 mm, veličina makropora 2 μm, veličina mezopora 13 nm (*Merck, Darmštadt, Nemačka*)

Kolona *Xterra C18*, 150 mm × 3.9 mm, 5 μm veličina čestica stacionarne faze (*Waters, Krug International Ltd.*, Beograd, Srbija)

3.1.3 Računarski programi

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

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

AutoDock v4.2 (*The Scripps Research Institute, Kalifornija, SAD*)

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

Design-Expert 7.0.0. (*Stat-Ease, Inc., Mineapolis, SAD*)

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

Dragon 6.0.7 (*Talete srl, Milano, Italija*)

RapidMiner Studio 9.2.0 (*RapidMiner, Boston, Masačusets, SAD*)

3.2 Karakterizacija inkluzionih kompleksa formiranih između odabranih model supstanci i β-CD-a

3.2.1 Određivanje stehiometrije – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi

Stehiometrija formiranih inkluzionih kompleksa je određena ESI-MS metodom u pozitivnom jonizacionom modu. Eksperimenti su izvedeni na *TSQ Quantum Access Max*, trostrukom kvadrupolu, opremljenom sa ESI jonizacionim izvorom. Analiza je sprovedena bez kolone, direktnim injektovanjem uzoraka, koji sadrže svaku od ispitivanih supstanci u smeši sa 5,0, 10,0 ili 15,0 mM β-CD-om. Standardni rastvori risperidona i olanzapina su pripremljeni rastvaranjem 10 mg standardne supstance u 10 mL smeše vode i acetonitrila u odnosu 50:50 (v/v) ($cst_1 = 1 \text{ mg mL}^{-1}$). Radni rastvori risperidona i olanzapina su pripremani rastvaranjem odgovarajuće zapremine prethodno pripremljenog standardnog rastvora cst_1 u 5,0, 10,0 ili 15,0 mM rastvoru β-CD-a, kako bi se dobila finalna koncentracija od 0,1 mg mL⁻¹ (rastvor cst_2). U slučaju nečistoća risperidona i olanzapina, radni rastvori su pripremani prateći istu proceduru, ali tako da finalna koncentracija radnih rastvora bude 0,05 mg mL⁻¹. Podaci su prikupljeni analiziranjem m/z vrednosti u opsegu od 100 – 3000, sa vremenom skeniranja podešenim na 1 s.

3.2.2 *In silico* predviđanje strukture inkluzionih kompleksa – studija molekuskog dokinga

Molekulska doking studija je sprovedena korišćenjem *online* dostupnog programa *AutoDock v4.2*. Kristalografska struktura β -CD-a je preuzeta iz *Brookhaven protein data bank*. Risperidon, olanzapin i odabrane srodne supstance u svojim geometrijski optimizovanim konformacijama su ispitivane u pogledu mogućnosti kompleksiranja sa molekulom β -CD-a. Da bi se pripremila, sprovela i analizirala doking simulacija korišćen je GUI (eng. *Graphical User Interface*) program *AutoDockTools* (ADT). *Lamarckian*-ov genetski algoritam je izabran za pretragu energetski najpovoljnijih konformacija. Tokom trajanja procesa dokinga, za svaku ispitivanu supstancu ispitivano je 100 različitih konformacija. Napravljena je koordinatna x, y, z mreža dimenzija 40 x 40 x 40 tačaka, sa razmakom između tačaka od 0,375 Å i centrirana na sredinu ispitivanog molekula leka ili srodne supstance. Maksimalan broj energetskih proračuna je podešen na 2500000. Optimizovane strukture inkluzionih kompleksa su korišćenje za izračunavanje konstanti koje opisuju nastale komplekse: energija vezivanja (eng. *Energy of Binding* – BE), konstanta inhibicije (eng. *estimated Inhibition Constant* – IC), ukupna intermolekulska energija, koja se sastoji iz van der Valsove energije, vodoničnih veza i desolvatacione energije (eng. *van der Waals energy, Hydrogen Bonding and Desolvation Energy* - VDW-HB-D), torziona energija (eng. *Torsion Energy* – TORE), elektrostatička energija (eng. *Electrostatic Energy* – EE) i nevezana energija sistema (eng. *Unbound system's Energy* – UE).

3.2.3 NMR analiza – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi

Rastvor za izvođenje NMR eksperimenata u cilju potvrde strukture risperidon – β -CD inkluzionog kompleksa je pripreman tako što je smeša 2,5 mg referentnog standarda risperidona i 5 mg β -CD-a rastvorena u 0,5 mL smeše acetonitril:voda (15:85, v/v):D₂O u odnosu 10:1. Rastvori za ispitivanje srodna supstanca 1 – β -CD, srodna supstanca 2 – β -CD i srodna supstanca 3 – β -CD inkluzionih kompleksa pripremani su prateći prethodno opisanu proceduru, sa razlikom u podešavanju pH vrednosti rastvora u slučaju srodna supstanca 1 – β -CD inkluzionog kompleksa. Rastvoru koji sadrži smešu srodne supstance 1 i β -CD-a pH vrednost je podešena na 2,75 i 4,25 dodavanjem odgovarajuće zapremine koncentrovane mravlje kiseline (23,6 mol L⁻¹). Struktura olanzapin – β -CD i srodna supstanca C – β -CD inkluzionih kompleksa je analizirana iz rastvora koji su pripremljeni odmeravanjem istih količina referentne standardne supstance, kao prethodno analiziranih supstanci, ali rastvaranjem u 0,5 mL smeše 0,1M HCl:D₂O u odnosu 10:1. Postojalo je nekoliko pokušaja da se smeša 2,5 mg srodne supstance B i 5 mg β -CD-a rastvori u različitim rastvaračima, ali zadovoljavajuća rastvorljivost nije postignuta.

Dvodimenzionalni ROESY eksperimenti su izvedeni na *Bruker Ascend 400* (400 MHz) spektrometru, korišćenjem *TopSpin 3.6.2* programa. Pulsni program korišćen za snimanje je *roesyphpr.2*, sa 16 probnih i 48 – 120 skenova. Svaki spektar se sastoji iz matriksa koga čine 2000 (F1 i F2) tačaka, a koji pokriva širinu od 4000 Hz. *Spinlock pulse* je 200 ms. Frekvencija *transmitter*-a je 1880,61 Hz sa razmakom između dva skena od 2 s. Kao referentni pik korišćen je pik rezidualne vode (HOD; δ 4.70).

3.3 QSRR-ANN u β -CD-modifikovanom RP-HPLC – opisivanje retencionog ponašanja i razvoj metoda za razdvajanje model supstanci

3.3.1 Priprema uzoraka

Standardni rastvor risperidona je pripremljen rastvaranjem 10 mg referentne standardne supstance u 10 mL smeše vode i acetonitrila u odnosu 50:50 (v/v) ($cst_1 = 1 \text{ mg mL}^{-1}$). Radni rastvor risperidona je pripremljen odmeravanjem odgovarajuće zapremine cst_1 i dodavanjem rastvora mobilne faze kako bi se dobila koncentracija od $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (rastvor cst_2). Standardni i radni rastvori srodnih supstanci risperidona su pripremani prateći istu proceduru, s tim što je koncentracija standardnog rastvora srodne supstance iznosila $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, a koncentracija radnog rastvora $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Mobilna faza predstavlja smešu vodenog rastvora β -CD-a (5,0, 7,5, 10,0, 12,5 i 15,0 mM) i acetonitrila u odnosu 80:20 (v/v). pH vrednost vodenih rastvora β -CD-a je podešena na 2,0, 2,75, 3,5, 4,25 i 5,0 dodavanjem odgovarajuće zapremine mravlje kiseline. Ista procedura pripreme standardnih i radnih rastvora je primenjena i kod olanzapina i srodnih supstanci. Prema tome, finalna koncentracija radnog rastvora olanzapina je $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, dok su koncentracije radnog rastvora srodne supstance B i srodne supstance C redom $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$. Formiranje inkluzionih kompleksa je podstaknuto mešanjem pripremljenih uzoraka 1h na vorteks mikseru pre analiziranja.

3.3.2 Hromatografski uslovi

HPLC eksperimenti su izvedeni na *Dionex Ultra 3000* tačnom hromatografu koji je opremljen sa detektorom fotodioda (*Photo Diode Array – PDA*). Separacija ispitivanih supstanci je postignuta na C18 monolitnoj hromatografskoj koloni *Merck Chromolith RP-18e* (100 mm x 4,6 mm, veličina makropora 2 μm , veličina mezopora 13 nm), pri temperaturama od 25 °C do 45 °C. Volumen injektovanja je 5 μL . Mobilne faza A je pripremljena rastvaranjem odgovarajuće količine β -CD-a u vodi HPLC kvaliteta, kako bi se postigle koncentracije rastvora od 5 mM do 15 mM (u inkrementima od 2,5). pH vrednost mobilne faze A je podešena dodatkom mravlje kiseline i varirana od 2 – 5 (u inkrementima od 0,75). Kao mobilna faza B je korišćen acetonitril, čiji je udeo variran u opsegu od 15% do 25% (v/v). Pripremljena mobilna faza je pre analize filtrirana kroz membranski filter veličine pora od 0,45 μm . Talasna dužina detektora je 285 nm.

3.3.3 QSRR-ANN – izračunavanje ulaznih i izlazne promenljive modela

Molekulski deskriptori, deskriptori koji opisuju inkluzione komplekse i instrumentalni parametri, varirani prema konstruisanom planu eksperimenata predstavljaju ulazne promenljive QSRR-ANN modela. Izlazna promenljiva, odnosno odgovor sistema koji se prati, je retencioni faktor (k) ispitivanih model supstanci. Da bi se izračunali molekulski deskriptori, sve supstance su podvrgnute minimizaciji energije i dobijene su dominantne forme pri različitim pH vrednostima. Izračunavanje pK_a i izbor dominantnih formi ispitivanih supstanci na različitim pH je izvedeno u *Marvin Sketch 4.1.13* programu. Konformacije sa minimumom energije su dobijene primenom MOPAC/AM1 metode za optimizaciju u *Chem 3D Ultra 7.0.0*

programu. *Marvin Sketch 4.1.13* je takođe korišćen za izračunavanje sledećih molekulskih deskriptora: particioni koeficijent oktanol-voda (logP), 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 Acceptor* - H-acc). Preostali molekulski deskriptori, gde spadaju dipol-dipol energija (DEN), naelektrisani dipol-dipol energija (CDEN), zapremina nedostupna rastvaraču (eng. *Solvent-excluded Volume* - SEV), *Connolly* površina dostupna rastvaraču (eng. *Connolly Solvent accessible area* – SAS), molarna refraktivnost (MR), površina molekula (eng. *Molecular Area* – MA), van der Valsova energija (VDW), van der Valsova energija između atoma udaljenih najmanje tri atoma (eng. *Non-1,4 van der Waals Energy* – NON-1,4 VDW), energija najniže nepopunjene orbitale (eng. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – LUMO) i energija najviše popunjene orbitale (eng. *Highest Occupied Molecular Orbital* – HOMO) izračunati su u *Chem 3D Ultra 7.0.0*. Deskriptori su izabrani na osnovu LSER teorije.

Deskriptori koji opisuju formirane inkluzione komplekse su izračunati na osnovu struktura inkluzionih kompleksa, koje su predviđene molekulskom doking studijom. BE, IC, VDW-HB-D, EE, TI, TORE i UE su izračunati u *AutoDock v4.2* programu.

Korelacije molekulskih deskriptora i deskriptora inkluzionih kompleksa su ispitane primenom metode linearne regresije u *Microsoft Office Excel 2007*.

Eksperimentalni prostor ispitivanja retencionog ponašanja model supstanci je adekvatno definisan primenom centralnog kompozicionog dizajna (eng. *Central Composite Design* – CCD), kao vrste eksperimentalnog dizajna. Eksperimentalni plan je kreiran u *Design-Expert 7.0.0*, a varirani su navedeni parametri: udeo acetonitrila u mobilnoj fazi (15% - 25% (v/v) u inkrementima od 2,5), pH vodenog dela mobilne faze (2 – 5, u inkrementima od 0,75), koncentracija β -CD u mobilnoj fazi (5 – 15 mM, u inkrementima od 2,5) i temperatura kolone (25 °C – 45 °C, u inkrementima od 5) (Tabela 5).

ANN modelovanje je sprovedeno u *Statistica Neural Networks* računarskom programu.

Tabela 5: Eksperimentalni plan dobijen primenom CCD-a (prilagođeno iz [29])

Broj eksperimenta	Faktori			
	ACN (% v/v)	pH	Temp. kolone (°C)	β-CD (mM)
1	17,5	2,75	30	7,5
2	22,5	2,75	30	7,5
3	17,5	4,25	30	7,5
4	22,5	4,25	30	7,5
5	17,5	2,75	40	7,5
6	22,5	2,75	40	7,5
7	17,5	4,25	40	7,5
8	22,5	4,25	40	7,5
9	17,5	2,75	30	12,5
10	22,5	2,75	30	12,5
11	17,5	4,25	30	12,5
12	22,5	4,25	30	12,5
13	17,5	2,75	40	12,5
14	22,5	2,75	40	12,5
15	17,5	4,25	40	12,5
16	22,5	4,25	40	12,5
17	15	3,5	35	10
18	25	3,5	35	10
19	20	2,0	35	10
20	20	5,0	35	10
21	20	3,5	25	10
22	20	3,5	45	10
23	20	3,5	35	5
24	20	3,5	35	15
25	20	3,5	35	10
26	20	3,5	35	10
27	20	3,5	35	10
28	20	3,5	35	10
29	20	3,5	35	10
30	20	3,5	35	10

3.3.4 Priprema rastvora za validaciju metoda

3.3.4.1 Rastvori za procenu selektivnosti metoda

Selektivnost metode se procenjuje tako što se poredi odgovor potencijalno interferirajućih supstanci na retencionim vremenima, koja odgovaraju ispitivanim aktivnim i srodnim supstancama, i izražava se čistoćom pika. Da bi se utvrdilo da li se na retencionim vremenima ispitivanih aktivnih i srodnih supstanci mogu detektovati interferirajuće supstance injektuju se

tri rastvora pri optimalnim hromatografskim uslovima za svaku metodu. Rastvori koji se injektuju su radni rastvor standardnih supstanci (risperidon i srodne supstance/ olanzapin i srodne supstance), rastvor placeba tableta (Rissar®/Sizap®) i rastvor placeba opterećen standardima (placebo Rissar® tableta opterećen standardima risperidona i srodnih supstanci/ placebo Sizap® tableta opterećen standardima olanzapina i srodnih supstanci).

3.3.4.2 Rastvori za određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije

Standardni rastvori srodnih supstanci risperidona i olanzapina su razblaženi kako bi se dobili rastvori koncentracija čije su površine pikova analita na hromatogramu 3 puta veće od površine pika bazne linije na istom retencionom vremenu za limit detekcije (eng. *Limit of Detection* – LOD). Za određivanje limita kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification* – LOQ) prave se razblaženja standardnih rastvora srodnih supstanci u koncentracijama koje će dati površine pikova analita na hromatogramu 10 puta veće od površine pika bazne linije na istom retencionom vremenu. Određene su vrednosti LOD i LOQ za sve ispitivane srodne supstance.

3.3.4.3 Rastvori za procenu linearnosti metoda

Standardni rastvor olanzapina koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ je korišćen za pripremu sedam rastvora olanzapina za procenu linearnosti. Odgovarajuće zapremine standardnog rastvora su uzete i pomešane sa rastvorom mobilne faze, kako bi se dobili razblaženi rastvori u opsegu koncentracija od $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $750 \mu\text{g mL}^{-1}$. Standardni rastvori srodne supstance B ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) i srodne supstance C ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) su korišćeni za pripremu sedam razblaženih rastvora u koncentracionom opsegu od $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ista procedura pripreme rastvora je primenjena i za risperidon (koncentracija standardnog rastvora $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) i njegovih srodnih supstanci (koncentracija standardnog rastvora $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Opseg koncentracija rastvora za ispitivanje linearnosti je $150 - 450 \mu\text{g mL}^{-1}$ za risperidon, $0,25 - 3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ za srodnu supstancu 1, $0,15 - 1,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ za srodnu supstancu 2 i $0,15 - 1,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ za srodnu supstancu 3. Nakon pripreme, svi rastvori su mešani 1h na vorteks mikseru pre analiziranja.

3.3.4.4 Rastvori za procenu tačnosti i preciznosti metoda

Rastvori za procenu tačnosti i preciznosti su pripremani iz doziranih oblika (tableta), koje sadrže risperidon ili olanzapin. Pre pripreme rastvora za procenu tačnosti i preciznosti metoda, određen je sadržaj aktivnih i srodnih supstanci u tabletama. Određena je prosečna masa dvadeset tableta, koje su zatim sprasene i odmerena je tabletna masa koja sadrži 10 mg aktivne supstance (olanzapina ili risperidona). Tabletna masa koja sadrži 10 mg aktivne supstance je rastvorena u 10 mL smeše acetonitrila i H_2O u odnosu 50:50 (v/v) i ostavljena na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Nakon rastvaranja i filtriranja, pripremljeni rastvor se koristi za pripremu radnih rastvora risperidona i olanzapina u koncentracijama od $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ redom, što je definisano kao 100% koncentracioni nivo. Količina aktivne i srodnih supstanci se određuje na osnovu prethodno konstruisane kalibracione krive. Nakon određivanja sadržaja, nastavljena je priprema uzoraka za procenu tačnosti i preciznosti uzimajući u obzir sadržaje olanzapina i njegovih srodnih supstanci, kao i risperidona i

njegovih srodnih supstanci po tableti. Odgovarajuće zapremine pripremljenih standardnih rastvora čija je koncentracija $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ su odmerene i opterećene referentnim standardom aktivne supstance kako bi se dobili rastvori koncentracija koje odgovaraju 80%, 100% i 120% koncentracionom nivou. Tačnost je procenjena kao *recovery* vrednost aktivne supstance kojom su opterećeni rastvori pripremljeni od tableta. *Recovery* srodnih supstanci je izračunat primenjujući iste principe, ali su referentni standardi srodnih supstanci dodati tako da se dobiju rastvori koncentracija koje odgovaraju LOQ, 100% i 120% koncentracionom nivou. Tačnost je procenjena kroz tri serije tri rastvora, čije koncentracije odgovaraju 80%, 100% i 120% koncentracionim nivoima za aktivne, a LOQ, 100% i 120% koncentracionim nivoima za srodne supstance.

Rastvori koji su pripremljeni za procenu tačnosti, iskorišćeni su i za određivanje preciznosti metoda. Preciznost je procenjena na tri koncentraciona nivoa (80%, 100% i 120% za aktivne supstance i LOQ, 100% i 120% za nečistoće) u tri replikata. Relativna standardna devijacija (*Relative Standard Deviation* – RSD) je izračunata kao mera preciznosti. Pre analize, svi rastvori su mešani 1 h na vorteks mikseru.

3.4 QSRR-ANN u predviđanju retencije i izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa i termodinamskih parametara kompleksiranja

3.4.1 Hromatografsko određivanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi

Standardni i radni rastvori risperidona i srodnih supstanci su pripremljeni prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.1. Ista procedura je primenjena za pripremu standardnih i radnih rastvora olanzapina, srodne supstance B i srodne supstance C. Koncentracija radnog rastvora olanzapina je bila $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a radnih rastvora srodne supstance B i srodne supstance C $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Inkluzioni kompleksi su formirani mešanjem radnih rastvora 1 h na vorteks mikseru pre analiziranja.

Eksperimenti su sprovedeni na *Dionex Ultra 300*, koji je opremljen sa PDA detektorom. Separacija je postignuta korišćenjem monolitne C18 kolone *Chromolith RP-18e* (100 mm x 4,6 mm, veličina makropora $2 \mu\text{m}$, veličina mezopora 13 nm). Mobilna faza se sastoji iz smeše H_2O ili $\beta\text{-CD}$ rastvorenog u vodi (5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 mM) i odgovarajućeg udela acetonitrila (15% ili 20% (v/v)). pH vrednost vodenog dela mobilne faze je podešena na 2,0, 3,5 ili 5,0 uz pomoć mravlje kiseline, dok je detekcija vršena na 285 nm.

3.4.2 Spektrofotometrijsko određivanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa – priprema uzoraka i eksperimentalni uslovi

Uzorci koji sadrže svaku od ispitivanih supstanci rastvorenu u smeši vode i acetonitrila u odnosu 80:20 (v/v) su pripremani u koncentracijama koje daju apsorbanciju u opsegu od 0,1 do 1. U nastavku su navedene ove koncentracije za svaku od ispitivanih supstanci: risperidon $c = 7,3e^{-8} \text{ mmol L}^{-1}$, srodna supstanca 1 $c = 4,7 e^{-8} \text{ mmol L}^{-1}$, srodna supstanca 2 $c = 4,6e^{-8} \text{ mmol L}^{-1}$, srodna supstanca 3 $c = 4,9e^{-8} \text{ mmol L}^{-1}$, olanzapin $c = 3,2e^{-8} \text{ mmol L}^{-1}$, srodna supstanca B $c = 4,3e^{-8} \text{ mmol L}^{-1}$ i srodna supstanca C $c = 6,1e^{-8} \text{ mmol L}^{-1}$. Za svaku od

ispitivanih supstanci, ovi rastvori su mešani sa rastućim koncentracijama β -CD-a kako bi se postigli molarni odnosi između ispitivanih supstanci i β -CD u opsegu od 1:5 do 1:45.

Spektrofotometrijska merenja su sprovedena na UV/Vis spektrofotometru *Cintra 101*. Određena je razlika u apsorbanciji između slobodne i kompleksirane supstance pri rastućim koncentracijama β -CD-a. Apsorbancija je merena na 285 nm, a eksperimenti su sprovedeni u okviru istog opsega pH vrednosti, kao i kod HPLC eksperimenata (pH = 2,0, 3,5 i 5,0). Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja za svaki odnos ispitivane supstance i β -CD-a, a prosečne vrednosti apsorbancije su zatim korišćene za određivanje konstanti stabilnosti nastalih kompleksa. Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa su određivane na sobnoj temperaturi (25 °C) primenom *Benesi-Hildebrand* jednačine [174] (13):

$$\frac{1}{\Delta A_i} = \frac{1}{K \Delta A} \frac{1}{[\beta-CD]} + \frac{1}{\Delta A} \quad (13)$$

gde se konstanta stabilnosti (K) izračunava iz nagiba i odsečka na ordinati krive zavisnosti promene u apsorbanciji usled kompleksiranja (ΔA_i) od $1/[\beta-CD]$.

3.5 Primena CAD-a u ispitivanju retencije u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu i izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa

3.5.1 Hromatografski uslovi

HPLC eksperimenti su izvedeni na *Dionex Ultimate 3000* (U)HPLC sistemu, koji je opremljen sa CAD detektorom. Supstance su razdvojene uz pomoć nepolarne C18 hromatografske kolone *Xterra* (150 mm x 3,9 mm, 5 μ m veličina čestica stacionarne faze). Mobilna faza se sastoji iz smeše H₂O i acetonitrila. Udeo vode je variran između 15% i 50% (v/v) u inkrementima od 5%. β -CD nije bio prisutan u vodenom delu mobilne faze, već samo u rastvoru uzorka, kako bi se izbegla potencijalna kontaminacija detektora i postigla krajnja osetljivost. pH vrednost vodenog dela mobilne faze je podešena na 2,0 ili 5,0 dodatkom mravlje kiseline. Ove dve pH vrednosti su izabrane, kako bi došlo do promene jonizacione forme ispitivanih supstanci. Parametri CAD-a su optimizovani i držani su konstantim na optimalnim vrednostima. Temperatura evaporacije je podešena na 50 °C, pritisak gasa na 50 psi, filter konstanta 10 s, a stepena funkcija (eng. *power function*) 1. Volumen injektovanja je 10 μ L, a protok mobilne faze je iznosio 1 mL min⁻¹.

3.5.2 Priprema uzoraka za ispitivanje retencije

Standardni rastvori risperidona i olanzapina su pripremljeni rastvaranjem 10 mg referentne standardne supstance u 10 mL smeše H₂O i acetonitrila u odnosu 50:50 (v/v), kako bi se dobila koncentracije standardnih rastvora risperidona i olanzapina 2,4 mM i 3,2 mM, redom. Standardni rastvori tri srodne supstance risperidona i dve srodne supstance olanzapina su pripremljeni rastvaranjem 10 mg standardne supstance u 100 mL smeše H₂O i acetonitrila u odnosu 50:50 (v/v). Rastvor β -CD-a je pripremljen rastvaranje odgovarajuće količine β -CD-a u dejonizovanoj vodi, kako bi se dobila finalna koncentracija od 5 mM. Radni rastvori svake od ispitivanih supstanci su pripremani uzimanjem odgovarajućeg alikvota standardnog

rastvora i rastvaranjem u prethodno pripremljenoj mobilnoj fazi kako bi se postigle sledeće finalne koncentracije: risperidon $c = 7,3e^{-5}$ mM, srodna supstanca 1 $c = 4,7e^{-5}$ mM, srodna supstanca 2 $c = 4,6e^{-5}$ mM, srodna supstanca 3 $c = 4,9e^{-5}$ mM, olanzapin $c = 3,2e^{-5}$ mM, srodna supstanca B $c = 4,3e^{-5}$ mM i srodna supstanca C $c = 6,1e^{-5}$ mM. Takođe, za svaku od ispitivanih supstanci, pripremljeno je pet radnih rastvora sa rastućim koncentracijama β -CD-a, kako bi dobio molarni odnos između ispitivane supstance i β -CD-a u opsegu od 1:5 do 1:45. Nakon dodatka β -CD-a, uzorci su mešani na vorteks mikseru 1 h, pre analize. Uzorci aktivnih i srodnih supstanci su korišćeni za HPLC-CAD praćenje retencije. Međutim, radni rastvori risperidona i olanzapina, kao predstavnika model smeše, su korišćeni i za ESI-MS analizu.

3.5.3 ESI-MS analiza – eksperimentalni uslovi

Eksperimenti su izvedeni na *TSQ Quantum Access Max*, koji kao maseni analizator koristi trostruki kvadrupol. Korišćena je ista hromatografska kolona, kao i pri izvođenju RP-HPLC-CAD eksperimenata (C18 *Xterra*, 150 mm x 3,9 mm, 5 μ m veličina čestica). Postupak podešavanja instrumentalnih parametara (tjuniranje) u pozitivnom modu je izveden sa standardnim rastvorima risperidona, olanzapina i β -CD-a u acetonitrilu, koncentracije 10 μ g mL⁻¹. Optimizovani ESI-MS parametri podrazumevaju napon spreja (eng. *spray voltage*) od 4000 V, temperatura isparivača (eng. *vaporizer temperature*) 350 °C, temperatura transfer kapilare (eng. *capillary temperature*) 300 °C, pritisak desolvacionog gasa 10 i pritisak pomoćnog desolvacionog gasa 55 arbitrarnih jedinica. Azot je korišćen kao gas za raspršivanje, dok je argon korišćen kao kolizionni gas. Odgovor je meren u modu praćenja odabranih reakcija (eng. *Selected Reaction Monitoring – SRM*) jona koji odgovaraju formiranim inkluzionim kompleksima, kako bi se detektovale m/z vrednosti jonskih vrsta koje predstavljaju ispitivane supstance i β -CD-a. Kolizionna energija korišćena za fragmentaciju je iznosila 5 V.

3.5.4 Konstruisanje kalibracionih krivih za izračunavanje konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa

Osam kalibracionih rastvora β -CD-a je pripremljeno korišćenjem adekvatne zapremine standardnog rastvora β -CD-a ($c = 5$ mM) i razblaživanjem mobilnom fazom (smeša vode i acetonitrila u odnosu 80:20 (v/v)), kako bi se postigla koncentracija u opsegu od 0.044 – 22 mM. Konstruisane su kalibracione krive zavisnosti površine ispod pika od koncentracije. Nakon toga su pripremljeni kalibracioni rastvori za svaku od ispitivanih supstanci. Za risperidon i srodne supstance, pripremljeno je šest kalibracionih rastvora uzimajući adekvatnu zapreminu standardnog rastvora, koja se razblažuje u smeši vode i acetonitrila u odnosu 80:20 (v/v). Dobijeni su sledeći koncentracioni opsezi: risperidon 0,024 – 0,27 mM, srodna supstanca 1 0,023 – 0,18 mM, srodna supstanca 2 0,035 – 0,17 mM, srodna supstanca 3 0,037 – 0,19 mM. Kalibracioni rastvori olanzapina i srodnih supstanci su pripremljeni na isti način kao i kalibracioni rastvori risperidona i srodnih supstanci. Dobijeni opsezi koncentracija su sledeći: olanzapin i srodna supstanca C 0,032 – 0,16 mM, a srodna supstanca B 0,15 – 0,75 mM.

3.6 Prošireni QSRR-ANN model u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu

3.6.1 Određivanje adsorpcionih izoterma β -CD-a

Količina β -CD-a koja se potencijalno adsorbira na površinu stacionarne faze, pri različitim eksperimentalnim uslovima, određena je sprovođenjem frontalne analize na *Dionex Ultimate 3000* (U)HPLC sistemu, sa PDA detektorom. Korišćena je monolitna analitička C18 kolona, *Chromolith RP-18e* (100 mm x 4,6 mm, veličina makropora 2 μ m, veličina mezopora 13 nm), a temperatura kolone je varirana od 25 °C do 45 °C. Površina stacionarne faze iznosi 300 m² g⁻¹ prema specifikaciji proizvođača.

Da bi se sprovedla frontalna analiza, potrebno je bilo pripremiti mobilnu fazu A i B. Mobilna faza A se sastoji iz smeše acetonitrila i 15 mM vodenog rastvora β -CD-a, sa podešenom pH vrednošću. Mobilnu fazu B čini smeša acetonitrila i vode HPLC kvaliteta, sa podešenom pH vrednošću. Udeo acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodenog dela mobilne faze i temperatura kolone su varirani prema planu eksperimenata, koji je dobijen primenom CCD-a, u prethodnom delu istraživanja i predstavljen u Tabeli 5 [29]. Odgovarajuća količina mravlje kiseline je dodata mobilnoj fazi A i B kako bi se postigle sledeće pH vrednosti: 2,00, 2,75, 3,50, 4,25 i 5,00. Mobilne faze A i B su mešane prema programu gradijenta, koji je prikazan u Tabeli 6. Protok mobilne faze je podešen na 1 mL min⁻¹, a volume injektovanja iznosi 5 μ L. Frontalnom analizom dobijene su probojne krive, koje služe za izračunavanje adsorpcionih izoterma β -CD-a. Kako bi se odredila količina β -CD-a koja se adsorbira na površinu stacionarne faze (β -CD_A), potrebno je odrediti probojna retenciona vremena. Posledično, β -CD_A (μ M) se izračunava prema navedenoj jednačini (14):

$$[\beta - CD_A] = \text{protok mobilne faze} \times (t_r - t_0) \times \frac{[\beta - CD]}{A} \quad (14)$$

gde je t_r (min) probojno retenciono vreme umanjeno za kašnjenje, koje nastaje kao posledica mrtve zapremine sistema t_0 (min) retenciono vreme pika mobilne faze, $[\beta - CD]$ (mM) koncentracija β -CD-a u mobilnoj fazi i A (m² g⁻¹) površina stacionarne faze hromatografske kolone [38]. Kašnjenje sistema se određuje kao probojno vreme acetona u određenom hromatografskom sistemu, gde je kolona zamenjena bezzapreminskom jedinicom (eng. *Zero dead volume*).

Tabela 6: Program gradijenta za izvođenje frontalne analize (prilagođeno iz [175])

t (min)	A (%)	B (%)
0,01 – 20,00	0	100
20,01 – 40,00	33	67
40,01 – 60,00	50	50
60,01 – 80,00	67	33
80,01 – 100,00	83	17
100,01 – 120,00	100	0

A – smeša vodenog rastvora β -CD-a i acetonitrila; B – smeša vode i acetonitrile

3.6.2 QSRR-ANN – ulazne promenljive, set podataka za modelovanje i formiranje mreže

Dragon 6.0.7 program je korišćen za izračunavanje približno 5000 različitih deskriptora, među kojima se za one koji međusobno visoko korelišu smatra da nose istu hemijsku informaciju. Prema tome, kako bi se eliminisali suvišni deskriptori izvodi se korelaciona analiza, sa graničnom vrednošću koeficijenta korelacije od 0,90. Prema definisanom limitu korelacije, za svaki par međusobno korelisanih deskriptora, onaj koji pokazuje najveći stepen korelacije sa ostalim deskriptorima je automatski eliminisan [176]. Pored zadržanih deskriptora izračunatih u *Dragon 6.0.7* programu, set podataka za modelovanje uključuje i tri deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse (BE, EE i UE), kao i molekulske deskriptore koji su se u prethodnom delu istraživanja pokazali kao značajni [29]. U prethodnom delu istraživanja, preliminarna selekcija deskriptora je bazirana na *Abraham*-ovoj LSER teoriji [67], i POL, SEV, logP i DEN, koji su se pokazali kao značajni, korišćeni su i kao *input*-i ovog proširenog QSRR-ANN modela. Kao i u prethodno razvijenom QSRR-ANN modelu, eksperimentalni plan, dobijen prema CCD-u, je definisao variranje parametara, koji su takođe uključeni u formiranje seta podataka za modelovanje. Pored udela acetonitrila u mobilnoj fazi (15% – 25% (v/v)), pH vodenog dela mobilne faze (2.00 – 5.00), koncentracije β -CD u vodenom delu mobilne faze (5.0 – 15.0 mM) i temperature kolone (25 °C– 45 °C), kao parametar dodat je i β -CD_A (μM), izračunat pri svakoj kombinaciji faktora, koju predlaže CCD predstavljen u Tabeli 5.

Sve ulazne promenljive su podvrgnute multiploj linearnoj regresiji (eng. *Multiple Linear Regression* – MLR) kako bi se ispitala njihova korelacija sa posmatranim odgovorom. MLR kvantifikuje zavisnost izabranog odgovora od više varijabli uklapanjem eksperimentalnih podataka u linearnu jednačinu. Multilinearni model je predstavljen sledećom jednačinom (15):

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \quad (15),$$

gde je k broj nezavisnih promenljivih, $\beta_1 - \beta_k$ regresioni koeficijenti, koji predstavljaju individualne doprinose svakog od ispitivanih deskriptora, dok y predstavlja zavisnu promenljivu.

MLR analiza je sprovedena u *Rapid Miner Studio 9.2.0* programu.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

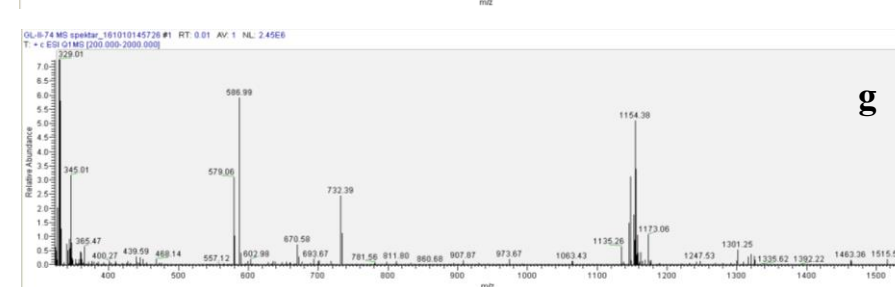
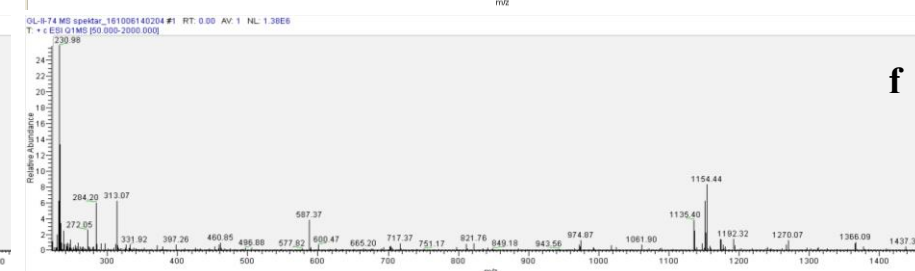
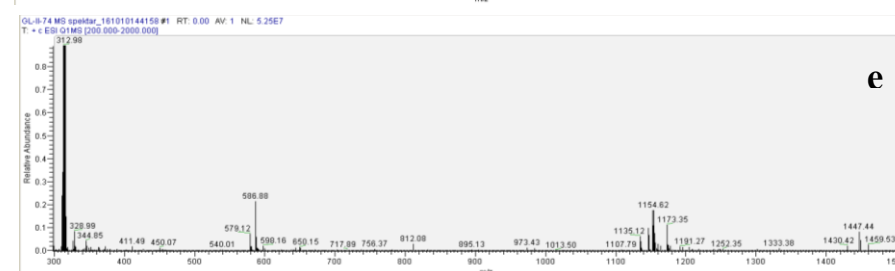
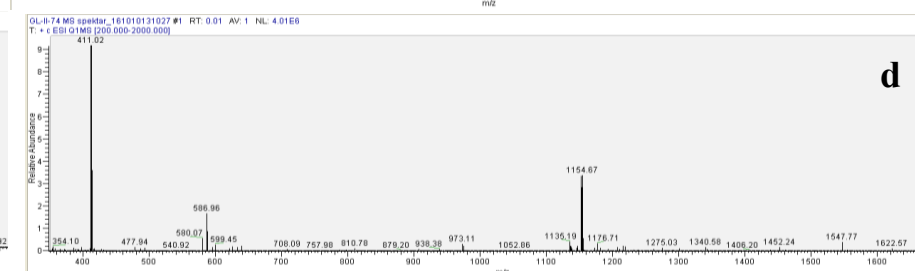
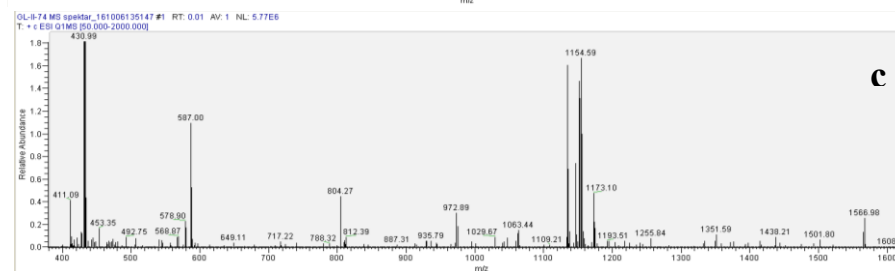
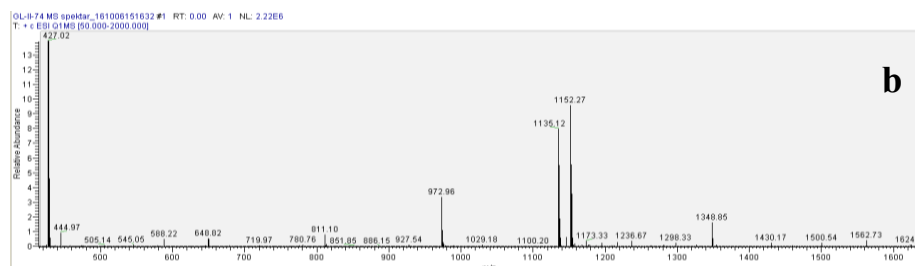
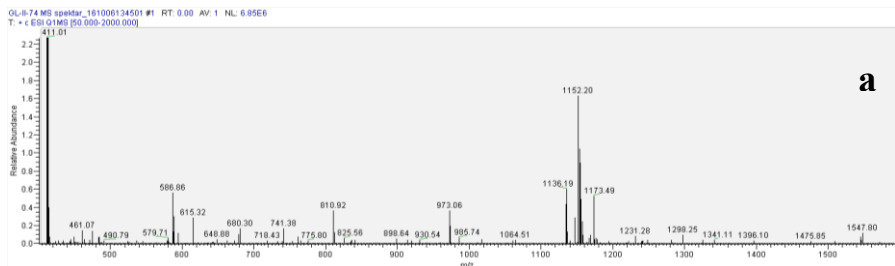
4.1 Karakterizacija inkluzionih kompleksa koji se formiraju između odabranih model supstanci i β -CD

4.1.1 Formiranje inkluzionih kompleksa i određivanje stehiometrije

Formiranje inkluzionih kompleksa postiže se primenom različitih tehnika, uključujući i jednostavno mešanje uzorka [8, 41]. U ovom radu inkluzioni kompleksi su formirani mešanjem pripremljenih uzoraka na vorteks mikseru u trajanju od 1 h. Jednostavno mešanje je najčešće dovoljno da podstakne formiranje inkluzionih kompleksa u rastvoru, ali pre njihovog daljeg izučavanja, potrebno je eksperimentalno potvrditi da su inkluzioni kompleksi formirani.

Shodno prethodno opisanim prednostima i manama metoda koje su u literaturi korišćene za određivanje stehiometrija kompleksa (potpoglavlje 1.3.1), u ovoj studiji stehiometrija formiranih kompleksa je određena primenom ESI-MS. Kao što je prethodno objašnjeno, ESI se smatra blagom jonizacionom tehnikom, koja je veoma moćna u ispitivanju interakcija između različitih supstanci i CD [177, 178].

Prema m/z vrednostima, uočenim posmatranjem opsega m/z vrednosti od 100 do 3000, svi inkluzioni kompleksi se formiraju u stehiometrijskom odnosu 1:1. Kako bi se isključila mogućnost formiranja inkluzionih kompleksa u odnosima koji se razlikuju od odnosa 1:1 (supstanca: β -CD = 1:2 ili supstanca: β -CD = 2:1) ispitivan je opseg m/z vrednosti do 3000, što je definisano konfiguracijom instrumenta kao najširi opseg. U slučaju risperidona, detektovani su joni koji odgovaraju protonovanom molekulu risperidona (vrednost m/z 411,5), protonovanom molekulu β -CD (vrednost m/z 1135,0), Na-aduktu β -CD-a (vrednost m/z 1173,2) i protonovanom inkluzionom kompleksu risperidon – β -CD (vrednost m/z 1546,5) (Slika 8a). Kada posmatramo srodne supstance risperidona, detektuju se joni koji odgovaraju redom protonovanoj srodnoj supstanci (vrednost m/z 427,0 za srodnu supstancu 1, vrednost m/z 432,5 za srodnu supstancu 2 i vrednost m/z 411,5 za srodnu supstancu 3), protonovanom molekulu β -CD-a (vrednost m/z 1135,0) i protonovanom inkluzionom kompleksu srodna supstanca – β -CD (vrednost m/z 1562,5 za inkluzioni kompleks srodna supstanca 1 – β -CD, vrednost m/z 1567,5 za inkluzioni kompleks srodna supstanca 2 – β -CD i vrednost m/z 1546,5 za inkluzioni kompleks srodna supstanca 3 – β -CD) (Slika 8b, c i d). Analiziranjem olanzapina i njegovih srodnih supstanci, uočavaju se joni koji odgovaraju protonovanom molekulu olanzapina (vrednost m/z 314,5), protonovanom molekulu srodne supstance B (vrednost m/z 230,3), protonovanom molekulu srodne supstance C (vrednost m/z 328,4), protonovanom molekulu β -CD-a (vrednost m/z 1135,0), kao i protonovanim olanzapin – β -CD (vrednost m/z 1448,4), srodna supstanca B – β -CD (vrednost m/z 1365,3) i srodna supstanca C – β -CD (vrednost m/z 1465,3) inkluzionim kompleksima (Slika 8e, f i g).



Slika 8: Full scan ESI+ maseni spektar inkluzionog kompleksa:

a) Risperidon – β -CD; b) Srodna supstanca 1 – β -CD; c) Srodna supstanca 2 – β -CD; d) Srodna supstanca 3 – β -CD; e) Olanzapin – β -CD; f) Srodna supstanca B – β -CD; g) Srodna supstanca C – β -CD (prilagođeno iz [35])

4.1.2 Predviđanje struktura formiranih inkluzionih kompleksa molekulskom doking studijom

Molekulska doking studija je sprovedena kako bi se predvidele najverovatnije strukture inkluzionih kompleksa koje β -CD formira sa različitim model supstancama. Predviđene strukture su dalje korišćene za izračunavanje deskriptora koji opisuju nastale inkluzione komplekse. Deskriptori koji opisuju inkluzione komplekse će pored molekulskih deskriptora i eksperimentalnih parametara biti korišćeni kao *input*-i QSRR-ANN modela.

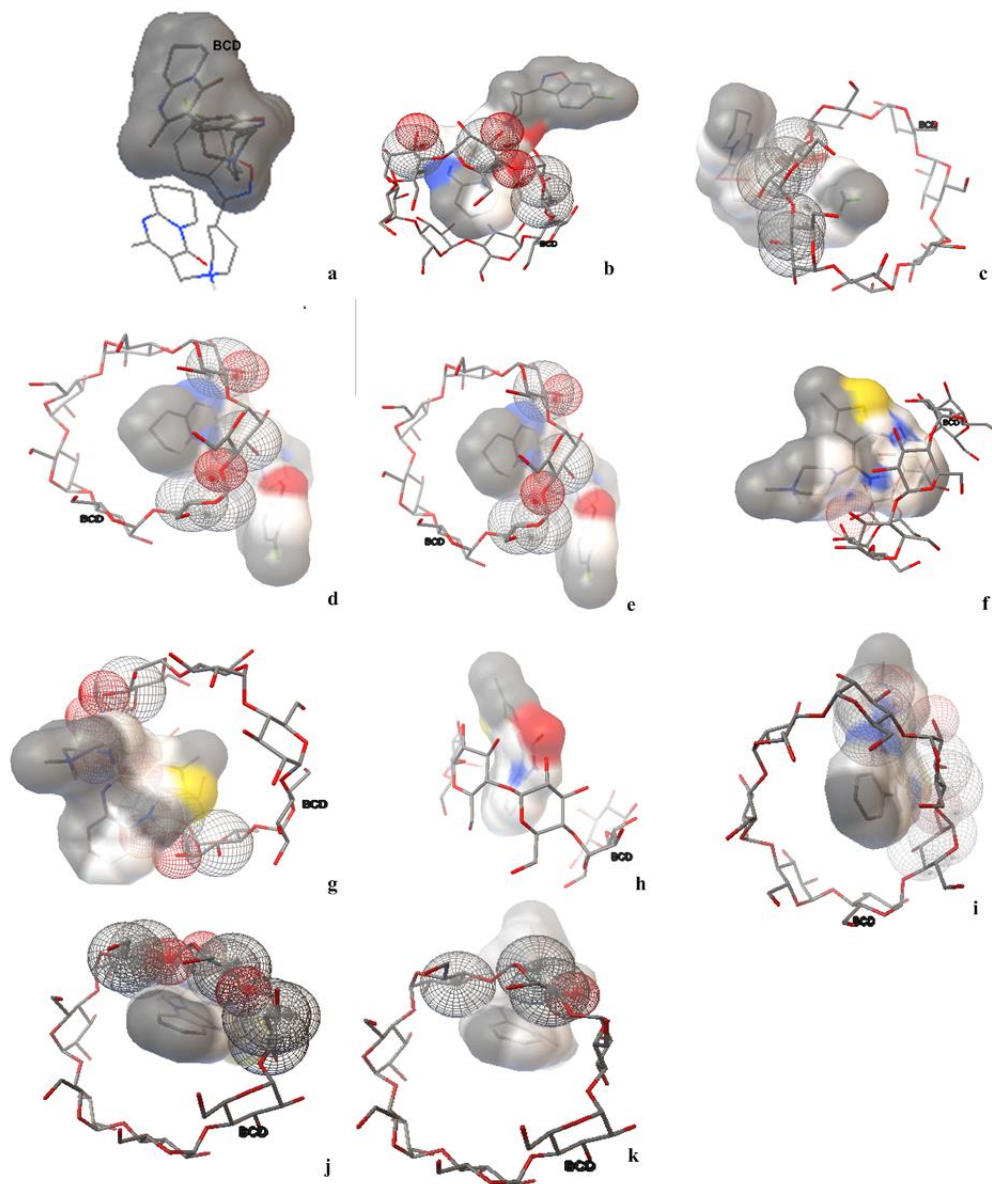
Molekul β -CD je u sprovedenoj studiji označen kao receptor, dok su odgovarajuće jonizacione forme ispitivanih model supstanci označene kao ligandi. Kao što je opisano i u poglavlju 3.2.2 eksperimentalnog dela, model supstance su podvrgnute minimizaciji energije i dominantne konformacije sa najmanjim sadržajem energije pri svakoj od analiziranih pH vrednosti su dalje primenjene u *in silico* kompleksiranju sa β -CD-om. Analizirani opseg pH vrednosti je odgovarao opsegu pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (2,00 – 5,00). Energija vezivanja nastalih inkluzionih kompleksa, kao i razlika u toploti formiranja inkluzionog kompleksa i slobodnog molekula su korišćene za izbor najstabilnijih konformacija inkluzionih kompleksa. Smatra se da što je niža energija vezivanja formiranog kompleksa, njegovo formiranje je termodinamički poželjnije. Ova pretpostavka je poslužila kao osnov za predlaganje najverovatnijih struktura formiranih inkluzionih kompleksa, koje su prikazane na slici 9.

U analiziranom opsegu pH vrednosti, risperidon je dominantno prisutan kao katjon (azot u piperidinskom prstenu je protonovan). Najmanja energija vezivanja kompleksa risperidon – β -CD je iznosila +1,19 kcal mol⁻¹ (Slika 9a). Srodna supstanca 1 je u svom nejonizovanom obliku pri pH 3,50, 4,25 i 5,00. Najmanja energija vezivanja formiranog kompleksa iznosila je kao i u slučaju risperidona +1,19 kcal mol⁻¹. Predviđena struktura formiranog inkluzionog kompleksa je predstavljena na slici 9b. Ako je pH vrednost podešena na 2,00 ili 2,75, srodna supstanca 1 je dominantno prisutna u katjonskoj formi, a najmanja energija vezivanja inkluzionog kompleksa iznosi -5,86 kcal mol⁻¹ (Slika 9c). Srodna supstanca 2 je dominantno prisutna u dikatjonskom obliku pri svim ispitivanim pH vrednostima. Najniža energija vezivanja formiranog inkluzionog kompleksa (Slika 9d) je iznosila -5,69 kcal mol⁻¹. Katjonski oblik je bio dominantni oblik srodne supstance 3 pri ispitivanom opsegu pH vrednosti od 2,00 – 5,00. Inkluzioni kompleks je formiran sa najnižom energijom vezivanja od -6,07 kcal mol⁻¹ (Slika 9e).

Olanzapin je dominantno prisutan u dikatjonskom obliku pri pH do 4,00. Kada je prisutan u ovoj formi, inkluzioni kompleks se formira sa energijom vezivanja od -5,82 kcal mol⁻¹ (Slika 9f). Sa druge strane, najniža energija vezivanja inkluzionog kompleksa koji se formira između katjonske forme olanzapina (pH 4,25 i 5,00) i β -CD-a je iznosila -5,37 kcal mol⁻¹, a predviđena struktura je predstavljena na slici 9g. Što se tiče srodnih supstanci olanzapina, srodna supstanca B je pri ispitivanim kiselim uslovima bila dominantno prisutna u nejonizovanom obliku. Inkluzioni kompleks je formiran sa energijom vezivanja od -5,60 kcal mol⁻¹ (Slika 9h). Za razliku od srodne supstance B, srodna supstanca C je u zavisnosti od pH vrednosti bila prisutna u više jonizacionih formi. U opsegu pH vrednosti od 2,00 do 2,50

dikatjonska forma srodne supstance C je bila dominantna, dok je pri pH 3,50 60% molekula bilo dominantno u katjonskom obliku, dok je preostalih 40% zauzimalo dikatjonsku formu. Nejonizovana forma srodne supstance C bila je dominantna pri pH 4,25 i 5,00. Najniže energije vezivanja inkluzionih kompleksa nastalih između β -CD i dikatjonske, katjonske i nejonizovane forme srodne supstance C iznosile su $-4,28 \text{ kcal mol}^{-1}$, $-5,63 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $-5,34 \text{ kcal mol}^{-1}$, redom (Slika 9i, j i k).

Doking studija je predvidela orijentaciju ispitivanih model supstanci prema molekulu β -CD-a i odredila koji deo molekula svake od ispitivanih supstanci ulazi u šupljinu β -CD. Deo molekula koji ulazi u CD-sku šupljinu, a još više deo koji ostaje van šupljine određuje retenciono ponašanje ispitivanih supstanci. Uticaj formiranja inkluzionih kompleksa na retenciono ponašanje ispitivanih supstanci biće diskutovan u narednim poglavljima.



Slika 9: Strukture inkluzionih kompleksa dobijene doking studijom (prilagođeno iz [29])

- a – Risperidon katjon – β -CD inkluzioni kompleks
- b – Srodna supstanca 1 nejonizovana – β -CD inkluzioni kompleks
- c – Srodna supstanca 1 katjon – β -CD inkluzioni kompleks
- d – Srodna supstanca 2 dikatjon – β -CD inkluzioni kompleks
- e – Srodna supstanca 3 katjon – β -CD inkluzioni kompleks
- f – Olanzapin dikatjon – β -CD inkluzioni kompleks
- g – Olanzapin katjon – β -CD inkluzioni kompleks
- h – Srodna supstanca B nejonizovana – β -CD inkluzioni kompleks
- i – Srodna supstanca C nejonizovana – β -CD inkluzioni kompleks
- j – Srodna supstanca C katjon – β -CD inkluzioni kompleks
- k – Srodna supstanca C dikatjon – β -CD inkluzioni kompleks

4.1.3 ^1H NMR spektroskopija u tumačenju struktura inkluzionih kompleksa

NMR spektroskopija je uspešno korišćena u analiziranju struktura kompleksa koji se formiraju između CD-a, kao molekula „domaćina“ i i različitih supstanci koje se sa njim kompleksiraju [179-181]. Dodatno, NMR spektroskopija nadmašuje druge metode za ispitivanje fenomena kompleksiranja, zbog svoje sposobnosti da istovremeno posmatra sve molekule u kompleksu na atomskom nivou [1]. Još jedna od karakteristika NMR tehnike, koja joj ide u prilog kada je u pitanju ispitivanje inkluzionih kompleksa, ogleda se u korišćenju rastvarača, čime mogu da se verodostojno ilustruju uslovi mobilne faze u tečnoj hromatografiji [180].

U ovoj studiji, ^1H – ^1H dipolarne interakcije između β -CD-a i ispitivanih model supstanci su određene izvođenjem 2D ROESY metode. ROESY kružni signali (eng. *Cross-peaks*) ukazuju na inter- i intramolekulske dipolarne interakcije. Na slici 10a je predstavljen 2D ROESY spektar inkluzionog kompleksa risperidon – β -CD. Identifikovani signali predstavljaju intermolekulske interakcije između signala risperidona, ako i intermolekulske interakcije između tri aromatična protona risperidona i H-3 i H-5 atoma β -CD-a, koji su locirani unutar šupljine. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prethodno sprovedene molekulske doking studije, gde lipofilniji deo strukture risperidona (6-fluoro-1,2-benzizoksazol) ulazi u šupljinu β -CD-a. Slike 10b i 11c ilustruju 2D ROESY spektre kompleksa između srodne supstance 1 i β -CD-a, kada je pH vrednost u uzorku podešena na 2,75 i 4,25, redom. Pri pH 2,75 i nižim, srodna supstanca 1 je dominantno prisutna u svom katjonskom obliku, dok nejonizovanu formu zauzima pri pH 3,5 i višim. Izabrana su dva pH nivoa pri kojima je srodna supstanca 1 dominantno prisutna u različitim jonizacionim formama, kako bi se otkrile eventualne razlike u interakcijama sa β -CD-om pri promeni jonizacione forme molekula srodne supstance. ROESY spektri prikazuju slične interakcije kao kod risperidona, što dovodi do pretpostavke da pH nema značajnu ulogu u procesu formiranja kompleksa. U slučaju srodnih supstanci 2 i 3, identifikovani signali takođe predstavljaju interakcije između aromatičnih protona srodne supstance i H-3 i H-5 atoma β -CD-a (Slika 10d, 11e). Analiziranjem dobijenih ROESY spektara dolazi se do zaključka da se risperidon i srodne supstance vezuju za β -CD na isti način.

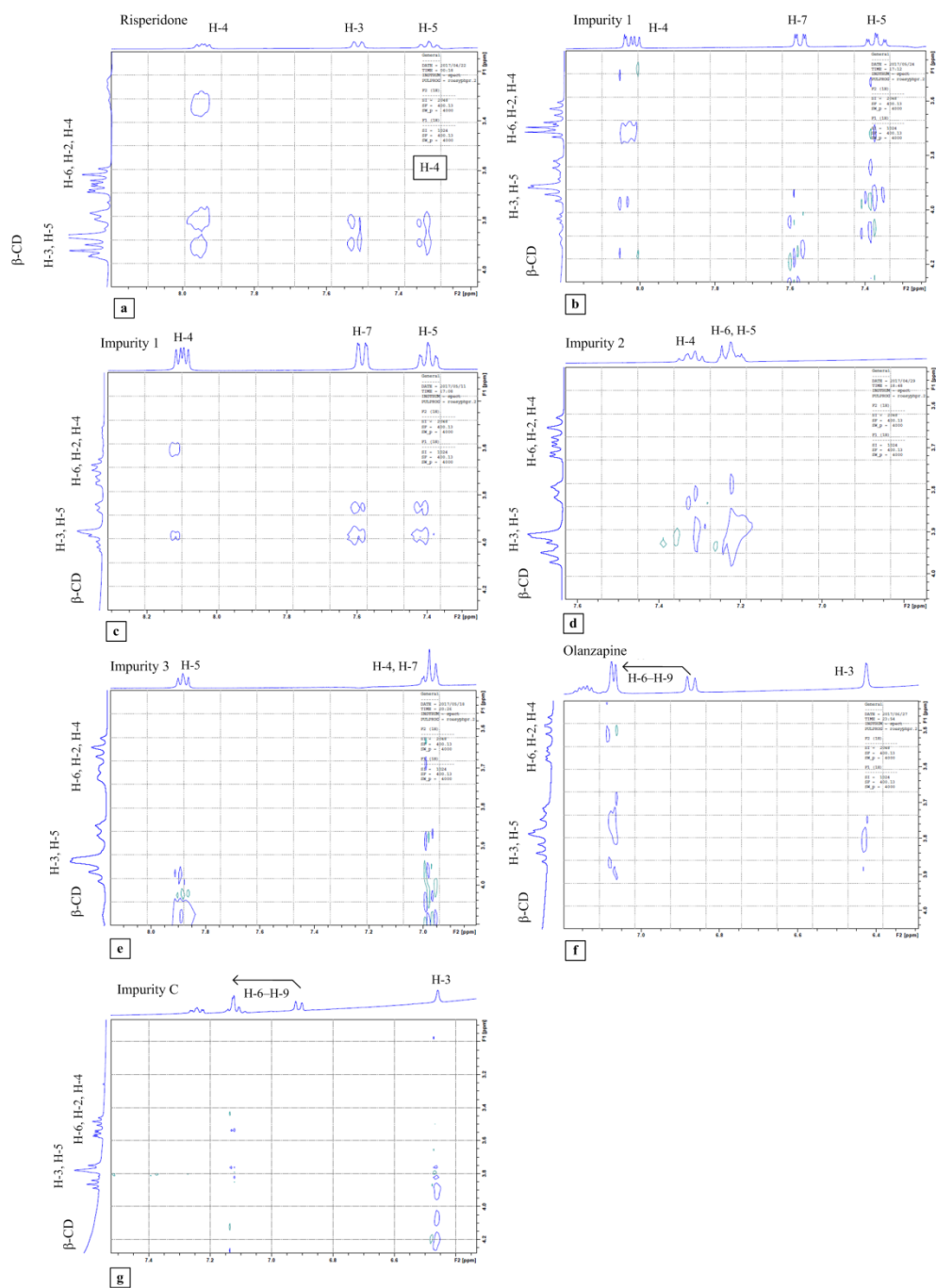
2D ROESY spektar inkluzionog kompleksa olanzapin – β -CD (Slika 10f), kao i srodna supstanca C – β -CD inkluzionog kompleksa (Slika 10g) ukazuje na interakcije aromatičnih i tiofenskih protona sa H-3 i H-5 β -CD-a, koji se nalaze unutar hidrofobne šupljine. Signali koji potiču od rastvarača (acetonitril i D_2O) ne interferiraju sa signalima β -CD-a i ispitivanih model supstanci, jer se identifikuju na različitim hemijskim pomeranjima. 2D ROESY spektri nisu snimljeni za inkluzioni kompleks koji se formira između srodne supstance B i β -CD-a, zbog loše rastvorljivosti 2,5 mg srodne supstance B i 5,0 mg β -CD-a u 0,5 mL bilo kog od upotrebljenih rastvarača. Prvo je kao rastvarač korišćena smeša acetonitril:voda (15:85, v/v) i D_2O , ali je udeo acetonitrila bio isuviše nizak da dovede do rastvaranja. Sa druge strane, povećanje udela acetonitrila dovodi do smanjene rastvorljivosti polarnog β -CD-a. Srodna supstanca B se nalazi u nejonizovanom obliku u ispitivanom opsegu pH vrednosti, pa su upotrebljeni rastvori HCl i NaOH u cilju smanjenja ili povećanja pH vrednosti, koje bi dovelo do jonizacije molekula srodne supstance, međutim adekvatna rastvorljivost ni na ovaj način

nije postignuta. Nisu pronađeni uslovi pri kojima bi srodna supstanca B bila jonizovana i adekvatno rastvorena kako bi bila pogodna za NMR ispitivanja. Zadovoljavajuća rastvorljivost u bilo kom od ispitivanih rastvarača može da se postigne ukoliko bi se koristile manje količine srodne supstance B i β -CD-a, ali u tom slučaju je teško postići dobar odnos signala i šuma (eng. *signal-to-noise ratio*) u NMR spektru, u prihvatljivom vremenskom okviru.

Rezultati NMR eksperimenata upoređeni su sa rezultatima molekulske doking studije. Jedan od razloga za izvođenje NMR eksperimenata je potvrda pouzdanosti i validnosti *in silico* predviđanja orijentacije ispitivanih model supstanci prema β -CD-skoj šupljini. Strukture inkluzionih kompleksa predviđene molekulskom doking studijom poklapaju se sa strukturama dobijenim NMR eksperimentima u slučaju svih ispitivanih supstanci, izuzev risperidonovih srodnih supstanci 2 i 3. Molekulska doking studija predlaže formiranje inkluzionog kompleksa srodne supstance 2 i 3 sa β -CD-om tako što lipofilniji deo strukture ostaje izvan šupljine [29]. Međutim, NMR eksperimentima je utvrđeno da je orijentacija risperidona i svih srodnih supstanci prema šupljini β -CD ista i da lipofilniji deo strukture ulazi unutar šupljine. Molekulska doking studija prioritizuje strukture inkluzionih kompleksa sa najmanjom energijom vezivanja, jer se smatra da su one termodinamički najstabilnije. Iz tog razloga, u slučaju srodne supstance 2 i 3, molekulska doking studija je predložila drugačiji tip vezivanja u odnosu na eksperimentalni pristup. Sa druge strane, ukoliko se analiziraju predložene strukture inkluzionih kompleksa sa malo većom energijom vezivanja, uočava se da su one u saglasnosti sa strukturama koje su dobijene izvođenjem NMR eksperimenata. Deskriptori koji opisuju komplekse, a koji će kasnije biti korišćeni za razvoj QSRR-ANN modela, imali su skoro iste vrednosti za oba načina vezivanja, koja su predložena u slučaju srodne supstance 2 i 3. Neznatne razlike u vrednostima izračunatih deskriptora ukazuju na to da posledični proces modelovanja neće biti ugrožen ovim razlikama.

Molekulska doking studija ima određene nedostatke, koji se u ovom konkretnom slučaju ogledaju u činjenici da dokingom nije verodostojno prikazan hromatografski sistem, jer se studija izvodi bez prisustva rastvarača, tj. u vakuumu. Prema tome, dokingom se samo predlaže najverovatnija orijentacija ispitivanih molekula prema šupljini β -CD-a. Kod β -CD-modifikovanih RP-HPLC sistema, formiranje inkluzionih kompleksa je pod uticajem svih komponenata hromatografskom sistema, koje u doking studiji nisu predstavljene. Shodno tome, postavljena je hipoteza da je upravo ovo razlog za prioritizaciju drugačijih struktura inkluzionih kompleksa srodne supstance 2 i 3 sa β -CD-om, u odnosu na NMR eksperimente.

Ne treba zanemariti prednosti *in silico* pristupa, u pogledu uštede vremena i resursa. Iz tog razloga, buduće istraživanje treba da bude usmereno na izvođenje i NMR eksperimenata i *in silico* pristupa na većem broju model supstanci, kako bi se doneo zaključak o uslovima u kojima se može koristiti *in silico* pristup, a u kojima je potrebna eksperimentalna potvrda predloženih struktura inkluzionih kompleksa.



Slika 10: Parcijalni 2D ROESY spektri koji pokazuju signale između:

- a – Risperidona i β -CD-a
- b – Srodne supstance 1 i β -CD-a na pH 2,75
- c – Srodne supstance 1 i β -CD-a na pH 4,25
- d – Srodne supstance 2 i β -CD-a
- e – Srodne supstance 3 i β -CD-a
- f – Olanzapina i β -CD-a
- g – Srodne supstance C i β -CD-a (prilagođeno iz [175])

4.2 QSRR-ANN u β -CD-modifikovanom RP-HPLC – opisivanje retencionog ponašanja i razvoj metoda za razdvajanje model supstanci

4.2.1 Izbor molekulskih deskriptora i deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse za građenje QSRR-ANN modela

Odabir deskriptora za građenje QSRR-ANN modela je izvršen na osnovu definisane granične vrednosti koeficijenta korelacije između izračunatih deskriptora. Korelisani su kako molekulski, tako i deskriptori koji opisuju formirane komplekse. Na ovaj način je smanjeno opterećenje sistema, eliminacijom deskriptora koji nose istu hemijsku informaciju. Granična vrednost koeficijenta korelacije je bila 0,99 i samo deskriptori koji nisu međusobno korelisali sa koeficijentom korelacije iznad ove vrednosti su odabrani za dalje modelovanje. Koeficijenti korelacije između parova deskriptora su predstavljeni u Tabeli 7. POL, SAS, MA, MR, VDW, D, LUMO i HOMO su visoko međusobno korelisali, pa je zadržan samo POL, jer je pokazao najveću korelaciju sa ostalim molekulskim deskriptorima. Među deskriptorima koji opisuju inkluzione komplekse, samo su IE i VDW-HB-D korelisali, pa je u model uključen VDW-HB-D. Nije bilo korelacije između molekulskih deskriptora i deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse, čime je podržan njihov jednak značaj u modelovanju retencije u ovakvim hromatografskim sistemima. Prilikom građenja QSRR-ANN modela nisu svi deskriptori odjednom uključeni u model, već je primenjen pristup postepenog uključivanja deskriptora.

Tabela 7: Koeficijent korelacije između parova molekulskih i deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse (prilagođeno iz [29])

	POL	H-don	H-acc	SAS	MA	SEV	MR	logP	CDEN	DEN	nonVDW	VDW	DEN2	LUMO	HOMO	BE	LE	IC	IE	VDWHBD	EE	TI	TORE	UE
POL	1																							
H-don	-0,2371	1																						
H-acc	0,6146	-0,5856	1																					
SAS	0,9937	-0,2531	0,6113	1																				
MA	0,9953	-0,2424	0,6088	0,9996	1																			
SEV	0,1287	-0,1855	-0,0096	0,2165	0,2084	1																		
MR	0,9964	-0,2763	0,6449	0,9925	0,9943	0,1636	1																	
Log P	0,3186	0,4576	0,2459	0,2911	0,2992	-0,2073	0,3259	1																
CDEN	-0,3026	0,3997	-0,0377	-0,3195	-0,3141	-0,1807	-0,3039	0,4629	1															
DEN	-0,5164	0,2970	-0,4795	-0,5500	-0,5354	-0,0436	-0,5204	-0,2379	0,4952	1														
nonVDW	0,7984	0,0461	-0,3178	-0,8244	-0,8181	-0,1101	-0,7808	-0,2832	0,4248	0,7701	1													
VDW	0,9659	-0,4330	0,9659	0,9630	0,9621	0,1588	0,9761	0,2505	-0,3863	-0,5895	-0,7688	1												
DEN2	0,9292	-0,3051	0,6390	0,9564	0,9506	0,2600	0,9290	0,2345	-0,3857	-0,7279	-0,8907	0,9187	1											
LUMO	0,9876	-0,2883	0,6679	0,9935	0,9932	0,1854	0,9902	0,3005	-0,3378	-0,6028	-0,8285	0,9680	0,9692	1										
HOMO	0,9876	0,9876	0,6679	0,9935	0,9932	0,1854	0,9902	0,3005	-0,3378	-0,6029	-0,8285	0,9680	0,9692	1	1									
BE	-0,4630	0,1459	-0,1873	-0,4451	-0,4381	-0,1070	-0,4494	-0,1279	0,1765	0,1747	0,2667	-0,4527	-0,3203	-0,3875	-0,3876	1								
LE	0,2431	-0,1067	0,2958	0,2668	0,2728	0,0273	0,2616	0,0753	-0,1156	-0,3119	-0,3927	0,2597	0,3873	0,3342	0,3341	0,7350	1							
IC	0,5393	-0,6813	0,7205	0,5365	0,5327	0,0015	0,5438	-0,2742	-0,1180	-0,1666	-0,2545	0,5667	0,5257	0,5555	0,5555	-0,1426	0,2501	1						
IE	-0,7964	0,2110	-0,4777	-0,7850	-0,7796	-0,1273	-0,7878	-0,2974	0,2597	0,2597	0,5659	-0,7766	-0,6945	-0,7527	-0,7528	0,8925	0,3591	-0,3395	1					
VDWHBD	-0,7942	0,2155	-0,4737	-0,7836	-0,7781	-0,1319	-0,7859	-0,2885	0,2813	0,4669	0,5721	-0,7769	-0,6973	-0,7525	-0,7525	0,8919	0,3571	-0,3318	0,9997	1				
EE	-0,4542	0,0348	-0,4084	-0,4163	-0,4213	0,1004	-0,4457	-0,4090	-0,5779	-0,2361	0,0432	-0,3851	-0,2578	-0,3707	-0,3707	0,4499	0,2342	-0,4616	0,4933	0,4704	1			
TI	-0,1961	-0,1961	-0,0069	-0,2026	-0,1915	-0,0976	-0,2030	0,5021	0,6718	0,3140	0,2340	-0,3760	-0,2211	-0,1937	-0,1938	0,2620	0,0643	-0,2517	0,2298	0,2411	-0,2185	1		
TORE	0,9392	-0,2111	0,7157	0,9438	0,9441	0,0914	0,9434	0,4262	-0,2633	-0,6805	-0,8352	0,9139	0,9563	0,9706	0,9706	-0,2550	0,4487	0,4919	-0,6637	-0,6639	-0,3123	-0,0572	1	
UE	-0,7034	0,4173	-0,3264	-0,7107	-0,7001	-0,0350	-0,6903	-0,0031	0,6874	0,7624	0,7934	-0,7761	-0,7539	-0,7115	-0,7115	0,4484	-0,1072	-0,3168	0,6505	0,6610	-0,0239	0,6922	0,6499	1

4.2.2 CCD u definisanju eksperimentalnog prostora

Tradicionalni pristup izvođenja eksperimenata gde se prati promena odgovora u zavisnosti od variranja jednog po jednog faktora (eng. *One Variable/Factor At a Time* – OVAT/OFAT) validan je u situacijama kada su ispitivane promenljive u potpunosti nezavisne jedna od druge. Pored toga, rezultati dobijeni na ovaj način dovode samo do lokalnog poznavanja vrednosti zavisnih promenljivih u tačkama u kojima je eksperiment izveden, ali ne i do razumevanja celog eksperimentalnog prostora. Metodologija eksperimentalnog dizajna predstavlja efikasnu proceduru planiranja eksperimenata i definisanja eksperimentalnog prostora. Variranjem više faktora istovremeno omogućava se ispitivanje interakcija nezavisno promenljivih, kao i njihovog uticaja na posmatranu zavisno promenljivu. Na osnovu dobijenog matematičkog modela moguće je predvideti vrednosti odgovora u bilo kojoj tački eksperimentalnog prostora, čak i za one kombinacije eksperimentalnih uslova pri kojima eksperimenti nisu fizički izvedeni. Metodologija eksperimentalnog dizajna omogućava dobijanje kvalitetnih informacija uz uštedu vremena, koja se postiže izvođenjem manjeg broja eksperimenata [182]. U ovom istraživanju preliminarnim eksperimentima je utvrđeno da su udeo acetonitrila kao organskog modifikatora mobilne faze (% v/v), pH vrednost vodenog dela mobilne faze, koncentracija β -CD-a u vodenom delu mobilne faze (mM) i temperatura kolone ($^{\circ}$ C) imali značajan uticaj na retenciono ponašanje odabranih model supstanci u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Navedeni faktori su korišćeni za kreiranje plana eksperimenata uz pomoć CCD-a, koji je adekvatno opisao eksperimentalni prostor i korišćen je u formiranju seta podataka za ANN modelovanje. Eksperimentalni plan je predstavljen u tabeli 5, a dobijeni retencioni faktori, koji su korišćeni kao *output*-i za ANN su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8: Retencioni faktori ispitivanih model supstanci dobijeni sprovođenjem eksperimenata prema CCD eksperimentalnom planu (prilagođeno iz [29])

Broj eksperimenta	Retencioni faktori						
	Olanzapin	Srodna supstanca B	Srodna supstanca C	Risperidon	Srodna supstanca 1	Srodna supstanca 2	Srodna supstanca 3
1	0,50	13,66	0,65	2,89	6,56	1,97	2,85
2	0,08	5,85	0,87	1,07	1,74	0,60	0,79
3	0,60	7,60	1,06	2,70	4,85	1,94	2,77
4	0,95	5,54	0,62	2,77	4,34	1,61	2,33
5	0,51	11,72	0,66	3,11	6,46	2,09	2,96
6	0,11	5,20	0,48	1,10	1,68	0,62	0,81
7	0,56	6,58	0,83	2,80	4,98	1,64	2,25
8	0,90	4,33	0,68	3,28	4,64	1,89	2,71
9	0,28	12,89	1,10	2,23	4,27	1,47	1,92
10	0,21	5,96	0,28	1,72	2,59	1,06	1,34
11	1,28	6,77	1,19	5,73	7,46	3,48	3,06
12	2,45	5,88	1,64	5,88	7,67	3,62	4,91
13	0,33	12,17	1,10	2,13	4,55	1,36	2,12
14	0,21	5,29	0,28	1,70	2,46	1,05	1,34
15	1,34	4,93	0,65	6,63	7,04	4,25	4,44
16	3,13	5,23	1,82	6,24	7,71	3,96	5,13
17	1,80	13,09	1,95	11,30	11,23	6,23	9,67
18	0,28	4,06	0,33	1,63	2,09	1,01	1,20
19	0,33	7,70	0,38	1,19	1,74	0,68	0,77
20	2,37	2,78	1,91	8,22	9,12	4,60	7,10
21	0,36	9,59	0,48	2,74	4,56	1,59	2,32
22	0,17	7,30	0,28	1,75	2,77	1,04	1,51
23	0,52	2,03	0,66	2,69	5,39	1,94	2,72
24	0,91	8,28	0,99	3,64	7,44	2,82	4,27
25	0,17	8,19	0,53	3,09	4,99	1,91	2,71
26	0,17	8,22	0,55	3,12	5,02	2,12	2,75
27	0,16	8,20	0,54	3,15	5,04	2,10	2,69
28	0,17	8,25	0,52	3,15	5,13	2,12	2,68
29	0,18	8,03	0,50	3,06	5,10	2,04	2,74
30	0,17	8,20	0,53	3,13	5,10	2,07	2,72

4.2.3 QSRR-ANN modelovanje

Kompleksnost β -CD-modifikovanih RP-HPLC uslovila je drugačiji metodološki pristup modelovanju retencije u odnosu na regularne RP-HPLC sisteme. Pored uticaja fizičko-hemijskih karakteristika ispitivanih model supstanci, koje su predstavljene molekulskim deskriptorima, na retenciju u određenom eksperimentalnom prostoru utiče i struktura formiranih inkluzionih kompleksa sa β -CD-om. Prema tome, kako bi QSRR-ANN model adekvatno opisao i predviđao retenciono ponašanje u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu, potrebno je uključiti i deskriptore kroz koje će se ispitivati i uticaj formiranih inkluzionih kompleksa na retenciju. Međutim, kako bi se izbeglo opterećenje modela velikim brojem deskriptora, molekulski deskriptori i deskriptori inkluzionih kompleksa nisu uključeni istovremeno. Odlučeno je da se primeni pristup postepenog uključivanja deskriptora, uz istovremeno ispitivanje uticaja variranja eksperimentalnih uslova na posmatrano retenciono ponašanje.

Prva neuronska mreža je kreirana prateći principe QSRR modelovanja u RP-HPLC-u gde se molekulski deskriptori i eksperimentalni parametri posmatraju kao *input*-i (eng. *Mixed modelling*), a retencioni faktori risperidona, olanzapina i srodnih supstanci su označeni kao *output*-i. Parametri mreže su optimizovani kako bi se smanjila RMSE za trening i validacioni set podataka. Posledično, dobijena je višeslojna nerekurentna mreža, koja se sastoji iz tri sloja (ulazni, skriveni sa četiri neurona i izlazni sloj). Mreža je trenirana algoritmom povratnog prolaska greške, sa stopom učenja podešenom na 0,3 i momentumom na 0,05. Treniranje mreže je zaustavljeno kada je došlo do konstantnog rasta vrednosti validacione greške. RMSE za trening, validacioni i test set podataka za dobijenu mrežu su iznosile 0,5748, 0,4385 i 0,6694, redom. R^2 između eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih faktora (k (exp)), i onih koje predviđa mreža (k (ANN) iznosio je 0,9826 za trening, 0,9838 za validacioni i 0,9727 za test set podataka. Ukoliko su vrednosti RMSE niske, model ima dobru sposobnost predviđanja. Prema tome, cilj je postići što niže vrednosti RMSE, dok vrednosti R^2 treba da budu što bliže 1. Što su vrednosti R^2 više postoji dobro slagane između eksperimentalno dobijenih i mrežom predviđenih odgovora, odnosno dobro su objašnjene varijacije koje postoje u predviđenim vrednostima odgovora. Nakon formiranja mreže, sprovedena je analiza osetljivosti (eng. *Sensitivity analysis*), kako bi se ispitaio uticaj pojedinačnih ulaznih promenljivih na dobijeni ANN model. Osetljivost ulazne promenljive je definisana kao odnos greške mreže kada je ta promenljiva izostavljena i greške mreže kada su uključene sve ulazne promenljive. Na ovaj način je moguće rangirati ulazne promenljive prema stepenu važnosti. Osetljivost jedne ulazne promenljive u odnosu na ostale je određena prema navedenim kriterijumima. Greška osetljivosti mreže (eng. *Variable Sensitivity Error – VSE*) predstavlja efikasnost mreže u slučaju kada ta promenljiva nije dostupna. Zatim, odnos osetljivosti promenljive (eng. *Variable Sensitivity Ratio – VSR*) predstavlja odnos VSE i greške modela kada su sve promenljive dostupne. Promenljiva koja značajnije doprinosi performansama modela u odnosu na ostale ima veću vrednost VSR [183]. Sprovedena analiza osetljivosti omogućuje postepeno isključivanje promenljivih (faktora), koje pokazuju manji uticaj na model, što su u ovom slučaju H-acc i NON VDW. ANN koja je formirana bez ova dva deskriptora imala je sledeće RMSE vrednosti: 0,3765 za trening, 0,9628 za validacioni i 0,9758 za test set podataka. R^2 je iznosio 0,9926 za trening, 0,9628 za validacioni i 0,9758 za test set podataka. Vrednosti RMSE i R^2 ukazuju na to da performanse mreže nisu poboljšane uklanjanjem manje značajnih ulaznih promenljivih.

Naredni pokušaj kreiranja ANN modela podrazumevao je uključivanje deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse i eksperimentalnih parametara kao *input*-a, dok *output* ostaje isti kao i kod prethodne mreže. Nakon optimizacije parametara mreže, najbolje performanse pokazala je višeslojna nerekurentna mreža sa tri sloja i osam neurona u skrivenom sloju. Mreža je kao i u prethodnom pokušaju trenirana algoritmom povratnog prolaska greške, sa stopom učenja od 0,3 i momentumom od 0,1. RMSE za trening, validacioni i test set podataka iznosila je 0,4341, 0,7344 i 1,2270, redom. R^2 između eksperimentalno dobijenih i ANN predviđenih vrednosti k je iznosio 0,9886 za trening, 0,9627 za validacioni i 0,9372 za test set podataka. Analiza osetljivosti je sprovedena i ukazala je na isključivanje TI i VDW-HB-D. Nakon isključivanja ovih promenljivih optimizovana je mreža sa tri sloja i pet neurona u skrivenom sloju, čija je RMSE iznosila 0,4610 za trening, 0,8525 za validacioni i 1,3190 za test set podataka, dok su R^2 vrednosti bile 0,9872 za trening, 0,9509 za validacioni i 0,9118 za test set podataka.

Sposobnost predviđanja oba ANN modela je bila relativno slaba, pa je naredni pokušaj podrazumevao uključivanje molekulskih deskriptora, deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse i eksperimentalnih parametara, koji pokazuju značajan uticaj na model, kao *input*-a, dok je retencioni faktor ispitivanih model supstanci posmatran kao *output* modela. Ulazne promenljive modela su bile POL, SEV, logP, DEN, BE, EE, UE, udeo acetonitrila u mobilnoj fazi (% v/v), koncentracija β -CD u vodenom delu mobilne faze (mM), pH vrednost vodenog dela mobilne faze i temperatura kolone ($^{\circ}$ C). Set podataka se sastojao od 210 eksperimenata, koji su podeljeni na trening, validacioni i test set, od kojih je svaki redom brojao 147, 31 i 32 eksperimenta. Rezultati ANN modelovanja su predstavljeni u Tabeli 9. Najbolje performanse je pokazala višeslojna nerekurentna mreža sa 11-8-1 topologijom, trenirana algoritmom povratnog prolaska greške. RMSE za trening, validacioni test set podataka su redom iznosile 0,2954, 0,3633 i 0,4864. R^2 između eksperimentalno dobijenih ($k(\text{exp})$) i ANN predviđenih k ($k(\text{ANN})$) vrednosti je iznosio 0,9962 za trening, 0,9927 za validacioni i 0,9829 za test set podataka. Visoke vrednosti R^2 i niske vrednosti RMSE za trening i validacioni set podataka ukazuju na dobre deskriptivne sposobnosti modela, dok visoke vrednosti R^2 i niske vrednosti RMSE test seta podataka reflektuju dobre prediktivne sposobnosti modela. Slika 11 grafički prikazuje slaganje između k dobijenih eksperimentalno i predviđenih ANN modelom. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da hromatografsko ponašanje nije moguće adekvatno opisati uz pomoć samo molekulskih deskriptora ili samo deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse. Prema tome, obe grupe deskriptora treba da budu uključene u model sa jednakom važnošću.

Tabela 9: Set podataka i rezultati QSRR-ANN modelovanja (prilagođeno iz [29])

Supstanca	ACN (%)	pH	Temp . (°C)	β -CD (mM)	POL	SEV	LOGP	DEN	BE	EE	UE	Set podataka	k(exp)	k(ANN)	Greška
Olanzapin	20	2	35	10	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Trening	0,325	0,195	0,010
Olanzapin	17,5	2,75	30	12,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Trening	0,187	0,060	0,009
Olanzapin	22,5	2,75	30	12,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Trening	0,211	0,055	0,020
Olanzapin	17,5	2,75	40	12,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Trening	0,327	0,103	0,017
Olanzapin	22,5	2,75	40	12,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Test	0,212	0,022	0,014
Olanzapin	17,5	2,75	30	7,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Trening	0,496	0,326	0,013
Olanzapin	22,5	2,75	30	7,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Test	0,081	0,171	0,019
Olanzapin	17,5	2,75	40	7,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Validacija	0,514	0,294	0,016
Olanzapin	22,5	2,75	40	7,5	35,85	261,806	2,859	-3,0189	-5,8	-0,11	-0,35	Validacija	0,105	0,179	0,005
Olanzapin	20	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,174	0,107	0,005
Olanzapin	20	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,171	0,107	0,005
Olanzapin	20	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,158	0,107	0,004
Olanzapin	20	3,5	45	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,171	0,184	0,001
Olanzapin	20	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,169	0,107	0,005
Olanzapin	20	3,5	35	5	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,517	0,217	0,022
Olanzapin	15	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,408	0,467	0,004
Olanzapin	20	3,5	35	15	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,906	0,613	0,022
Olanzapin	20	3,5	25	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Test	0,357	0,037	0,024
Olanzapin	20	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,175	0,107	0,005
Olanzapin	20	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Validacija	0,172	0,107	0,005
Olanzapin	25	3,5	35	10	35,85	260,511	2,859	-3,12777	-5,6962	-0,1147	-0,6049	Trening	0,113	0,126	0,001
Olanzapin	17,5	4,25	40	12,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Validacija	1,343	1,081	0,019
Olanzapin	17,5	4,25	40	7,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Trening	1,421	1,429	0,001
Olanzapin	17,5	4,25	30	7,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Validacija	1,234	1,760	0,039
Olanzapin	22,5	4,25	30	7,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Validacija	0,945	0,769	0,013
Olanzapin	22,5	4,25	40	7,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Test	0,895	0,752	0,011
Olanzapin	22,5	4,25	40	12,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Test	2,900	2,268	0,047
Olanzapin	17,5	4,25	30	12,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Trening	1,281	0,805	0,035
Olanzapin	22,5	4,25	30	12,5	35,85	258,403	2,859	-3,30491	-5,5272	-0,1224	-1,0196	Test	2,453	2,094	0,026
Olanzapin	20	5	35	10	35,85	256,812	2,859	-3,43868	-5,3996	-0,1282	-1,3328	Trening	3,150	3,023	0,009
Srodna supstanca B	20	2	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	7,702	7,536	0,012
Srodna supstanca B	17,5	2,75	30	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	12,936	12,972	0,003
Srodna supstanca B	22,5	2,75	30	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	5,958	5,667	0,022

Supstanca	ACN (%)	pH	Temp . (°C)	β -CD (mM)	POL	SEV	LOGP	DEN	BE	EE	UE	Set podataka	k(exp)	k(ANN)	Greška
Srodna supstanca B	17,5	2,75	40	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	12,172	11,523	0,048
Srodna supstanca B	22,5	2,75	40	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Validacija	5,287	5,149	0,010
Srodna supstanca B	17,5	2,75	30	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	13,661	13,194	0,034
Srodna supstanca B	22,5	2,75	30	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Validacija	5,850	5,682	0,012
Srodna supstanca B	17,5	2,75	40	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	11,716	11,585	0,010
Srodna supstanca B	22,5	2,75	40	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Validacija	5,199	5,347	0,011
Srodna supstanca B	20	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	8,186	7,999	0,014
Srodna supstanca B	20	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	8,220	7,999	0,016
Srodna supstanca B	20	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Validacija	8,195	7,999	0,014
Srodna supstanca B	20	3,5	45	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	7,295	6,837	0,034
Srodna supstanca B	20	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Test	8,250	7,999	0,019
Srodna supstanca B	20	3,5	35	5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Validacija	7,460	7,883	0,031
Srodna supstanca B	15	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Validacija	7,518	7,820	0,022
Srodna supstanca B	20	3,5	35	15	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	8,281	8,110	0,013
Srodna supstanca B	20	3,5	25	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	9,589	9,199	0,029
Srodna supstanca B	20	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	8,025	7,999	0,002
Srodna supstanca B	20	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	8,199	7,999	0,015
Srodna supstanca B	25	3,5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	4,084	3,935	0,011
Srodna supstanca B	17,5	4,25	40	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Test	4,930	4,581	0,026
Srodna supstanca B	17,5	4,25	40	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	3,264	3,033	0,017
Srodna supstanca B	17,5	4,25	30	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Test	4,000	5,360	0,100
Srodna supstanca B	22,5	4,25	30	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	5,539	5,257	0,021
Srodna supstanca B	22,5	4,25	40	7,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	4,331	4,289	0,003
Srodna supstanca B	22,5	4,25	40	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	5,230	4,903	0,024
Srodna supstanca B	17,5	4,25	30	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	6,767	6,491	0,020
Srodna supstanca B	22,5	4,25	30	12,5	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Trening	5,882	5,775	0,008
Srodna supstanca B	20	5	35	10	24,15	164,195	2,8	-7,3871	-2,11	0	0	Validacija	2,775	2,444	0,024
Srodna supstanca C	20	2	35	10	36,88	278,164	2,8527	-0,5673	-2,4241	-0,0933	0,02956	Validacija	0,382	0,687	0,022
Srodna supstanca C	17,5	2,75	30	12,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Trening	0,313	0,259	0,004
Srodna supstanca C	22,5	2,75	30	12,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Test	0,279	0,226	0,004
Srodna supstanca C	17,5	2,75	40	12,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Trening	0,350	0,292	0,004
Srodna supstanca C	22,5	2,75	40	12,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Trening	0,275	0,156	0,009
Srodna supstanca C	17,5	2,75	30	7,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Trening	0,646	0,481	0,012
Srodna supstanca C	22,5	2,75	30	7,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Validacija	0,210	0,046	0,012
Srodna supstanca C	17,5	2,75	40	7,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Validacija	0,657	0,298	0,026

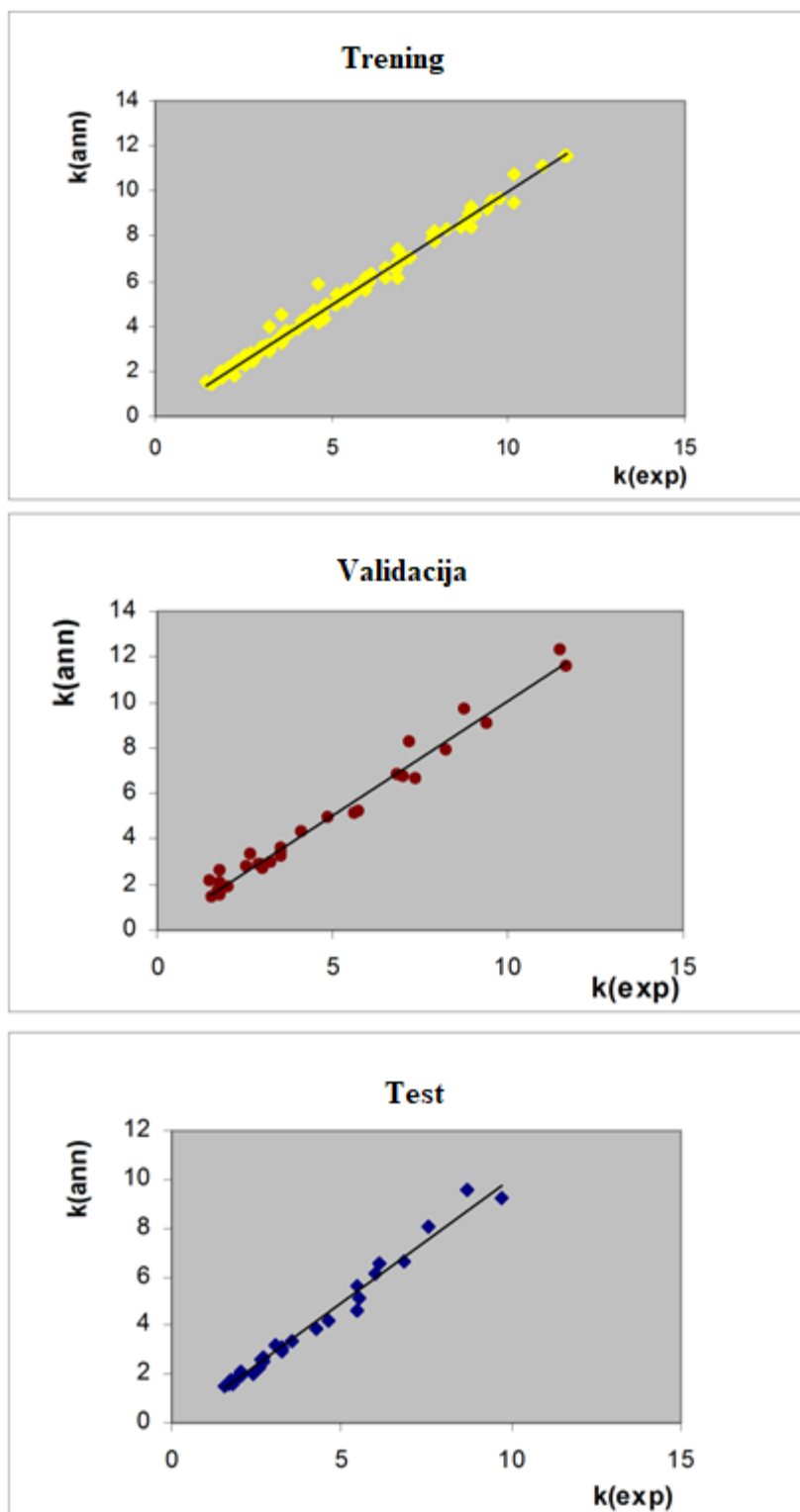
Supstanca	ACN (%)	pH	Temp . (°C)	β-CD (mM)	POL	SEV	LOGP	DEN	BE	EE	UE	Set podataka	k(exp)	k(ANN)	Greška
Srodna supstanca C	22,5	2,75	40	7,5	36,67	278,994	2,90975	-1,94891	-3,642	-0,103	0,0774	Trening	0,475	0,097	0,028
Srodna supstanca C	20	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,529	0,435	0,007
Srodna supstanca C	20	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,550	0,435	0,008
Srodna supstanca C	20	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,535	0,435	0,007
Srodna supstanca C	20	3,5	45	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,277	0,236	0,003
Srodna supstanca C	20	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,519	0,435	0,006
Srodna supstanca C	20	3,5	35	5	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,659	0,254	0,030
Srodna supstanca C	15	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Test	0,695	0,663	0,002
Srodna supstanca C	20	3,5	35	15	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Test	0,986	0,705	0,021
Srodna supstanca C	20	3,5	25	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,478	0,494	0,001
Srodna supstanca C	20	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Validacija	0,499	0,435	0,005
Srodna supstanca C	20	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,531	0,435	0,007
Srodna supstanca C	25	3,5	35	10	36,67	270,011	2,8527	-2,69383	-4,349	-0,1056	0,042	Trening	0,207	0,112	0,007
Srodna supstanca C	17,5	4,25	40	12,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Trening	0,940	1,161	0,016
Srodna supstanca C	17,5	4,25	40	7,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Trening	1,288	0,842	0,033
Srodna supstanca C	17,5	4,25	30	7,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Trening	1,281	1,162	0,009
Srodna supstanca C	22,5	4,25	30	7,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Test	0,620	0,392	0,017
Srodna supstanca C	22,5	4,25	40	7,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Trening	0,678	0,230	0,033
Srodna supstanca C	22,5	4,25	40	12,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Trening	1,200	1,182	0,001
Srodna supstanca C	17,5	4,25	30	12,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Trening	1,188	1,000	0,014
Srodna supstanca C	22,5	4,25	30	12,5	36,11	265,761	2,8527	-3,41426	-5,204	-0,11	-0,066	Trening	1,641	1,235	0,030
Srodna supstanca C	20	5	35	10	36,11	264,757	2,8527	-3,386	-5,33	-0,11	-0,15	Trening	1,907	2,170	0,019
Risperidon	20	2	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	1,000	1,239	0,018
Risperidon	17,5	2,75	30	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	2,463	2,071	0,029
Risperidon	22,5	2,75	30	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Test	1,716	1,271	0,033
Risperidon	17,5	2,75	40	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Validacija	2,129	2,381	0,019
Risperidon	22,5	2,75	40	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	1,695	1,340	0,026
Risperidon	17,5	2,75	30	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	2,893	3,019	0,009
Risperidon	22,5	2,75	30	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	1,071	0,838	0,017
Risperidon	17,5	2,75	40	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	3,110	2,985	0,009
Risperidon	22,5	2,75	40	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	1,100	0,924	0,013
Risperidon	20	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	3,091	2,721	0,027
Risperidon	20	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	3,123	2,721	0,030
Risperidon	20	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Validacija	3,152	2,721	0,032
Risperidon	20	3,5	45	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Validacija	1,750	2,691	0,069

Supstanca	ACN (%)	pH	Temp . (°C)	β -CD (mM)	POL	SEV	LOGP	DEN	BE	EE	UE	Set podataka	k(exp)	k(ANN)	Greška
Risperidon	20	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	3,145	2,721	0,031
Risperidon	20	3,5	35	5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	2,692	2,713	0,002
Risperidon	15	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	5,990	6,112	0,009
Risperidon	20	3,5	35	15	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	3,638	4,095	0,034
Risperidon	20	3,5	25	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	2,742	2,634	0,008
Risperidon	20	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Test	3,058	2,721	0,025
Risperidon	20	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Validacija	3,134	2,721	0,031
Risperidon	25	3,5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Test	1,118	1,294	0,013
Risperidon	17,5	4,25	40	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Validacija	6,625	6,092	0,039
Risperidon	17,5	4,25	40	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	6,844	6,627	0,016
Risperidon	17,5	4,25	30	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	7,156	6,865	0,022
Risperidon	22,5	4,25	30	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	2,772	3,082	0,023
Risperidon	22,5	4,25	40	7,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	3,276	3,015	0,019
Risperidon	22,5	4,25	40	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	6,239	5,805	0,032
Risperidon	17,5	4,25	30	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	5,726	5,543	0,013
Risperidon	22,5	4,25	30	12,5	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Test	5,881	5,472	0,030
Risperidon	20	5	35	10	42,95	345,512	2,71	-5,47	-5,25	-0,09	-1,12	Trening	8,216	8,125	0,007
Srodna supstanca 1	20	2	35	10	45,33	352,732	2,7	-9,4168	-5,37	-0,02	-3,17	Trening	1,736	1,564	0,013
Srodna supstanca 1	17,5	2,75	30	12,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Trening	3,990	4,054	0,005
Srodna supstanca 1	22,5	2,75	30	12,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Trening	2,588	2,326	0,019
Srodna supstanca 1	17,5	2,75	40	12,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Trening	4,548	4,384	0,012
Srodna supstanca 1	22,5	2,75	40	12,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Trening	2,458	2,493	0,003
Srodna supstanca 1	17,5	2,75	30	7,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Validacija	6,558	6,556	0,000
Srodna supstanca 1	22,5	2,75	30	7,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Validacija	1,735	1,312	0,031
Srodna supstanca 1	17,5	2,75	40	7,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Trening	6,463	6,368	0,007
Srodna supstanca 1	22,5	2,75	40	7,5	45,33	352,561	2,7	-7,96116	-5,1188	-0,0763	-2,5175	Trening	1,680	1,408	0,020
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Test	4,994	4,475	0,038
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Trening	5,020	4,475	0,040
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Trening	5,035	4,475	0,041
Srodna supstanca 1	20	3,5	45	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Trening	2,767	4,145	0,102
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Test	5,125	4,475	0,048
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	5	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Trening	5,389	5,162	0,017
Srodna supstanca 1	15	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Test	10,679	11,854	0,087
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	15	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Trening	7,440	6,978	0,034
Srodna supstanca 1	20	3,5	25	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Trening	4,556	4,731	0,013

Supstanca	ACN (%)	pH	Temp . (°C)	β-CD (mM)	POL	SEV	LOGP	DEN	BE	EE	UE	Set podataka	k(exp)	k(ANN)	Greška
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Trening	5,099	4,475	0,046
Srodna supstanca 1	20	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Test	5,100	4,475	0,046
Srodna supstanca 1	25	3,5	35	10	45,33	352,384	2,7	-6,45118	-4,8581	-0,1346	-1,8406	Validacija	1,412	2,256	0,062
Srodna supstanca 1	17,5	4,25	40	12,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Trening	7,039	7,048	0,001
Srodna supstanca 1	17,5	4,25	40	7,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Trening	11,109	11,064	0,003
Srodna supstanca 1	17,5	4,25	30	7,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Validacija	12,255	11,994	0,019
Srodna supstanca 1	22,5	4,25	30	7,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Trening	4,341	4,342	0,000
Srodna supstanca 1	22,5	4,25	40	7,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Trening	4,639	3,923	0,053
Srodna supstanca 1	22,5	4,25	40	12,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Validacija	7,709	7,688	0,002
Srodna supstanca 1	17,5	4,25	30	12,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Trening	7,461	7,103	0,026
Srodna supstanca 1	22,5	4,25	30	12,5	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Trening	7,674	7,618	0,004
Srodna supstanca 1	20	5	35	10	45,33	352,277	2,7	-5,5351	-4,7	-0,17	-1,43	Trening	9,123	9,113	0,001
Srodna supstanca 2	20	2	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Validacija	0,679	0,834	0,011
Srodna supstanca 2	17,5	2,75	30	12,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,695	1,424	0,020
Srodna supstanca 2	22,5	2,75	30	12,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,057	0,932	0,009
Srodna supstanca 2	17,5	2,75	40	12,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,359	1,606	0,018
Srodna supstanca 2	22,5	2,75	40	12,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,052	0,774	0,021
Srodna supstanca 2	17,5	2,75	30	7,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,972	2,006	0,002
Srodna supstanca 2	22,5	2,75	30	7,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	0,597	0,442	0,011
Srodna supstanca 2	17,5	2,75	40	7,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	2,087	1,856	0,017
Srodna supstanca 2	22,5	2,75	40	7,5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	0,620	0,354	0,020
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,908	1,857	0,004
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	2,120	1,857	0,019
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Test	2,095	1,857	0,018
Srodna supstanca 2	20	3,5	45	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,036	1,548	0,038
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	2,115	1,857	0,019
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	5	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	1,943	1,624	0,024
Srodna supstanca 2	15	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	3,608	3,709	0,007
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	15	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Validacija	2,817	3,030	0,016
Srodna supstanca 2	20	3,5	25	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Validacija	1,587	2,058	0,035
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	2,035	1,857	0,013
Srodna supstanca 2	20	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	2,066	1,857	0,015
Srodna supstanca 2	25	3,5	35	10	45,93	356,195	3,323	-6,9841	-5,19	-0,14	-1,07	Trening	0,730	0,511	0,016
Srodna supstanca 2	17,5	4,25	40	12,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Trening	4,252	3,720	0,039
Srodna supstanca 2	17,5	4,25	40	7,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Trening	3,979	3,893	0,006

Supstanca	ACN (%)	pH	Temp . (°C)	β -CD (mM)	POL	SEV	LOGP	DEN	BE	EE	UE	Set podataka	k(exp)	k(ANN)	Greška
Srodna supstanca 2	17,5	4,25	30	7,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Test	4,232	4,281	0,004
Srodna supstanca 2	22,5	4,25	30	7,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Trening	1,609	1,841	0,017
Srodna supstanca 2	22,5	4,25	40	7,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Trening	1,889	1,498	0,029
Srodna supstanca 2	22,5	4,25	40	12,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Trening	3,961	3,596	0,027
Srodna supstanca 2	17,5	4,25	30	12,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Test	3,480	3,464	0,001
Srodna supstanca 2	22,5	4,25	30	12,5	45,93	355,925	3,323	-6,97743	-5,0496	-0,134	-1,118	Trening	3,620	3,717	0,007
Srodna supstanca 2	20	5	35	10	45,93	355,272	3,323	-6,9613	-4,7103	-0,1195	-1,234	Trening	4,601	4,531	0,005
Srodna supstanca 3	20	2	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Test	0,769	1,118	0,026
Srodna supstanca 3	17,5	2,75	30	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	1,859	1,649	0,016
Srodna supstanca 3	22,5	2,75	30	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	1,343	1,224	0,009
Srodna supstanca 3	17,5	2,75	40	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	2,118	1,904	0,016
Srodna supstanca 3	22,5	2,75	40	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	1,339	1,214	0,009
Srodna supstanca 3	17,5	2,75	30	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	2,845	2,803	0,003
Srodna supstanca 3	22,5	2,75	30	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	0,794	0,731	0,005
Srodna supstanca 3	17,5	2,75	40	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Validacija	2,956	2,738	0,016
Srodna supstanca 3	22,5	2,75	40	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	0,811	0,803	0,001
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Test	2,706	2,281	0,031
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	2,750	2,281	0,035
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	2,690	2,281	0,030
Srodna supstanca 3	20	3,5	45	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Test	1,509	2,168	0,049
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Validacija	2,680	2,281	0,029
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Test	2,715	2,568	0,011
Srodna supstanca 3	15	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	5,408	5,025	0,028
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	15	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	4,266	3,799	0,034
Srodna supstanca 3	20	3,5	25	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	2,320	2,361	0,003
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Test	2,739	2,281	0,034
Srodna supstanca 3	20	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Test	2,717	2,281	0,032
Srodna supstanca 3	25	3,5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Test	0,606	1,075	0,035
Srodna supstanca 3	17,5	4,25	40	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	4,442	4,264	0,013
Srodna supstanca 3	17,5	4,25	40	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	5,990	6,058	0,005
Srodna supstanca 3	17,5	4,25	30	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	6,273	6,369	0,007
Srodna supstanca 3	22,5	4,25	30	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	2,329	2,557	0,017
Srodna supstanca 3	22,5	4,25	40	7,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	2,708	2,488	0,016
Srodna supstanca 3	22,5	4,25	40	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	5,127	5,153	0,002
Srodna supstanca 3	17,5	4,25	30	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	3,059	3,823	0,056

Supstanca	ACN (%)	pH	Temp . (°C)	β -CD (mM)	POL	SEV	LOGP	DEN	BE	EE	UE	Set podataka	k(exp)	k(ANN)	Greška
Srodna supstanca 3	22,5	4,25	30	12,5	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	4,907	4,963	0,004
Srodna supstanca 3	20	5	35	10	44,56	342,341	3,5038	-7,6135	-5,45	-0,15	-1,9	Trening	7,102	6,471	0,047



Slika 11: Slaganje između eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionog faktora ($k(\text{exp})$) i vrednosti izračunatih ili predviđenih ANN ($k(\text{ANN})$) (prilagođeno iz [29])

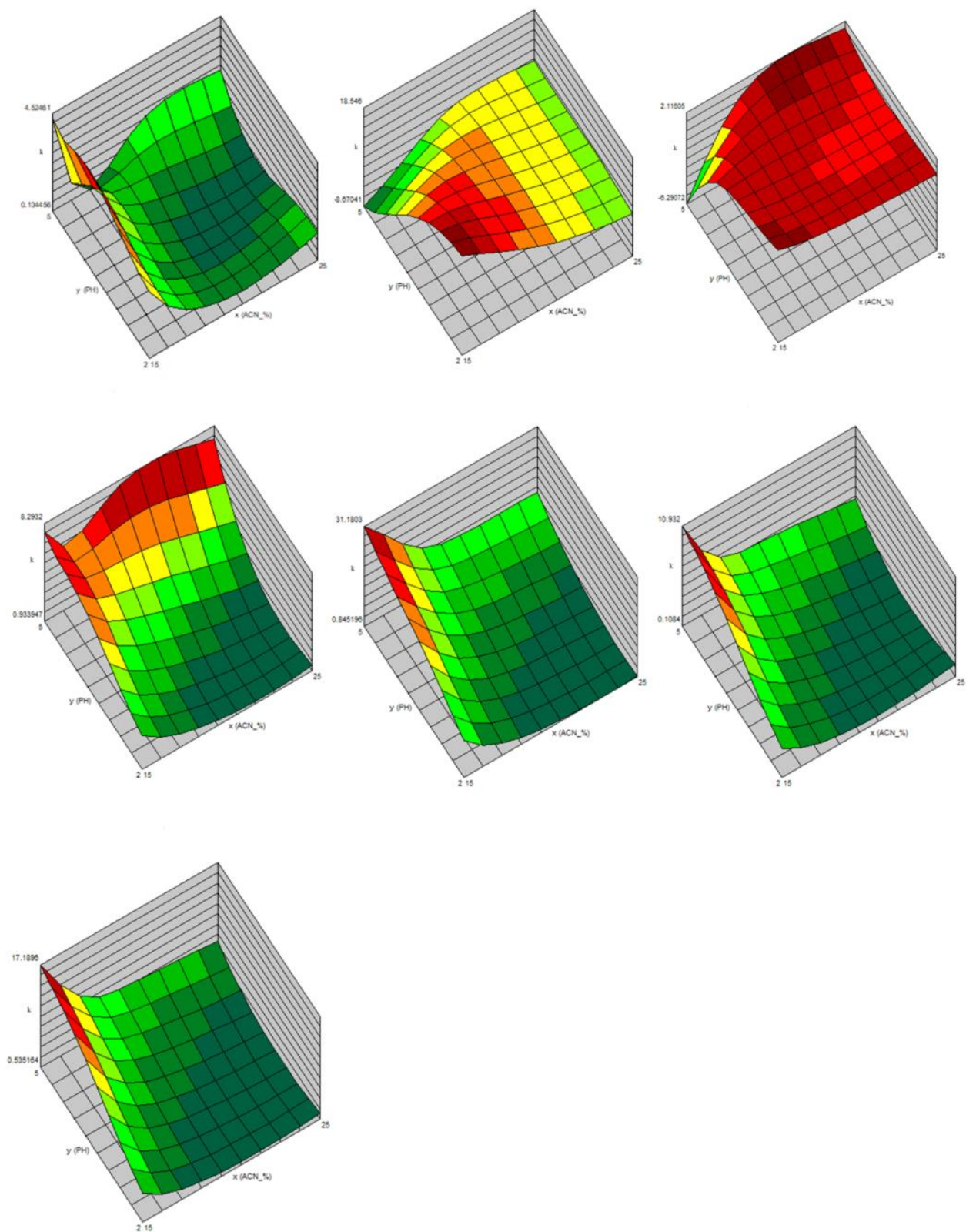
4.2.4 Razvoj ekološki prihvatljivih metoda tačne hromatografije za razdvajanje odabranih model supstanci

Postavljen QSRR-ANN model uspešno je primenjen u optimizaciji hromatografskih uslova za razdvajanje odabranih model supstanci putem metodologije površine odgovora (eng. *Response surface methodology*). Cilj optimizacije je bio da se postigne optimalna rezolucija između pikova koji se sledstveno eluiraju, kao vrednosti retencionog faktora olanzapina i srodne supstance C, kao supstanci koje se najkraće zadržavaju na koloni, iznad 1. Grafici površine odgovora zavisnosti retencionog faktora olanzapina, risperidona i srodnih supstanci predviđenog QSRR-ANN modelom, od dva najznačajnija eksperimentalna parametra – udela acetonitrila u mobilnoj fazi (% v/v) i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze su predstavljeni na Slici 13.

Predviđene vrednosti retencionog faktora olanzapina su rasle sa smanjenjem udela acetonitrila i povećanjem pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (Slika 12a). Retencioni faktor srodne supstance C je pratio isti trend ponašanja kao i retencioni faktor olanzapina (Slika 12c), dok je retencioni faktor srodne supstance B opadao sa porastom udela acetonitrila, nezavisno od pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (Slika 12b). Grešku mreže treba uvek uzeti u obzir prilikom izbora opsega faktora koji zadovoljavaju zadate kriterijume. Optimalna kombinacija faktora mora da proizvede rešenje sa boljim performansama od onih koje su podešene kao minimum prihvatljivosti.

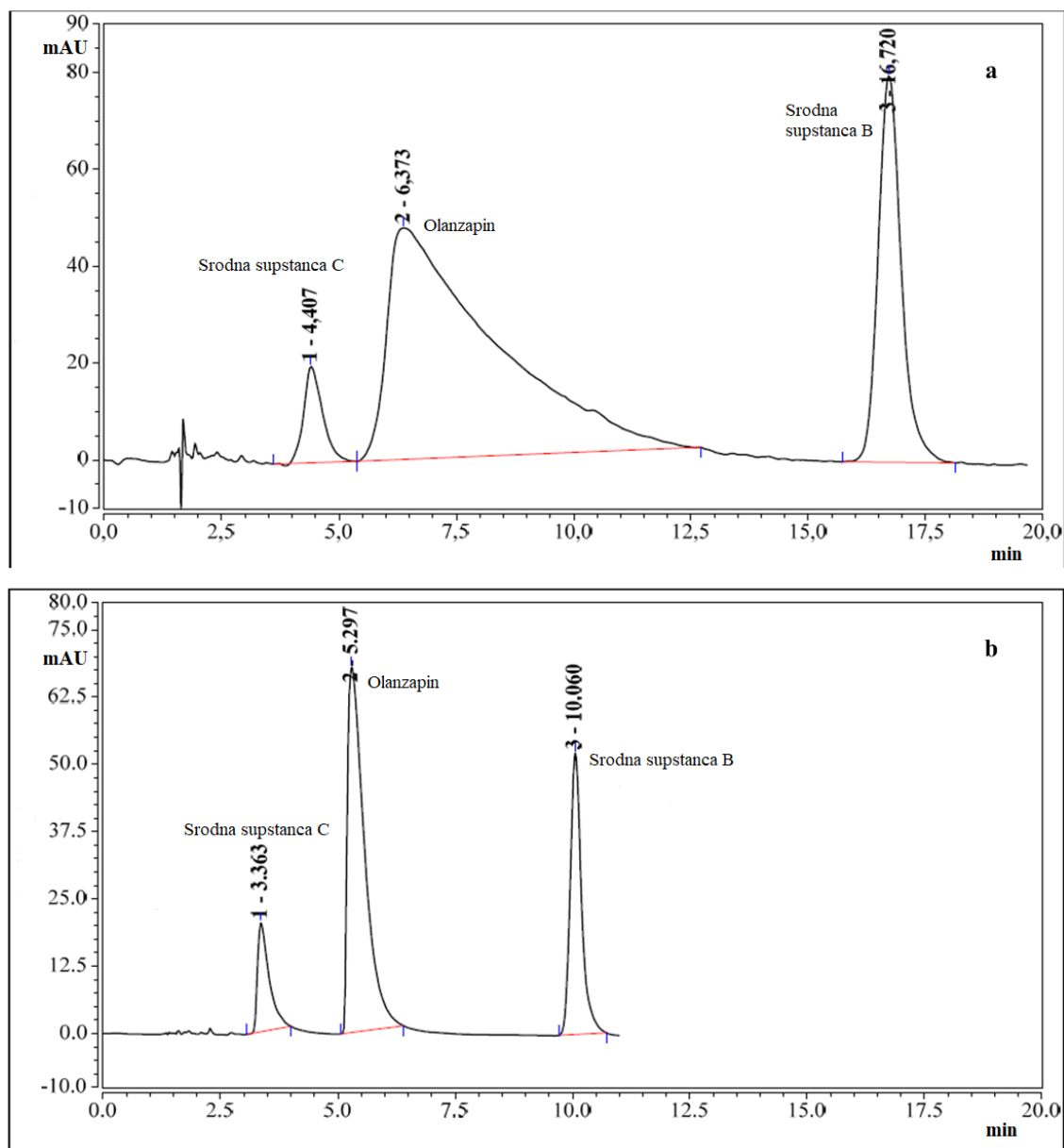
Nakon detaljne analize površina odgovora koje pokrivaju opseg pH vrednosti od 2,00 do 5,00 i udela acetonitrila u mobilnoj fazi od 15% do 25% (v/v), optimalna kombinacija faktora koja dovodi do razdvajanja pikova i postizanja $k > 1$ za olanzapin i srodnu supstancu C, kao i što nižih vrednosti k za srodnu supstancu B je sledeća: 22% acetonitrila u mobilnoj fazi (v/v), pH vodenog dela mobilne faze 5,00, temperatura kolone 35 °C i koncentracija β -CD-a u vodenom delu mobilne faze 10 mM.

Za risperidon i srodne supstance, QSRR-ANN model je takođe korišćen za optimizaciju hromatografske metode, kako bi se postigla optimalna rezolucija između susednih pikova. 3D grafici površine odgovora zavisnosti ANN predviđenih retencionih faktora od udela acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze za sve ispitivane supstance su prikazani na Slici 12. Analiziranjem konstruisanih 3D površina odgovora uočava se da sledeća kombinacija faktora dovodi do optimalne rezolucije pikova koji se blisko eluiraju: 17,5 % acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze 2,40, temperatura kolone 35 °C i koncentracija β -CD u mobilnoj fazi 10 mM.



Slika 12: 3D grafici površine odgovora retencionog faktora predviđenog QSRR-ANN modelom u zavisnosti od udela acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze: a) Olanzapina; b) Srodne supstance B; c) Srodne supstance C; d) Risperidona; e) Srodne supstance 1; f) Srodne supstance 2; g) Srodne supstance 3 (prilagođeno iz [29])

Reprezentativni hromatogram olanzapina i srodnih supstanci dobijen primenom β -CD-modifikovane RP-HPLC metode upoređen je sa hromatogramom koji se dobija pri istim eksperimentalnim uslovima, ali bez prisustva β -CD-a u mobilnoj fazi (Slika 13a, 13b).

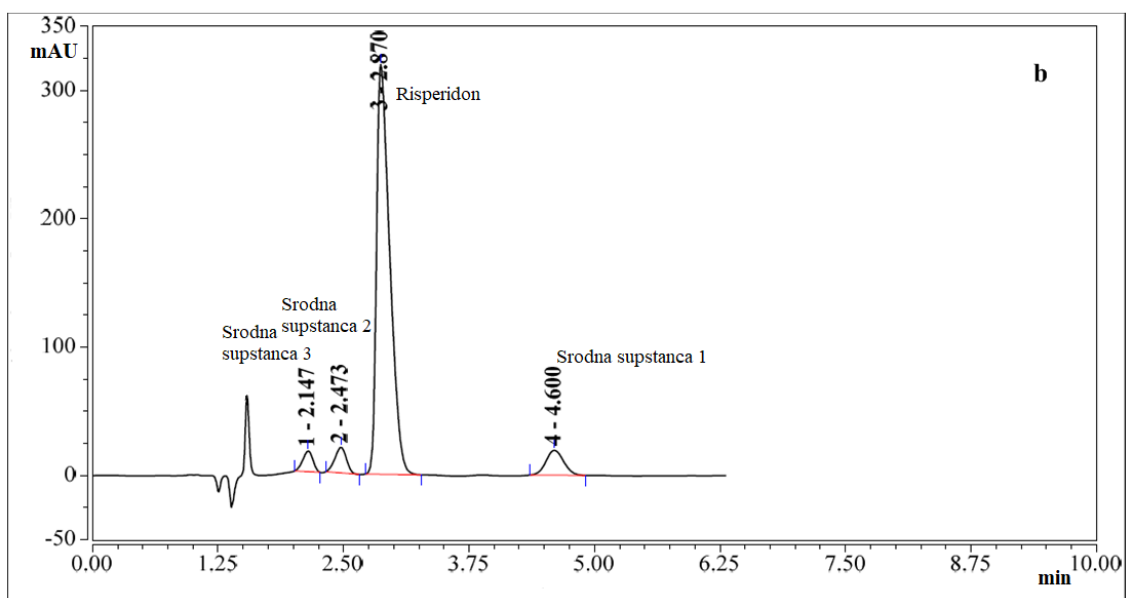
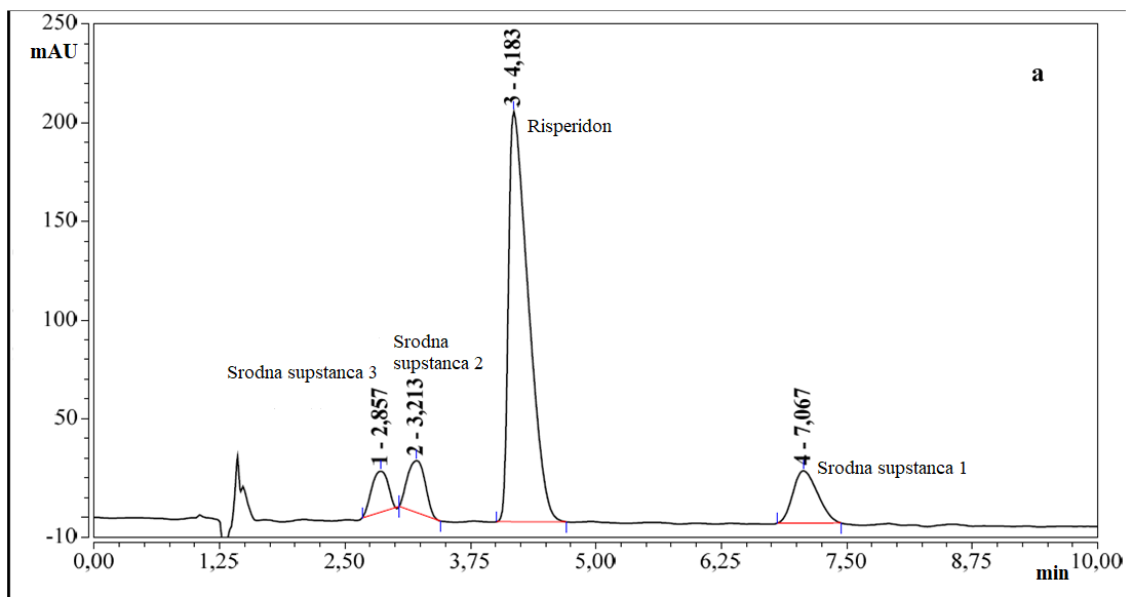


Slika 13: Hromatogram olanzapina i srodnih supstanci dobijen sa 22% (v/v) acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodene faze 5,0 i 35 °C temperaturom kolone (a) i hromatogram olanzapina i srodnih supstanci dobijen sa 22% (v/v) acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodene faze 5,0, 35 °C temperaturom kolone i 10 mM koncentracijom β -CD u vodenom delu mobilne faze (b) (prilagođeno iz [29])

Primećuje se da su retencionna vremena olanzapina i srodnih supstanci bila kraća kada je β -CD dodat u mobilnu fazu. Rezultati molekulske doking studije pokazuju da u slučaju olanzapina i srodnih supstanci benzodiazepinski deo strukture ulazi u β -CD-sku šupljinu, dok polarniji deo strukture ostaje slobodan za interakcije sa stacionarnom fazom (Slika 8f – k). Iz tog razloga je skraćenje retencionog vremena olanzapina i srodnih supstanci nakon kompleksiranja sa β -CD-om očekivano. Prethodno je rečeno da je srodna supstanca B prisutna u svojoj nejonizovanoj formi u ispitivanom opsegu pH vrednosti, pa se shodno tome duže zadržava na stacionarnoj fazi u odnosu na jonizovane forme olanzapina i srodne supstance C. Dodatkom β -CD-a u mobilnu fazu ukupno vreme trajanja

hromatografske analize je skraćeno sa 18,0 minuta na 10,0 minuta. pH vrednost vodenog dela mobilne faze je podešena na 5,00, kako bi vrednosti retencionog faktora olanzapina i srodne supstance C bile veća od 1. Sa druge strane, ova vrednost pH nije idealno rešenje, jer je olanzapin delimično u svom katjonskom, a delimično u dikatjonskom obliku, pa dolazi do razvlačenja pika pri njegovom kraju usled sekundarnih interakcija sa stacionarnom fazom (eng. *peak tailing*). Dodatak β -CD-a u mobilnu fazu je takođe uticao i na poboljšanje oblika pika, što potvrđuje literaturno opisanu činjenicu da CD neće smanjiti efikasnost RP-HPLC metode, već upravo suprotno.

Reprezentativni hromatogrami risperidona i srodnih supstanci, sa i bez prisustva β -CD-a u mobilnoj fazi, dobijeni su pri istim ostalim eksperimentalnim uslovima i upoređeni (Slika 14a, 14b). Uočava se veće skraćenje retencionog vremena risperidona i srodne supstance 1 usled dodatka β -CD-a u mobilnu fazu u odnosu na srodnu supstancu 2 i srodnu supstancu 3. Primenom optimizovane RP-HPLC metode ukupno vreme trajanja analize je skraćeno za približno 3 minuta, dok je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi iznosio samo 17,5% (v,v). Kada se analiziraju hromatogrami dobijeni sa i bez prisustva β -CD-a u mobilnoj fazi, evidentna je razlika u retencionim vremenima ispitivanih supstanci, čime se potvrđuje uticaj kompleksiranja na retenciono ponašanje. Optimizovane ekološki prihvatljive β -CD-modifikovane RP-HPLC metode omogućile su uspešno razdvajanje svih pikova u kraćem vremenskom periodu u odnosu na klasičnu RP-HPLC metodu, pri istim uslovima i sa relativnom manjim udelom acetonitrila u mobilnoj fazi.



Slika 14: Hromatogram risperidona i srodnih supstanci sa 17,5% (v/v) acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodene faze 2,4 i 35 °C temperaturom kolone (a) i hromatogram risperidona i srodnih supstanci sa 17,5% (v/v) acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodene faze 2,4, 35 °C temperaturom kolone i 10 mM koncentracijom β -CD u vodenom delu mobilne faze (b) (prilagođeno iz [29])

4.2.4.1 Validacija razvijenih ekološki prihvatljivih β -CD-modifikovanih RP-HPLC metoda za razdvajanje risperidona i srodnih supstanci, kao i olanzapina i srodnih supstanci

Kako su razvijene metode namenjene za upotrebu u proceni kvaliteta farmaceutskih proizvoda, validirane su prema ICH Q2 (R1) smernicama [184]. Analiziranjem rastvora pripremljenih od tableta nisu uočeni interferirajući pikovi na retencionim vremenima ispitivanih supstanci. Dodatno, čistoća pikova ispitivanih supstanci je 99,0%, čime je potvrđena selektivnost metode. LOD i LOQ za sve srodne supstance su određeni na osnovu pristupa određivanja odnosa signala i šuma (eng. *Signal-to-Noise* – S/N). S/N odnos 3:1 i 10:1 su generalno prihvaćeni za procenu LOD i LOQ, redom. Određene vrednosti LOD i LOQ za sve ispitivane srodne supstance su prikazane u Tabeli 10. Predložene LOQ vrednosti su potvrđene sa odgovarajućom RSD (%) vrednošću, koja treba da bude ispod 10%, iz 10 ponavljanja, za svaku srodnu supstancu. Na ovaj način se postiže prihvatljiva osetljivost predloženih metoda i određuju se koncentracije prvih kalibracionih standarda. Predloženi koncentracioni opsezi za olanzapin, risperidon i srodne supstance bili su u linearnom odnosu sa površinama pikova, što je prikazano izračunatim regresionim parametrima. Regresioni parametri su bili u saglasnosti sa kriterijumima prihvatljivosti za linearnost i ovi rezultati su predstavljeni u Tabeli 10.

Sadržaj risperidona u Rissar® tabletama je određen i iznosio je 99,87% ($299,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Takođe određen je i sadržaj srodnih supstanci, koji je iznosio 0,07% ($0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$) za srodnu supstancu 1, 0,05% ($0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$) za srodnu supstancu 2 i 0,05% ($0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$) za srodnu supstancu 3. Sadržaj olanzapina u Sizap® tabletama je iznosio 100,5% ($502,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok je sadržaj srodne supstance B bio 0,05% ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), a pik srodne supstance C nije detektovan. Tačnost razvijenih metoda je procenjena prema dobijen *recovery* vrednostima, koje su bile u okviru opsega prihvatljivosti (98,0% - 102,0% za aktivnu supstancu i 70,0% - 130,0% za srodne supstance sa 0,5% limitom specifikacije) [184, 185]. Tačnost metode je procenjena na tri koncentraciona nivoa, kao što je predstavljeno u Tabeli 10. Preciznost metode je procenjena izračunavanjem RSD (%) na tri koncentraciona nivoa, za svaku ispitivanu supstancu. Prikazane vrednosti RSD zadovoljavaju sledeće kriterijume: $\text{RSD} \leq 2,0\%$ za aktivnu supstancu i $\text{RSD} \leq 15,0\%$ za srodne supstance sa limitom specifikacije od 0,5% [184, 185]. Potvrđena je stabilnost rastvora risperidona i srodnih supstanci 48 h na sobnoj temperaturi. Rastvori olanzapina i srodnih supstanci su zbog fotosenzitivnosti čuvani zaštićeni od svetlosti i takođe su bili stabilni 48 h na sobnoj temperaturi.

Tabela 10: Validacioni parametri (prilagođeno iz [29])

Supstanca	Linearnost					Tačnost		
	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	a	b	r	Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (R, %)	Preciznost (RSD, %)
Olanzapin	–	250 – 750	0,270	12,590	0,999	400 (80%)	100,80	0,77
						500 (100%)	101,20	0,50
						600 (120%)	100,30	0,70
Srodna supstanca B	0,075	0,25 – 3,00	0,281	0,034	0,996	0,25 (LOQ)	108,60	5,42
						2,50 (100%)	82,95	3,06
						3,00 (120%)	82,00	3,90
Srodna supstanca C	0,075	0,25 – 3,00	0,002	0,009	0,996	0,25 (LOQ)	120,00	1,38
						2,50 (100%)	109,60	4,28
						3,00 (120%)	120,50	3,92
Risperidon	–	150 – 450	0,166	3,608	0,998	240 (80%)	99,00	0,51
						300 (100%)	102,00	0,08
						360 (120%)	100,50	0,12
Srodna supstanca 1	0,075	0,25 – 3,00	0,152	0,004	0,997	0,25 (LOQ)	88,90	4,10
						2,50 (100%)	108,40	3,70
						3,00 (120%)	114,90	1,50
Srodna supstanca 2	0,045	0,15 – 1,80	0,084	0,016	0,995	0,15 (LOQ)	91,00	4,75
						1,50 (100%)	95,60	3,60
						1,80 (120%)	90,50	3,30
Srodna supstanca 3	0,045	0,15 – 1,80	0,214	0,015	0,996	0,15 (LOQ)	102,40	9,40
						1,50 (100%)	95,00	3,10
						1,80 (120%)	95,10	1,20

a – nagib, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacije (prihvatljive vrednosti > 0,99 za aktivnu supstancu, > 0,98 za srodne supstance); *recovery*: 98,0% – 102,0% za aktivnu supstancu, 70,0% – 130,0% za srodne supstance za specifikacionim limitom od 0,5%; RSD: $\leq 2,0\%$ za aktivnu supstancu, $\leq 15,0\%$ za srodne supstance sa specifikacionim limitom od 0,5%

4.2.4.2 Procena ekološke prihvatljivosti razvijenih metoda

Svrha razvoja i primene ekološki prihvatljivih analitičkih metoda je smanjenje i/ili eliminacija upotrebe toksičnih organskih rastvarača i svih ostalih reagenasa sa štetnim efektima. *Galuszka* i saradnici [111] su razvili alat za semikvantitativnu evaluaciju analitičke procedure sa ciljem procene ekološke prihvatljivosti analitičke metode. Predloženi alat je u ovoj studiji upotrebljen za ispitivanje ekološke prihvatljivosti razvijenih metoda za razdvajanje risperidona i srodnih supstanci, kao i olanzapina i srodnih supstanci. Prilikom ispitivanja ekološke prihvatljivosti razvijenih metoda izračunavanjem analitičkog ekološkog skora, izvršena je detaljna procena vrste i količine upotrebljenih reagenasa, utrošene količine energije, stepena opasnosti i količine generisanog otpada. Nakon detaljne procene štetnosti upotrebljenih hemikalija, utrošene energije, kao i produkovanog otpada i dodeljivanja kaznenih poena svakom segmentu analitičke procedure izračunat je analitički ekološki skor za obe razvijene metode. Analitički ekološki skor i njegov način izračunavanja za metodu koja je razvijena za razdvajanje risperidona i srodnih supstanci, kao i metodu za razdvajanje olanzapina i srodnih supstanci je predstavljen u Tabeli 11. Prema vrednostima analitičkog ekološkog skora (92/100) metode za razdvajanje aktivne od srodnih supstanci za risperidon i olanzapin se smatraju odličnim u pogledu ekološke prihvatljivosti.

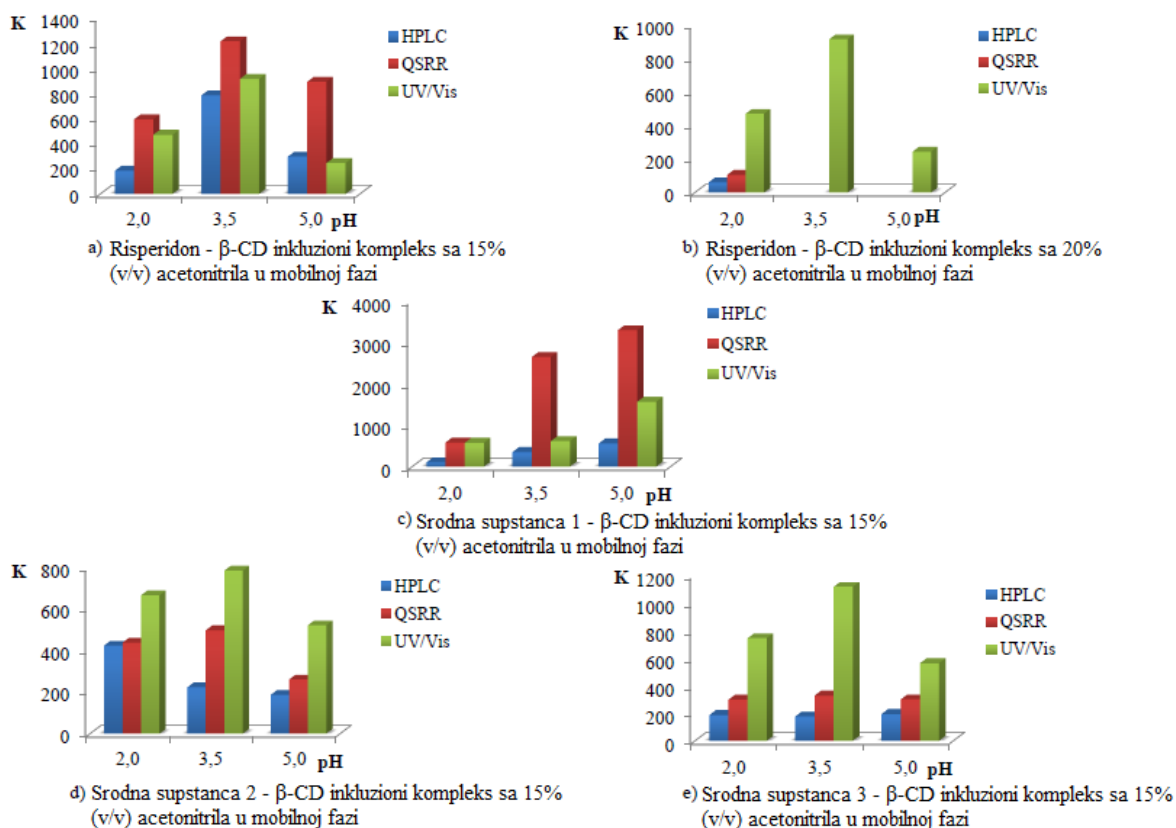
Tabela 11: Procena ekološke prihvatljivosti razvijenih β -CD-modifikovanih RP-HPLC metoda
(prilagođeno iz [29])

Kazneni poeni za metodu za razdvajanje olanzapina i srodnih supstanci	
Reagensi	Kazneni poeni
Acetonitril: 2.2 mL	4
HPLC voda	0
β -CD	0
	$\Sigma = 4$
Instrumenti	
LC	1
UV/Vis spektrofotometar	0
Opasnost pri radu sa hemikalijama i/ili opremom	0
Otpad	3
	$\Sigma = 4$
Ukupni kazneni poeni = 8	
Analitički ekološki skor = 92	
Kazneni poeni za metodu za razdvajanje risperidona i srodnih supstanci	
Reagensi	Kazneni poeni
Acetonitril: 1.225 mL	4
HPLC voda	0
β -CD	0
	$\Sigma = 4$
Instrumenti	
LC	1
UV/Vis spektrofotometar	0
Opasnost pri radu sa hemikalijama i/ili opremom	0
Otpad	3
	$\Sigma = 4$
Ukupni kazneni poeni = 8	
Analitički ekološki skor = 92	

4.3 Primena QSRR-ANN modela u izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa i termodinamičkih parametara kompleksiranja

Klasični QSRR modeli kvantifikuju zavisnost retencije analita od njegovih strukturnih karakteristika, a pored uticaja fizičko-hemijskih osobina poželjno je ispitati i doprinos eksperimentalnih parametara, kao nezavisnih promenljivih, na hromatografsko ponašanje (eng. *Mixed modelling*) [186]. Različiti algoritmi mašinskog učenja, sposobni za rešavanje komplikovanih matematičkih problema, u koje spada i ANN, mogu biti upotrebljeni za građenje QSRR modela [88]. U prethodnom delu istraživanja razvijen je QSRR-ANN model sa dobrim deskriptivnim i prediktivnim osobinama, koji je uspešno primenjen za opisivanje retencionog ponašanja risperidona, olanzapina i njihovih srodnih supstanci u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu [29]. Razvijeni QSRR-ANN model je upotrebljen kako bi se predložio novi *in silico* pristup za određivanje konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa u HPLC. U okviru definisanog eksperimentalnog prostora, vrednosti retencionog faktora za svaku od ispitivanih supstanci su predviđane modelom pri različitim koncentracijama β -CD-a u mobilnoj fazi (0,0 mM, 5,0 mM, 7,5 mM, 10,0 mM, 12,5 mM i 15,0 mM) i temperaturama kolone (25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C). Udeo acetonitrila u mobilnoj fazi je iznosio 15% (v/v) ili 20% (v/v). Opseg variranja udela acetonitrila u mobilnoj fazi je bio relativno uzak, pošto su udeli niži od 15% (v/v) izbegavani kako bi se sprečilo prolongiranje retencionog vremena. Sa druge strane, udeli acetonitrila iznad 20% (v/v) mogu da imaju uticaj na interakcije koje dovode do kompleksiranja. Ukoliko je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi iznad 20% (v/v), retencija će biti predvođena interakcijama acetonitrila sa ispitivanom supstancom, pa može doći do zanemarivanja uticaja kompleksiranja na retenciju.

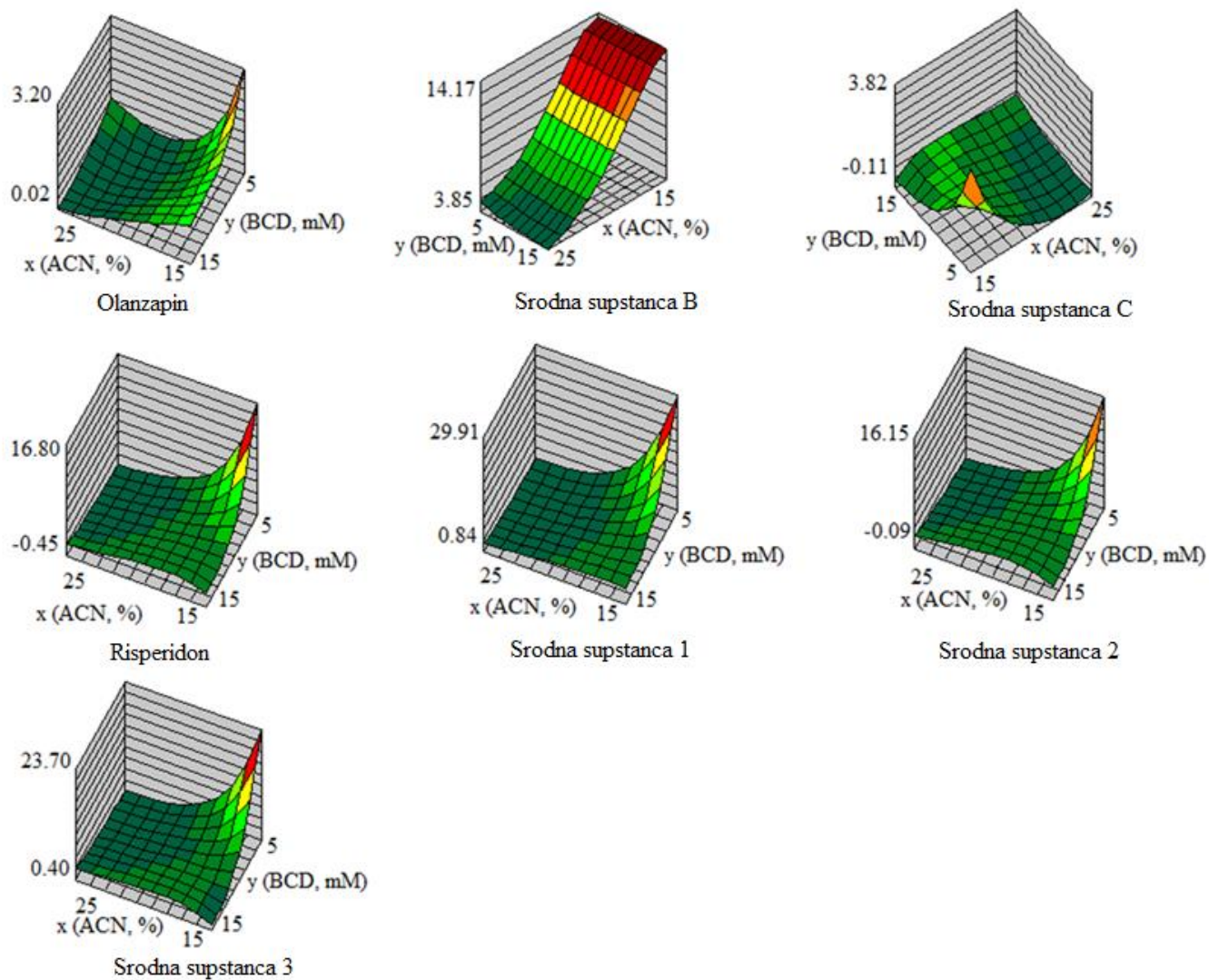
QSRR-ANN model je uspešno predviđao k i k_0 u definisanom eksperimentalnom prostoru, ali nije uvek uočen očekivani pad vrednosti k sa porastom koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi. Posledično, nije bilo moguće izračunati konstante stabilnosti kompleksa za sve supstance pri svim ispitivanim eksperimentalnim uslovima. Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa koje risperidon i srodne supstance formiraju sa β -CD-om su uspešno izračunate uz pomoć QSRR-ANN modela u ispitivanom pH opsegu, pri udelu acetonitrila u mobilnoj fazi od 15% (v/v) (Slika 15a, 15c, 15d i 15e). Međutim, sa porastom koncentracije acetonitrila na 20% (v/v) vrednost k risperidona je opadala sa porastom koncentracije β -CD-a, ukoliko je pH vrednost podešena na 2,0 (Slika 15b), dok je pri drugim pH vrednostima predviđena vrednost k neočekivano rasla, što je onemogućilo izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa. Pri udelu acetonitrila u mobilnoj fazi od 20% (v/v), slično retenciono ponašanje pokazuju i inkluzioni kompleksi koje risperidonove srodne supstance formiraju sa β -CD-om. Vrednosti k rastu sa porastom koncentracije β -CD-a do vrednosti od 10 mM ili veće, što je onemogućilo izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa. Ovaj fenomen se može dovesti u vezu sa strukturom formiranih inkluzionih kompleksa. Međutim, treba uzeti u obzir i mogućnost formiranja sekundarnih interakcija između slobodnih silanolnih grupa stacionarne faze i dela strukture ispitivane supstance koji ostaje izvan šupljine β -CD-a.



Slika 15: Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa određene HPLC eksperimentima, QSRR-ANN modelom i UV/Vis spektrofotometrijom za:

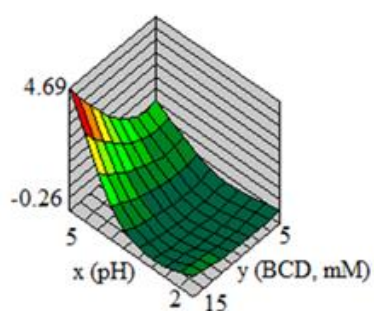
- Risperidon – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 15% (v/v)
- Risperidon – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 20% (v/v)
- Srodna supstanca 1 – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 15% (v/v)
- Srodna supstanca 2 – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 15% (v/v)
- Srodna supstanca 3 – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 15% (v/v) (prilagođeno iz [35])

Inkonzistentnost u retencionom ponašanju u okviru eksperimentalnog prostora u multikomponentnom sistemu, sa više od jednim ekvilibrijumom, zahteva detaljnija objašnjenja. Prema tome, uočeno ponašanje risperidona i srodnih supstanci ilustrovano je graficima površine odgovora, gde je prikazana zavisnost retencionog faktora od udela acetonitrila i koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi (Slika 16), kao i od pH vrednosti vodene faze i koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi (Slika 17). Analiziranjem grafika površine odgovora prikazanog na slici 16, uočava se slično retenciono ponašanje risperidona i srodnih supstanci reflektovano kroz porast retencionog faktora sa smanjenjem koncentracije β -CD-a u ispitivanom opsegu pH vrednosti. Međutim, postoji interakcija između koncentracije β -CD-a i udela acetonitrila u mobilnoj fazi (Slika 17), koja pruža potencijalno objašnjenje porasta retencionog faktora sa koncentracijama β -CD-a od 10 mM i većim.

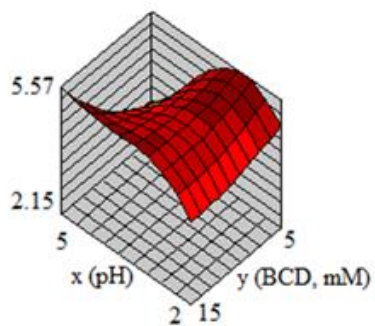


Slika 16: 3D grafici površine odgovora retencionog faktora predviđenog QSRR-ANN modelom u zavisnosti od koncentracije β -CD i udela acetonitrila u mobilnoj fazi:

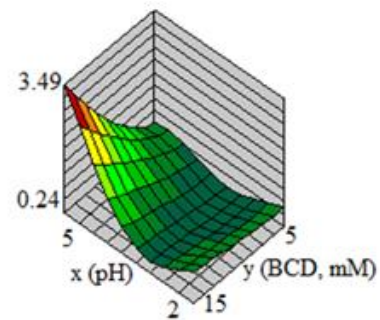
- Olanzapina
 - Srodne supstance B
 - Srodne supstance C
 - Risperidon
 - Srodne supstance 1
 - Srodne supstance 2
 - Srodne supstance 3
- (prilagođeno iz [35])



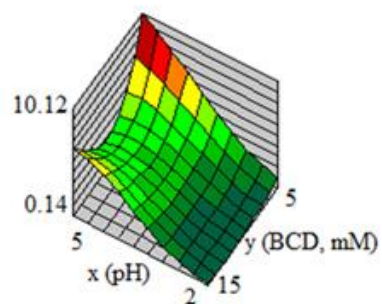
Olanzapin



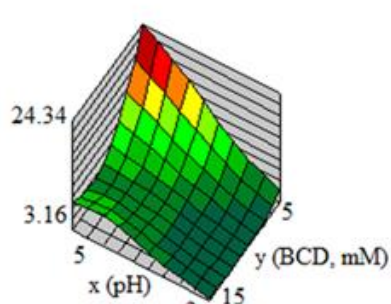
Srodna supstanca B



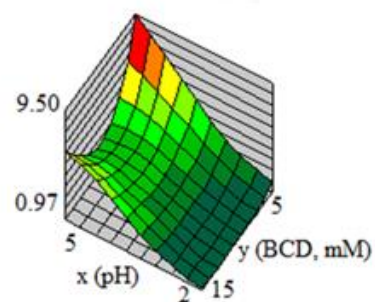
Srodna supstanca C



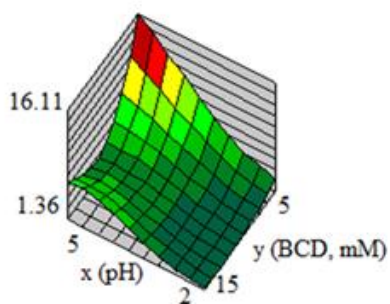
Risperidon



Srodna supstanca 1



Srodna supstanca 2

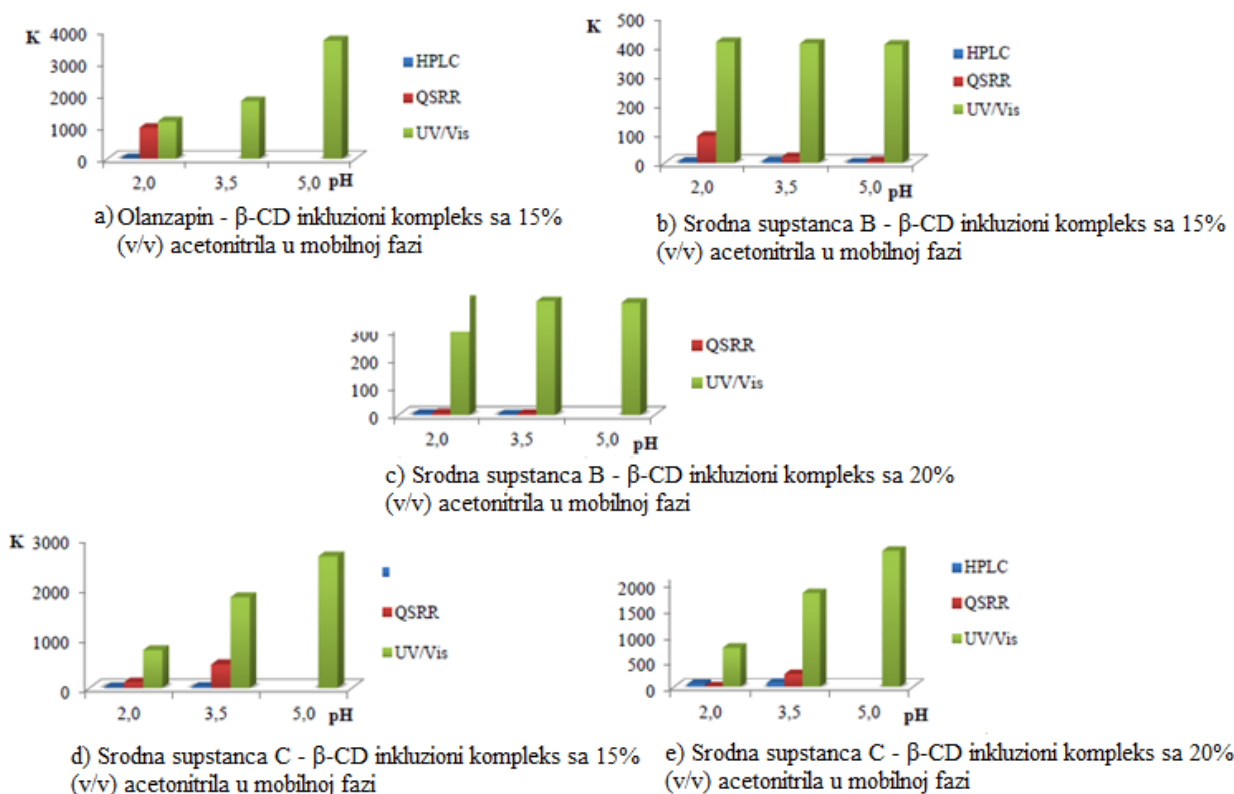


Srodna supstanca 3

Slika 17: 3D grafici površine odgovora retencionog faktora predviđenog QSRR-ANN modelom u zavisnosti od koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze:

- a) Olanzapina
- b) Srodne supstance B
- c) Srodne supstance C
- d) Risperidona
- e) Srodne supstance 1
- f) Srodne supstance 2
- g) Srodne supstance 3
(prilagođeno iz [35])

Kada govorimo o određivanju konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa koji se formiraju između olanzapina i β -CD-a, one se mogu izračunati samo ukoliko je udeo acetonitrila 15% (v/v) i pH vrednost 2,0 (Slika 18a). Eksperimentalni pristup i pristup u kome se promena vrednosti retencionog faktora predviđa QSRR-ANN modelom su omogućili izračunavanje konstante stabilnosti inkluzionog kompleksa samo pri jednoj kombinaciji eksperimentalnih uslova. Iz tog razloga, trend promene vrednosti konstante stabilnosti kompleksa sa promenom eksperimentalnih uslova nije uočen, pa olanzapin nije bio pogodan kandidat za potvrdu pogodnosti predložene metodologije. Kako bi se ovakvo ponašanje olanzapina objasnilo, potrebno je obogatiti set model supstanci sa dodatnim supstancama različitih molekulskih karakteristika. Konstante stabilnosti kompleksa između srodne supstance B i β -CD-a su uspešno izračunate u ispitivanom opsegu pH vrednosti, ukoliko je udeo acetonitrila 15% (v/v) i pri pH vrednostima 2,0 i 3,5 ukoliko je udeo acetonitrila 20% (v/v) (Slika 18b i 18c). 3D grafici površine odgovora pokazuju varijabilno ponašanje srodne supstance B pri različitim pH vrednostima u zavisnosti od koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi, što je neočekivano uzimajući u obzir njenu nejonizovanu formu u celom ispitivanom opsegu pH vrednosti (Slika 16). Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa srodne supstance C i β -CD-a su uspešno izračunate ukoliko je pH vrednost podešena na 2,0 ili 3,5, nezavisno od udela acetonitrila u mobilnoj fazi (Slika 18d i 18e).



Slika 18: Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa određene HPLC eksperimentima, QSRR-ANN modelom i UV/Vis spektrofotometrijom za:

- Olanzapin – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 15% (v/v)
- Srodna supstanca B – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 15% (v/v)
- Srodna supstanca B – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 20% (v/v)
- Srodna supstanca C – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 15% (v/v)
- Srodna supstanca C – β -CD inkluzioni kompleks, ako je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 20% (v/v) (prilagođeno iz [35])

Retenciono ponašanje je generalno u funkciji molekulske strukture ispitivanih supstanci i njenih interakcija sa mobilnom i stacionarnom fazom. Međutim, ukoliko se radi o β -CD-modifikovanim RP-HPLC sistemima, prisutan je i β -CD rastvoren u mobilnoj fazi, koji takođe može da ostvaruje interakcije sa supstancom, mobilnom ili stacionarnom fazom. Proces vezivanja između ispitivane supstance i šupljine β -CD-a uvek predstavlja dinamički ekvilibrijum, koji je uslovljen strukturom ispitivane supstance i korišćenim aditivima i rastvaračima [41]. Od značaja za kompleksiranje je i sterni faktor, koji zavisi od odnosa veličine β -CD-ske šupljine i veličine supstance koja se vezuje za β -CD. Pored komplementarnosti u veličini, potrebna je i određena energetska sila, koja privlači molekule ka šupljini β -CD-a. Inicijalni ekvilibrijum za formiranje kompleksa je brz, traje nekoliko minuta, dok je finalni ekvilibrijum teško dostižan, zbog konformacionih prilagođavanja molekula „gosta“ unutar šupljine β -CD-a. Promene u pH vrednosti mobilne faze mogu značajno da utiču na retenciono ponašanje, jer simultano dovode do promene jonizacione forme ispitivane supstance, kao i slobodnih silanolnih grupa na površini stacionarne faze. Uopšteno, ukoliko promene pH vrednosti dovode do porasta jonizacije, supstance će biti kraće zadržane na stacionarnoj fazi u poređenju sa nejonizovanim supstancama [187]. Dodatno, sekundarne interakcije sa stacionarnom fazom mogu da budu smanjene, usled nejonizovanih slobodnih silanolnih grupa pri pH nižim od 3,0. Prema tome, ukoliko je pH vrednost mobilne faze 2,0, sekundarne interakcije koje supstanca ostvaruje sa

slobodnim silanolnim grupama stacionarne faze su oslabljene, ostavljajući acetonitrilu i β -CD-u da ostvaruju interakcije sa supstancom i odrede da li će retencija biti predvođena kompleksiranjem ili acetonitriplom. Pretpostavlja se da bi ovo mogao biti jedan od razloga mogućnosti izračunavanja konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa svih ispitivanih supstanci pri pH vrednosti 2,0 i udelu acetonitrila 15% (v/v) i većine supstanci ukoliko je udeo acetonitrila 20% (v/v). Razlika u retencionom ponašanju koja nastaje sa promenom udela acetonitrila može se pripisati sposobnosti acetonitrila da uđe u šupljinu β -CD-a istiskujući supstancu, koja je već unutar šupljine i na ovaj način slabeći interakcije koje ta supstanca ostvaruje sa β -CD-skom šupljinom [188]. Ukoliko je pH vrednost 3,5, konstante stabilnosti se mogu izračunati za inkluzione komplekse koje srodna supstanca B i srodne supstanca C grade sa β -CD-om. Za razliku od ostalih supstanci, srodna supstanca B je nejonižovana u ispitivanom opsegu pH vrednosti. Dodatno, postoji komplementarnost između veličine srodne supstance B (dijametar 8 Å) i šupljine β -CD-a (dijametar 7,5 Å), koja podstiče stabilnost kompleksa i omogućava inkorporiranje gotovo čitavog molekula srodne supstance B u šupljinu. Ne postoji idealno poklapanje u dimenzijama srodne supstance C (dijametar 10 Å) i šupljine β -CD-a, međutim različito naelektrisanje srodne supstance C pri promeni pH vrednosti vodene faze omogućava formiranje interakcija sa β -CD-om, koje dodatno stabilizuju inkluzioni kompleks. Ukoliko je pH vrednost podešena na 2,0 ili 3,5, srodna supstanca C je dominantno prisutna u svojoj dikatjonskoj formi i ostvaruje elektrostatičke interakcije sa šupljinom β -CD-a. Očigledno je da dijametar ima važnu ulogu u stabilnosti inkluzionih kompleksa u pogledu uklapanja supstance u šupljinu, ali isto tako je potvrđeno da kod risperidona (dijametar 17,0 Å) i srodnih supstanci (dijametar 17,0 Å, 17,0 Å i 15,0 Å za srodnu supstancu 1, 2 i 3, redom) samo lipofilniji deo strukture ulazi u šupljinu β -CD-a, ne ceo molekul [29]. Prema tome, može se zaključiti da je komplementarnost u dimenzijama ispitivane supstance i šupljine β -CD-a jedan od faktora koji utiču na stabilnost inkluzionih kompleksa, ali ne i vodeći faktor.

Do sada u literaturi nisu pronađene studije u kojima praćenje promene retencionog faktora usled kompleksiranja u HPLC nije dovelo do izračunavanja konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa. Iz tog razloga su sprovedeni HPLC eksperimenti u okviru istog eksperimentalnog prostora, kako bi se potvrdili rezultati dobijeni primenom QSRR-ANN modela. Promena vrednosti k je ispitivana na tri različite pH vrednosti vodenog dela mobilne faze i pri udelu acetonitrila od 15% do 20% (v/v). Na osnovu određene promene vrednosti k do koje dolazi usled kompleksiranja izračunate su konstante stabilnosti formiranih inkluzionih kompleksa. Dobijenim rezultatima potvrđen je isti trend u izračunavanju konstanti stabilnosti kao i kod predviđanja promene k QSRR-ANN modelom (Slika 16 i 19). Iako konstante stabilnosti kompleksa nisu izračunate u celom ispitivanom eksperimentalnom opsegu, to ne znači da inkluzioni kompleksi između ispitivanih supstanci i β -CD-a nisu formirani. Formiranje inkluzionih kompleksa je potvrđeno masenom spektrometrijom prilikom određivanja njihove stehiometrije. Međutim, u cilju dodatne potvrde pretpostavke da konstante stabilnosti kompleksa nisu izračunate pri svim eksperimentalnim uslovima zbog karakteristika hromatografskog sistema, one su određene i UV/Vis spektrofotometrijom, koja predstavlja jednostavnu, jeftinu i efikasnu metodu za potvrdu formiranja inkluzionih kompleksa. Razlika u apsorbciji slobodne i supstance u kompleksu pokazuje da je došlo do kompleksiranja i služi za izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa. Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa su određene u istom opsegu pH vrednosti u kom su izvođeni i HPLC eksperimenti i izračunate pomoću *Benesi-Hildebrand* jednačine (13). Grafički je prikazano da vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa dobijene primenom UV/Vis spektrofotometrije pokazuju isti trend ponašanja kao i vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa koje su dobijene HPLC eksperimentima ili QSRR-ANN

modelom (Slika 16 i 19). Stehiometrijski odnos supstance i β -CD-a u kompleksu, kao i numeričke vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa treba da budu nezavisni od metodologije koja je primenjena za određivanje, ali se takva situacija u praksi retko uočava. *Lofsson* i saradnici su prijavili značajne razlike u vrednostima konstanti stabilnosti kompleksa dobijenih fluorimetrijskim i potenciometrijskim pristupom. Takođe, varijabilnosti su uočene između vrednosti konstanti stabilnosti, koje su dobijene UV/Vis spektrofotometrijom, cirkularnim dihiroizmom, HPLC i studijama rastvorljivosti [34]. *Cirri* i saradnici su takođe upoređivali različite tehnike za određivanje konstante stabilnosti kompleksa i potvrdili varijabilnost između tehnike propustljivosti membrana, molekuskog modelovanja i afinitetne kapilarne elektroforeze [189]. U ovoj studiji se uočava da vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa dobijene HPLC eksperimentima, QSRR-ANN modelom i UV/Vis spektrofotometrijom nemaju u potpunosti iste vrednosti, što je opravdano upotrebom različitih tehnika. Međutim, važno je naglasiti da vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa dobijene različitim pristupima prate isti trend. Primećena variranja u vrednostima konstanti stabilnosti mogu biti posledica primene različitih eksperimentalnih tehnika i vrednosti bi bile u potpunosti iste samo pod idealnim uslovima [34, 47, 189, 190].

Kako bi se obezbedile dodatne informacije o dinamici procesa kompleksiranja, izračunati su termodinamički parametri, pri svim onim eksperimentalnim uslovima koji su dozvoljavali određivanje konstante stabilnosti i variranjem temperature u opsegu od 25 °C do 40 °C. Proces formiranja inkluzionog kompleksa risperidona sa β -CD-om je udružen sa negativnim vrednostima ΔS° i veoma negativnim vrednostima ΔH° . Negativne vrednosti ΔS° ne idu u prilog formiranju kompleksa, jer ukazuju na porast vodoničnih veza, koje doprinose nestabilnosti inkluzionih kompleksa. Međutim, one su nadjačane više negativnim vrednostima ΔH° , koje predstavljaju porast van der Valsovih veza između šupljine β -CD-a i lipofilnijeg dela strukture risperidona. U pogledu ΔS° i ΔH° vrednosti, srodne supstance risperidona se slično ponašaju prilikom procesa formiranja kompleksa. Jedini izuzetak su pozitivne vrednosti ΔH° udružene sa negativnim vrednostima ΔS° za srodnu supstancu 3, ukoliko su eksperimentalni uslovi takvi da podrazumevaju 15% (v/v) acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednost vodenog dela mobilne faze 5,0. Ovakve vrednosti ΔH° i ΔS° ukazuju na to da je proces formiranja kompleksa između srodne supstance 3 i β -CD-a vođen entropijom. Naime, visoko negativne vrednosti ΔS° mogu da se pripisuju intermolekulskim vodoničnim vezama [59]. Kod olanzapina, i ΔS° i ΔH° vrednosti su negativne, sa negativnijim vrednostima ΔH° , koje ovaj proces kompleksiranja klasifikuju kao vođen entalpijom. ΔG° vrednosti su takođe negativne, što ukazuje na spontanost procesa kompleksiranja. Proces formiranja kompleksa između srodne supstance B i β -CD-a, kao i srodne supstance C i β -CD-a je udružen sa veoma negativnim vrednostima ΔH° i pozitivnim vrednostima ΔS° , što govori o dobrom uklapanju ovih supstanci u šupljinu β -CD-a, sa veoma malo ili bez vodoničnih veza, koje destabilizuju inkluzioni kompleks. Vrednosti termodinamičkih parametara za svaku od ispitivanih supstanci su predstavljene u Tabeli 12. Uočava se da pri određenim uslovima ΔH° i ΔS° nisu određene, iako je konstanta stabilnosti kompleksa izračunata pri temperaturi od 25 °C. Razlog se pronalazi u neočekivanom retencionom ponašanju sa porastom temperature od 25 °C do 40 °C, koje je već uočeno u ovakvim hromatografskim sistemima i predstavljeno u literaturi [191].

Tabela 12: Termodinamički parametri kompleksiranja određeni za inkluzione komplekse koje ispitivane supstance formiraju sa β -CD-om (prilagođeno iz [35])

Supstanca	15% (v/v) ACN				20% (v/v) ACN			
	Stehiometrija	pH	ΔH°	ΔS°	Stehiometrija	pH	ΔH°	ΔS°
Risperidon	1:1	2	-536,33	-73,84	1:1	2,0	-215,57	-45,74
	1:1	3,5	-477,58	-77,47	1:1	3,5	N/A	N/A
	1:1	5	-140,96	-61,98	1:1	5,0	N/A	N/A
Srodna supstanca 1	1:1	2	-311,46	-68,40	1:1	2,0	N/A	N/A
	1:1	3,5	N/A	N/A	1:1	3,5	N/A	N/A
	1:1	5	N/A	N/A	1:1	5,0	N/A	N/A
Srodna supstanca 2	1:1	2	-842,85	-83,19	1:1	2,0	N/A	N/A
	1:1	3,5	-241,41	-61,08	1:1	3,5	N/A	N/A
	1:1	5	-93,29	-49,54	1:1	5,0	N/A	N/A
Srodna supstanca 3	1:1	2	-356,62	-61,41	1:1	2,0	N/A	N/A
	1:1	3,5	-164,87	-54,64	1:1	3,5	N/A	N/A
	1:1	5	174,40	-40,51	1:1	5,0	N/A	N/A
Olanzapin	1:1	2	-411,18	-73,08	1:1	2,0	N/A	N/A
	1:1	3,5	N/A	N/A	1:1	3,5	N/A	N/A
	1:1	5	N/A	N/A	1:1	5,0	N/A	N/A
Srodna supstanca B	1:1	2	-58,40	10,13	1:1	2,0	531,75	32,55
	1:1	3,5	N/A	N/A	1:1	3,5	N/A	N/A
	1:1	5	N/A	N/A	1:1	5,0	N/A	N/A
Srodna supstanca C	1:1	2	-72,78	45,44	1:1	2,0	N/A	N/A
	1:1	3,5	-225,75	42,44	1:1	3,5	N/A	N/A
	1:1	5	N/A	N/A	1:1	5,0	N/A	N/A

N/A – not assessed

Slaganje rezultata dobijenih HPLC eksperimentima sa rezultatima dobijenim QSRR-ANN predviđanjem je podstaklo upotrebu *in silico* alata u određivanju konstanti stabilnosti kompleksa, isključujući potrebu za opsežnim i vremenski zahtevnim eksperimentima. Takođe, uočeno neočekivano hromatografsko ponašanje navelo je autore da preispitaju pogodnost promene u retencionom faktoru kao parametra za izračunavanje konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Rezultati su pokazali da konstante stabilnosti i termodinamički parametri kompleksiranja mogu da se izračunavaju uz pomoć formula (4) i (5), ali ne pri širokom spektru eksperimentalnih uslova. U zavisnosti od strukture ispitivane supstance interakcije koje vode kompleksiranju nisu uvek sposobne da nadvladaju ostale interakcije u sistemu, pa retencioni faktor nije uvek idealan fizičko-hemijski parametar za praćenje prilikom procene stabilnosti inkluzionih kompleksa. Još jedna od prednosti primene QSRR modela ogleda se u definisanju eksperimentalnog prostora u kojem će interakcije koje dovode do kompleksiranja biti dominantnije od ostalih interakcija u sistemu, što omogućuje određivanje konstanti stabilnosti kompleksa na osnovu promene u vrednosti retencionog faktora.

4.4 Primena CAD-a u ispitivanju retencije u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu i izračunavanju konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa

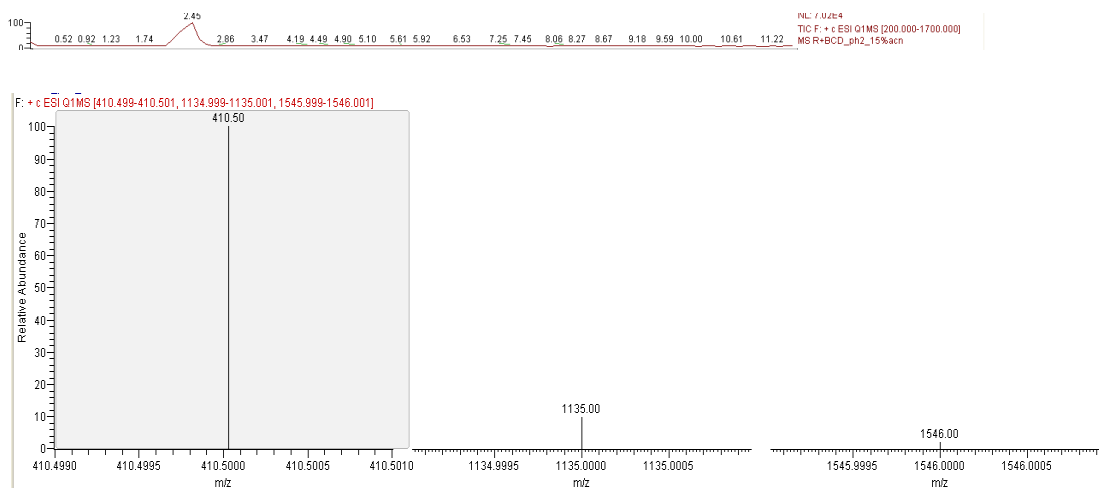
4.4.1 Ispitivanje retencije odabranih supstanci i njihovih inkluzionih kompleksa sa β -CD-om uz pomoć CAD-a

U prethodnom delu istraživanja β -CD je dodat u rastvor uzorka i mobilne faze, a hromatogrami snimljeni PDA detektorom za sve od ispitivanih supstanci pokazuju samo jedan pik. Slobodan β -CD iz mobilne faze se eluira sa pikom rastvarača, ali zbog odsustva hromofora u strukturi ovaj pik nije vidljiv PDA detektorom.

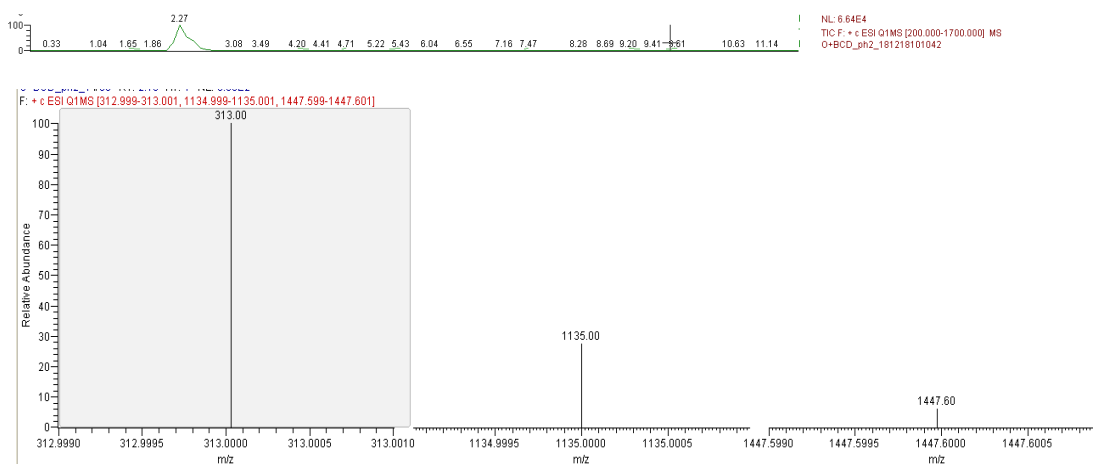
Kako bi se postigao brz dinamički ekvilibrijum, β -CD nije dodat u rastvor mobilne faze, već samo u uzorak. U ovakvom sistemu stavljen je fokus na ispitivanje retencije β -CD inkluzionog kompleksa u poređenju sa retencijom slobodne supstance. ESI-MS je inicijalno korišćen za detekciju β -CD-a. Međutim, prilikom analiziranja nekovalentnih interakcija koje risperidon, olanzapin i srodne supstance formiraju sa β -CD-om nisu dobijeni dovoljno stabilni i intenzivni ESI-MS signali (podaci nisu prikazani). Slab intenzitet signala uprkos visokoj koncentraciji mogao bi se objasniti činjenicom da β -CD-i ne poseduju grupe koje mogu da jonizuju. Iz tog razloga uveden je CAD, čije se prednosti ogledaju i u relativno jednostavnom razvoju metode, uz optimizaciju samo nekoliko parametara. Dodatno, uprkos mogućnosti da detektuje sve neisparljive supstance, nezavisno od prisustva hromofora u strukturi, detektori naelektrisanja u aerosolu (eng. *Aerosol based detectors*) daju uniforman odgovor, koji je zavistan samo od količine supstance. Sa druge strane, postoje određeni preduslovi kada je u pitanju sastav mobilne faze, i to u pogledu isparljivosti rastvarača i izbora pufera [192, 193]. Prvo treba uzeti u obzir isparljivost komponenata mobilne faze, zatim vrstu i udeo organskog modifikatora. Odgovor CAD-a je veći ukoliko se koristi veći udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, zbog bolje isparljivosti mobilne faze i posledično efikasnijeg procesa evaporacije [194]. Sastav mobilne faze je u ovom istraživanju optimizovan u cilju dobijanja najboljeg odgovora CAD-a i preveniranja dekompozicije inkluzionog kompleksa. Prema tome, acetonitril je upotrebljen kao organski rastvarač, a njegov udeo je variran u opsegu od 5% do 50% (v/v). Mobilna faza se sastojala iz smeše HPLC vode sa podešenom pH vrednošću i acetonitrila. pH vrednost vodenog dela mobilne faze je podešena na 2,0 ili 5,0 dodatkom mravlje kiseline, kako bi se menjala jonizaciona forma ispitivanih supstanci. Pri pH 2,0 risperidon je bio oko 88% u katjonskoj formi, dok je preostalih 12% molekula bilo u formi dikatjona. Međutim, ukoliko je pH 5,0 risperidon je skoro 100% prisutan u katjonskom obliku. U slučaju srodne supstance 1, ukoliko je pH 2,0 nečistoća je 87% protonovana, 9% nejoničana i 4% u formi dikatjona. Sa druge strane, pri pH 5,0 99% srodne supstance 1 je nejoničana. Srodna supstanca 2 je 88% dvostruko i 12% trostruko protonovana pri pH 2,0, dok je 42% molekula u formi katjona, a 58% u formi dikatjona ukoliko je pH 5,0. Srodna supstanca 3 je na obe ispitivane pH vrednosti dominantno prisutna u formi katjona. Olanzapin je dominantno prisutan u svojoj dikatjonskoj formi pri obe ispitivane pH vrednosti. Srodna supstanca B je nejoničana pri ispitivanom opsegu pH, dok je srodna supstanca C oko 84% u svom dikatjonskom i 15% u katjonskom obliku pri pH 2,0. Ukoliko je pH 5,0, srodna supstanca C je 94% nejoničana i samo 6% protonovana. pH vrednost vodenog dela mobilne faze i uzorka je varirana kako bi se ispitaio uticaj raspodele jonizacionih stanja na proces formiranja inkluzionih kompleksa.

Pored optimizacije sastava mobilne faze uzeti su u obzir i parametri detektora, kako bi se obezbedio najbolji odgovor. Kako bi se postigla odgovarajuća osetljivost detektora, izvršena je optimizacija temperature evaporacije, filter konstante i brzine snimanja podataka (eng. *Gain range*). Preliminarni eksperimenti su pokazali da se najbolji odnos signala i šuma dobija kada je temperatura evaporacije 50 °C, filter konstanta 10 s, a brzina snimanja podataka 10 Hz. Stepena funkcija (eng. *Power function*) je optimizovana kako bi se pronašli odgovarajući uslovi za linearizaciju odgovora CAD-a. Vrednost stepene funkcije 1 se pokazala kao najpogodnija.

Analiziranjem inkluzionih kompleksa koje svaka od ispitivanih model supstanci gradi sa β -CD-om na hromatogramu dobijenom CAD-om uočavaju se dva pika, izuzev u slučaju inkluzionog kompleksa koji gradi srodna supstanca B. Injektovanjem standardnog rastvora β -CD-a potvrđeno je da prvi pik na hromatogramu potiče od slobodnog β -CD-a. Drugi pik se eluira nakon pika slobodnog β -CD-a i postavlja se pitanje da li se inkluzioni kompleks eluira na istom retencionom vremenu kao i slobodna model supstanca. Ukoliko je tako, retencioni mehanizmi slobodne supstance nadvladavaju retencione mehanizme inkluzionog kompleksa, ili dolazi do dezintegracije kompleksa na slobodan β -CD i supstancu. Kako bi se utvrdilo koja od ove dve pretpostavke je tačna, uzorci koji sadrže smešu risperidona i β -CD-a ili olanzapina i β -CD-a su analizirani LC-MS/MS tehnikom. Kako bi se obezbedila separacija ispitivanih supstanci korišćena je ista vrsta hromatografske kolone i identični eksperimentalni uslovi kao prilikom izvođenja RP-HPLC eksperimenata. ESI-MS signali su bili nestabilni i slabog intenziteta, ali su zadovoljili potrebe identifikacije. SRM tranzicije su korišćenje u svrhu potvrde slobodne supstance i formiranog inkluzionog kompleksa sa β -CD-om. Risperidon i olanzapin su uzeti kao predstavnici analizirane model smeše i dobijeni rezultati su ilustrovani slikom 19.



a

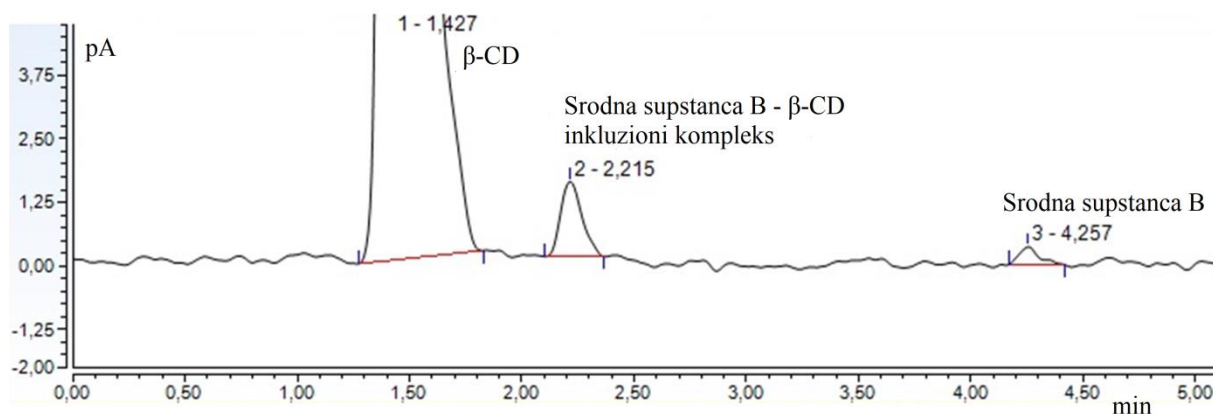


b

Slika 19: Jonski hromatogram dobijen praćenjem odabranih reakcija (SRM) risperidon – β -CD i olanzapin – β -CD inkluzionih kompleksa (prilagođeno iz [195])

ESI-MS/MS rezultati su potvrdili prisustvo inkluzionog kompleksa (1447 m/z inkluzioni kompleks olanzapin – β -CD i 1548 m/z inkluzioni kompleks risperidon – β -CD) i koeluiranje slobodne supstance i inkluzionog kompleksa detekcijom fragmenata sa m/z vrednostima 410,50 (risperidon) i 1135,00 (β -CD) prilikom analiziranja smeše risperidona i β -CD-a, kao i m/z 313,00 (olanzapin) i 1135,00 (β -CD) prilikom analiziranja smeše olanzapina i β -CD-a.

Interesantno je istaći da prilikom analiziranja smeše srodne supstance B i β -CD-a sa mobilnom fazom koja sadrži 50% (v/v) acetonitrila, na CAD hromatogramu se uočavaju tri pika (Slika 20). Prvi pik potiče od slobodnog β -CD-a, zatim sledi pik inkluzionog kompleksa, praćen pikom slobodne srodne supstance B (Slika 20).



Slika

20: Hromatogram dobijen RP-HPLC-CAD metodom, koji prikazuje β -CD, srodnu supstancu B i njihov inkluzioni kompleks (prilagođeno iz [195])

Pik inkluzionog kompleksa srodna supstanca B – β -CD nije detektovan pri udelima acetonitrila manjim od 50% (v/v), usled nedovoljnog intenziteta. Ovo zapažanje je u skladu sa zavisnošću odgovora CAD-a od količine organskog modifikatora u mobilnoj fazi. Intenzitet odgovora CAD-a je uslovljen promenama eksperimentalnih parametara, a uticaj eksperimentalnih parametara na odgovor detektora je u vezi sa njegovim principom funkcionisanja. Princip funkcionisanja CAD-a podrazumeva nebulizaciju eluenta uz pomoć struje azota i formiranje čestica nakon procesa evaporacije i uklanjanja većih kapljica. Sekundarna struja azota, koja je prethodno prošla preko korona igle, difuzno prenosi pozitivno naelektrisanje na formirane čestice, a količina naelektrisanja, koja je direktno proporcionalna količini supstance, biva detektovana visoko osetljivim elektrometrom [193]. Na osnovu principa funkcionisanja detektora može se zaključiti da će intenzitet njegovog odgovora zavisi od sastava mobilne faze i instrumentalnih uslova. Karakteristike mobilne faze se najviše odnose na vrstu i udeo korišćenog organskog modifikatora, sa posebnim osvrtom na aditive, kojima se menja viskoznost i ispraljivost mobilne faze. Veći udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi poboljšava odgovor CAD-a, jer se usled manje viskoznosti proizvode manje kapljice, čime se povećava stepen evaporacije. Takođe, srodna supstanca B se skoro cela inkorporira u β -CD-sku šupljinu, a i deo koji ostaje van šupljine je nejonizovan u ispitivanom opsegu pH vrednosti, pa su i elektrostatičke interakcije sa stacionarnom fazom redukovane. Proces kompleksiranja se odvija samo u uzorku, a pošto β -CD nije prisutan u mobilnoj fazi ne može da utiče na retencione mehanizme i posledično razdvajanje pika koji potiče od inkluzionog kompleksa od pika koji potiče od slobodne srodne supstance B [29].

Postavljena je hipoteza da jonizaciona forma supstance koja gradi inkluzioni kompleks ima značajnu ulogu u procesu formiranja inkluzionog kompleksa i utiče na retenciono ponašanje supstanci u kompleksu. Na taj način bi moglo da se objasni retenciono ponašanje srodne supstance B i inkluzionog kompleksa koji ona gradi sa β -CD-om. Međutim, posmatrajući risperidonovu srodnu supstancu 1, koja takođe zauzima nejonizovanu formu pri pH 5,0, vidimo da pored jonizacione forme postoje i dodatni faktori koji utiču na proces formiranja kompleksa i posledično retenciono ponašanje. Iako je poznato iz literature da organska lipofilna jedinjenja grade inkluzione

komplekse sa hidrofobnom šupljinom β -CD-a, treba detaljnije analizirati i istaći značaj $\log P$ vrednosti u procesu formiranja inkluzionih kompleksa.

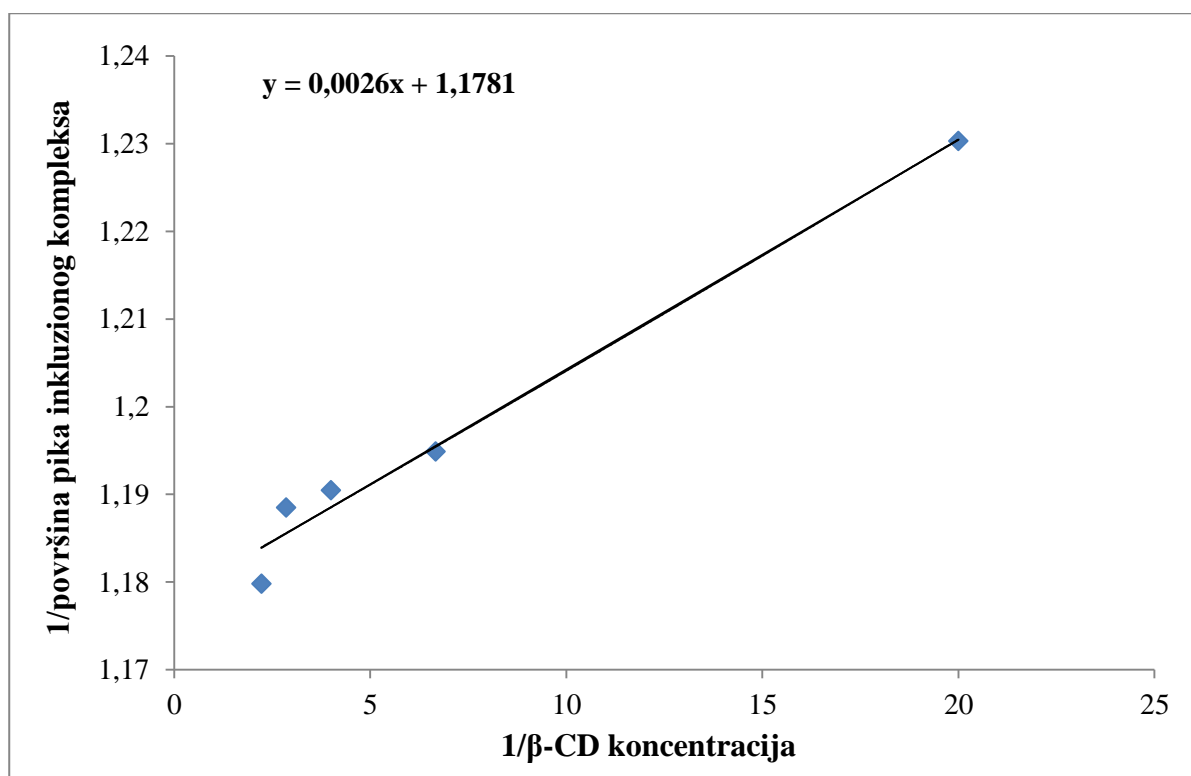
4.4.2 Određivanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa sa β -CD-om korišćenjem CAD-a

Pristup koji je u literaturi korišćen za MS određivanje konstanti stabilnosti kompleksa [47] je u ovom istraživanju primenjen za izračunavanje konstanti stabilnosti uz pomoć CAD-a. U prethodnom delu istraživanja je primenom ESI-MS pristupa određena stehiometrija (poglavlje 4.1.1) i potvrđen je pretpostavljeni odnos 1:1 supstance u kompleksu i β -CD-a [35]. Prema tome, konstante stabilnosti kompleksa mogu da se izračunavaju kao konstante ekvilibrijuma između kompleksirane, slobodne supstance i β -CD-a. Ukupna koncentracija ispitivane supstance se sastoji iz koncentracije slobodne i kompleksirane supstance. Na isti način ukupna koncentracija β -CD-a podrazumeva koncentraciju slobodnog i β -CD-a u inkluzionom kompleksu. Porast koncentracije β -CD-a trebao bi da doprinosi formiranju inkluzionog kompleksa, dok istovremeno opada koncentracija slobodne supstance, koja sa β -CD-om formira inkluzioni kompleks. Izračunavanja su bazirana na jednačini sličnoj *Benesi-Hildebrand* jednačini (13), koja koreliše uočene razlike u relativnom intenzitetu kompleksa sa inicijalnim ukupnim koncentracijama ispitivane supstance i β -CD-a. U radu sa CAD-om, intenziteti kompleksa su izraženi kao površine pikova koji odgovaraju formiranim inkluzionim kompleksima. Konstante stabilnosti kompleksa su izračunate uz pomoć sledeće jednačine (16):

$$\frac{1}{\Delta I_r} = \frac{1}{k_c D_t K [\beta-CD]_t} + \frac{1}{k_c D_t} \quad (16)$$

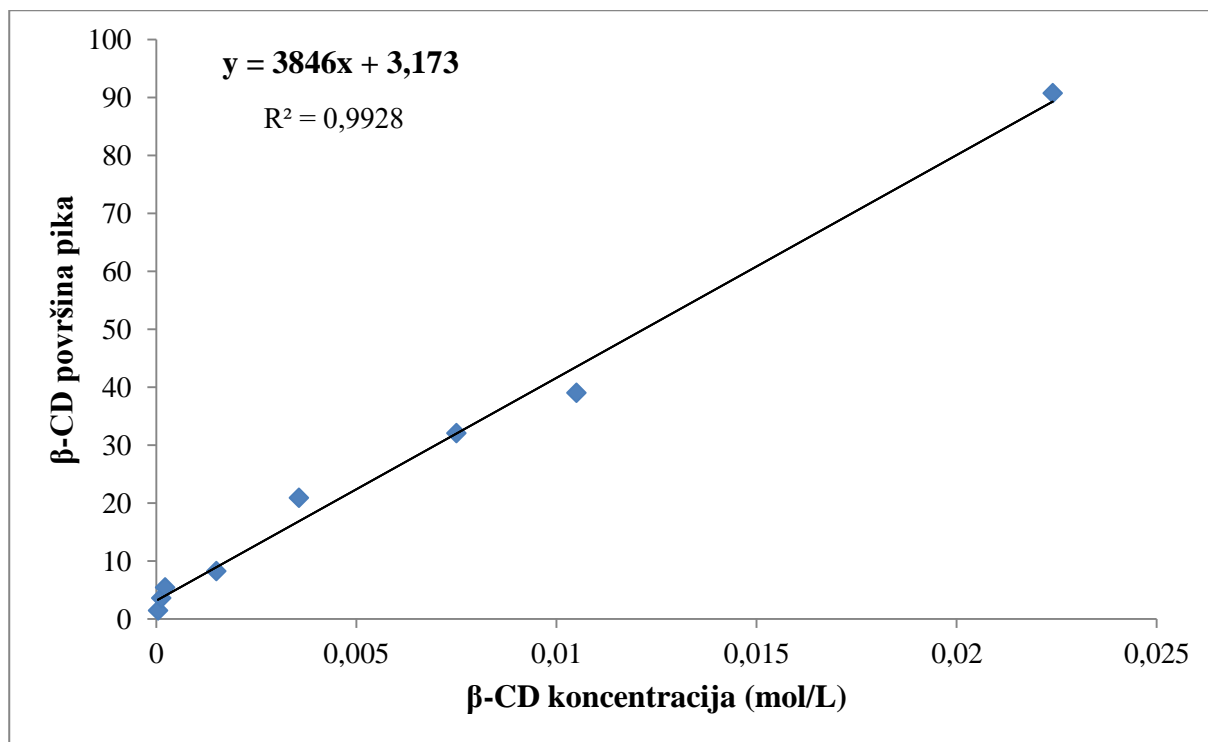
gde $I/\Delta I_r$ predstavlja relativnu površinu pika, D_t ukupnu koncentraciju ispitivane supstance, $[\beta-CD]_t$ ukupnu koncentraciju β -CD-a, k_c konstantu proporcionalnosti i K konstantu stabilnosti inkluzionog kompleksa.

Koncentracija srodne supstance B u uzorku je bila konstanta, dok je koncentracija β -CD-a postepeno povećavana kako bi se postigao odnos između srodne supstance B i β -CD-a u opsegu od 1:5 do 1:45. Zatim su konstruisani grafici zavisnosti $I/\Delta I_r$ od $1/[\beta-CD]$, koji su omogućili izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa deljenjem odsečka na ordinati i nagiba dobijenih linearnih pravih. Korišćenjem dobijenog grafika zavisnosti $I/\Delta I_r$ od $1/[\beta-CD]$ (Slika 21), izračunata je konstanta stabilnosti inkluzionog kompleksa koji se formira između srodne supstance B i β -CD-a, i ona je iznosila $449,81 \text{ M}^{-1}$. Sva merenja su izvršena u triplikatu.



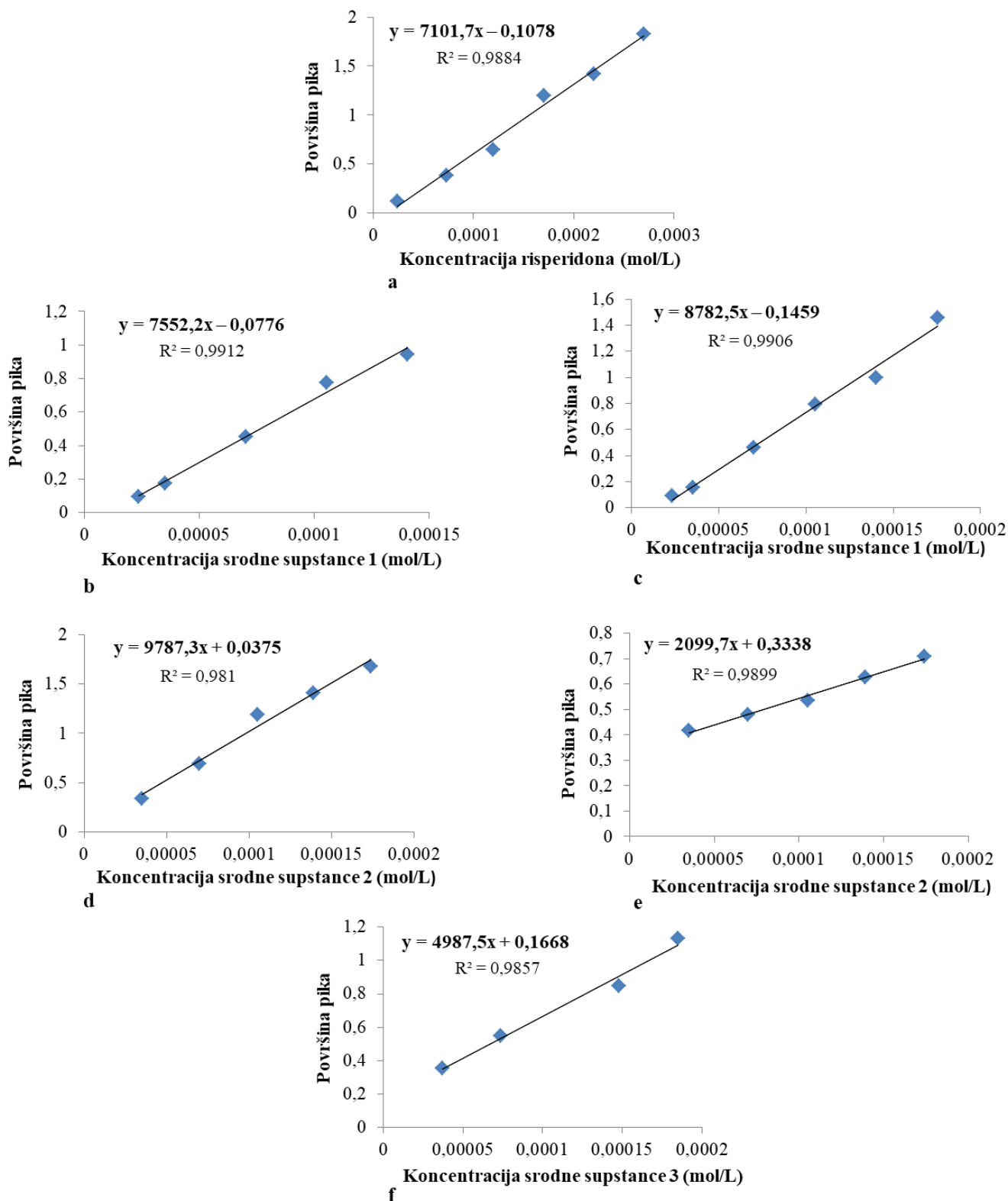
Slika 21: Linearna kriva zavisnosti $1/\text{površina pika inkluzionog kompleksa}$ od $1/\beta\text{-CD koncentracija}$ korišćena za izračunavanje konstante stabilnosti inkluzionog kompleksa srodna supstanca B – $\beta\text{-CD}$ (prilagođeno iz [195])

Kod supstanci gde pik koji potiče od slobodne supstance nije uspešno razdvojen od pika koji potiče od inkluzionog kompleksa, pa površina pika inkluzionog kompleksa ne može lako da se odredi, predložen je modifikovan pristup za izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa. Ukoliko se slobodna supstanca i inkluzioni kompleks eluiraju na istom retencionom vremenu, prvi korak podrazumeva diferencijaciju površine pika koja odgovara svakom od njih. Uočeno je da sa dodatkom standardne količine ispitivane supstance u uzorak $\beta\text{-CD}$ -a dolazi do smanjenja površine pika $\beta\text{-CD}$ -a u poređenju sa površinom pika $\beta\text{-CD}$ -a ukoliko je on sam u uzorku. Smanjenje površine pika $\beta\text{-CD}$ -a usled dodatka ispitivane supstance javlja se zbog procesa formiranja inkluzionog kompleksa. Kao u slučaju olanzapinove srodne supstance B, i kod ostalih model supstanci koncentracija $\beta\text{-CD}$ -a je postepeno povećavana kako bi se postigli molarni odnosi te supstance i $\beta\text{-CD}$ -a u odnosu od 1:5 do 1:45. Uočena razlika u površini pika slobodnog $\beta\text{-CD}$ -a odgovara molarnoj koncentraciji $\beta\text{-CD}$ -a, koja učestvuje u procesu formiranja inkluzionog kompleksa. Za potrebe određivanja ove molarne koncentracije $\beta\text{-CD}$ -a, koja odgovara razlici u površini pika slobodnog i kompleksiranog $\beta\text{-CD}$ -a konstruisana je kalibraciona kriva $\beta\text{-CD}$ -a (Slika 22). Koeficijent korelacije kalibracione krive je iznosio 0,996.

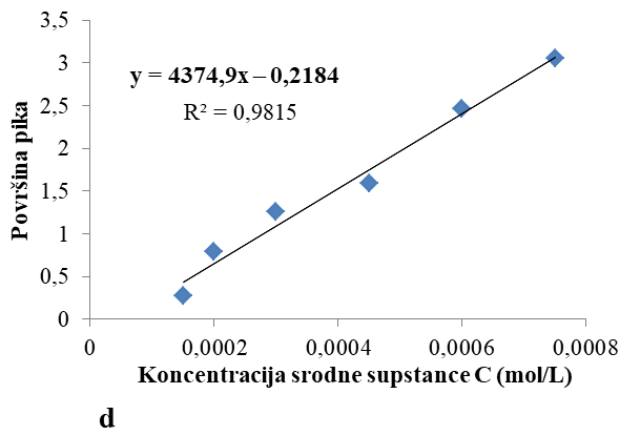
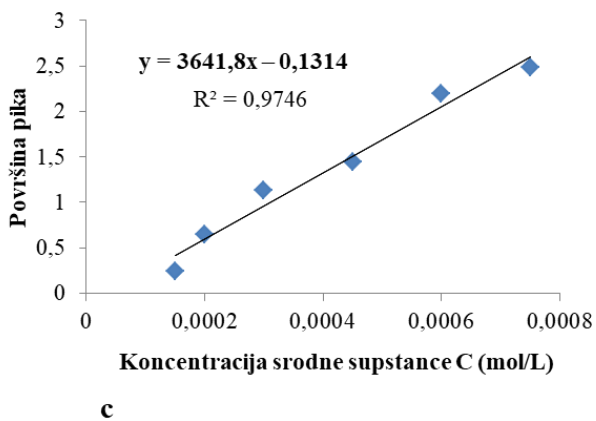
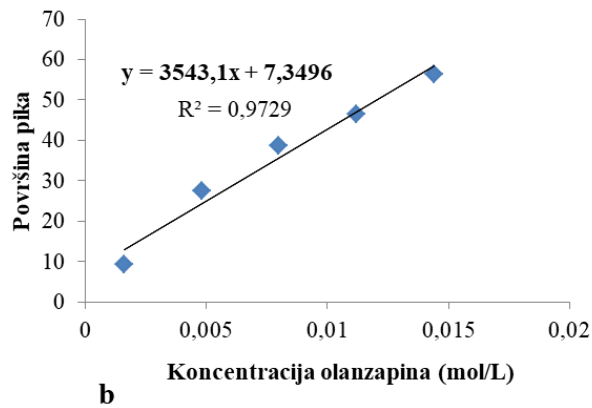
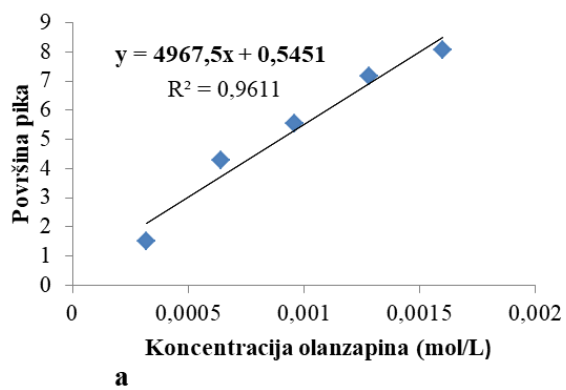


Slika 22: Kalibraciona kriva β -CD (prilagođeno iz [195])

Prethodno je potvrđeno da se inkluzioni kompleksi formiraju u 1:1 stehiometrijskom odnosu, pa je molarna koncentracija model supstance koja učestvuje u formiranju kompleksa jednaka molarnoj koncentraciji β -CD-a, koja takođe učestvuje u formiranju kompleksa. Iz tog razloga konstruisane su kalibracione krive za svaku od ispitivanih model supstanci, kako bi se odredila površina pika koja odgovara izračunatoj molarnoj koncentraciji supstance, koja učestvuje u formiranju inkluzionog kompleksa (Slike 23 i 24). Korišćenjem kalibracionih krivih, izračunate su površine pika supstance i β -CD-a koje učestvuju u formiranju kompleksa i predstavljaju relativni intenzitet kompleksa. Primenom jednačine (16) konstruisani su grafici zavisnosti $1/\text{površina pika kompleksa}$ od $1/[\beta\text{-CD}]$ i K je izračunata uz pomoć nagiba i odsečka na ordinati konstruisane linearne prave. U Tabeli 13 su prikazane konstante stabilnosti kompleksa izračunate za risperidon i srodne supstance, kao i olanzapin i srodnu supstancu C, zajedno sa jednačinama prave. Kod srodne supstance 1, srodne supstance 3, olanzapina i srodne supstance C linearni grafici su odmah dobijeni, dok je kod risperidona i srodne supstance 2 primenjena transformacija, takođe u zavisnosti od eksperimentalnih uslova. Prilikom analiziranja risperidona, prvo je dobijena polinomijalna zavisnost ($y = -8e^{-7x^2} + 0,0031x - 0,7177$) i y je transformisan u cilju dobijanja linearne zavisnosti. Kada govorimo o srodnoj supstanci 2, ukoliko je pH vrednost podešena na 2,0, odgovor srodne supstance 2 je inverzno transformisan kako bi se dobila linearna zavisnost.



Slika 23: Kalibracione krive risperidona pH 2,0 – 5,0 (a), srodne supstance 1 pH 2,0 (b), srodne supstance 1 pH 5,0 (c), srodne supstance 2 pH 2,0 (d), srodne supstance 2 pH 5,0 (e) i srodne supstance 3 pH 2,0 – 5,0 (f) (prilagođeno iz [195])



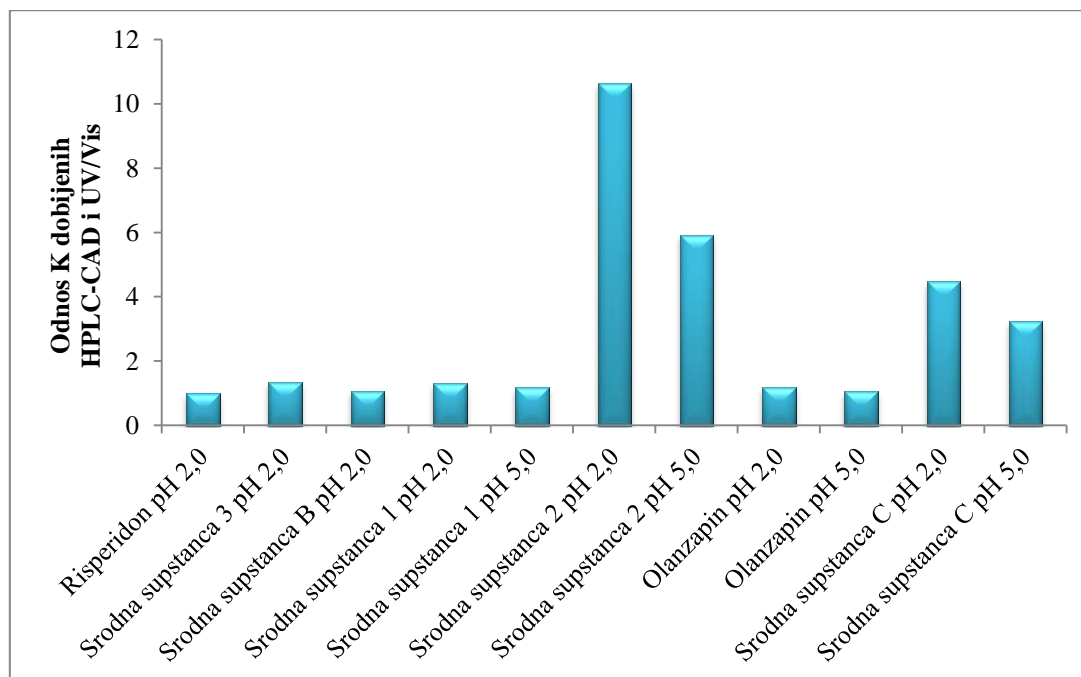
Slika 24: Kalibracione krive olanzapina pH 2,0 (a), olanzapina pH 5,0 (b), srodne supstance C pH 2,0 (c) i srodne supstance C pH 5,0 (d) (prilagođeno iz [195])

Tabela 13: Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa izračunate indirektnim pristupom uz pomoć CAD-a (prilagođeno iz [195])

Supstanca	Stehiometrija	pH	Jednačina prave zavisnosti <i>1/površina pika kompleksa od 1/[β-CD]*</i>	<i>K (M⁻¹)</i> (25 °C)
Risperidon	1:1	2,0	$y = 1067,8x + 9,179$	173,33
Srodna supstanca 1	1:1	2,0	$y = 1e^{-5}x - 0,026$	2066,43
	1:1	5,0	$y = 7e^{-6}x - 0,009$	1318,73
Srodna supstanca 2	1:1	2,0	$y = 5e^{-5}x - 1,092$	20616,00
	1:1	5,0	$y = 5e^{-5}x - 0,692$	13309,87
Srodna supstanca 3	1:1	2,0	$y = 4e^{-5}x + 0,042$	1004,88
Olanzapin	1:1	2,0	$y = 0,0003x + 0,018$	65,38
	1:1	5,0	$y = 0,0001x + 0,0062$	47,30
Srodna supstanca C	1:1	2,0	$y = 0,0028x - 0,142$	169,55
	1:1	5,0	$y = 0,001x + 0,232$	199,52

*Jednačine koje su korišćene za izračunavanje konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa

Konstante stabilnosti kompleksa dobijene primenom ovog predloženog pristupa bilo je potrebno uporediti sa vrednostima koje su dobijene uz pomoć prethodno dobro potvrđenih metodologija, kako bi se dokazala validnost pristupa. Zbog sličnosti RP-HPLC-CAD sistemu idealna metodologija za potvrdu validnosti bi bila β-CD-modifikovana RP-HPLC, ali primenom β-CD-modifikovane RP-HPLC konstante stabilnosti ne mogu da budu uvek izračunate. Iz tog razloga su korišćene vrednosti *K*, koje su u prethodnom delu istraživanja dobijene primenom UV/Vis spektrofotometrije. *K* je određena pri pH 2,0 za inkluzione komplekse koje sa β-CD-om formiraju risperidon, srodna supstanca 3 i srodna supstanca B, dok su za srodnu supstancu 1, srodnu supstancu 2, olanzapin i srodnu supstancu C vrednosti *K* određene pri pH 2,0 i 5,0, zbog promene jonizacione forme. Kao što je prethodno objašnjeno, numeričke vrednosti *K* treba da budu nezavisne od primenjene metodologije za njeno izračunavanje, međutim kao i ovde u praksi se takva situacija retko sreće. Iz tog razloga, izračunati su odnosi između *K* dobijene RP-HPLC-CAD i *K* dobijene UV/Vis metodom za svaku od ispitivanih supstanci. Dobijeni odnosi su predstavljeni na Slici 25. Za sve supstance gde je *K* određena na jednom pH, odnos vrednosti *K* je bio oko 1,5 ukazujući na slične vrednosti *K* dobijene različitim pristupima. Slično ponašanje se primećuje i kod olanzapina i srodne supstance 1, na oba ispitivana pH. Međutim, odnosi *K* dobijeni različitim metodama su znatno veći kod srodne supstance 2 i srodne supstance C. Kod ove dve supstance znatno veće vrednosti *K* su dobijene RP-HPLC-CAD metodom, ali se isto ponašanje uočava pri obe ispitivane pH vrednosti. Za sve model supstance odnos *K* prati isti trend i malo je veći pri pH 2,0 nego pri pH 5,0. Svi navedeni rezultati ukazuju na potencijal primene predložene RP-HPLC-CAD metode u određivanju *K*, ali je potrebno detaljnije ispitati razloge zbog kojih se kod određenih supstanci javljaju velike razlike u odnosima *K* dobijenim različitim metodama.



Slika 25: Odnosi između konstanti stabilnosti kompleksa dobijenih HPLC-CAD i UV/Vis za svaku od ispitivanih model supstanci (prilagođeno iz [195])

4.5 Prošireni QSRR-ANN model u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu

4.5.1 Selekcija ulaznih promenljivih za potrebe QSRR-ANN modelovanja

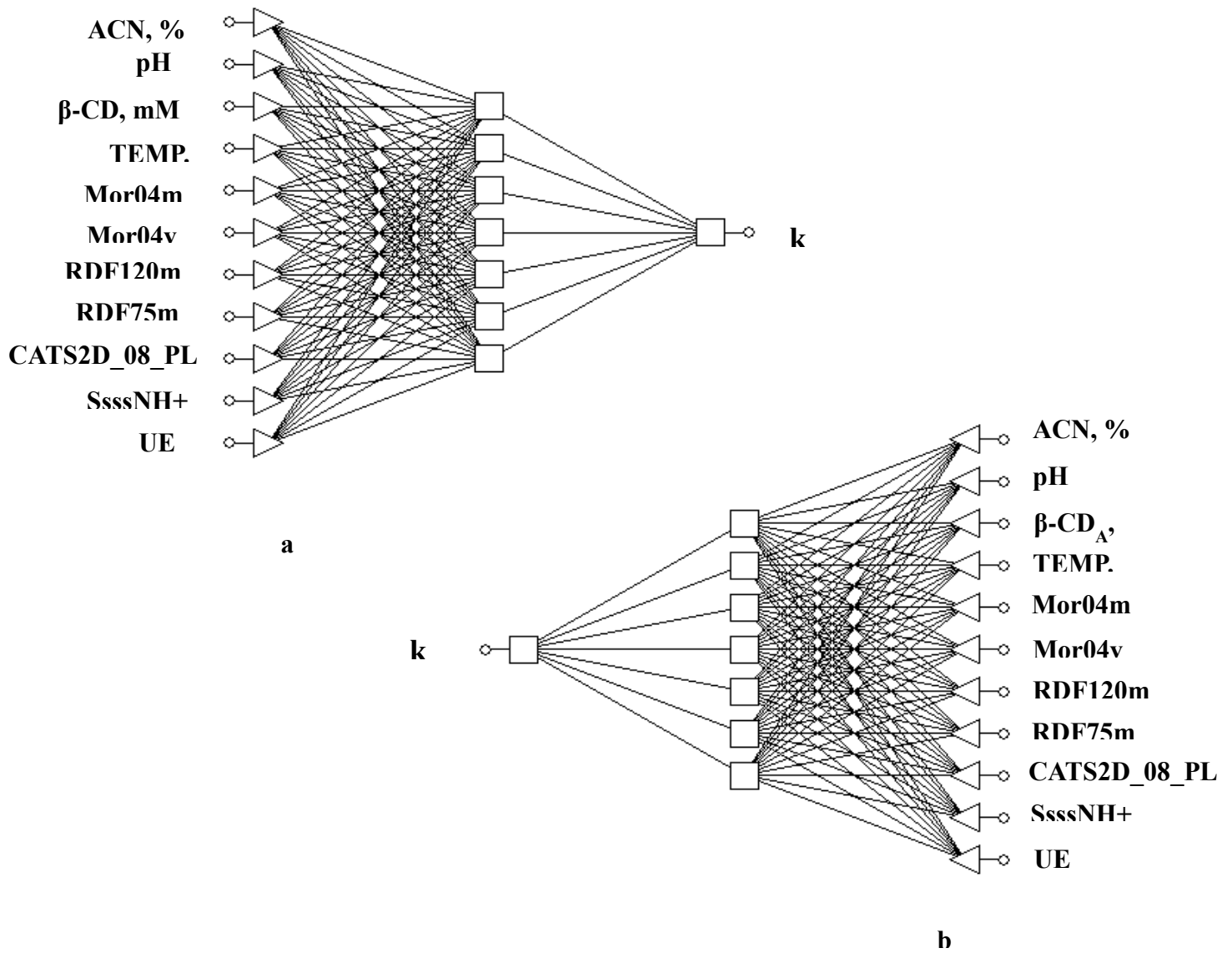
U prethodnom delu istraživanja birani su samo oni molekularni deskriptori, koji prema LSER teoriji doprinose retencionim osobinama ispitivanih supstanci. Ovakav pristup je poželjan sa aspekta poznate veze između odabranih deskriptora i posmatranog odgovora i na ovaj način bi moglo da se objasni retenciono ponašanje u klasičnim RP-HPLC sistemima. Međutim, u β -CD-modifikovanim RP-HPLC sistemima dolazi do različitih komplikovanih interakcija koje se uspostavljaju u mobilnoj fazi, a koje su udružene sa mogućnošću da interakcije drugačije od onih koje objašnjava LSER teorija predvide retenciju. Dodatno, u zavisnosti od molekularne strukture ispitivanih supstanci formiraće se manje ili više stabilni inkluzijski kompleksi sa β -CD-om, što ukazuje na potrebu za uključivanjem većeg broja molekularnih deskriptora, čime bi se izvršila detaljna analiza zavisnosti retencije od molekularne strukture u β -CD-modifikovanim RP-HPLC sistemima. Kako bi se izvršila ova detaljnija analiza, prethodno ispitivani POL, SEV, logP i DEN su obogaćeni sa opsežnim setom teorijskih deskriptora. Ovakav pristup može da bude koristan sa naučne tačke gledišta, jer se uzima u obzir značajno velik broj deskriptora, a samim tim i karakteristika molekula. Sa druge strane, ovaj velik broj deskriptora koje može biti dodeljen jednoj supstanci može i da prouzrokuje probleme u pogledu adekvatne selekcije određenog broja deskriptora za dalje modelovanje. Posledično, odgovarajuća selekcija najinformativnijih molekularnih deskriptora za određeni set supstanci je ključna za uspešno građenje QSRR modela [73].

Nakon ispitivanja međusobne korelacije, 279 molekularnih deskriptora je preostalo za dalju analizu. Uzajamno nekorelisanih 279 molekularnih deskriptora, zajedno sa četiri molekularna deskriptora, koja su se pokazala značajnim u prethodnom istraživanju (POL, SEV, logP i DEN), tri deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse (BE, EE i UE) i eksperimentalni parametri su podvrgnuti MLR analizi, kako bi se identifikovali oni sa najznačajnijim doprinosom praćenom odgovoru. Ulazne

promenljive koje su bile u značajnoj korelaciji sa izlaznom promenljivom (retencioni faktor) uključivali su sve eksperimentalne parametre, UE kao deskriptor koji opisuje inkluzione komplekse i sledeće molekulske deskriptore: Mor04m (*signal 04/weighted by mass*), Mor04v (*signal 04/weighted by van der Waals volume*), RDF120m (*radial distribution function – 120/weighted by mass*), RDF075m (*radial distribution function – 075/weighted by mass*), CATS2D_08_PL (*CATS2D positive-lipophilic at lag 08*) i SsssNH+ (*sum of sssNH+ E-states*). Navedene ulazne promenljive su korišćene za posledično formiranje QSRR-ANN modela.

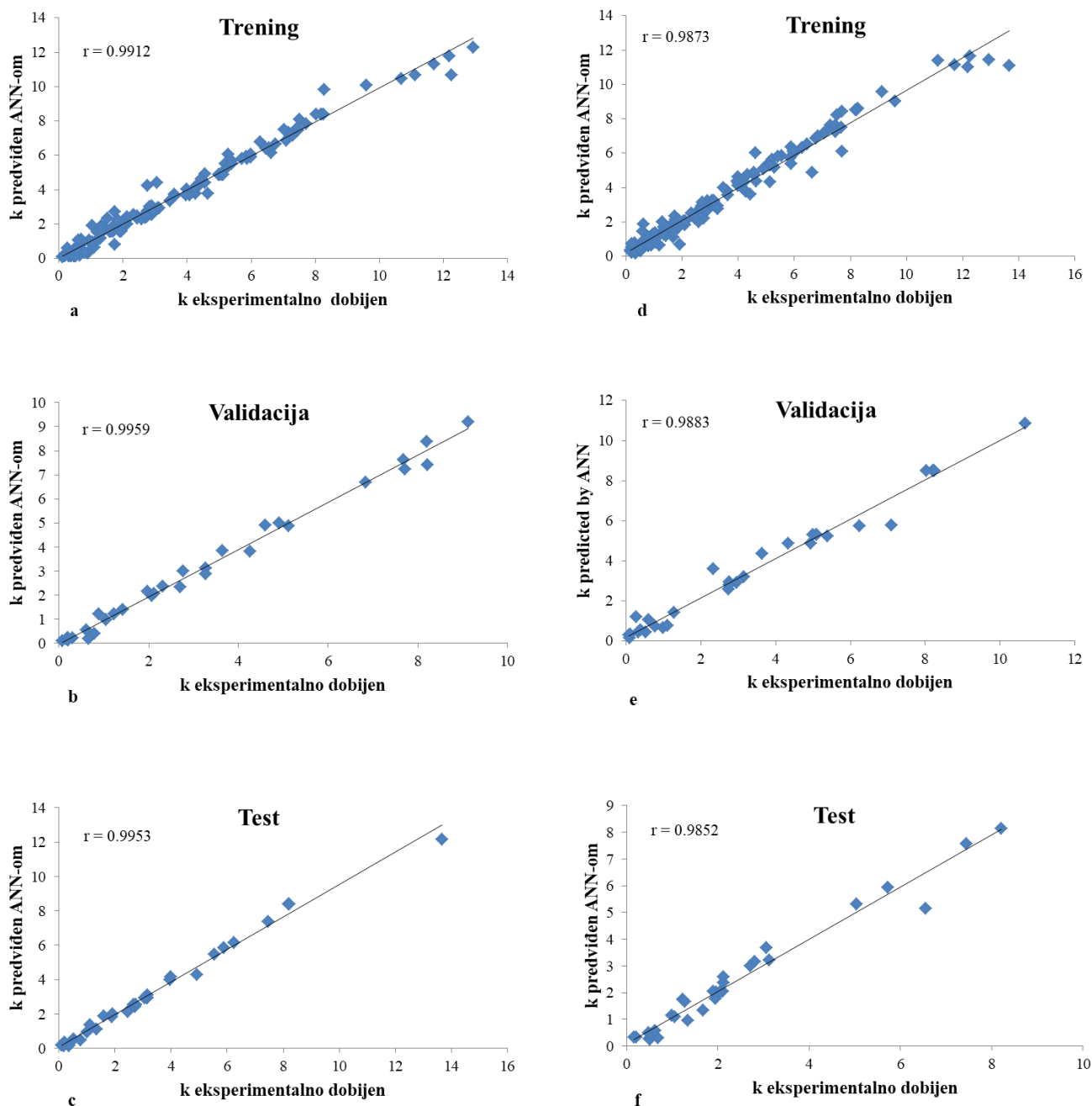
4.5.2 QSRR-ANN modelovanje

Činjenica da koncentracija β -CD u mobilnoj fazi i β -CD_A u velikoj meri korelišu onemogućila je njihovu zajedničku upotrebu kao *input*-a iste mreže. Pored prepoznate korelacije ove dve promenljive, njihovo simultano uključivanje u model može da ugrozi interpretaciju njihovih pojedinačnih uticaja na retenciju u kompleksnom sistemu kao što je β -CD-modifikovan RP-HPLC. Prema tome, konstruisane su dve neuronske mreže. Naime, prva mreža je uključivala procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodenog dela mobilne faze, temperaturu kolone, koncentraciju β -CD-a u mobilnoj fazi, UE, Mor04m, Mor04v, RDF120m, RDF075m, CATS2D_08_PL i SsssNH+, dok su se *input*-i druge mreže razlikovali samo u uključivanju β -CD_A umesto koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi. Set podataka se sastojao iz 210 eksperimenata, od kojih je 147 odvojeno za trening, 32 za validaciju, a 31 za test. Dodeljivanje pojedinačnih eksperimenata u određene podsetove je izvedeno nasumično. Višeslojna nerekurentna mreža sa 11-7-1 topologijom je pokazala najbolje performanse, nezavisno od toga da li je kao *input* korišćena koncentracija β -CD-a u mobilnoj fazi ili β -CD_A (Slika 26a i 26b).



Slika 26: Višeslojna nerekurentna mreža 11-7-1 topologije sa koncentracijom β -CD-a (a) ili β -CD_A (b) kao *input*-om mreže (prilagođeno iz [175])

Obe mreže su trenirane algoritmom povratnog prolaska greške sa stopom učenja od 0,1 i momentumom 0,3 ukoliko je u pitanju mreža sa koncentracijom β -CD-a u mobilnoj fazi ili 0,4 kod mreže koja uključuje β -CD_A. Kod prve ANN dobijene RMSE vrednosti iznose 0,3884, 0,2666 i 0,3401 za trening, validacioni i test set podataka, redom. Dobijene su i visoke R² vrednosti (0,9912 za trening, 0,9959 za validacioni i 0,9953 za test set podataka), koje zajedno sa niskim RMSE vrednostima ukazuju na dobru prediktivnu sposobnost mreže. Druga mreža, sa β -CD_A umesto koncentracijom β -CD-a u mobilnoj fazi, takođe pokazuje zadovoljavajuće prediktivne i deskriptivne sposobnosti, izražene kroz RMSE vrednosti od 0,4863 za trening, 0,4545 za validacioni i 0,3620 za test set podataka i R² vrednosti koje iznose 0,9873 za trening, 0,9883 za validacioni i 0,9852 za test set podataka. Dodatno, slika 27a – 27c ilustruje odlično slaganje između eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih faktora za svaki set podataka i vrednosti retencionih faktora koje su predviđene QSRR-ANN modelom koji sadrži koncentraciju β -CD u mobilnoj fazi, dok slika 27d – 27e prikazuje da je skoro jednako dobro slaganje postignuto između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti retencionog faktora i kod mreže koja sadrži β -CD_A, umesto koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi. Očigledno je da obe mreže imaju izuzetne performanse i mogu da se koriste u adekvatnom opisivanju ispitivanih hromatografskih sistema i razjašnjenju faktora od kojih retencija u najvećoj meri zavisi.



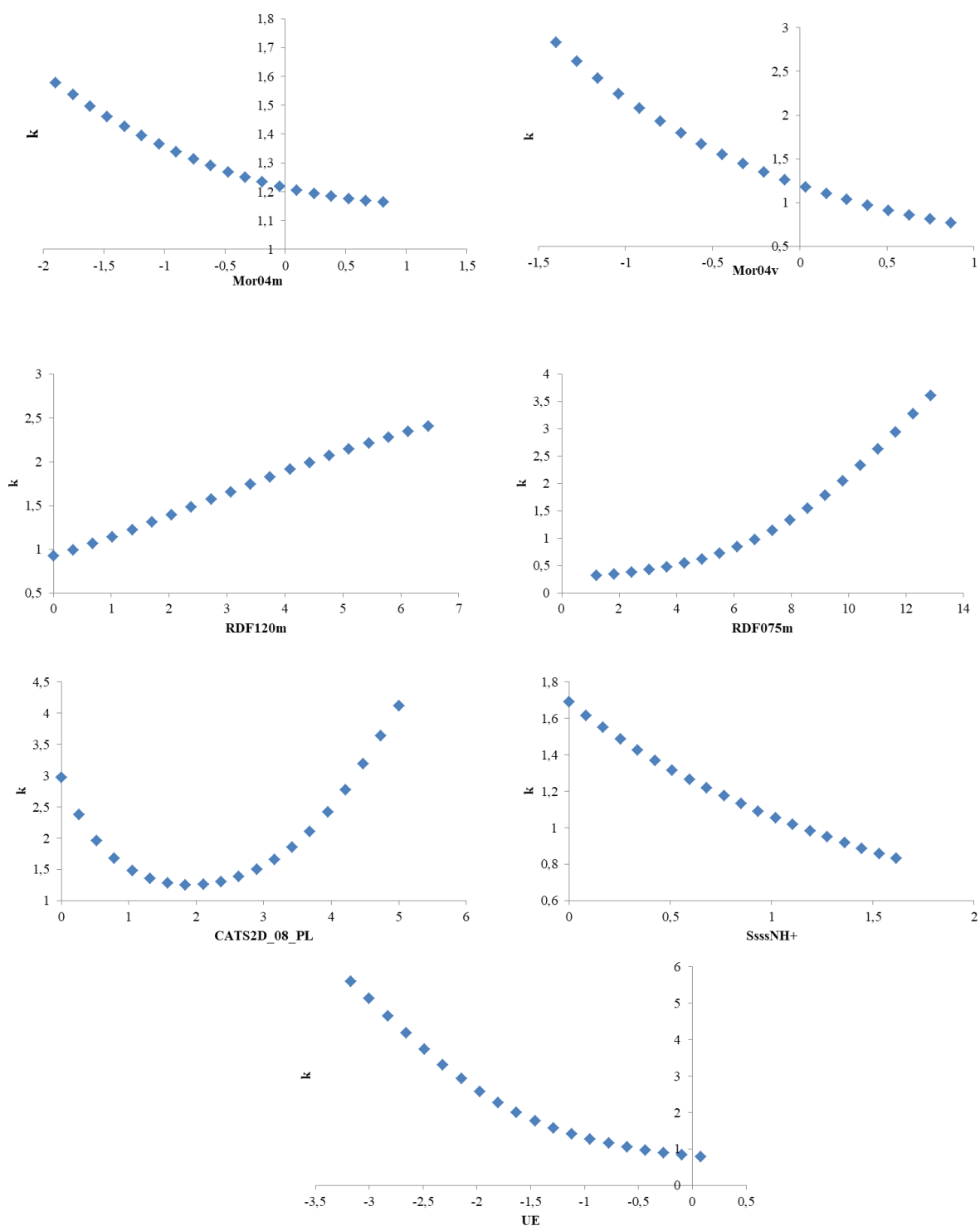
Slika 27: Korelacija između vrednosti retencionih faktora dobijenih eksperimentalno i predviđenih QSRR-ANN modelom sa koncentracijom β -CD-a u mobilnoj fazi za trening (a), validacioni (b) i test (c) set podataka i QSRR-ANN modelom sa β -CD_A za trening (d), validacioni (e) i test (f) set podataka (prilagođeno iz [175])

Zatim je sprovedena analiza osetljivosti i izračunate su VSE i VSR vrednosti. VSR vrednosti su omogućile rangiranje promenljivih prema njihovom značaju za performanse modela. Analizom osetljivosti prve ANN dobijene su relativno visoke VSR vrednosti za sve ispitivane promenljive, izuzev za temperaturu kolone (VSR = 0,958). Prema VSR vrednostima ostale promenljive su rangirane na sledeći način: CATS2D_08_PL (VSR = 6,769), RDF075m (VSR = 6,592), pH (VSR = 6,092), SsssNH⁺ (VSR = 4,530), Mor04v (VSR = 3,908), RDF120m (VSR = 3,617), β -CD koncentracija (VSR = 3,287), procenat acetonitrila (VSR = 2,929), UE (VSR = 2,568) i Mor04m (VSR = 1,980).

Kod druge ANN, najniže VSR vrednosti su dobijene kod sledećih promenljivih: Mor04v (VSR = 1,212), RDF120m (VSR = 1,391), temperatura kolone (VSR = 1,442), β -CD_A (VSR = 1,702) i Mor04m (VSR = 1,806). Sa druge strane, preostale promenljive su pokazale relativno visoke vrednosti VSR, prema kome se mogu rangirati na sledeći način: CATS2D_08_PL (VSR = 5,602), RDF075m (VSR = 4,494), procenat acetonitrila (VSR = 3,453), pH (VSR = 3,135), SsssNH⁺ (VSR = 2,777) i UE (VSR = 2,649).

Zaključuje se da su performanse obe ANN najviše pod uticajem CATS2D_08_PL i RDF075m.

Otkrivanje strukturnih karakteristika koje imaju najizraženiji uticaj na retenciju u ovakvoj vrsti hromatografskih sistema je jedan od glavnih ciljeva sprovedenog istraživanja, pa su svi molekularni deskriptori uključeni u model detaljno analizirani. ANN sa koncentracijom β -CD-a kao *input*-om, koja pokazuje malo bolje performanse u odnosu na drugu ANN, primenjena je kako bi se procenili individualni uticaji svakog od deskriptora, uzimajući u obzir razliku između najveće i najmanje vrednosti retencionog faktora u ispitivanom opsegu vrednosti deskriptora. Odnos najveće i najmanje vrednosti retencionog faktora u ispitivanom opsegu vrednosti molekularnog deskriptora je označen kao *ratio*, i njegove najveće vrednosti su udružene sa sledećim deskriptorima: RDF075m (*ratio* = 11,18), UE (*ratio* = 7,10), Mor04v (*ratio* = 3,70) i CATS2D_08_PL (*ratio* = 3,29). Deskriptori koji imaju najveće *ratio* vrednosti su najznačajniji za posmatrani *output*. Za preostale deskriptore RDF120m, SsssNH⁺ i Mor04m dobijene su redom *ratio* vrednosti od 2,61, 2,03 i 1,35. Grafički prikaz promene vrednosti retencionog faktora u zavisnosti od vrednosti svakog od ispitivanih deskriptora je dat na slici 28.

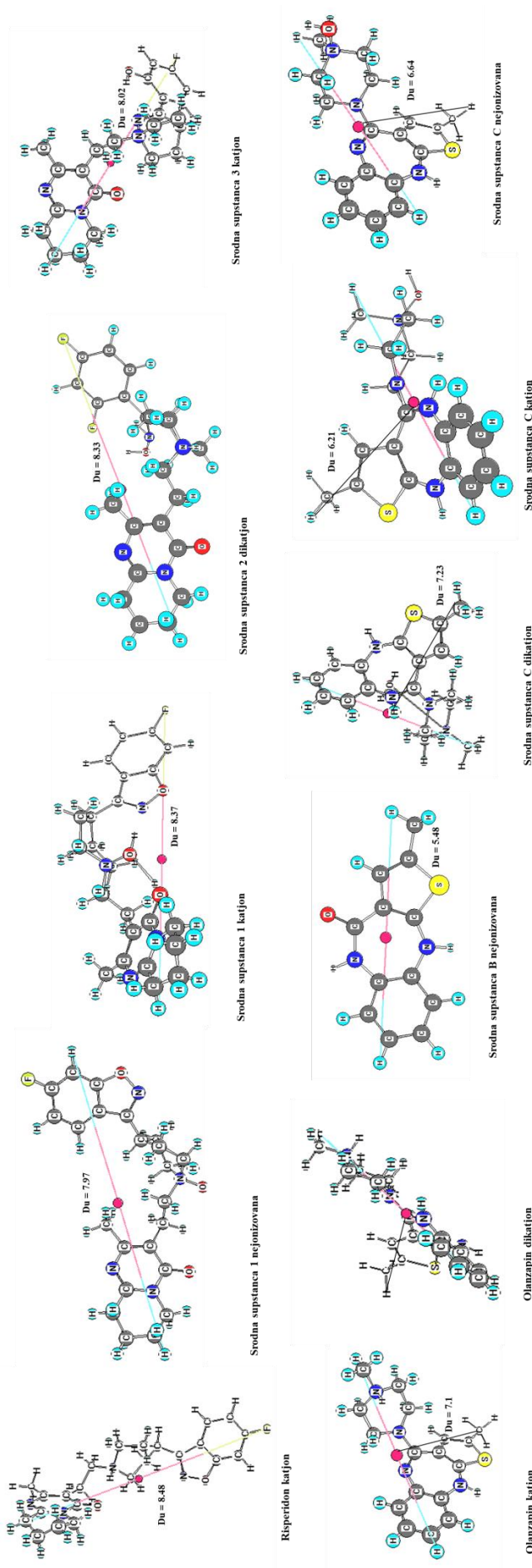


Slika 28: Uticaj svakog od ispitivanih deskriptora na retencioni faktor (prilagođeno iz [175])

Mor04m, Mor04v, RDF120m i RDF075m pripadaju grupi 3D geometrijskih deskriptora. Mor04m i Mor04v su 3D-MoRSE deskriptori, dok RDF120m i RDF075m pripadaju grupi *Radial Distribution Function* (RDF) deskriptora. 3D-MoRSE deskriptori pružaju molekularni prikaz strukture zasnovan na elektronskoj difrakciji. Ovi deskriptori mogu biti nekorigovani ili korigovani atomskom masom, atomskim van der Valsovim volumenom, atomskom Sandersonovom elektronegativnošću ili atomskom polarizabilnošću. Korigovanje (eng. *Weighting*) deskriptora je uvedeno kako bi se napravila razlika između atoma, jer su korigovani deskriptori osjetljivi na prisustvo određenim

molekulskih fragmenata. Mor04m je korigovan atomskom masom, dok je Mor04v korigovan van der Valsovim volumenom [196]. RDF deskriptori su zasnovani na raspodeli udaljenosti u geometrijskom prikazu molekula. RDF deskriptori imaju određene sličnosti sa funkcijom intenziteta rasutih elektrona (eng. *Scattered electron intensity - I(s)*), koja se koristi za određivanje 3D-MoRSE deskriptora. RDF deskriptori pružaju informacije o udaljenosti između atoma u molekulu, udaljenosti veza, tipu atoma i prstenova [72]. Mogu da se objasne i kao raspodela verovatnoće da se određeni atom pronađe u sfernoj zapremini sa radijusom r [197]. SsssNH⁺ pripada grupi deskriptora koji kodiraju topološke i elektronske informacije o određenom tipu atoma u molekulu. Oni kombinuju strukturne informacije o elektronskoj dostupnosti svakog tipa atoma, prisustvu ili odsustvu određenog tipa atoma i broju atoma. U oznaci SsssNH⁺, S se odnosi na sumu sssNH⁺ E-stanja, malo s označava jednostruku vezu, dok NH⁺ služi za identifikaciju hemijskog elementa. CATS2D_08_PL pripada grupi *Chemically Advanced Template Search* 2D deskriptora (CATS) [75].

RDF075m je prema dobijenim rezultatima označen kao najznačajniji za retenciju ispitivanih model supstanci u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu, pa je predstavljen u više detalja. RDF075m deskriptor predstavlja trodimenzionalnu distribuciju mase izračunatu na udaljenosti od 7,5 Å od geometrijskog centra molekula, i odnosi se na sterne faktore na istoj udaljenosti [198, 199]. Slika 28 prikazuje pozitivnu korelaciju RDF075m deskriptora sa retencionim faktorom ispitivanih model supstanci. Kako bi se odredile grupe koje najviše doprinose RDF075m deskriptoru, identifikovane su grupe koje se nalaze na udaljenosti od 7,5 Å od geometrijskog centra molekula. Ove grupe su označene i predstavljene na slici 29. Uočava se da fluor iz benzizoksazolnog prstena približno odgovara označenoj udaljenosti od geometrijskog centra molekula, u slučaju risperidona i srodnih supstanci. NMR eksperimenti su utvrdili da isti deo strukture (6-fluoro-1,2-benzizoksazol) risperidona i srodnih supstanci ulazi u šupljinu β -CD-a prilikom procesa formiranja inkluzionog kompleksa. Kod olanzapina i srodnih supstanci, grupe koje su locirane na 7,5 Å od geometrijskog centra molekula su metil grupe benzodiazepinskog prstena, koji prema rezultatima NMR studije ulazi u šupljinu β -CD-a. Ovi rezultati potkrepljuju postavljenu hipotezu da su ove grupe i njihovi sterne faktori najznačajniji u procesu formiranja inkluzionih kompleksa, i na ovaj način vrednost RDF075m deskriptora doprinosi retenciji ispitivanih supstanci.

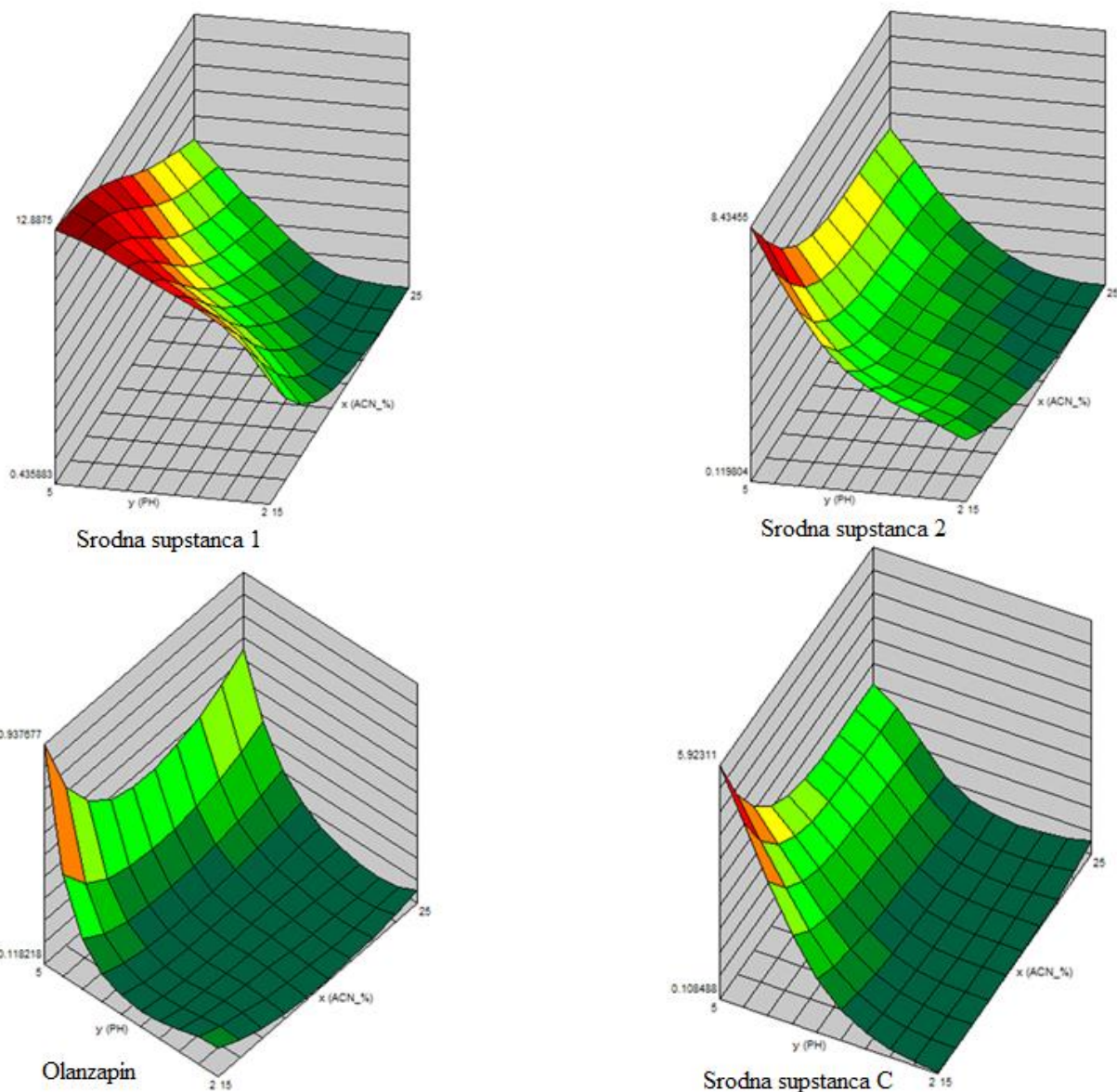


Slika 29: Identifikacija grupa koje su približno 7,5 Å udaljene od geometrijskog centra svake od ispitivanih supstanci u geometrijski optimizovanim konformacijama (prilagođeno iz [174])

Ukoliko posmatramo ispitivanu model smešu, risperidon ima najvišu vrednost RDF075m deskriptora (12,866), dok olanzapinova srodna supstanca B ima najnižu vrednost ovog deskriptora (1,224). Kako bi se procenio uticaj koncentracije β -CD-a na retenciju supstanci sa najvišom i najnižom vrednošću RDF075m deskriptora, određen je odnos između vrednosti retencionog faktora dobijenog pri 5 mM i 15 mM koncentraciji β -CD-a u mobilnoj fazi i ostalim faktorima koji su držani pri konstantnim vrednostima na srednjem nivou. Ukoliko posmatrano srodnu supstancu B, kao predstavnika supstanci sa niskom vrednošću RDF075m deskriptora dobijeni odnos vrednosti retencionih faktora je 1,32, dok je kod risperidona kao supstance sa visokom vrednošću RDF075m ovaj odnos iznosio 1,61. Prema tome, uticaj koncentracije β -CD-a na retenciju je malo veći kod supstanci sa višim vrednostima RDF075m deskriptora. Takođe, uticaj udela acetonitrila u mobilnoj fazi na retenciju je izraženiji kod supstanci sa visokim vrednostima RDF075m. Izračunati odnos retencionih faktora dobijenih pri najnižim i najvišim udelima acetonitrila u mobilnoj fazi je iznosio 4,37 za risperidon i 2,21 za srodnu supstancu B.

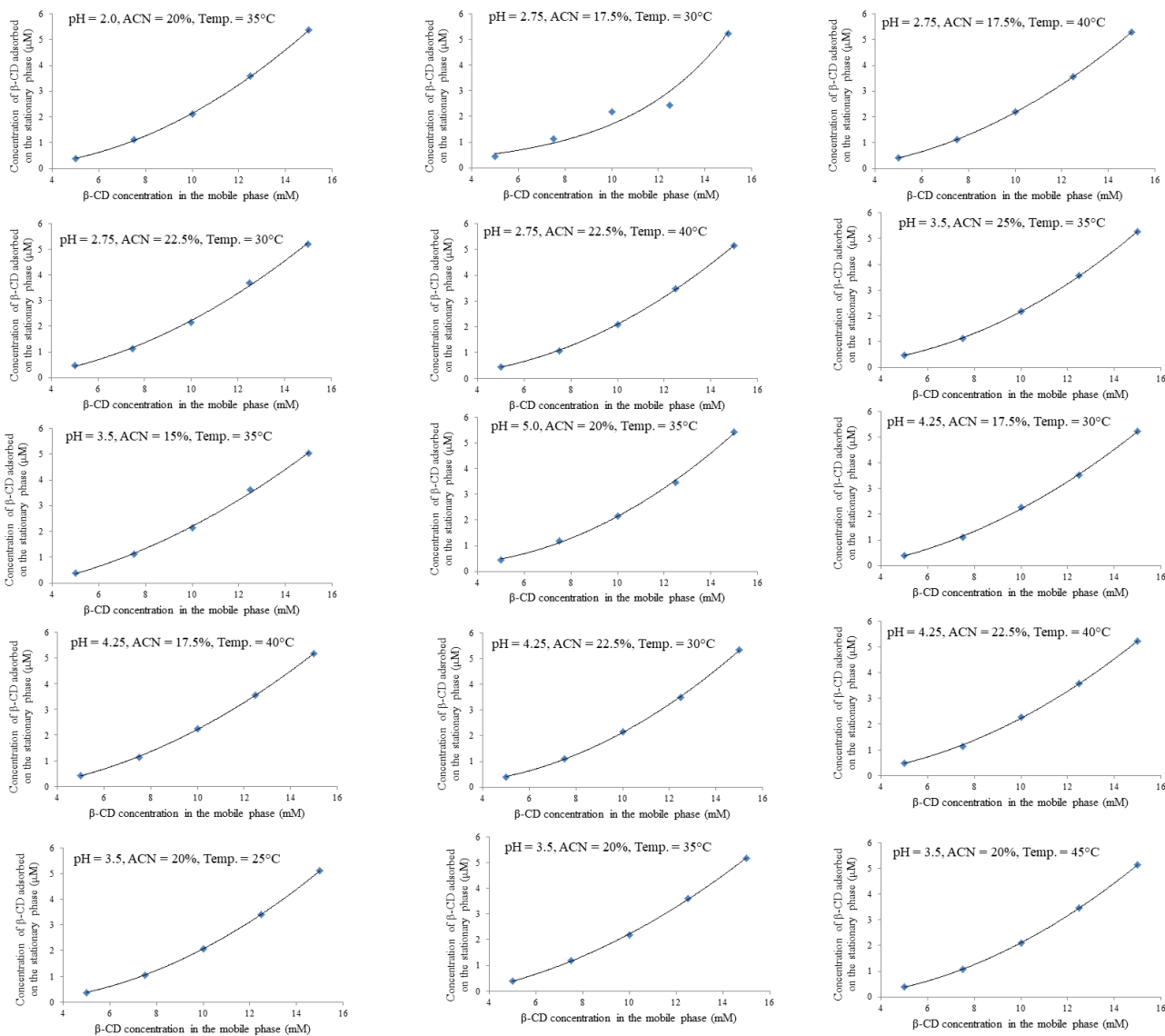
Mor04v i UE su u negativnoj korelaciji sa retencionim faktorom (Slika 28), što znači da sa povećanjem vrednosti deskriptora dolazi do smanjenja retencionog faktora. Mor04v deskriptor je izračunat uzimanjem sume svih van der Valsovih volumena atoma i korišćenjem različitih funkcija ugaonog rasipanja. Mor04v deskriptor prikazuje 3D poziciju atoma, koji određuju veličinu i oblik molekula [196]. Značaj ovog deskriptora u opisivanju retenciju u β -CD-modifikovanom RP-HPLC potvrđuje značajnost uloge molekulske veličine i oblika u retencionom ponašanju u ovakvim hromatografskim sistemima. Dodatno, visoke vrednosti UE uzrokuju smanjenje vrednosti retencionog faktora, što je posledica kompleksiranja. U tom pogledu, postavljena je hipoteza da ukoliko je nevezana energija sistema (eng. *Unbound system's energy*) visoka, slobodno stanje molekula je nestabilno, što istovremeno znači da je vezivanje termodinamički poželjno, pa je formirani inkluzioni kompleks stabilan. To za posledicu ima skraćanje retencionog vremena. CATS2D deskriptori su bazirani na topološkim distancama [75]. Odnos između retencionih faktora ispitivane model smeše i CATS2D_08_PL deskriptora može da se opiše polinomskom funkcijom.

Procenjen je i uticaj eksperimentalnih parametara, koji daju značajan doprinos performansama modela, na retenciju ispitivane model smeše. Kod supstanci koje menjaju jonizacionu formu u zatom opsegu pH vrednosti, ispitana je zavisnost retencionog faktora od udela acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze sa jedne strane (Slika 30), kao i od β -CD_A i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (Slika 33). U posmatranoj model smeši, prva supstanca kod koje se jonizaciona forma menja sa promenom pH je risperidonova srodna supstanca 1. Slika 30 prikazuje da je retenciono ponašanje supstanci koje jonizuju u skladu sa klasičnim RP-HPLC mehanizmima. Naime, vrednost retencionog faktora katjonske forme srodne supstance 1 (pH 2,0 i 2,75), dikatjonske forme srodne supstance 2 (pH do 5,0), smeše katjonske i dikatjonske forme olanzapina (pH do 5,0) i dikatjonske forme srodne supstance C (pH do 3,5) su relativno niske u celom ispitivanom opsegu udela acetonitrila. Kod srodne supstance 1 i srodne supstance C porast retencionog faktora je primećen kada je pH vrednost iznad 3,5 zbog rasprostranjenosti nejonizovane forme srodne supstance 1 i smeše katjonskog, dikatjonskog i nejonizovanog oblika srodne supstance C, i ovaj efekat je izraženiji ukoliko su udeli acetonitrila niži.



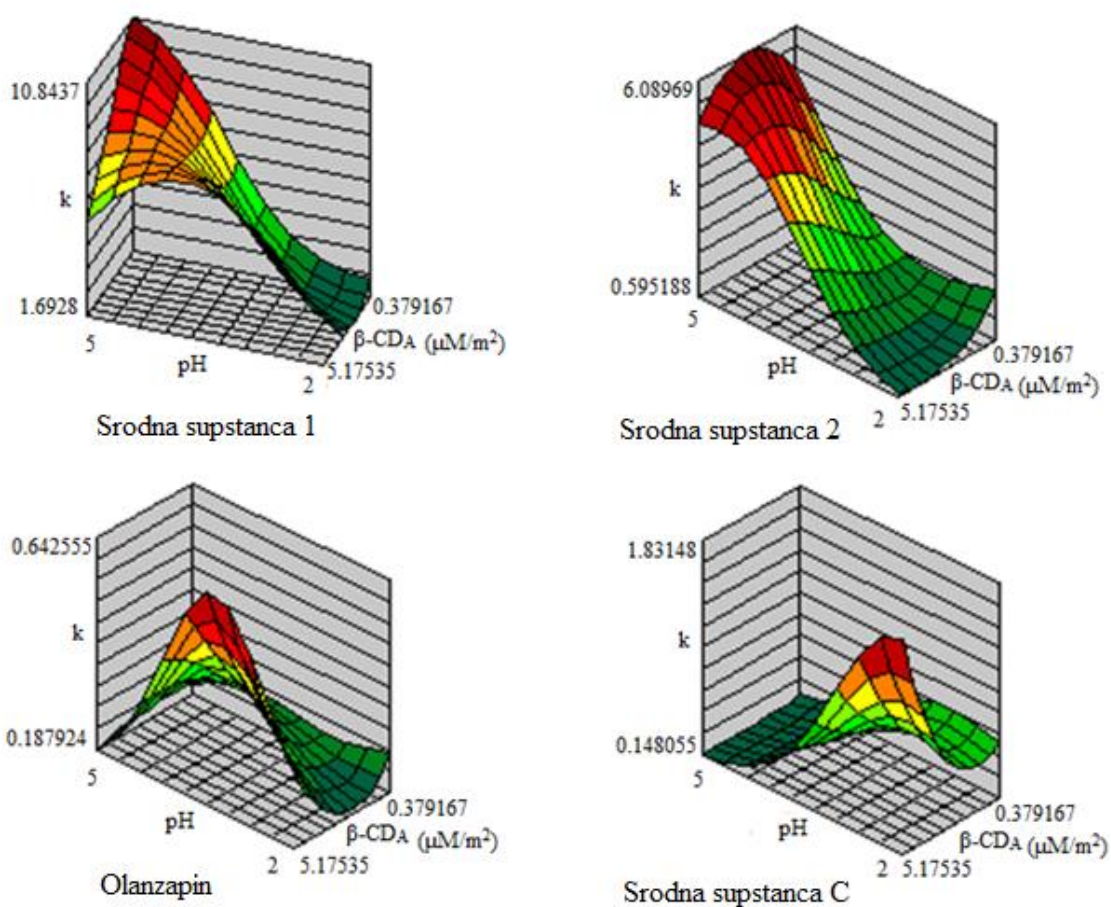
Slika 30: 3D grafici površine odgovora retencionog faktora jonizujućih supstanci u zavisnosti od udela acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (prilagođeno iz [175])

Pored uloge acetonitrila u retenciji, u β -CD-modifikovanom RP-HPLC uočava se uticaj kako slobodnog β -CD-a, tako i količine β -CD-a koja se adsorbuje na površinu stacionarne faze. Konstruisane adsorpcione izoterme (Slika 31) prikazuju zavisnost β -CD_A od koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi. β -CD_A. Adsorpcione izoterme prikazuju da β -CD_A ne postiže plato pri ispitivanim eksperimentalnim uslovima, ali veće koncentracije β -CD su prevazilazile njegovu rastvorljivost u mobilnoj fazi.



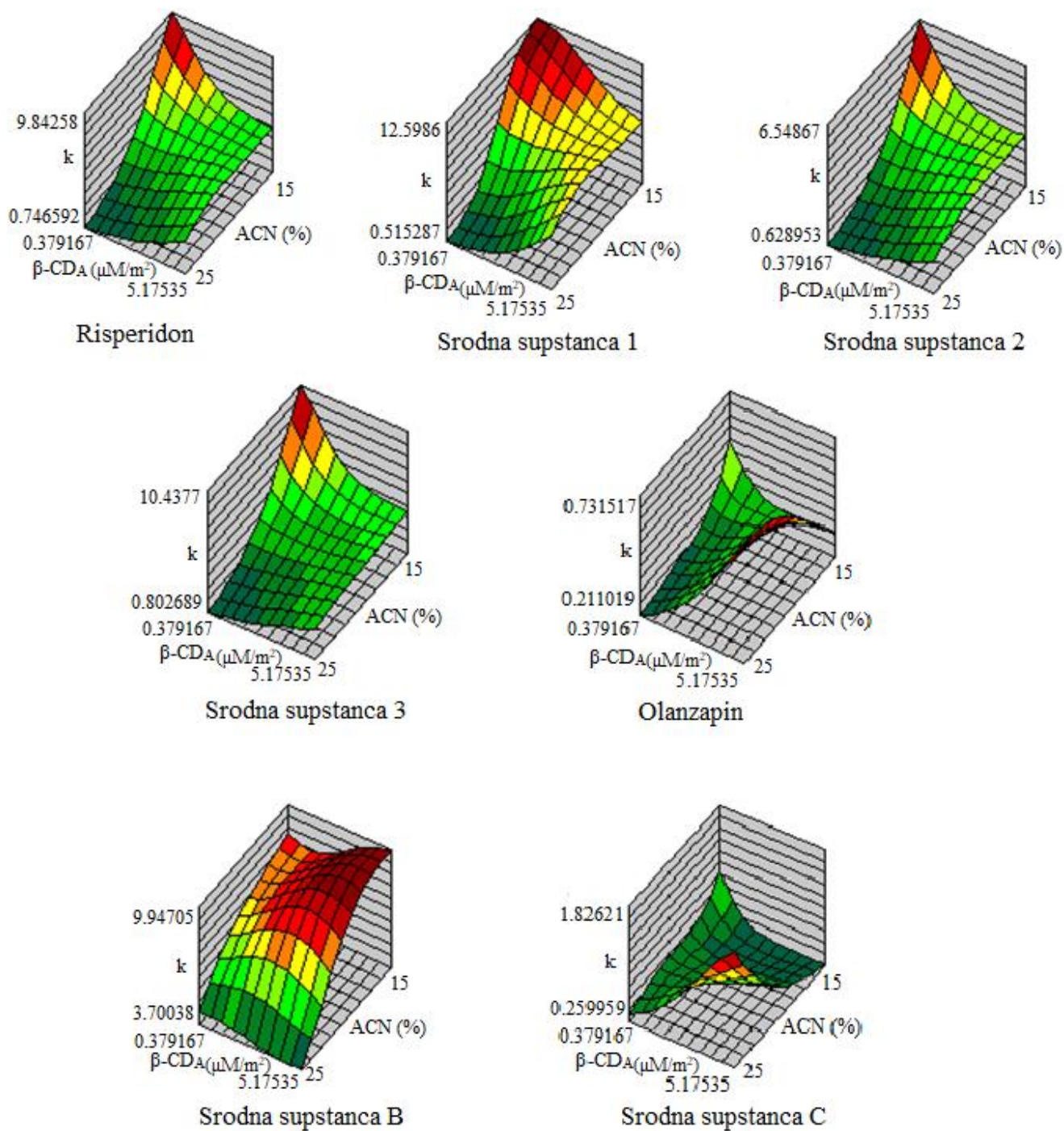
Slika 31: Adsorpcione izoterme (prilagođeno iz [175])

Promene u retencionom faktoru supstanci koje jonizuju diskutovane su u odnosu na promene pH vrednosti vodenog dela mobilne faze i β -CD_A (Slika 32). Retencioni faktor srodne supstance 1 i srodne supstance 2 raste sa porastom pH vrednosti i promenom jonizacione forme, nezavisno od β -CD_A, dok retencioni faktor olanzapina i srodne supstance C zanemarljivo varira sa promenom pH vrednosti i β -CD_A. U momentu kada β -CD_A dostiže svoju maksimalnu koncentraciju ($5,17 \mu\text{M m}^{-2}$) uočen je veoma interesantan efekat – retencioni faktor je rastao do određene vrednosti, a zatim je dolazilo do naglog pada, koji se kod različitih supstanci događao pri drugačijim pH vrednostima. Kod srodne supstance 1 i srodne supstance 2 ovaj pad u vrednosti retencionog faktora je uočen pri pH 5,0, kod olanzapina pri pH 2,5, a kod srodne supstance C pri pH 2,0. Uočen pad u vrednosti retencionog faktora nije povezan sa pH-zavisnom jonizacijom supstance. Međutim, pretpostavlja se da ukoliko je stacionarna faza zasićena sa β -CD-om, njegova dostupnost za kompleksiranje u mobilnoj fazi je povećana, zbog čega dolazi do skraćenja retencionog vremena.



Slika 32: 3D grafici površine odgovora retencionog faktora jonizujućih supstanci u zavisnosti of β -CD_A i pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (prilagođeno iz [175])

Model smeša sadrži i supstance koje u ispitivanom opsegu pH vrednosti ne jonizuju, pa je retenciono ponašanje supstanci koje čine model smešu ispitano i u zavisnosti od udela acetonitrila u mobilnoj fazi i β -CD_A (Slika 33). Kod risperidona i srodnih supstanci, kao i olanzapinove srodne supstance B najduže retenciono vreme je uočeno sa najmanjim udelima acetonitrila u mobilnoj fazi, nezavisno od β -CD_A. Međutim, pri najvišim vrednostima β -CD_A retencioni faktori ispitivanih supstanci rastu sa porastom udela acetonitrila i najveći su pri udelu acetonitrila od 20% (v/v). Pretpostavlja se da ukoliko je vrednost β -CD_A visoka, stacionarna faza se zasiti sa β -CD-om, pa postoji mogućnost adsorbovanja stabilnih inkluzionih kompleksa na njenu površinu, čime se suprimira njihovo eluiranje [200]. Zatim dolazi do ponovnog pada retencionog faktora sa daljim povećanjem udela acetonitrila u mobilnoj fazi. Sa udelima acetonitrila u mobilnoj fazi od 25% (v/v) retencioni faktori su imali niske vrednosti, nezavisno od vrednosti β -CD_A, ukazujući na činjenicu da pri ovim uslovima je retencija predvođena acetonitriplom. Retencioni faktori olanzapina i srodne supstance C se nisu značajno menjali sa promenama udela acetonitrila u mobilnoj fazi i β -CD_A.



Slika 33: 3D grafici površine odgovora retencionog faktora ispitivanih supstanci u zavisnosti od β -CD_A i udela acetonitrila u mobilnoj fazi (prilagođeno iz [175])

5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju je uspešno sprovedena karakterizacija inkluzionih kompleksa koji se formiraju između odabranih model supstanci i β -ciklodekstrina. ESI-MS metodom je određena stehiometrija i potvrđeno je da se svi inkluzioni kompleksi formiraju u 1:1 odnosu između ispitivane model supstance i β -CD-a. NMR eksperimentima je potvrđena relevantnost *in silico* alata, kao što je molekularni doking, u predviđanju struktura inkluzionih kompleksa, uz generalnu preporuku da se ispita veći broj supstanci, kako bi se utvrdilo pri kojim uslovima su *in silico* alati dovoljni u određivanju strukture inkluzionih kompleksa, odnosno koji uslovi zahtevaju dodatne NMR eksperimente.

Prvi put je uspostavljen QSRR-ANN model koji kvantifikuje zavisnost retencije od molekularskih deskriptora, deskriptora inkluzionih kompleksa i eksperimentalnih parametara u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Pokazano je da retenciono ponašanje olanzapina, risperidona i srodnih supstanci može biti adekvatno objašnjeno samo ukoliko model istovremeno uključuje molekularne deskriptore, deskriptore inkluzionih kompleksa i eksperimentalne parametre, kao ulazne promenljive. Nezavisno od njihovog individualnog uticaja na retenciono ponašanje, simultano uključivanje je neophodno kako bi se dobio model sa dobrim prediktivnim osobinama. Prema dobijenom QSRR-ANN modelu, najznačajniji deskriptori u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu su polarizabilnost, zapremina nedostupna rastvaraču, logaritam oktanol-voda particionog koeficijenta, dipol-dipol energija, energija vezivanja kompleksa, elektrostatička energija i nevezana energija sistema. Razvijeni model je omogućio efikasnu optimizaciju razdvajanja risperidona i srodnih supstanci, kao i olanzapina i srodnih supstanci. Primenom optimizovanih β -CD-modifikovanih RP-HPLC metoda razdvajanje risperidona i srodnih supstanci je postignuto za tri minuta kraće vreme, a olanzapina i srodnih supstanci za osam minuta kraće vreme u odnosu na optimizovanu RP-HPLC metodu bez dodatog β -CD u mobilnu fazu. Pouzdanost metoda je potvrđena kroz procenu selektivnosti, osetljivosti, linearnosti, tačnosti i preciznosti. Validirane metode su pokazale i odličan analitički ekološki skor (92/100), čime je potvrđena njihova ekološka prihvatljivost.

QSRR-ANN model je uspeo da predvidi promenu vrednosti retencionog faktora do koje dolazi usled kompleksiranja u definisanom eksperimentalnom prostoru. Predviđene promene vrednosti retencionog faktora su poslužile za izračunavanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa i termodinamičkih parametara kompleksiranja u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu, bez izvođenja velikog broja eksperimenata. Primena *in silico* prediktivnih alata se izdvojila kao alternativa eksperimentima, posebno zbog redukovane upotrebe rastvarača i hemikalija, čime se i troškovi analize svode na minimum.

I QSRR-ANN modelovanje i HPLC eksperimenti su pokazali da se konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa ne mogu odrediti na osnovu promene vrednosti retencionog faktora usled kompleksiranja pri svim eksperimentalnim uslovima. Na primeru ispitivane model smeše uočeno je da je konstanta stabilnosti uspešno izračunata ukoliko je pH vodene faze 2,0, nezavisno od ostalih uslova, jer pri ovoj pH vrednosti dolazi do smanjenja sekundarnih interakcija sa slobodnim silanolnim grupama stacionarne faze. Promena retencionog faktora risperidona i srodnih supstanci bila je pod velikim uticajem udela acetonnitrila u mobilnoj fazi, dok retencija olanzapina i srodnih supstanci nije bila samo pod uticajem eksperimentalnih uslova, već su ključnu ulogu imali i sposobnost jonizacije supstance, kao i dijametar molekula. Uočeno retenciono ponašanje odabranih model supstanci u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu nije u skladu sa poznatim teorijama o

ovakvim hromatografskim sistemima i do sada nije opisano u literaturi. Iz tog razloga je poželjno ovaj fenomen potvrditi na opširnijem setu model supstanci, koje bi se razlikovale u lipofilnosti, sposobnosti jonizacije, kao i sposobnosti za formiranje inkluzionih kompleksa sa β -CD-om.

CAD je omogućio razdvajanje pika slobodne supstance i inkluzionog kompleksa koji ta supstanca formira sa β -CD-om. Ustanovljeno je da se slobodna supstanca i formirani kompleks eluiraju prema sopstvenim retencionim mehanizmima, koji su pod značajnim uticajem log P vrednosti i jonizacione forme, što ukazuje na značaj strukturnih karakteristika u retencionom ponašanju supstanci u ovakvim hromatografskim sistemima. Potvrđeno je da lipofilnije supstance grade stabilnije inkluzione komplekse. Dodatno, ukoliko je deo supstance koji se nalazi izvan CD-ske šupljine nejonizovan, smanjene su interakcije sa stacionarnom fazom, što takođe doprinosi razdvajanju pika slobodne supstance i kompleksa. Konstante stabilnosti kompleksa koji se formira između srodne supstance B i β -CD-a su uspešno izračunate primenom *Benesi-Hildebrand* jednačine. Međutim, ukoliko se slobodna supstanca i formirani kompleks eluiraju na istom retencionom vremenu, konstante stabilnosti kompleksa su izračunate primenom novog, u ovom radu prvi put opisanog metodološkog pristupa. Ovaj metodološki pristup za izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa je potvrđen na ispitivanoj model smeši.

U poslednjem delu istraživanja razvijen je prošireni QSRR-ANN model, koji je pokazao izuzetne performanse i sposobnost pronalaženja faktora koji najviše utiču na retenciju u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Izražen uticaj molekulske strukture na retenciju je najbolje opisan kroz deskriptore, koji nose informacije o lipofilnosti, dimenzijama i obliku molekula, kao i udaljenosti grupa, koje su odgovorne za vezivanje sa β -CD-om. Ovi deskriptori su najviše udruženi sa promenama u retencionom faktoru, a među njima prednost se daje RDF075m deskriptoru, koji govori o uticaju grupa koje su 7,5 Å udaljene od geometrijskog centra molekula na retenciju. Takođe je pokazano da je uticaj koncentracije β -CD-a i udela acetonitrila u mobilnoj fazi na retenciju izraženiji kod supstanci sa većim vrednostima RDF075m deskriptora. Dodatno, retenciju određuje veličina i lipofilnost upotrebljenog CD-a, jer od njegovih karakteristika zavisi i strukturno uklapanje molekula koji sa CD-om formiraju komplekse.

Kod supstanci koje jonizuju potvrđen je značajan uticaj pH vrednosti vodene faze na retenciono ponašanje. Ukoliko se posmatra uticaj pH vodene faze i koncentracije β -CD adsorbovane na površinu stacionarne faze (β -CD_A), promene u retencionom ponašanju se uočavaju samo pri najvišim vrednostima β -CD_A, ali ove promene nisu u vezi sa jonizacionom formom ispitivanih supstanci. Udeo acetonitrila u mobilnoj fazi i β -CD_A takođe utiču na retenciju jonizujućih supstanci u ispitivanom opsegu pH vrednosti. Ukoliko je udeo acetonitrila u mobilnoj fazi 25% (v/v), vrednosti retencionog faktora su niske, nezavisno od β -CD_A, i smatra se da je pri ovim uslovima retencija određena mehanizmima interakcije acetonitrila sa ispitivanim supstancama i stacionarnom fazom.

Primena *in silico* alata, kao što je molekulski doking u određivanju strukture inkluzionih kompleksa i QSRR-ANN modeli u predviđanju retencionog ponašanja i izračunavanju konstanti stabilnosti kompleksa, doprinosi generalnom konceptu održivosti u RP-HPLC-u, jer dovodi do ušteda u vremenu, novcu i resursima. Rezultati ovog istraživanja daju preporuke za korišćenje dostupnih *in silico* pristupa u karakterizaciji β -CD-modifikovanih RP-HPLC sistema. Međutim, proces formiranja inkluzionih kompleksa sa β -CD-om, iako opsežno ispitivan, i dalje nije u potpunosti jasan. Iz tog razloga, nije jednostavno prevideti koji tačno deo strukture određene supstance će se

inkorporirati u šupljinu CD-a, kao i koliki je afinitet određenog molekula za vezivanje sa CD-om. Postojeće nedoumice otvaraju nova istraživačka pitanja. Prema tome, oblast kompleksiranja različitih supstanci sa CD-inima, se i dalje može smatrati pionirskom, koliko god to kontradiktorno bilo svim godinama koje su posvećene izučavanja CD-skih sistema.

6. LITERATURA

1. Dodziuk H. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications: John Wiley & Sons; 2006.
2. Jin Z-Y. Cyclodextrin chemistry: Preparation and application: World Scientific; 2013.
3. Szente L, Szemán J, Sohajda T. Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;130:347-65.
4. Alston DR, Ashton PR, Lilley TH, Stoddart JF, Zarzycki R, Slawin AM, et al. Second-sphere coordination of carboplatin and rhodium complexes by cyclodextrins (cyclomalto-oligosaccharides). *Carbohydr Res.* 1989;192:259-81.
5. Connors KA. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem Rev.* 1997;97(5):1325-58.
6. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev.* 1998;98(5):1743-54.
7. Schneiderman E, Stalcup AM. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B: Biomedical sciences and applications.* 2000;745(1):83-102.
8. Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 2004;39(9):1033-46.
9. Singh M, Sharma R, Banerjee U. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv.* 2002;20(5-6):341-59.
10. Jug M, Bećirević-Laćan M. Cyclodextrin-based pharmaceutical. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti: Medicinske znanosti.* 2008 (499= 32):9-26.
11. Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res.* 1997;14(5):556-67.
12. Bhardwaj R, Dorr RT, Blanchard J. Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclodextrins. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2000;54(3):233-9.
13. Fujishima N, Kusaka K, Umino T, Urushinata T, Terumi K. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. Japanese patent JP. 2001;136:898.
14. Szejtli J, Szente L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;61(3):115-25.
15. Hougeir FG, Kircik L. A review of delivery systems in cosmetics. *Dermatol Ther.* 2012;25(3):234-7.
16. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech.* 2005;6(2):E329-E57.
17. Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2007;329(1-2):1-11.
18. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2018;535(1-2):272-84.
19. Lai X, Tang W, Ng S-C. Novel cyclodextrin chiral stationary phases for high performance liquid chromatography enantioseparation: Effect of cyclodextrin type. *J Chromatogr A.* 2011;1218(33):5597-601.
20. Armenta S, Garrigues S, De la Guardia M. Green analytical chemistry. *TrAC, Trends Anal Chem.* 2008;27(6):497-511.
21. Płotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. *J Chromatogr A.* 2013;1307:1-20.
22. González-Ruiz V, León AG, Olives AI, Martín MA, Menéndez JC. Eco-friendly liquid chromatographic separations based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives. *Green Chemistry.* 2011;13(1):115-26.
23. Chankvetadze B. Liquid chromatographic separation of enantiomers. *Liquid Chromatography: Elsevier;* 2017. p. 69-86.
24. Shieh WJ, Hedges A. Properties and applications of cyclodextrins. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry.* 1996;33(5):673-83.
25. Cserhádi T, Forgács E. Cyclodextrins in chromatography: Royal Society of Chemistry; 2003.
26. Mazzobre M, Elizalde B, dos Santos C, Cevallos PP, Buera M. Nanoencapsulation of food ingredients in cyclodextrins: Effect of water interactions and ligand structure. *Functional food product development.* 2010;2:24.
27. Abarca RL, Rodríguez FJ, Guarda A, Galotto MJ, Bruna JE. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem.* 2016;196:968-75.

28. Marques HMC. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Fragrance J.* 2010;25(5):313-26.
29. Maljurić N, Golubović J, Otašević B, Zečević M, Protić A. Quantitative structure–retention relationship modeling of selected antipsychotics and their impurities in green liquid chromatography using cyclodextrin mobile phases. *Anal Bioanal Chem.* 2018:1-18.
30. Moraes CM, Abrami P, de Paula E, Braga AF, Fraceto LF. Study of the interaction between S (-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm.* 2007;331(1):99-106.
31. Ravelet C, Geze A, Villet A, Grosset C, Ravel A, Wouessidjewe D, et al. Chromatographic determination of the association constants between nimesulide and native and modified β -cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;29(3):425-30.
32. Shuang S, Choi MM. Retention behaviour and fluorimetric detection of procaine hydrochloride using carboxymethyl- β -cyclodextrin as an additive in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2001;919(2):321-9.
33. Singh R, Bharti N, Madan J, Hiremath S. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes—a review. *J Pharm Sci Technol.* 2010;2(3):171-83.
34. Loftsson T, Másson M, Brewster ME. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci.* 2004;93(5):1091-9.
35. Maljurić N, Otašević B, Malenović A, Zečević M, Protić A. Quantitative structure retention relationship modeling as potential tool in chromatographic determination of stability constants and thermodynamic parameters of β -cyclodextrin complexation process. *J Chromatogr A.* 2020:460971.
36. Lisec O, Hugo P, Seidel-Morgenstern A. Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms. *J Chromatogr A.* 2001;908(1-2):19-34.
37. Guiochon G, Felinger A, Shirazi DG. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*: Elsevier; 2006.
38. Knox JH, Hartwick RA. Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic hetaerons. *J Chromatogr A.* 1981;204:3-21.
39. Cecchi T. Retention Mechanism for Ion-Pair Chromatography with Chaotropic Reagents. From Ion-Pair Chromatography toward a Unified Salt Chromatography. *Adv Chromatogr.* 2011;49:1-35.
40. Vemić A, Kalinić M, Erić S, Malenović A, Medenica M. The influence of salt chaotropicity, column hydrophobicity and analytes' molecular properties on the retention of pramipexole and its impurities. *J Chromatogr A.* 2015;1386:39-46.
41. Gabelica V, Galic N, De Pauw E. On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002;13(8):946-53.
42. Uekama K, Hirayama F, Ikeda K, Inaba K. Utilization of cyclodextrin complexation for separation of E, A, and B prostaglandins by ion-exchange liquid chromatography. *J Pharm Sci.* 1977;66(5):706-10.
43. Armstrong DW, Nome F, Spino LA, Golden TD. Efficient detection and evaluation of cyclodextrin multiple complex formation. *J Am Chem Soc.* 1986;108(7):1418-21.
44. Danel C, Azaroual N, Brunel A, Lannoy D, Vermeersch G, Odou P, et al. Study of the complexation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with cyclodextrin hosts using affinity capillary electrophoresis and ^1H NMR spectroscopy. *J Chromatogr A.* 2008;1215(1):185-93.
45. Tablet C, Matei I, Hillebrand M. The determination of the stoichiometry of cyclodextrin inclusion complexes by spectral methods: possibilities and limitations. *Stoichiometry and Research—The Importance of Quantity in Biomedicine.* 2012:47-76.
46. Condict L, Hung A, Ashton J, Kasapis S. High-temperature binding parameters and molecular dynamics of 4-hydroxybenzoic acid and β -casein complexes, determined via the method of continuous variation and fluorescence spectroscopy. *Food Hydrocolloids.* 2021;114:106567.
47. Dotsikas Y, Loukas YL. Efficient determination and evaluation of model cyclodextrin complex binding constants by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14(10):1123-9.
48. McLafferty FW. Tandem mass spectrometry. *Science.* 1981;214(4518):280-7.
49. Daniel JM, Friess SD, Rajagopalan S, Wendt S, Zenobi R. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *Int J Mass spectrom.* 2002;216(1):1-27.
50. Ganem B, Li YT, Henion JD. Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* 1991;113(16):6294-6.

51. Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;101:238-50.
52. Lancioni C, Keunchkarian S, Castells CB, Gagliardi LG. Determination of thermodynamic binding constants by affinity capillary electrophoresis. *Talanta.* 2019;192:448-54.
53. Sursyakova VV, Maksimov NG, Levdansky VA, Rubaylo AI. Combination of phase-solubility method and capillary zone electrophoresis to determine binding constants of cyclodextrins with practically water-insoluble compounds. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;160:12-8.
54. Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem Rev.* 1998;98(5):1875-918.
55. Kríž Z, Koča J, Imberty A, Charlot A, Auzély-Velty R. Investigation of the complexation of (+)-catechin by β -cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques. *Organic & biomolecular chemistry.* 2003;1(14):2590-5.
56. Sun D-Z, Li L, Qiu X-M, Liu F, Yin B-L. Isothermal titration calorimetry and ^1H NMR studies on host-guest interaction of paeonol and two of its isomers with β -cyclodextrin. *Int J Pharm.* 2006;316(1-2):7-13.
57. Manzoori JL, Amjadi M. Spectrofluorimetric study of host-guest complexation of ibuprofen with β -cyclodextrin and its analytical application. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2003;59(5):909-16.
58. Saroj MK, Payal R, Jain SK, Sharma N, Rastogi RC. Investigation of indole chalcones encapsulation in β -cyclodextrin: determination of stoichiometry, binding constants and thermodynamic parameters. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 2018;90(3-4):305-20.
59. Rozou S, Michaleas S, Antoniadou-Vyza E. Study of structural features and thermodynamic parameters, determining the chromatographic behaviour of drug-cyclodextrin complexes. *J Chromatogr A.* 2005;1087(1):86-94.
60. Liu Y, Jin L, Zhang H-Y. Inclusion Complexation Thermodynamics of Acridine Red and Rhodamine B by Natural and Novel Oligo (ethylenediamine) Tethered Schiff Base β -Cyclodextrin. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry.* 2002;42(1-2):115-20.
61. Aljhani R, Andre C, Lethier L, Guillaume YC. An HPLC chromatographic framework to analyze the β -cyclodextrin/solute complexation mechanism using a carbon nanotube stationary phase. *Talanta.* 2015;144:226-32.
62. Hancock T, Put R, Coomans D, Vander Heyden Y, Everingham Y. A performance comparison of modern statistical techniques for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic QSRR studies. *Chemometrics Intellig Lab Syst.* 2005;76(2):185-96.
63. Kaliszan R, van Straten MA, Markuszewski M, Cramers CA, Claessens HA. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships. *J Chromatogr A.* 1999;855(2):455-86.
64. Aschi M, D'Archivio AA, Maggi MA, Mazzeo P, Ruggieri F. Quantitative structure-retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta.* 2007;582(2):235-42.
65. Goryński K, Bojko B, Nowaczyk A, Buciński A, Pawliszyn J, Kaliszan R. Quantitative structure-retention relationships models for prediction of high performance liquid chromatography retention time of small molecules: endogenous metabolites and banned compounds. *Anal Chim Acta.* 2013;797:13-9.
66. Bączek T, Kaliszan R, Novotná K, Jandera P. Comparative characteristics of HPLC columns based on quantitative structure-retention relationships (QSRR) and hydrophobic-subtraction model. *J Chromatogr A.* 2005;1075(1-2):109-15.
67. Sadek PC, Carr PW, Doherty RM, Kamlet MJ, Taft RW, Abraham MH. Study of retention processes in reversed-phase high-performance liquid chromatography by the use of the solvatochromic comparison method. *Anal Chem.* 1985;57(14):2971-8.
68. Abraham MH, McGowan J. The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia.* 1987;23(4):243-6.
69. Kaliszan R, Bączek T, Buciński A, Buszewski B, Sztupecka M. Prediction of gradient retention from the linear solvent strength (LSS) model, quantitative structure-retention relationships (QSRR), and artificial neural networks (ANN). *J Sep Sci.* 2003;26(3-4):271-82.

70. Čolović J, Kalinić M, Vemić A, Erić S, Malenović A. Investigation into the phenomena affecting the retention behavior of basic analytes in chaotropic chromatography: Joint effects of the most relevant chromatographic factors and analytes' molecular properties. *J Chromatogr A*. 2015;1425:150-7.
71. Golubović J, Birkemeyer C, Protić A, Otašević B, Zečević M. Structure–response relationship in electrospray ionization-mass spectrometry of sartans by artificial neural networks. *J Chromatogr A*. 2016;1438:123-32.
72. Todeschini R, Consonni V. *Handbook of molecular descriptors*: John Wiley & Sons; 2008.
73. Bodzioch K, Durand A, Kaliszan R, Bączek T, Vander Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta*. 2010;81(4):1711-8.
74. Karelson M, Lobanov VS, Katritzky AR. Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. *Chem Rev*. 1996;96(3):1027-44.
75. Todeschini R, Consonni V. *Molecular descriptors for chemoinformatics: volume I: alphabetical listing/volume II: appendices, references*: John Wiley & Sons; 2009.
76. Consonni V, Todeschini R, Pavan M. Structure/response correlations and similarity/diversity analysis by GETAWAY descriptors. 1. Theory of the novel 3D molecular descriptors. *J Chem Inf Comput Sci*. 2002;42(3):682-92.
77. Soltzberg LJ, Wilkins CL. Molecular transforms: a potential tool for structure-activity studies. *J Am Chem Soc*. 1977;99(2):439-43.
78. Schuur J, Gasteiger J. Infrared spectra simulation of substituted benzene derivatives on the basis of a 3D structure representation. *Anal Chem*. 1997;69(13):2398-405.
79. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*. 1998;19(14):1639-62.
80. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Molecular modeling of proteins*: Springer; 2008. p. 365-82.
81. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785-91.
82. Goodarzi M, Jensen R, Vander Heyden Y. QSRR modeling for diverse drugs using different feature selection methods coupled with linear and nonlinear regressions. *J Chromatogr B*. 2012;910:84-94.
83. Krmar J, Vukićević M, Kovačević A, Protić A, Zečević M, Otašević B. Performance comparison of nonlinear and linear regression algorithms coupled with different attribute selection methods for Quantitative Structure-Retention Relationships modelling in micellar liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2020:461146.
84. Duarte A, Capelo S. Application of chemometrics in separation science. *J Liq Chromatogr Rel Technol*. 2006;29(7-8):1143-76.
85. Daszykowski M, Walczak B. Use and abuse of chemometrics in chromatography. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2006;25(11):1081-96.
86. Graupe D. *Principles of artificial neural networks*: World Scientific; 2013.
87. Marini F, Bucci R, Magrì A, Magrì A. Artificial neural networks in chemometrics: History, examples and perspectives. *Microchem J*. 2008;88(2):178-85.
88. Zupan J. Introduction to artificial neural network (ANN) methods: what they are and how to use them. *Acta Chimica Slovenica*. 1994;41:327-.
89. Svozil D, Kvasnicka V, Pospichal J. Introduction to multi-layer feed-forward neural networks. *Chemometrics Intellig Lab Syst*. 1997;39(1):43-62.
90. Carlucci G, D'Archivio AA, Maggi MA, Mazzeo P, Ruggieri F. Investigation of retention behaviour of non-steroidal anti-inflammatory drugs in high-performance liquid chromatography by using quantitative structure–retention relationships. *Anal Chim Acta*. 2007;601(1):68-76.
91. Smits J, Melssen W, Buydens L, Kateman G. Using artificial neural networks for solving chemical problems: Part I. Multi-layer feed-forward networks. *Chemometrics Intellig Lab Syst*. 1994;22(2):165-89.
92. Priddy KL, Keller PE. *Artificial neural networks: an introduction*: SPIE press; 2005.

93. Golubović J, Protić A, Zečević M, Otašević B, Mikić M, Živanović L. Quantitative structure–retention relationships of azole antifungal agents in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2012;100:329-37.
94. Veerasamy R, Rajak H, Jain A, Sivadasan S, Varghese CP, Agrawal RK. Validation of QSAR models–strategies and importance. *International Journal of Drug Design & Discovery*. 2011;3:511-9.
95. Roy K, Kar S, Das RN. *A primer on QSAR/QSPR modeling: Fundamental concepts*: Springer; 2015.
96. Bordás B, Kömives T, Szántó Z, Lopata A. Comparative Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship Study of Safeners and Herbicides. *J Agric Food Chem*. 2000;48(3):926-31.
97. Fan Y, Shi LM, Kohn KW, Pommier Y, Weinstein JN. Quantitative structure-antitumor activity relationships of camptothecin analogues: cluster analysis and genetic algorithm-based studies. *J Med Chem*. 2001;44(20):3254-63.
98. Suzuki T, Ide K, Ishida M, Shapiro S. Classification of environmental estrogens by physicochemical properties using principal component analysis and hierarchical cluster analysis. *J Chem Inf Comput Sci*. 2001;41(3):718-26.
99. Lancashire LJ, Lemetre C, Ball GR. An introduction to artificial neural networks in bioinformatics—application to complex microarray and mass spectrometry datasets in cancer studies. *Briefings in bioinformatics*. 2009;10(3):315-29.
100. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2013;50:78-84.
101. Anastas P, Eghbali N. *Green chemistry: principles and practice*. *Chem Soc Rev*. 2010;39(1):301-12.
102. Bendicho C, Lavilla I, Pena-Pereira F, Romero V. Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review. *J Anal At Spectrom*. 2012;27(11):1831-57.
103. Welch CJ, Wu N, Biba M, Hartman R, Brkovic T, Gong X, et al. Greening analytical chromatography. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2010;29(7):667-80.
104. Tobiszewski M, Namieśnik J. Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2012;35:67-73.
105. Koel M. Do we need green analytical chemistry? *Green Chemistry*. 2016;18(4):923-31.
106. Shaaban H. New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(25):6929-44.
107. Dispas A, Lebrun P, Sassiati P, Ziemons E, Thiébaud D, Vial J, et al. Innovative green supercritical fluid chromatography development for the determination of polar compounds. *J Chromatogr A*. 2012;1256:253-60.
108. Yabré M, Ferey L, Somé I, Gaudin K. Greening reversed-phase liquid chromatography methods using alternative solvents for pharmaceutical analysis. *Molecules*. 2018;23(5):1065.
109. Van Aken K, Streckowski L, Patiny L. EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2006;2(1):3.
110. Raynie D, Driver JL, editors. *Green assessment of chemical methods*. 13th Green Chem Conf, USA; 2009.
111. Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2012;37:61-72.
112. Germann D, Kurylo N, Han F. Risperidone. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 37: Elsevier; 2012. p. 313-61.
113. Musenga A, Saracino MA, Sani G, Raggi MA. Antipsychotic and antiepileptic drugs in bipolar disorder: the importance of therapeutic drug monitoring. *Curr Med Chem*. 2009;16(12):1463-81.
114. Sattanathan P, Babu JM, Vyas K, Reddy R, Rajan S, Sudhakar P. Structural studies of impurities of risperidone by hyphenated techniques. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40(3):598-604.
115. Bharathi C, Chary DK, Kumar MS, Shankar R, Handa V, Dandala R, et al. Identification, isolation and characterization of potential degradation product in risperidone tablets. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;46(1):165-9.
116. El-Sherif ZA, El-Zeany B, El-Houssini OM. High performance liquid chromatographic and thin layer densitometric methods for the determination of risperidone in the presence of its degradation products in bulk powder and in tablets. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;36(5):975-81.

117. Tomar RS, Joseph T, Murthy A, Yadav D, Subbaiah G, Reddy KK. Identification and characterization of major degradation products of risperidone in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;36(1):231-5.
118. Suthar A, Dubey S, Patel S, Shah A. Determination of Risperidone and forced degradation behavior by HPLC in tablet dosage form. *International Journal of PharmTech Research.* 2009;1(3):568-74.
119. García Peña CM, Martínez Miranda L, Iraizoz Barrios A, Martínez Espinosa V, Torres García M, León Guerrero GM. Método analítico para la cuantificación y ensayo de disolución de risperidona tabletas 3 mg. *Revista Cubana de Farmacia.* 2009;43(4):31-44.
120. Imam SS, Aqil M, Akhtar M, Sultana Y, Ali A. Optimization of mobile phase by 3 2-mixture design for the validation and quantification of risperidone in bulk and pharmaceutical formulations using RP-HPLC. *Analytical Methods.* 2014;6(1):282-8.
121. Rub RA, Beg S, Kazmi I, Afzal O, Almalki WH, Alghamdi S, et al. Systematic development of a bioanalytical UPLC-MS/MS method for estimation of risperidone and its active metabolite in long-acting microsphere formulation in rat plasma. *J Chromatogr B.* 2020;1160:122433.
122. Ezzeldin E, Abo-Talib NF, Tammam MH. UPLC-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of fluoxetine, risperidone, and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in plasma: application to pharmacokinetics study in rats. *Journal of analytical methods in chemistry.* 2017;2017.
123. Mandrioli R, Mercolini L, Lateana D, Boncompagni G, Raggi MA. Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. *J Chromatogr B.* 2011;879(2):167-73.
124. Saracino MA, de Palma A, Boncompagni G, Raggi MA. Analysis of risperidone and its metabolite in plasma and saliva by LC with coulometric detection and a novel MEPS procedure. *Talanta.* 2010;81(4-5):1547-53.
125. Locatelli I, Mrhar A, Grabnar I. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone enantiomers in human blood plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;50(5):905-10.
126. Schneider S, Sibille E, Yegles M, Neels H, Wennig R, Mühe A. Time resolved analysis of risperidone and 9-hydroxy-risperidone in hair using LC/MS-MS. *J Chromatogr B.* 2009;877(24):2589-92.
127. Kirschbaum KM, Finger S, Vogel F, Burger R, Gerlach M, Riederer P, et al. LC with column-switching and spectrophotometric detection for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human serum. *Chromatographia.* 2008;67(3):321-4.
128. De Meulder M, Remmerie BM, de Vries R, Sips LL, Boom S, Hooijschuur EW, et al. Validated LC-MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine. *J Chromatogr B.* 2008;870(1):8-16.
129. Čabovska B, Cox S, Vinks A. Determination of risperidone and enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B.* 2007;852(1-2):497-504.
130. Kousoulos C, Dotsikas Y, Loukas YL. Turbulent flow and ternary column-switching on-line clean-up system for high-throughput quantification of risperidone and its main metabolite in plasma by LC-MS/MS: application to a bioequivalence study. *Talanta.* 2007;72(2):360-7.
131. Foroutan SM, Zarghi A, Shafaati A. Rapid high performance liquid chromatographic determination of risperidone in human plasma. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2010 (1):37-70.
132. Bhatt J, Subbaiah G, Singh S. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry.* 2006;20(14):2109-14.
133. Zhang L, Jiao Z, Yao Z, Zhong Y, Zhong M, Yu Y. The validation of an LC-MS method for the determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma. *Chromatographia.* 2005;61(5):245-51.
134. Raggi MA, Bugamelli F, Sabbioni C, Saracino MA, Petio C. HPLC-DAD determination of plasma levels of the antipsychotic risperidone and its main metabolite for toxicological purposes. *J Sep Sci.* 2005;28(3):245-50.

135. Flarakos J, Luo W, Aman M, Svinarov D, Gerber N, Vouros P. Quantification of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma and saliva from adult and pediatric patients by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004;1026(1-2):175-83.
136. Moody DE, Laycock JD, Huang W, Foltz RL. A high-performance liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometric method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma. *J Anal Toxicol*. 2004;28(6):494-7.
137. Remmerie B, Sips L, De Vries R, De Jong J, Schothuis A, Hooijschuur E, et al. Validated method for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2003;783(2):461-72.
138. Llerena A, Berecz R, Dorado P, de la Garza CS, Norberto MaJ, Cáceres M, et al. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography: application to the evaluation of CYP2D6 drug interactions. *J Chromatogr B*. 2003;783(1):213-9.
139. Titier K, Deridet E, Cardone E, Abouelfath A, Moore N. Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma after overdose. *J Chromatogr B*. 2002;772(2):373-8.
140. Aravagiri M, Marder SR. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2000;35(6):718-24.
141. Avenoso A, Facciola G, Salemi M, Spina E. Determination of risperidone and its major metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000;746(2):173-81.
142. Balant-Gorgia AE, Gex-Fabry M, Genet C, Balant LP. Therapeutic drug monitoring of risperidone using a new, rapid HPLC method: reappraisal of interindividual variability factors. *Ther Drug Monit*. 1999;21(1):105-15.
143. Nagasaki T, Ohkubo T, Sugawara K, Yasui N, Furukori H, Kaneko S. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to therapeutic drug monitoring in Japanese patients with schizophrenia. *J Pharm Biomed Anal*. 1999;19(3-4):595-601.
144. Olesen OV, Linnet K. Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in serum from patients comedicated with other psychotropic drugs. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997;698(1-2):209-16.
145. Aravagiri M, Marder S, Wirshing D, Wirshing W. Plasma concentrations of risperidone and its 9-hydroxy metabolite and their relationship to dose in schizophrenic patients: simultaneous determination by a high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Pharmacopsychiatry*. 1998;31(03):102-9.
146. Aravagiri M, Marder SR, Van Putten T, Midha KK. Determination of risperidone in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to therapeutic drug monitoring in schizophrenic patients. *J Pharm Sci*. 1993;82(5):447-9.
147. Le Moing J, Edouard S, Levron J. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1993;614(2):333-9.
148. Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *The Lancet*. 2009;373(9657):31-41.
149. Bhana N, Foster RH, Olney R, Plosker GL. Olanzapine. *Drugs*. 2001;61(1):111-61.
150. Tumpa A, Stajić A, Jančić-Stojanović B, Medenica M. Quality by design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;134:18-26.
151. Krishnaiah C, Murthy MV, Kumar R, Mukkanti K. Development of a stability-indicating UPLC method for determining olanzapine and its associated degradation products present in active pharmaceutical ingredients and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;54(4):667-73.

152. Hiriyaana SH, Basavaiah K, Goud PG, Dhayanithi V, Raju K, Pati HP. Identification and characterization of olanzapine degradation products under oxidative stress conditions. *Acta Chromatographica*. 2008;20(1):81-93.
153. European Pharmacopeia 8.0. July, 2013.
154. Thakuria R, Nangia A. Olanzapinium salts, isostructural solvates, and their physicochemical properties. *Crystal growth & design*. 2013;13(8):3672-80.
155. Vivek M, Jigar A, Shweta S, Sunil R. First and second derivative spectrophotometric methods for determination of olanzapine in pharmaceutical formulation. *International Journal of ChemTech Research*. 2010;2:756-61.
156. Biryol İ, Erk N. Voltammetric, spectrophotometric, and high performance liquid chromatographic analysis of olanzapine. *Anal Lett*. 2003;36(11):2497-513.
157. Rao RN, Raju AN, Narsimha R, Babu GR. Isolation and characterization of process related impurities of olanzapine using HPLC and ESI-MS/MS. *J Sep Sci*. 2008;31(1):107-18.
158. Cui D, Li Y, Lian M, Yang F, Meng Q. Development of a simple and stability-indicating RP-HPLC method for determining olanzapine and related impurities generated in the preparative process. *Analyst*. 2011;136(15):3149-56.
159. Du P, Li P, Zhao R, Liu H, Liu L. Optimized UPLC–MS/MS method for the quantitation of olanzapine in human plasma: application to a bioequivalence study. *Bioanalysis*. 2019;11(13):1291-302.
160. Ulrich S. Assay of olanzapine in human plasma by a rapid and sensitive gas chromatography-nitrogen phosphorus selective detection (GC-NPD) method: validation and comparison with high-performance liquid chromatography-coulometric detection. *Ther Drug Monit*. 2005;27(4):463-8.
161. Weigmann H, Härtter S, Maehrlein S, Kiefer W, Krämer G, Dannhardt G, et al. Simultaneous determination of olanzapine, clozapine and demethylated metabolites in serum by on-line column-switching high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001;759(1):63-71.
162. Boulton DW, Markowitz JS, DeVane CL. A high-performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for olanzapine in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001;759(2):319-23.
163. Bao J, Potts BD. Quantitative determination of olanzapine in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001;752(1):61-7.
164. Sabbioni C, Saracino MA, Mandrioli R, Albers L, Boncompagni G, Raggi MA. Rapid analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in human plasma using high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *Anal Chim Acta*. 2004;516(1-2):111-7.
165. D'Arrigo C, Migliardi G, Santoro V, Spina E. Determination of olanzapine in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit*. 2006;28(3):388-93.
166. Saracino MA, Gandolfi O, Dall'Olio R, Albers L, Kenndler E, Raggi MA. Determination of Olanzapine in rat brain using liquid chromatography with coulometric detection and a rapid solid-phase extraction procedure. *J Chromatogr A*. 2006;1122(1-2):21-7.
167. Ansermot N, Brawand-Amey M, Kottelat A, Eap CB. Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr A*. 2013;1292:160-72.
168. Uřinová R, Brozmannová H, Šiřtík P, Šilhán P, Kacirřová I, Lemr K, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. *J Chromatogr B*. 2012;907:101-7.
169. Albayrak M, Kadioglu Y, Yaman ME, Senol O, Oral E. Determination of olanzapine for therapeutic drug monitoring in schizophrenia patients by LC/MS method. *Biomed Chromatogr*. 2019;33(4):e4468.
170. Atila Karaca S, Yeniceli Uğur D. Development of a validated HPLC method for simultaneous determination of olanzapine and aripiprazole in human plasma. 2018.
171. Khelfi A, Azzouz M, Abtroun R, Reggabi M, Alamir B. Determination of chlorpromazine, haloperidol, levomepromazine, olanzapine, risperidone, and sulphiride in human plasma by liquid

- chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *International journal of analytical chemistry*. 2018;2018.
172. Ni X-J, Wang Z-Z, Shang D-W, Lu H-Y, Zhang M, Wen Y-G. Simultaneous analysis of olanzapine, fluoxetine, and norfluoxetine in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B*. 2018;1092:506-14.
 173. Dziurkowska E, Jiménez-Morigosa C, López-Rivadulla M, Wesolowski M. Development and validation of solid-phase extraction coupled with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of olanzapine in saliva. *J Chromatogr B*. 2020;1136:121896.
 174. Connors KA. *Binding constants: the measurement of molecular complex stability*: Wiley-Interscience; 1987.
 175. Djajić N, Petković M, Zečević M, Otašević B, Malenović A, Holzgrabe U, et al. A comprehensive study on retention of selected model substances in β -cyclodextrin-modified high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2021:462120.
 176. Mauri A, Consonni V, Pavan M, Todeschini R. Dragon software: An easy approach to molecular descriptor calculations. *Match*. 2006;56(2):237-48.
 177. Ahn S, Ramirez J, Grigorean G, Lebrilla CB. Chiral recognition in gas-phase cyclodextrin: Amino acid complexes—Is the three point interaction still valid in the gas phase? *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001;12(3):278-87.
 178. Dotsikas Y, Loukas YL. Kinetic degradation study of insulin complexed with methyl-beta cyclodextrin. Confirmation of complexation with electrospray mass spectrometry and ^1H NMR. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;29(3):487-94.
 179. Waibel B, Scheiber J, Meier C, Hammitzsch M, Baumann K, Scriba GK, et al. Comparison of cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes in the absence and presence of urea by means of capillary electrophoresis, nuclear magnetic resonance and molecular modeling. Wiley Online Library; 2007.
 180. Krait S, Salgado A, Chankvetadze B, Gago F, Scriba GK. Investigation of the complexation between cyclodextrins and medetomidine enantiomers by capillary electrophoresis, NMR spectroscopy and molecular modeling. *J Chromatogr A*. 2018;1567:198-210.
 181. Salgado A, Chankvetadze B. Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the understanding of enantiomer separation mechanisms in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2016;1467:95-144.
 182. Leardi R. Experimental design in chemistry: a tutorial. *Anal Chim Acta*. 2009;652(1-2):161-72.
 183. Lou W, Nakai S. Artificial neural network-based predictive model for bacterial growth in a simulated medium of modified-atmosphere-packed cooked meat products. *J Agric Food Chem*. 2001;49(4):1799-804.
 184. Guideline. ICH Q2 (R1). *Validation of analytical procedures: text and methodology*. 2005.
 185. Crowther JB. *Validation of pharmaceutical test methods*. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. 2001;3:415-43.
 186. D'Archivio AA, Maggi MA, Mazzeo P, Ruggieri F. Quantitative structure–retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography based on WHIM and GETAWAY molecular descriptors. *Anal Chim Acta*. 2008;628(2):162-72.
 187. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC method development*: John Wiley & Sons; 2012.
 188. Claude B, Morin P, Lafosse M, Andre P. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized β - and γ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004;1049(1-2):37-42.
 189. Cirri M, Maestrelli F, Orlandini S, Furlanetto S, Pinzauti S, Mura P. Determination of stability constant values of flurbiprofen–cyclodextrin complexes using different techniques. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;37(5):995-1002.
 190. Loukas YL. Evaluation of the methods for the determination of the stability constant of cyclodextrin–chlorambucil inclusion complexes. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;16(2):275-80.
 191. Ohta H, Włodarczyk E, Piaskowski K, Kaleniecka A, Lewandowska L, Baran MJ, et al. Unexpected differences between planar and column liquid chromatographic retention of 1-acenaphthenol enantiomers controlled by supramolecular interactions involving β -cyclodextrin at subambient temperatures. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(14):3695-706.

192. Hutchinson JP, Remenyi T, Nesterenko P, Farrell W, Groeber E, Szucs R, et al. Investigation of polar organic solvents compatible with Corona Charged Aerosol Detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2012;750:199-206.
193. Ligor M, Studzińska S, Horna A, Buszewski B. Corona-charged aerosol detection: an analytical approach. *Crit Rev Anal Chem*. 2013;43(2):64-78.
194. Almeling S, Ilko D, Holzgrabe U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;69:50-63.
195. Đajić N, Otašević B, Malenović A, Zečević M, Holzgrabe U, Protić A. Corona Charged Aerosol Detector in studying retention and β -cyclodextrin complex stability using RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;193:113711.
196. Devinyak O, Havrylyuk D, Lesyk R. 3D-MoRSE descriptors explained. *J Mol Graph Model*. 2014;54:194-203.
197. Cao S. QSAR, molecular docking studies of thiophene and imidazopyridine derivatives as polo-like kinase 1 inhibitors. *J Mol Struct*. 2012;1020:167-76.
198. González MP, Puente M, Fall Y, Gómez G. In silico studies using Radial Distribution Function approach for predicting affinity of 1α , 25-dihydroxyvitamin D3 analogues for Vitamin D receptor. *Steroids*. 2006;71(6):510-27.
199. Dobričić V, Marković B, Nikolic K, Savić V, Vladimirov S, Čudina O. 17β -carboxamide steroids—in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique. *Eur J Pharm Sci*. 2014;52:95-108.
200. Mohseni RM, Hurtubise RJ. Retention characteristics of several compound classes in reversed-phase liquid chromatography with β -cyclodextrin as a mobile phase modifier. *J Chromatogr A*. 1990;499:395-410.

7. PRILOZI

LISTA SKRAĆENICA

ANN – Veštačke neuronske mreže

APCI – Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom

BE – Energija vezivanja

CAD – Detektor naelektrisanja u aerosolu

CCD – Centralni kompozitni dizajn

CD – Ciklodekstrin

CDEN – Naelektrisani dipol-dipol energija

CV – Ukrštena validacija

DEN – Dipol-dipol energija

EE – Elektrostatička energija

EP – Evropska farmakopeja

ESI-MS – Masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom

FDA – Svetska agencija za hranu i lekove

GC-MS – Gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom

H-acc – Broj slobodnih elektronskih parova koji mogu graditi vodonične veze

H-don – Broj vodonikovih atoma koji mogu graditi vodonične veze

HOMO – Energija najviše popunjene orbitale

IC – Konstanta inhibicije

LC-MS – Tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom

LC-MS/MS – Tečna hromatografija spregnuta sa tandem masenom spektrometrijom

LLE – Tečno – tečna ekstrakcija

LMOCV – „Ostavi mnogo van“ ukrštena validacija

Log P – Logaritam oktanol-voda particionog koeficijenta

LOOCV – „Ostavi jedan van“ ukrštena validacija

LSER – Linearna korelacija solvatohromnih energija solvatacije

LUMO – Energija najniže nepopunjene orbitale

MA – Površina molekula

MEPS – Mikroekstrakcija na punjenom sorbentu

MLA – Algoritmi mašinskog učenja

MLR – Multipla linearna regresija

MR – Molarna refraktivnost

MRM – Praćenje više reakcija

NMR – Nuklearna magnetno-rezonantna spektroskopija

NON-1,4 VDW – van der Valsova energija između atoma udaljenih najmanje tri atoma

PCA – Analiza glavnih komponenti

PDA – Detektor fotodioda

PLS – Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

POL – Polarizabilnost

PRESS – Predviđena suma kvadrata rezidua

Q^2 – Koeficijent determinacije ukrštene validacije

QSRR – Kvantitativni odnos strukture i retencije

R^2 – Koeficijent determinacije

RMSE – Kvadratni koren srednje vrednosti sume kvadrata greške

RP-HPLC – Reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

RSD – Relativna standardna devijacija

SAS – *Connolly* površina dostupna rastvaraču

SEV – Zapremina nedostupna rastvaraču

SIM – Praćenje odabranih jona

SPE – Čvrsto – tečna ekstrakcija

SRM – Praćenje odabranih reakcija

SVR – Metoda regresije potpornih vektora

TORRE – Torziona energija

UE – Nevezana energija sistema

UHPLC – Tečna hromatografija pod veoma visokim pritiskom

USP – Američka farmakopeja

VDW – van der Valsova energija

VDW-HB-D – Ukupna intermolekulska energija, koja se sastoji iz van der Valsove energije, vodoničnih veza i desolvacione energije

ΔG° – Gibsova slobodna energija

ΔH° – Standardna molarna entalpija

ΔS° – Standardna molarna entropija

PUBLIKACIJE OBUHVAĆENE DOKTORSKOM DISERTACIJOM

Spisak naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima

- 1) **Djajić N**, Petković M, Zečević M, Otašević B, Malenović A, Holzgrabe U, Protić A. A comprehensive study on retention of selected model substances in β -cyclodextrin-modified high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2021;1645:462120
 - a. **Naziv časopisa:** Journal of Chromatography A
 - b. **Impakt faktor (2020):** 4,759
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 17/83

- 2) **Đajić N**, Otašević B, Malenović A, Zečević M, Holzgrabe U, Protić A. Corona Charged Aerosol Detector in studying retention and β -cyclodextrin complex stability using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113711
 - a. **Naziv časopisa:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
 - b. **Impakt faktor (2020) =** 3,935
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 24/83

- 3) **Maljurić N**, Otašević B, Malenović A, Zečević M, Protić A. Quantitative structure retention relationship modeling as potential tool in chromatographic determination of stability constants and thermodynamic parameters of β -cyclodextrin complexation process. *Journal of Chromatography A*. 2020;1619:460971
 - a. **Naziv časopisa:** Journal of Chromatography A
 - b. **Impakt faktor (2020):** 4,759
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 17/83

- 4) **Maljurić N**, Golubović J, Otašević B, Zečević M, Protić A. Quantitative structure–retention relationship modeling of selected antipsychotics and their impurities in green liquid chromatography using cyclodextrin mobile phases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018;410(10):2533-50
 - a. **Naziv časopisa:** Analytical and Bioanalytical Chemistry
 - b. **Impakt faktor (2019):** 3,637
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 18/86

Spisak radova saopštenih na naučnim skupovima i objavljenih u izvodu ili u celosti

- 1) **Nevena Maljurić**, Biljana Otašević, Jovana Krmar, Mira Zečević, Ana Protić. Insight in Retention Mechanisms of Basic Analytes in β -Cyclodextrin Modified HPLC. 13th Mass Spectrometry School in Biotechnology and Medicine (MSBM). Dubrovnik, Croatia. 7-13. Jul 2019. **(M34)**
- 2) **Nevena Maljurić**, Biljana Otašević, Jovana Krmar, Mira Zečević, Ana Protić. Primena HPLC metode u određivanju konstanti stabilnosti kompleksa β -ciklodekstrina sa odabranim antipsihoticima. VII kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 10-14. Oktobar 2018. **(M62)**
- 3) **Nevena Maljurić**, Miloš Petković, Jovana Krmar, Biljana Otašević, Mira Zečević, Ana Protić. Molecular docking studies and ¹H NMR spectroscopy in β -cyclodextrin complexes structure elucidation. 2nd International Symposium on Advances in Pharmaceutical Analysis – APA 2018, Lille, France. 12-13. Jul 2018. **(M34)**
- 4) **Nevena Maljurić**, Ana Protić, Biljana Otašević, Jelena Golubović, Mira Zečević, Jovana Krmar. Stoichiometry and stability constants determination of β -cyclodextrin – drug complexes. 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC-2017). Prague, Czech Republic. 18-22. Jun 2017. **(M34)**
- 5) **Nevena Maljurić**, Ana Protić, Biljana Otašević, Jelena Golubović, Jovana Krmar, Mira Zečević. Investigation of chromatographic behavior of aripiprazole and its five impurities. 6th Congress of Pharmacy in Macedonia with international participation, Ohrid, Macedonia, 1-5. Jun 2016. **(M33)**

8. BIOGRAFIJA

Nevena Đajić (rođena Maljurić) je rođena 24.6.1989. u Novom Sadu. Studije farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,42. Godinu dana kasnije završava i istraživački master program na Erasmus Medicinskom Centru, Erasmus Univerziteta u Roterdamu.

Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu – modul analitika lekova upisuje školske 2014/15. i polaže sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,86. Naučno-istraživački rad započinje u okviru projekta pod nazivom „Sinteza, kvantitativni odnosi između strukture i dejstva, fizičko-hemijska karakterizacija i analiza farmakološki aktivnih supstanci“, čiji je nosilac Farmaceutski fakultet.

Učestvovala je u dva bilateralna projekta, prvi sa Farmaceutskim fakultetom Univerziteta u Ljubljani pod nazivom „Novi antibiotici iz endofitnih gljiva“, a drugi sa Institutom za farmaciju i hemiju namirnica, Univerziteta u Virzburgu pod nazivom „Hemometrijski pristup ispitivanju odgovora *Corona Charged Aerosol* detektora u farmaceutskoj analizi“.

Od 2017. je zaposlena u zvanju istraživač-pripravnik, a od 2019. istraživač-saradnik na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Učestvovala je u realizaciji praktične nastave na integrisanim akademskim studijama farmacije iz predmeta Analitika lekova i Eksperimentalni dizajn u farmaciji.

Aktivno je učestvovala u izradi studentskih istraživačkih i završnih radova studenata.

Autor je ili koautor 15 radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja, od kojih su 4 rada obuhvaćena doktorskom disertacijom, i 3 rada objavljena u časopisima nacionalnog značaja. Učestvovala je na skupovima nacionalnog i međunarodnog značaja sa 18 radova štampanih u izvodu, i po jednim usmenim izlaganjem na skupu nacionalnog i međunarodnog značaja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Невена Ђајић

Број индекса 3/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хемометријски подржана карактеризација хроматографских система модификованих
В-циклодекстрином са одабраним модел супстанцама

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

Потпис аутора

У Београду, 13.9.2021.

Невена Ђајић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Невена Ђајић

Број индекса 3/14

Студијски програм Аналитика лекова

Наслов рада Хеометријски подржана карактеризација хроматографских система модификованих В-циклодекстрином са одабраним модел супстанцама

Ментор Др Ана Протић, ванредни професор

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 13.9.2021.

Невена Ђајић

Изјава о коришћењу

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

Хеометријски подржана карактеризација хроматографских система модификованих В-циклодекстрином са одабраним модел супстанцама

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 13.9.2021.

Nevena Đajić