

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

DARIJA LJ. OBRADOVIĆ

**MODELOVANJE RETENCIONOG  
PONAŠANJA LIGANADA  
IMIDAZOLINSKIH I SEROTONINSKIH  
RECEPTORA I SRODNIH JEDINJENJA U  
RAZLIČITIM HROMATOGRAFSKIM  
USLOVIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

DARIJA LJ. OBRADOVIĆ

**MODELING THE RETENTION  
BEHAVIOUR OF IMIDAZOLINE AND  
SEROTONIN RECEPTOR LIGANDS AND  
THEIR RELATED COMPOUNDS UNDER  
THE DIFFERENT CHROMATOGRAPHIC  
CONDITIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**MENTOR:**

\_\_\_\_\_  
Dr Danica Agbaba-mentor, profesor emeritus  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

\_\_\_\_\_  
Dr Katarina Nikolić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

\_\_\_\_\_  
Dr Oleg Alekseevič Špigun, profesor dopisni član Ruske Akademije Nauka,  
Hemijski fakultet Moskovskog državnog univerziteta naziva M.V. Lomonosov

\_\_\_\_\_  
Dr Filip Andrić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

**DATUM ODBRANE:**

---

*Ova doktorska disertacija je rezultat naučno-istraživačkog rada na Katedri za farmaceutsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, Laboratorijama za hromatografiju Hemijskog fakulteta Moskovskog državnog univerziteta naziva M.V. Lomonosov, Laboratoriji superkritičnih fluida Instituta opšte i neorganske hemije naziva N.S. Kurnakov Ruske Akademije Nauka, kao i Katedri za Medicinsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Medicinskog univerziteta u Lublinu.*

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, profesoru emeritusu Danici Agbabi na iskazanoj velikoj podršci, pruženom znanju, razumevanju, sugestijama i naučnim usmerenjima još od studenskih dana.*

*Zahvalnost dugujem i prof. dr Katarini Nikolić i doc. dr Slavici Oljačić za naučnu podršku i stručne savete.*

*Na iskazanom velikom poverenju, podršci, saradnji i pruženom znanju zahvaljujem se profesoru, dopisnom članu Ruske Akademije Nauka, Olegu Alekseviču Špigunu, kao i doc dr Andreju Nikolaeviču Stavrianidiniju sa Hemijskog fakulteta Moskovskog državnog univerziteta naziva M.V. Lomonosov. Takođe, veliku zahvalnost dugujem i naučnim saradnicima sa Instituta opšte i neorganske hemije naziva N.S. Kurnakov Ruske Akademije Nauka, dr Olegu Igoreviču Pokrovskom i dr Olgi Olegovni Parenago.*

*Za saradnju i pruženo veliko znanje, dugujem zahvalnost i prof. dr Lukaszu Komsti sa Farmaceutskog fakulteta Medicinskog univerziteta u Lublinu. Takođe, za saradnju i doprinos boljem kvalitetu naučnog istraživanja zahvaljujem se profesoru emeritusu Terezi Kovalskoj sa Hemijskog instituta, Univerziteta Silesija u Poljskoj.*

*Zahvaljujem se prof. dr Filipu Andriću na saradnji, podršci i naučnim sugestijama.*

*Zahvaljujem se svojim profesorima i kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju na podršci i razumevanju.*

*Zahvalnost dugujem prof. dr Vladimiru Đukiću za životno ohrabrenje, kao i dr Dragani Popović.*

*Ambasadi Republike Srbije u Ruskoj Federaciji zahvaljujem se za podršku u rešavanju administrativnih pitanja.*

*Zahvaljujem se prijateljima i kolegama.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, roditeljima i bratu Danilu, kao i svom Aleksandru jer su bili veliki oslonac i velika podrška.*

# MODELOVANJE RETENCIONOG PONAŠANJA LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I SEROTONINSKIH RECEPTORA I SRODNIH JEDINJENJA U RAZLIČITIM HROMATOGRAFSKIM USLOVIMA

## SAŽETAK

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitano je retenciono ponašanje liganada imidazolinskih/ $\alpha$ -adrenergičkih receptora, liganada serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja. Obe grupe ispitivanih jedinjenja osnovnim ili sporednim mehanizmima deluju na centralni nervni sistem. Retencione karakteristike odabranih jedinjenja su ispitane primenom hromatografije hidrofилnih interakcija (HILIC), reverzno-fazne tečne hromatografije (RP-LC) i superkritične fluidne hromatografije (SFC) na polarnim stacionarnim fazama.

Proces istraživanja obuhvatio je karakterizaciju retencionih mehanizama primenom linearnih retencionih modela i procenu uticaja ukupne polarnosti mobilne faze na retenciono ponašanje. Uvedeni su novi parametri retencije i formirani modeli za predviđanje retencionog ponašanja na *mixed-mode* stacionarnoj fazi u odnosu na fizičko-hemijske osobine ispitivanih jedinjenja, kao i karakteristike mobilne faze. U hromatografskim sistemima u kojima dolazi do smene između HILIC i RP retencionih mehanizama, predložene su nove jednačine za definisanje i predviđanje vrednosti prevojne tačke. Parametri retencije su detaljno ispitani u SFC i HILIC sistemima, i izdvojene molekulske osobine sa najvećim uticajem na reticioni mehanizam. Takođe, u SFC-u je primenjena metodologija eksperimentalnog dizajna za definisanje retencionih karakteristika.

Formirani modeli omogućuju pouzdano predviđanje retencionog ponašanja novosintetisanih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i strukturno srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim uslovima. Dobijeni rezultati su pokazali da se testirani hromatografski sistemi mogu uspešno primeniti u farmaceutskim ispitivanjima.

**Ključne reči:** ligandi imidazolinskih receptora, ligandi serotoninskih receptora, centralni nervni sistem, HILIC, RP-LC, SFC, prevojna tačka, reticioni mehanizmi

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

---

# MODELING THE RETENTION BEHAVIOUR OF IMIDAZOLINE AND SEROTONIN RECEPTOR LIGANDS AND THEIR RELATED COMPOUNDS UNDER THE DIFFERENT CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

## RESUME

In this doctoral dissertation, retention behaviour was investigated of imidazoline/ $\alpha$ -adrenergic receptor ligands, serotonin receptor ligands and their related compounds. Both groups of investigated compounds exert an effect on central nervous system by the primary or secondary mechanism. Retention characteristic of the selected compounds on polar stationary phases was examined for hydrophilic interaction chromatography (HILIC), reversed-phase liquid chromatography (RP-LC), and supercritical fluid chromatography (SFC).

The research included characterization of retention mechanisms with use of the linear retention models and an assessment of the influence of total polarity of mobile phase on retention behaviour. Novel retention parameters were introduced and models were devised to predict retention behaviour in the mixed-mode chromatography systems, taking into the account physico-chemical properties of tested compounds and mobile phase characteristics. The turning point was defined for chromatographic systems characterizing with the bimodal HILIC/RP retention mechanisms and novel equations were proposed for prediction of the turning point values. Retention behaviour was investigated under the HILIC and SFC conditions, and the most important molecular properties governing retention were selected. In the case of SFC, the experimental design methodology was also applied to describe analyte retention.

The proposed models allow a reliable prediction of retention behaviour for the newly synthesized imidazoline and serotonin receptors ligands and their structurally related compounds. The obtained results show that the investigated chromatographic systems can successfully be applied to pharmaceutical investigations.

**Keywords:** imidazoline receptor ligands, serotonin receptor ligands, central nervous system, HILIC, RP-LC, SFC, turning point, retention mechanisms

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific subfield:** Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

# МОДЕЛИРОВАНИЕ УДЕРЖИВАНИЯ ЛИГАНДОВ ИМИДАЗОЛИНОВЫХ И СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

## РЕЗЮМЕ

В этой докторской диссертации было исследовано удерживание лигандов имидазолиновых /  $\alpha$ -адренергических рецепторов, лигандов серотониновых рецепторов и родственных соединений. Обе группы тестируемых соединений действуют на центральную нервную систему по основным или вторичным механизмам. Характеристики удерживания выбранных соединений были исследованы с помощью хроматографии гидрофильного взаимодействия (ХИЛИК), обращенной фазовой жидкостной хроматографии (ОФ-ЖХ) и сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) на полярных неподвижных фазах.

Основные этапы исследования включали применение линейных моделей и оценку влияния общей полярности подвижной фазы на удерживание. Новые параметры и сформированы модели были введены для прогнозирования удерживания в смешанной стационарной фазе, в зависимости от физико-химических свойств тестируемых соединений и характеристики подвижной фазы. В хроматографических системах в которых меняются ХИЛИК и ОФ механизмы удерживания, новые уравнения были сделаны для определения и прогнозирования значения поворотной точки. Параметры удерживания в системах ХИЛИК и СФХ детально исследованы с выделением молекулярных свойств оказывающие наибольшее влияние на механизм удерживания. Кроме того, чтобы описать удерживание в СФХ, была применена и методология экспериментального дизайна.

Предложенные уравнения позволяют надежно прогнозировать характеристики удерживания для новых лигандах имидазолиновых и серотониновых рецепторов и структурно родственных соединениях в различных хроматографических условиях. Полученные результаты показали, что испытанные хроматографические системы могут успешно применяться в фармацевтических целях.

**Ключевые слова:** лиганды имидазолиновых рецепторов, лиганды серотониновых рецепторов, центральная нервная система, ХИЛИК, ОФ-ЖХ, СФХ, точка поворота, механизмы удерживания

**Область науки:** Фармация

**Узкая научная область:** Фармацевтическая-медицинская химия и структурный анализ

## SADRŽAJ:

### 1. UVOD

#### 1.1. Imidazolinski receptori

1.1.1. Adrenergički  $\alpha$  receptori

1.1.2. Ligandi imidazolinskih/ $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora

1.1.2.1. Endogeni ligandi imidazolinskih receptora

1.1.2.2. Egzogeni liganadi imidazolinskih/ $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora i srodna jedinjenja

#### 1.2. Serotoninski i dopaminski receptori

1.2.1. Ligandi serotoninskih/dopaminskih receptora i srodna jedinjenja

#### 1.3. Podela hromatografskih uslova u tečnoj hromatografiji

1.3.1. *Mixed-mode* stacionarna faza

#### 1.4. Modelovanje retencionog ponašanja u tečnoj hromatografiji

1.4.1. Modelovanje retencionog ponašanja zasnovano na retencionim mehanizmima

1.4.1.1. Hromatografski parametri u proceni kvaliteta razdvajanja

1.4.2. Modelovanje retencionog ponašanja zasnovano na kvantitativnoj vezi strukture i retencije

1.4.2.1. Molekulski deskriptori

1.4.2.2. Modelovanje retencionog ponašanja na osnovu linearne korelacije solvacionih energija

1.4.2.3. Modelovanje retencionog ponašanja zasnovano na primeni metode potpornih (podržavajućih) vektora

1.4.2.4. Analiza glavnih komponenti

1.4.2.5. Selekcija promenljivih primenom višestruke linearne regresione analize

1.4.3. Modelovanje retencionog ponašanja primenom metodologije eksperimentalnog dizajna

### 2. CILJ RADA

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Hemikalije i oprema

3.1.1. Standardi ispitivanih supstanci

3.1.2. Oprema

3.1.2.1. Kolone

3.1.3. Hemikalije

3.1.4. Priprema mobilne faze

3.1.5. Priprema rastvora uzoraka

#### 3.2. Modelovanje retencionog ponašanja

3.2.1. Retencioni parametri

3.2.2. Kompjuterske metode

3.2.3. Opšti retencioni modeli

3.2.4. Primena *Box-Cox* transformacije u modelovanju retencionog ponašanja

3.2.5. Parametar selektivnosti, *S*

#### 3.3. Primena metodologije eksperimentalnog dizajna u modelovanju retencionog ponašanja

3.3.1. Modelovanje retencionog ponašanja u SFC sistemu



### **3.4. Modelovanje retencionog ponašanja na osnovu fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja**

3.4.1. Izračunavanje molekulskih deskriptora

3.4.2. QSRR modelovanje

3.4.2.1. QSRR modelovanje u AQ-HILIC i RP sistemima

3.4.2.2. QSRR modelovanje u NA-HILIC i SFC sistemima

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

### **4.1. Modelovanje retencionog ponašanja u AQ-HILIC i RP sistemima**

4.1.1. Uticaj zapreminskog udela modifikatora mobilne faze na retenciono ponašanje

4.1.2. Uticaj ukupne polarnosti mobilne faze na retenciono ponašanje

4.1.3. Uticaj fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja na retenciono ponašanje

4.1.4. Modelovanje retencionih mehanizama na *mixed-mode* stacionarnoj fazi

4.1.4.1. Određivanje prevojne tačke na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi

4.1.5. Izvođenje retencionih parametara na *mixed-mode* stacionarnoj fazi

### **4.2. Modelovanje retencionog ponašanja u NA-HILIC i SFC sistemima**

4.2.1. Procena retencionog ponašanja na osnovu parametra selektivnosti,  $S$

4.2.2. Primena LSS modela u definisanju retencionog ponašanja

4.2.3. Primena LSER modela u definisanju retencionog ponašanja

4.2.4. Faktori selektivnosti u NA-HILIC i SFC sistemima

4.2.5. Uticaj parametara hromatografskog sistema na retenciono ponašanje

### **4.3. Modelovanje retencionog ponašanja u SFC sistemu na *mixed-mode* stacionarnoj fazi primenom metodologije eksperimentalnog dizajna**

## **5. ZAKLJUČAK**

## **6. LITERATURA**

## **7. PRILOZI**

## **8. BIOGRAFIJA**

## LISTA SKRAĆENICA:

- AQ-HILIC (*Aqueous Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*): vodeni uslovi u hromatografiji hidrofilnih interakcija
- ATP (*Adenosine Triphosphate*): adenzin trifosfat
- CCD (*Central Composite Design*): centralni kompozitni dizajn
- CNS (*Central Neural System*): centralni nervni sistem
- DoE (*Design of Experiments*): dizajn eksperimenata
- DA (*Dopamine*): dopamin
- FFD (*Full Factorial Design*): potpuni faktorski dizajn
- FrFD (*Fractional Factorial Design*): frakcioni faktorski dizajn
- HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*): visokoefikasna tečna hromatografija
- HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*): hromatografija hidrofilnih interakcija
- HF (*Hartree Fock*): metoda optimizacije molekulske strukture
- 5-HT (*5-Hydroxy Tryptamine*): 5-hidroksitriptamin, serotonin
- LSER (*Linear Solvation Retention Relationship*): model linearne veze retencije i solvatacione energije
- LSS (*Linear Solvent Strength*): model linearne veze retencije i elucione snage rastvarača
- MAO (*Monoamine Oxidase*): monoamino oksidaza
- MLR (*Multilinear Regression*): višestruka linearna regresiona analiza
- MS (*Mass Spectrometry*): masena spektrometrija
- NA-HILIC (*Non-Aqueous Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*): nevodeni uslovi u hromatografiji hidrofilnih interakcija
- PAC (*p-aminoclonidine*): p-aminoklonidin
- PCA (*Partial Component Analysis*): analiza glavnih komponenti
- PM3 (*Parametrized Model 3*): metod optimizacije
- RP-LC (*Reversed Phase Liquid Chromatography*): reverzno-fazna tečna hromatografija
- RMSEE (*Root Mean Square Error of Estimation*): srednja kvadratna greška procene
- RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*): srednja kvadratna greška predviđanja
- QSRR (*Quantitative-Structure Retention Relationship*): kvantitativna veze između strukture i retencije
- SFC (*Supercritical Fluid Chromatography*): superkrična fluidna hromatografija
- SVM (*Support Vector Machine*): metoda podržavajućih vektora
- TLC (*Thin Layer Chromatography*): hromatografija na tankom sloju
- UV (*Ultraviolet*): spektrofotometrija u ultraljubičastoj oblasti

# 1. UVOD

Ligandi  $\alpha$ -adrenergičkih/imidazolinskih i serotoninskih receptora predstavljaju značajnu grupu jedinjenja, koja osnovnim ili sporednim mehanizmima postiže odgovarajući farmakološki efekat na centralni nervni sistem (CNS). Ligandi  $\alpha$ -adrenergičkih/imidazolinskih receptora su derivati parcijalno hidriranog imidazolovog heterociklusa kao npr. derivati 2-metilenimidazolina (primenjuju se u terapiji hipertenzije, alergijskog konjuktivitisa, nazalne kongestije), 2-aminoimidazolina (primenjuju se u terapiji hipertenzije, glaukoma, poremećaja pažnje kod dece, multiple skleroze, spinalne analgezije), 2-aril(alkil)imidazolina (primenjuju se kao nazalni dekongestivi) i derivati amidina/gvanidina (primenjuju se u terapiji hipertenzije, srčane insuficijencije, dijabetesa) [1-3].

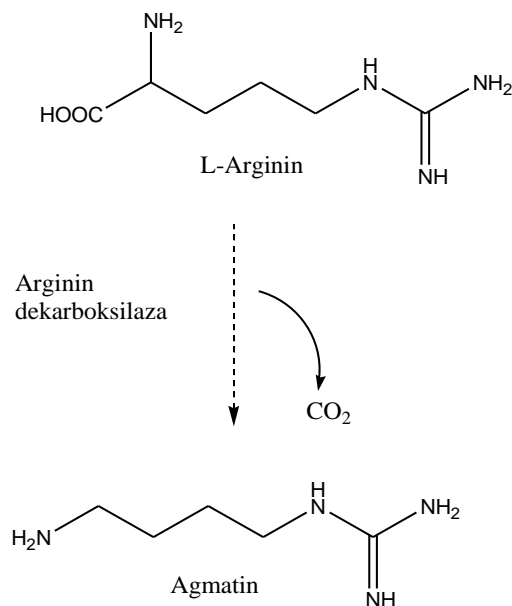
Ligandi serotoninskih receptora su derivati piperazina i najčešće se koriste u terapiji šizofrenije, depresije, manije i drugih udruženih stanja. U istoj farmakološkoj grupi, uočava se hemijska raznolikost koja utiče na biofarmaceutske osobine kao što su lipofilnost, stepen jonizacije, rastvorljivost, permeabilnost i brzina rastvaranja [4-8]. Modelovanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim sistemima omogućilo bi predviđanje retencionih karakteristika, ali i *in vitro* i *in vivo* karakterizaciju biofarmaceutskih/farmakokinetičkih osobina novosintetisanih molekula sa dejstvom na CNS.

## 1. 1. Imidazolinski receptori

Istraživanja mehanizma centralnog antihipertenzivnog dejstva klonidina su dovela do definisanja koncepta imidazolinskih receptora. Nekoliko studija je pokazalo da su pored aktivacije  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, za hipotenzivni efekat klonidina odgovorni i drugi farmakološki mehanizmi [1-3]. Predpostavku da klonidin može da interaguje sa receptorom koji specifično prepoznaje imidazolinsku i srodnu strukturu, predložili su *Bousquet* i saradnici 1984. godine. Mikroinjektovanjem strukturno različitih agenasa u moždano stablo, autori su došli do zaključka da centralni hipotenzivni efekat nije posledica aktivacije  $\alpha$ -adrenergičkih receptora, nego posledica prisustva imidazolinskog heterociklusa u strukturi klonidina [9-12].

Godine 1987., *Emsberger* i saradnici su ispitali vezivanje strukturnog analoga klonidina, para-aminoklonidina (PAC), za receptore u ventrolateralnoj meduli. Tom prilikom je utvrđeno da se 70% PAC vezuje za  $\alpha$ -adrenergičke receptore, a ostatak za neadrenergičke strukture koje sa visokim afinitetom prepoznaju imidazolinsku i srodnu strukturu ispitivanog jedinjenja. Na taj način, prvi put je u biološkim sistemima potvrđeno prisustvo imidazolinskih receptora [13-14].

Godine 1994., agmatin (N-(4-aminobutil)gvanidin) je klasifikovan kao endogeni ligand imidazolinskih receptora koji nastaje metaboličkom dekarboksilacijom L-arginina (Slika 1). Pored imidazolinskih, agmatin je ligand  $\alpha_2$ -adrenergičkih i glutamatnih NMDA (N-metil-D-aspartatni) receptora. Uočeno je da agmatin olakšava oslobađanje insulina iz pankreasnih  $\beta$  ćelija [15], gonadotropin-oslobađajućeg hormona iz ćelija hipotalamusa [16] i inhibira oslobađanje noradrenalina iz presinaptičkih nervnih završetaka [17]. Takođe, pronađeno je da agmatin učestvuje i kao intermedijer u biosintezi poliamina [18]. Tačna uloga agmatina nije utvrđena, ali njegovo prisustvo u specifičnim neurološkim putevima i serumu, odgovara ulozi neurotransmitera ili hormona [2, 15].



Slika 1. Šema biosinteze agmatina

Smatra se da su receptori za imidazolinske strukture po svojoj hemijskoj prirodi proteini (*imidazolinski receptor protein*). Do sada, poznata su tri osnovna tipa imidazolinskih receptora:

- Imidazolinski-1 receptori ( $I_1$ ) se nalaze u rostralnoj-ventrolateralnoj meduli, hipokampusu, hipotalamusu, striatumu ali i u frontalnom korteksu. Predpostavlja se da su lokalizovani na plazma membranama neurona kao i da su povezani sa G-proteinima.
- Imidazolinski-2 receptori ( $I_2$ ) se dele na podtipove  $I_{2A}$  i  $I_{2B}$ . Učestvuju u neuroprotekciji i široko su distribuirani u CNS-u. Predstavljaju alosterno vezujuće mesto enzima monoamino oksidaze-A (MAO-A) i monoamino oksidaze-B (MAO-B). Mogu se naći i u jetri, adipocitima, bubregu i adrenalnoj meduli. Široko su distribuirani na membranama mitohondrija.
- Imidazolinski-3 receptori ( $I_3$ ) su lokalizovani na pankreasnim  $\beta$  ćelijama i smatra se da utiču na sekreciju insulina [11, 19-20].

Hipotenzivni efekat klonidina i srodnih jedinjenja je posledica aktivacije  $I_1$  receptora koji se nalaze na periferiji i u strukturama centralnog nervnog sistema. Po definiciji  $I_1$  receptori poseduju veliki afinitet vezivanja za supstance strukturno srodne klonidinu, koje vezivanjem za receptor smanjuju oslobađanje neurotransmitera iz sinaptičkih završetaka (norepinefrin, epinefrin) u perifernim tkivima. Posledično dovode do opadanja periferne vaskularne rezistencije, srčane kontraktilnosti i vaskularnog pritiska. U literaturi su poznati fiziološki efekti nastali aktivacijom  $\alpha_2$ -adrenergičkog receptora, ali je ustanovljeno da i aktivacija  $I_1$  receptora doprinosi nastanku sličnih simptoma [21-23].

$I_2$  receptori su prvobitno otkriveni na membranama mitohondrija kao alosterno vezujuće mesto enzima monoamino oksidaze (MAO). Smatra se da promena broja vezujućih mesta za enzime MAO-A i MAO-B može da dovede do anksioznosti i depresivnog ponašanja. Takođe, kod pacijenata sa depresijom smanjen je i broj  $I_1$  i  $I_2$  receptora. Pored antidepressivnog efekta, ligandi  $I_2$  receptora imaju ulogu u homeostazi glukoze i povećavaju insulinsku rezistenciju kod pacijenata sa

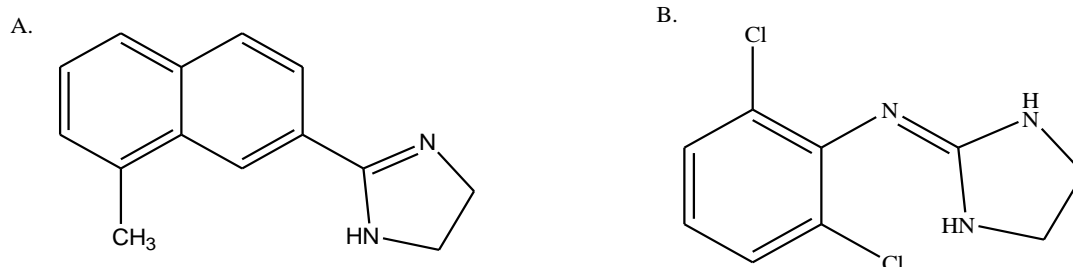
metaboličkim simptomima, jer utiču na aktivnost simpatikusa i aktivaciju autonomnog nervnog sistema npr. metformin, moksonidin [24].

Strukturni derivati gvanidina (amilorid) poseduju visok afinitet vezivanja  $I_2$  receptore, dok se 2-aminoimidazolini sa visokim afinitetom vezuju za  $I_1$  receptore. Za razliku od liganada imidazolinskih receptora ( $I_1$  i  $I_2$ ) koji povećavaju osetljivost perifernih tkiva na insulin, agonisti  $I_3$  receptora utiču na senzitivnost ATP-kalijumovih kanala. Pankreasne  $\beta$  ćelije poseduju  $I_3$  receptore i određene studije ukazuju na direktan uticaj  $I_3$  receptora na oslobađanje insulina iz pankreasnih  $\beta$  ćelija. Harman, endogeni  $\beta$ -karbolin i imidazolinski agonist, direktno podstiče oslobađanje kalcijuma i porast sekrecije insulina preko nekoliko različitih farmakoloških mehanizama uključujući i vezivanje za  $I_3$  receptore [25-26].

Heterogenost imidazolinskih receptora objašnjava se njihovim prisustvom u mozgu i drugim tkivima, kao i asocijacijom sa drugim tipovima receptora ( $\alpha_2$ -adrenergički receptori) [27]. Imidazolinski receptori se farmakološki razlikuju od  $\alpha_2$  receptora zbog čega se i ne aktiviraju dejstvom kateholamina. Feniletilamini, uključujući kateholamine, agonisti su na  $\alpha_2$  receptorima i neaktivni su na imidazolinskim receptorima. Mnoge studije su ispitivale blisku interakciju imidazolinskih i  $\alpha_2$ -adrenoreceptora na molekulskom nivou. Sličnost između imidazolinskih i  $\alpha_2$  receptora potvrđena je velikim brojem liganada koji se istovremeno vezuju za oba tipa receptora kao npr. sinergizam  $I_1$ -imidazolinskih sa  $\alpha_2$ -adrenergičkim receptorima u postizanju centralnog hipotenzivnog efekta (moksonidin). Sposobnost pojedinih derivata imidazolina i srodnih jedinjenja da se istovremeno vezuju za imidazolinske i  $\alpha_2$ -adrenoreceptore ukazuje da su kod oba receptorska sistema glavne funkcionalne grupe orjentisane na isti način. Prema tome, skromnim strukturnim modifikacijama postojećih liganada može se izmeniti njihov afinitet i selektivnost za imidazolinske i  $\alpha_2$ -adrenoreceptore [28-30].

Na osnovu 3-D kvantitativne veze strukture i aktivnosti (3-D *Quantitative Structure-Activity Relationship*, 3-D QSAR), izdvojene su sterne karakteristike koje utiču na afinitet vezivanja za  $I_2$ -imidazolinske i  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore:

- i) Negativni sterni efekat  $-\text{CH}_3$  supstituenta otežava vezivanje za  $I_2$  receptore (Slika 2A).
- ii) Atom hlora na klonidinu favorizuje uklapanje u  $\alpha_2$ -adrenoreceptor u poređenju sa  $I_2$  receptorom (Slika 2B).
- iii) Aromatični supstituenti kao 2-naftil ili stiril derivati favorizuju vezivanje za  $I_2$  u odnosu na  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore (Slika 2A) [29].



Slika 2. Hemijske strukture A. 2-naftilsupstituisani imidazolini B. klonidin

Planarne konformacije liganada favorizuju vezivanje za  $I_2$  receptore, dok je deformisana konformacija pogodnija za vezivanje za  $\alpha_2$ -adrenoreceptore [29]. Elektrostatičke interakcije liganada sa  $I_2/\alpha_2$  receptorima potiču od asparaginske kiseline prisutne na različitim hidrofobnim

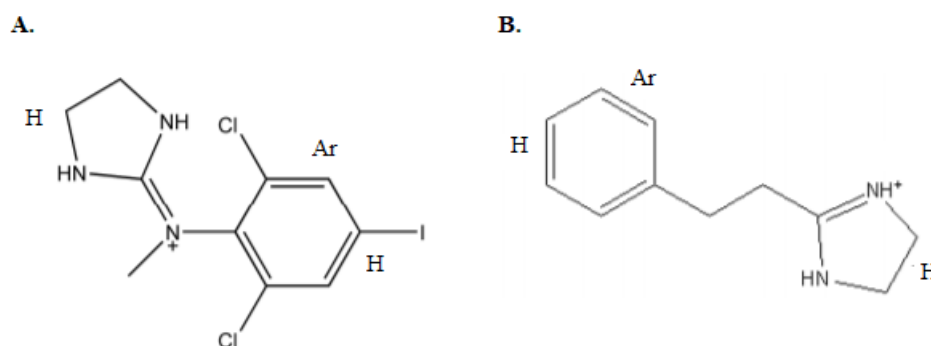
regionima  $I_2/\alpha_2$  receptora. Zbog toga, položaj hidrofobnih regiona i karboksilnih kiselina na  $I_2/\alpha_2$  receptorima određuje topološke karakteristike liganada. Porast lipofilnosti, dipolnog momenta zajedno sa smanjenjem naelektrisanja azota heterocikličnog prstena utiče na povećano vezivanje za  $I_1$  receptore, dok su lipofilnost i energija najviše zauzete molekulske orbitale (HOMO energija) značajni za  $I_1/\alpha_2$  receptorsku selektivnost [28-30].

### 1.1.1. Adrenergički $\alpha$ receptori

Adrenergički receptori ili adrenoreceptori pripadaju grupi G-protein receptora (GPCR) koji se aktiviraju kateholaminima, odnosno, norepinefrinom (noradrenalin) i epinefrinom (adrenalin). Alfa agonisti su ligandi koji se vezuju za  $\alpha$  receptore na vaskularnom glatkom mišiću izazivajući kontrakciju, vazokonstrikciju i oponašajući na taj način, efekte aktivacije adrenergičkih nerava na krvne sudove. Vaskularni glatki mišić ima dve vrste  $\alpha$ -adrenoreceptora,  $\alpha_1$  ( $G_q$  kuplovani receptor) i  $\alpha_2$  ( $G_i$  kuplovani receptor) adrenoreceptor. Alfa<sub>1</sub>-adrenoreceptori su dominantni receptori na vaskularnim glatkim mišićima. Zavisno od tkiva i vrste krvnog suda, na glatkom mišiću se nalaze i  $\alpha_2$ -adrenergički receptori. Alfa<sub>2</sub> receptori su povezani sa  $G_i$  proteinima, a vezivanje  $\alpha$  agonista posledično izaziva kontrakciju glatkih mišića. Alfa<sub>2</sub>-adrenoreceptori su smešteni na presinapatičkim nervnim završecima. Aktivacijom  $\alpha_2$  receptora dolazi do povratne inhibicije oslobađanja noradrenalina i centralnog vazodilatatornog efekta. Uprkos dobroj efikasnosti, profil neželjenog dejstva (sedacija, suva usta) utiče da se  $\alpha_2$  agonisti ne mogu primeniti kao prvi izbor u terapiji hronične hipertenzije [31-32].

### 1.1.2. Ligandi imidazolinskih/ $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora

Farmakofore liganda  $I_1$  receptora obuhvataju dva hidrofobna regiona (H), dve proton donorske grupe, aromatični prsten (Ar), kao i pozitivno naelektrisani deo strukture (Slika 3A). Najznačajnije strukturne karakteristike liganada  $I_2$  receptora su hidrofobni delovi molekule (dva hidrofobna regiona), aromatični prsten i pozitivno naelektrisani deo strukture (Slika 3B). Efaroksan je selektivni agonista  $I_3$  receptora, s tim da najznačajnije strukturne karakteristike nisu izdvojene QSAR ispitivanjima, zbog malog broja dostupnih liganada koji se vezuju za  $I_3$  receptore [28, 33-34].

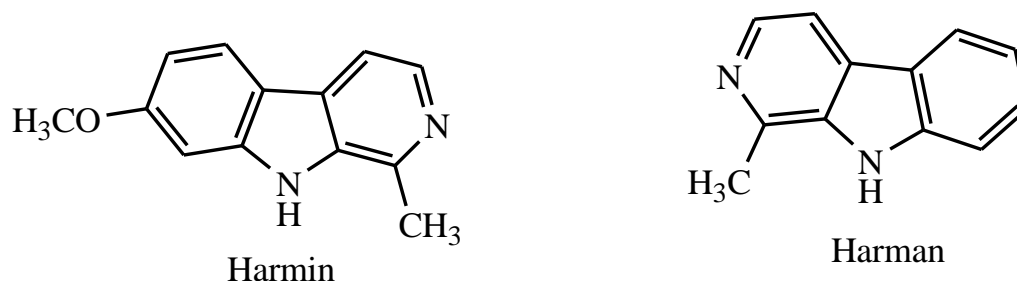


Slika 3. Šematski prikaz farmakofore A. liganada  $I_1$  receptora B. liganada  $I_2$  receptora [28].

### 1.1.2.1. Endogeni ligandi imidazolinskih receptora

Definisanje neadrenergičkih vezujućih mesta za imidazolinske strukture u mozgu i drugim tkivima, pokrenulo je ideju o centralnom hipotenzivnom efektu klonidina i hemijski srodnih jedinjenja. Tom prilikom, otkriće imidazolinskog receptora (*Bousquet* i saradnici) postavilo je i pitanje postojanja endogenih liganada. Kao endogeni ligandi, pored agmatina (Slika 1), prepoznate su i pojedine  $\beta$ -karbolinske strukture kao što su harmin i harman [18, 35].

Harman (1-metil-3H,4H,9H-pirido[3,4-b]indol) i harmin (7-metoksi-1-metil-3H,4H,9H-pirido[3,4-b]indol) su derivati  $\beta$ -karbolina i nastaju biosintezom iz triptamina i karboksilnih kiselina kratkog lanca. Pripadaju grupi endogenih liganada na imidazolinskim  $I_1/I_2$  receptorima, i pokazuju centralni hipotenzivni efekat [36]. Njihove hemijske strukture su prikazane na Slici 4.



Slika 4. Hemijske strukture endogenih liganada imidazolinskih receptora.

### 1.1.2.2. Egzogeni liganadi imidazolinskih/ $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora i srodna jedinjenja

Egzogena jedinjenja koja se vezuju za imidazolinske receptore obuhvataju derivate 2-aminoimidazolina, 2-metilenimidazolina, 2-alkil(aril)imidazolina i amidina/gvanidina [1-2].

U strukturne derivate 2-aminoimidazolina (2-iminoimidazolina) spadaju klonidin, brimonidin i tizanidin. Klonidin (2-((2,6-dihlorofenil)imino)imidazolidin) je prvo jedinjenje za koje je ustanovljeno da poseduje antihipertenzino dejstvo aktivacijom imidazolinskih  $I_1$  receptora. Pored toga, pokazao je afinitet i ka  $I_2$ -imidazolinskim i  $\alpha_2$ -adrenergičkim receptorima. U hemijskoj strukturi, klonidin sadrži lipofilni *ortho*-dihloro supstituent u fenilnom prstenu, ali je glavna razlika u odnosu na hemijsku strukturu  $\alpha_1$  agonista zamena ugljenikovog atoma azotovim mostom. Na taj način, uvedena je ciklična gvanidino grupa i mogućnost za nastanak amino-imino tautomerije. Klonidin se primenjuje u terapiji poremećaja pažnje kod dece, ali i kao analgetik koristi tokom spinalne anestezije [37]. Tizanidin (5-hloro-4-(2-imidazolin-2-ilamino)-2,1,3-benzotiadiazol) je analog klonidina koji se primenjuje kao miorelaksans u terapiji multiple skleroze, kao i kod povreda kičmene moždine. Smatra se da miorelaksantno i analgetičko dejstvo tizanidina potiče od aktivacije  $\alpha_{2C}$ -adrenergičkih receptora [38]. Brimonidin (5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)hinoksalin) deluje kao agonista  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora sa znatno većom selektivnošću u odnosu na klonidin. Koristi se u hroničnoj terapiji glaukoma [39].

Gvanabenz (supstituisani, metilidenaminogvanidin), gvanfacin (supstituisan, acilgvanidin), amilorid (supstituisan, acilgvanidin) i metformin (supstituisan, guanilgvanidin) su strukturni derivati amidina/gvanidina. Guanabenz (((2,6-dihlorobenziliden)amino)gvanidin) poseduje visok afinitet za  $\alpha_1$  u odnosu na  $I_2$  receptore i koristi se u terapiji hipertenzije. Gvanfacin (N-karbamimidoil-2 (2,6-

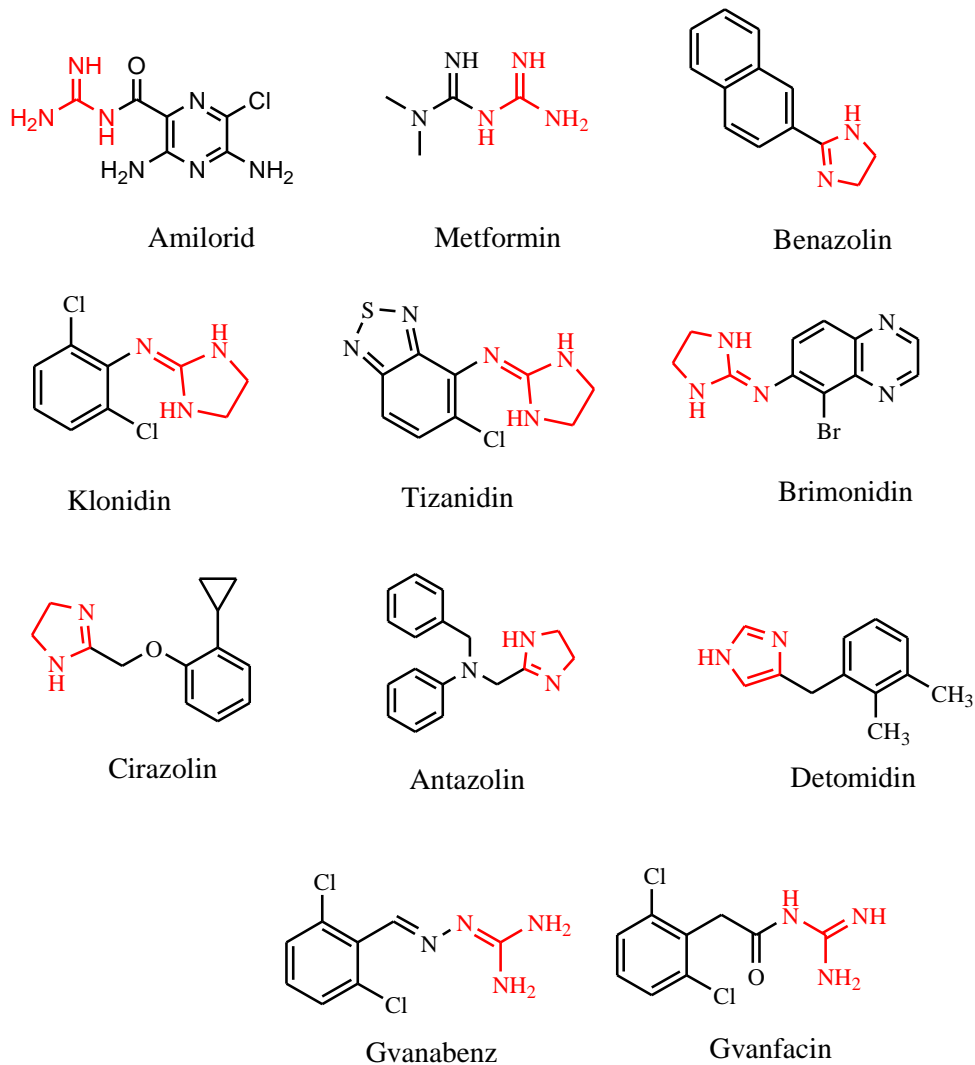


dihlorofenil)acetamid) je centralno delujući  $\alpha_2$  agonista koji se koristi u terapiji hipertenzije i poremećaja pažnje kod dece [40]. Amilorid (amidino-3,5-diamino-6-hloropirazinkarboksamid) je diuretik koji štedi kalijum zbog čega se primenjuje u terapiji hipertenzije i srčane insuficijencije. Amilorid pokazuje veći afinitet vezivanja za  $I_{2A}$  receptore u odnosu na  $I_{2B}$  receptore [41]. Metformin (1,1-dimetilbigvanidin) je oralni antidijabetik, koji se koristi u terapiji *diabetes mellitus*-a tipa II. Ispitivanja na pacovima su pokazala da amilorid i metformin vezivanjem za  $I_{2A}$  receptore stimulišu oslobađanje  $\beta$ -endorfina iz ćelija nadbubrežne žlezde i posledično dovode do povećanog preuzimanja glukoze u ćelije skeletnih mišića [42].

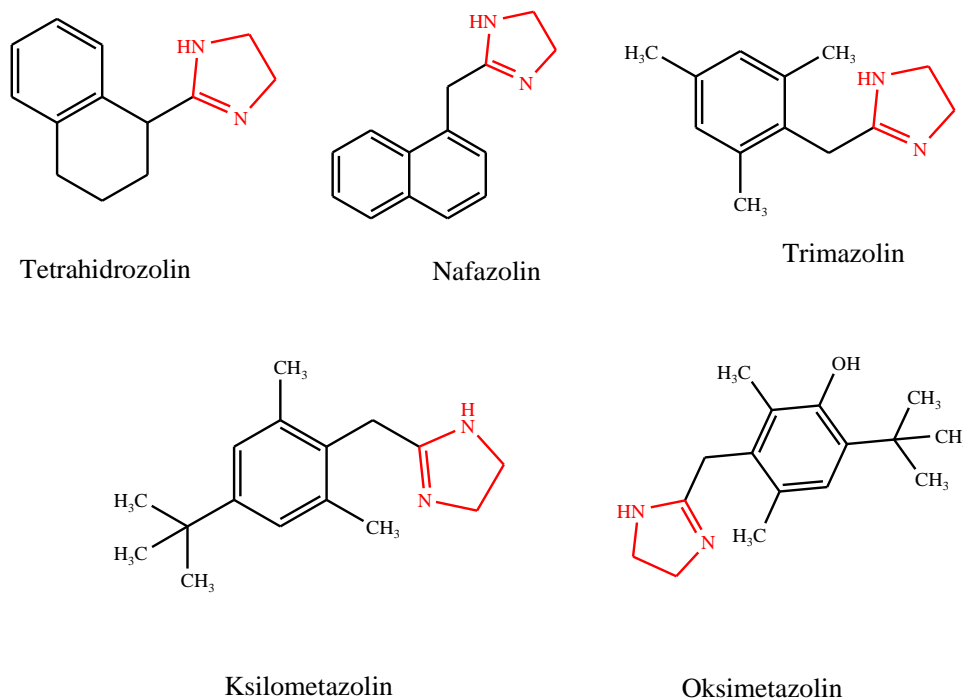
Cirazolin (2-[(2-ciklopropilfenoksi)metil]-4,5-dihidro-1H-imidazol) je derivat 2-metilenimidazolina sa izraženom aktivnošću na  $\alpha$  receptorima: agonista na  $\alpha_{1A}$ , antagonista na  $\alpha_2$  i parcijalni agonista na  $\alpha_{1B}$  i  $\alpha_{1D}$  receptorima. Pored adrenergičkih, cirazolin poseduje visok afinitet vezivanja i za imidazolinske  $I_2$  receptore [43]. Benazolin je derivat 2-arilimidazolina koji pokazuje visoku selektivnost ka  $I_1$  i  $I_2$  receptorima, u odnosu na  $\alpha$ -adrenergičke receptore. Do sada, cirazolin i benazolin se u istraživanjima primenjuju kao eksperimentalni ligandi [28].

Antazolin i detomidin su derivati 2-metilenimidazolina. Antazolin (2-(N-benzilanilinometil)-2-imidazolin) je agonista  $I_1/I_2$  receptora i antagonista na  $H_1$  receptorima. Zbog prisustva *terc*-amino grupe u strukturi poseduje antiholinergičke osobine. Antazolin se koristi kao antihistaminik, ali i u brzom tretmanu atrijalne fibrilacije [44]. Detomidin (4-(2,3-dimetilbenzil)imidazol) je agonist  $\alpha_2$  receptora, koji poseduje sedativno-analgetički efekat. Analgetičko dejstvo detomidina se može objasniti *i*) antiinflamatornim efektom kao posledicom inhibirane sinteze prostanglandina *ii*) inhibicijom transmisionih puteva bola u CNS-u, *iii*) vezivanjem za  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore. Koristi se kao veterinarski lek za ublažavanje bolova tokom hiruških i dijagnostičkih postupaka [45] (Slika 5).

Hemijske strukture agonista imidazolinskih i  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora su prikazane na Slici 5.

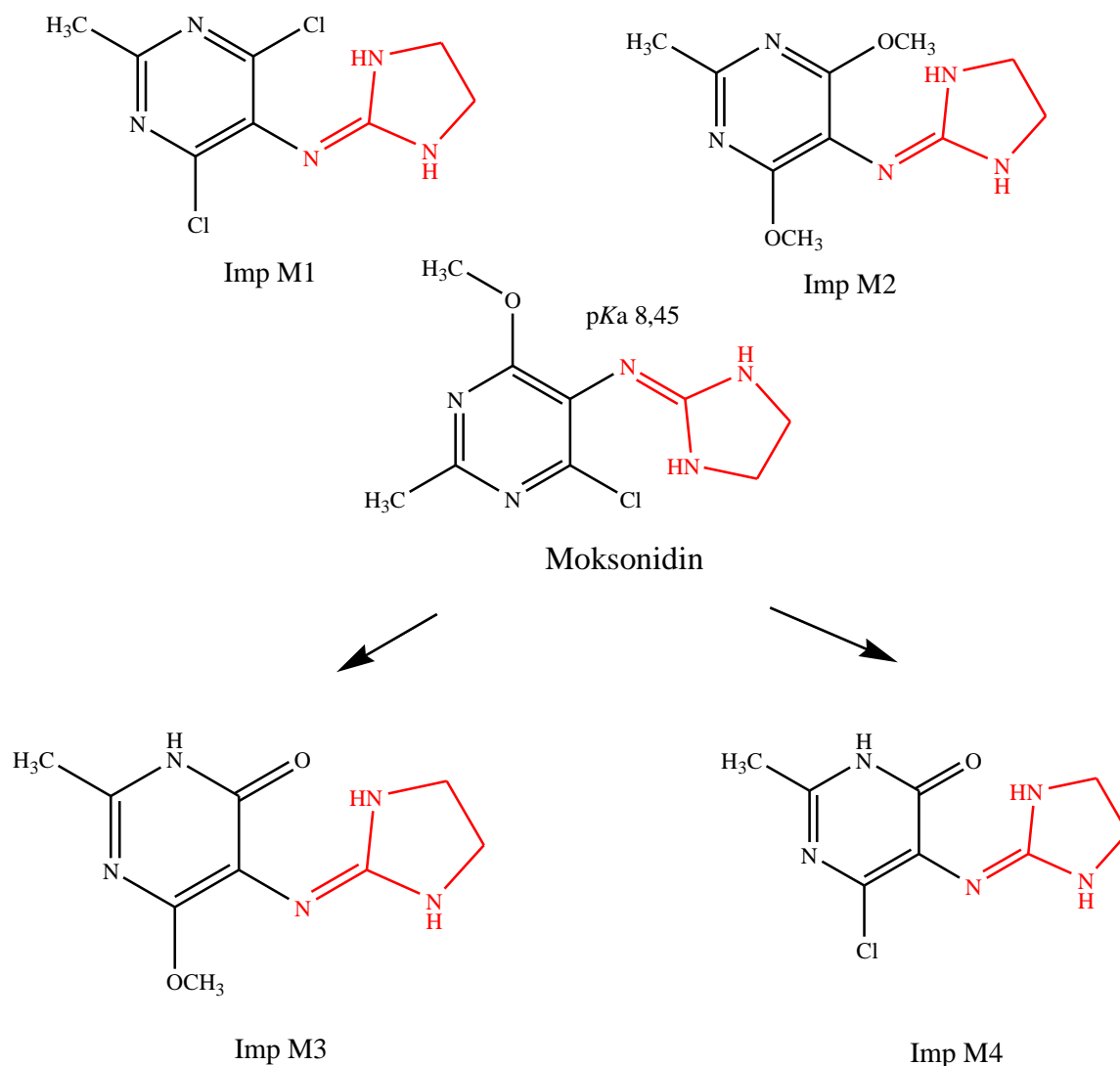
Slika 5. Hemijske strukture agonista imidazolinskih i  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora.

Ksilometazolin (2-[(4-tert-butil-2,6-dimetilfenil)metil]-4,5-dihidro-1H-imidazol), nafazolin (2-(naftalen-1-ilmetil)-4,5-dihidro-1H-imidazol), oksimetazolin (2-(4-tert-butil-2,6-dimetil-3-hidroksibenzil)-2-imidazol) i trimazolin (4,5-dihidro-2-((2,4,6-trimetilfenil)metil)-1H-imidazol) (Slika 6) su strukturni derivati 2-metilenimidazolina, dok je tetrahydrozolin (4,5-dihidro-2-(1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenil)-1H-imidazol) derivat 2-aril(alkil)imidazolina. Ksilometazolin, oksimetazolin, trimazolin, nafazolin i tetrahydrozolin su  $\alpha_1$  agonisti koji se u terapiji primenjuju lokalno kao nazalni dekongestivi. Zbog simpatomimetičkih efekata, ne preporučuju se kod pacijenata sa visokim krvnim pritiskom i kardiovaskularnim oboljenjima [46].



Slika 6. Hemijske strukture agonista na  $\alpha_1$  receptorima.

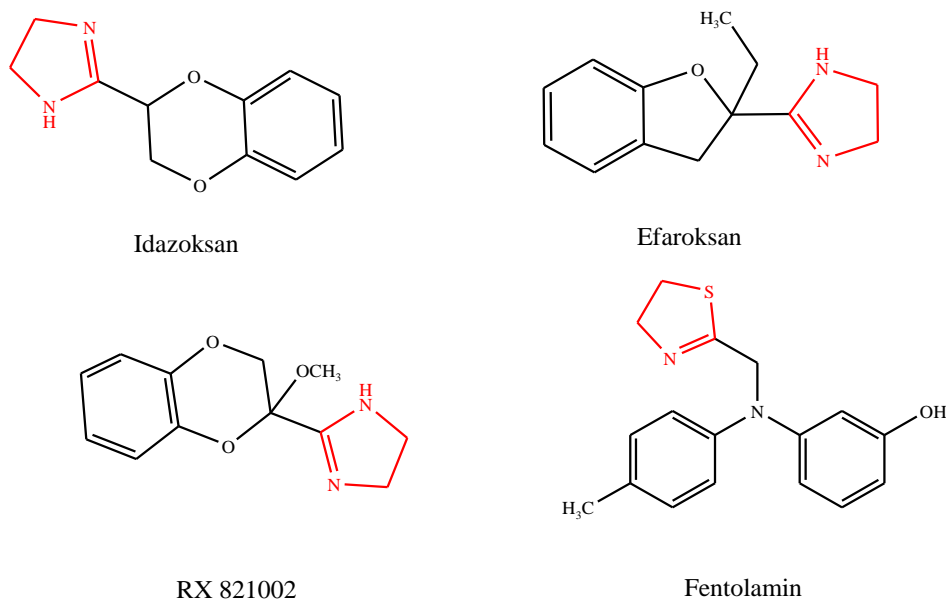
Moksonidin (4-hloro-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-6-metoksi-2-metilpirimidin-5-amin) i strukturno srodna jedinjenja predstavljaju derivate 2-aminoimidazolina (Slika 7). Moksonidin je agonist  $I_1/\alpha_2$  receptora koji postiže centralni antihipertenzivni efekat i poboljšava metabolički profil kod pacijenata sa *diabetes mellitus*-om [47]. Predstavlja slabu bazu i na fiziološkom pH 7,40 je zastupljen u katjonskom obliku (91,80%). Vrednost pKa parametra gvanidino grupe moksonidina je 8,45 [48]. Srodne hemijske strukture sa promenama na aril radikalu su 6-hloromoksonidin (Imp M1) i 4-metoksimoksonidin (Imp M2). Takođe, u procesu hemijske degradacije u položajima C4 i C6 pirimidinskog jezgra, mogu nastati 4-hidroksimoksonidin (Imp M3) i 6-desmetilmoksonidin (Imp M4) [14, 49-51].



Slika 7. Hemijske strukture moksonidina i srodnih jedinjenja.

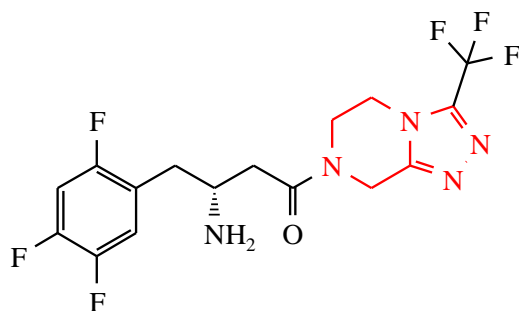
Fentolamin (3-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-ilmetil)(4-metilfenil)amino]fenol) je neselektivni antagonist na  $\alpha$  receptorima i koristi se u urgentnoj terapiji hipertenzivnih stanja, posebno kod feohromocitoma (Slika 8) [31].

Idazoksan, efaroksan i RX 821002 spadaju u derivate 2-aril(alkil)imidazolina (Slika 8). Idazoksan (2-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-il)-4,5-dihidro-1H-imidazol) je antagonist na  $\alpha_2/I_2$  receptorima i pokazuje pozitivne efekte u terapiji *Alzheimer*-ove bolesti i velikog depresivnog poremećaja [52-53]. Efaroksan (2-(2-etil-3H-benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-1H-imidazol) je antagonist na  $I_1/\alpha_2$  receptorima, i stimuliše oslobađanje insulina iz pankreasnih  $\beta$  ćelija i poboljšava oralnu toleranciju na glukozu [54-56]. RX 821002 je metoksi derivat idazoksana koji pokazuje visok afinitet vezivanja za imidazolinske  $I_3$  receptore i adrenergičke  $\alpha_2$  receptore [53].



Slika 8. Hemijske strukture antagonista imidazolinskih i  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora.

Sitagliptin ((3R)-3-amino-1-[3-(trifluorometil)-5H,6H,7H,8H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7-il]-4-(2,4,5-trifluorofenil)butan-1-on) je derivat triazola (Slika 9). Kao inhibitor enzima dipeptidil peptidaze-4 (DPP-4), koristi se u terapiji *diabetes melitus*-a tipa II. U prilog povoljnim metaboličkim efektima izazvanim sitagliptinom, uočeno je da piperazinimidazolinski derivati mogu da aktiviraju imidazolinski I<sub>3</sub> receptor i stimulišu oslobađanja insulina iz  $\beta$  ćelija pankreasa [57-59]. Pored toga, sitagliptin deluje i na CNS gde je uočeno da može smanjiti rizik od nastanka *Alzheimer*-ove bolesti [60-62].



Slika 9. Hemijska struktura sitagliptina.

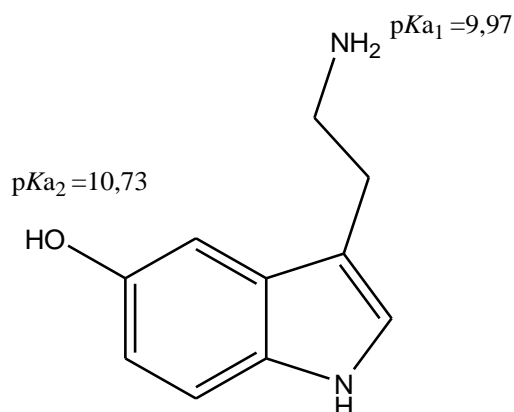
## 1.2. Serotoninski i dopaminski receptori

Serotonin (3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol) ili 5-hidroksitriptamin (5-HT) (Slika 10) je biogeni amin koje deluje kao centralni neurotransmiter i vazokonstriktor. U strukturi sadrži alifatičnu amino ( $pK_{a1}=9,97$ ) i fenolnu grupu ( $pK_{a2}=10,73$ ) [63]. Na fiziološkom pH 7,40 su prisutni neutralni (0,43%), katjonski (98,79%) i cviterjonski (0,77%) oblici serotonina [48]. Katjonska forma ekstracelularnog 5-HT je najzastupljenija (98,79%) i transportuje se u ćelije pomoću membranskih 5-HT transportera (SERT) [64], dok se neutralna forma transportuje u sekretorne vezikule preko vezikularnih monoamino transportera (VMATs) [65].

Serotonin ima značajnu ulogu u nekoliko fizioloških i hormonalnih signalnih puteva uključujući bes, agresiju, raspoloženje, apetit, kognitivne funkcije, kao i mnoge druge fiziološke i patofiziološke procese. U perifernoj cirkulaciji, većina serotonina se proizvodi u ćelijama intestinuma. Skladišti se u trombocitima i oslobađa tokom vazokonstrikcije nakon koje deluje kao agonista na ostale trombocite. Približno 90% serotonina u humanom organizmu se nalazi u enterohromafinim ćelijama gastrointestinalnog trakta gde reguliše crevne pokrete.

Deo serotonina se sintetiše u serotoninskim neuronima u nukleusu *Raphe* i reguliše neuropsihijatrijske procese, kontrolu raspoloženja i spavanja, zbog čega se pojava depresije i anksioznosti povezuje sa disfunkcijom serotoninskog sistema. U terapiji depresije, koristi se nekoliko grupa lekova kao što su triciklični antidepresivi (hlomipramin, imipramin, amitriptilin), inhibitori monoamino oksidaze (iproniazid, moklobemid) i selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina (fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, sertalin). Iako je zbog bezbednosti primene i dobre tolerancije, upotreba tricikličnih antidepresiva (TCA) zamenjena selektivnim inhibitorima ponovnog preuzimanja serotonina (SSRI), efikasnost SSRI kod teških oblika depresije je i dalje predmet diskusije. Lekovi iz grupe SSRI blokiraju monoaminski transportni protein (SERT), koji transportuje serotonin u presinaptičke neurone, i na taj način povećavaju raspoloživost serotonina u sinaptičkom prostoru [66].

Početak šizofrenije se obično objašnjava dopaminskom hipotezom, ali je ustanovljeno da su i serotoninski receptori uključeni u patofiziologiju ove bolesti [67]. U lečenju šizofrenije mogu se koristiti antipsihotici prve (tipični, tradicionalni antipsihotici) i druge (atipični, novi antipsihotici) generacije. Antipsihotici prve generacije (haloperidol, flufenazin) svoje terapijsko dejstvo ostvaruju vezivanjem za dopaminske  $D_2$  receptore suzbijajući na taj način simptome šizofrenije poput halucinacija i zabluda (deluzija). Ovi lekovi izazivaju ekstrapiramidalne neželjene efekte (tremor, distonija, akatizija, tardivna diskinezija, sekundarni parkinsonizam) kao posledicu inhibicije  $D_2$  receptora u nigrostriatalnom putu u mozgu, koji povezuje SNC (*substantia nigra pars compacta*) sa DS-om (*dorsal striatum*). Druga generacija antipsihotika (aripiprazol, ziprazidon, olanzapin) ima veći afinitet za  $5-HT_{2A}$  receptore i niži afinitet za  $D_2$  receptore, zbog čega je učestalost ekstrapiramidalnih neželjenih efekata smanjena. Kao posledicu vezivanja za histaminske  $H_1$ , muskarinske i  $\alpha$ -adrenergičke receptore, atipični antipsihotici izazovaju antiholinergičke neželjene efekte, povećanu sedaciju, kao i metaboličke neželjene efekte (gojaznost, *diabetes mellitus*) [68-70]. Kako je primena atipičnih lekova (klozapin, olanzapin) često povezana sa gojaznošću, hiperlipidemijom, poremećajem tolerancije na glukozu prednost kratkotrajne bolje podnošljivosti je u sukobu sa pojavom dugoročnih metaboličkih i kardiovaskularnih problema [71-74].

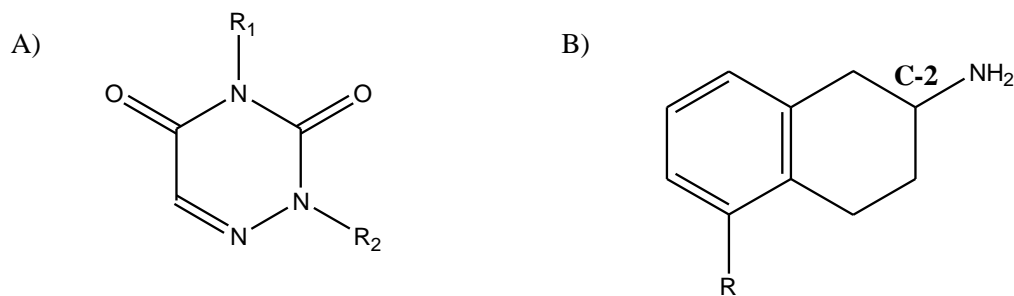


Slika 10. Hemijska struktura serotonina.

Klasifikacija serotonininskih receptora je složena i oni se mogu podeliti na sedam familija, od koji šest pripada G-protein receptorima [4-7]. Karakteristike farmakološki najznačajnijih podtipova 5-HT receptora su:

- (1) 5-HT<sub>1</sub> (1A, 1B, 1C, 1D, 1E) poseduju najveći afinitet za vezivanje serotonina. Kao autoreceptori su prisutni na serotoninским neuronima i predstavljaju target za antipsihotike. Njihova značajna uloga je u regulisanju poremećaja raspoloženja (depresija, anksioznost), ali i u patofiziologiji šizofrenije. 5-HT<sub>1A</sub> agonisti redukuju oslobađanje serotonina i smanjuju anksioznost. 5-HT<sub>1B</sub> receptori su lokalizovani u trigeminalnoj gangliji i predstavljaju target za anitimidigrenike (triptane). 5-HT<sub>1</sub> receptori su uključeni u procese učenja, pamćenja, spavanja, kao i patofiziološke procese opsesivno-kompulzivnih poremećaja i agresije.
- (2) 5-HT<sub>2</sub> (2A, 2B, 2C) receptori učestvuju u aktivacionom putu fosfolipaze C. U CNS-u, učestvuju u patofiziologiji nastanka šizofrenije, depresije i anksioznosti. 5-HT<sub>2B</sub> receptori se mogu naći u gastrointestinalnom traktu, kardiovaskularnm sistemu, kardiomiocitima, stomaku, plućima, dok se 5-HT<sub>2C</sub> receptori nalaze u epitelijalnim ćelijama hornoidnog pleksusa gde utiču na produkciju cerebrospinalne tečnosti. Farmakološka ispitivanja su pokazala da 5-HT<sub>2C</sub> receptori imaju ulogu u regulaciji telesne mase i osećaja gladi, kao i patofiziologiji Parkinsonove bolesti, šizofreniji i anksioznosti.
- (3) 5-HT<sub>6</sub> imaju veliki afinitet za tipične i atipične anipsihotike, uključujući klozapin. Veliki broj antipsihotika i antidepressiva inhibira 5-HT<sub>6</sub> stimulisanu aktivaciju adenilat ciklaze, tako da se antagonisti 5-HT<sub>6</sub> receptora mogu koristiti u lečenju kognitivne disfunkcije.
- (4) 5-HT<sub>7</sub> imaju ulogu u termoregulaciji i ciklusu spavanja. Uključeni su u centralne i periferne endokrine funkcije npr. procese oslobađanja vazopresina i oksitocina. Agonisti 5-HT<sub>7</sub> receptora inhibiraju oslobađanje luteotropnog hormona [4-8, 75-78].

Strukturni derivati arilpiperazina, 3,5-diokso-(2H, 4H)-1,2,4-triazini (Slika 11A) su selektivni agonisti na 5-HT<sub>1A</sub> receptorima. Uočeno je da su hidrofobni delovi molekula (aromatični prsten) u strukturi agoniste, kao i proton-akceptorske osobine (karbonilna grupa, imidska grupa, imino grupa, amino grupa) značajni za aktivaciju 5-HT<sub>1A</sub> receptora [79].

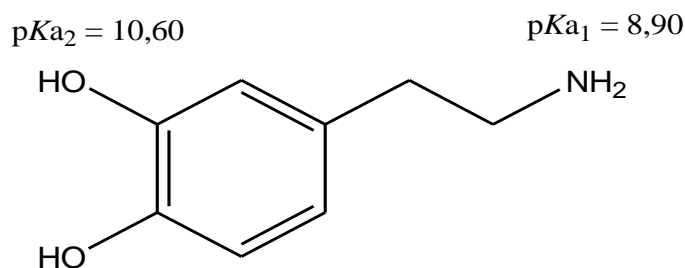


Slika 11. Hemijska struktura A) 3,5-dioekso-(2H, 4H)-1,2,4-triazin B) 5-supstutuisani-2-aminotetralin

Analozi 5-supstutuisanih-2-aminotetralina (5-SAT) se visokim afinitetom vezuju za 5-HT<sub>7</sub> i 5-HT<sub>1A</sub> receptore (Slika 11B). Sterne grupe na C(5)-položaju u 5-SAT ligandima povećavaju selektivnost ka 5-HT<sub>7</sub> receptorima, dok sterne i hidrofobne grupe na hiralnom C(2)-amino položaju utiču na vezivanje za 5-HT<sub>1A</sub> receptor [79-80].

U patofiziologiji oboljenja CNS-a važnu ulogu ima i dopaminski sistem. Dopamin (3,4-dihidroksifenilamin, DA) je neurotransmiter, koji učestvuje u fiziološkim funkcijama u centralnom i perifernom nervnom sistemu, interakcijom sa dopaminskim receptorima (Slika 12). Protonovan oblik dopamina je rastvorljiv u vodi, ali istovremeno i podložan reakcijama oksidacije. Vrednosti parametra jonizacije dopamina su  $pK_{a1} = 8,90$  (za alifatičnu amino grupu) i  $pK_{a2} = 10,60$  (za fenolnu grupu) [48, 81]. Na fiziološkom pH 7,40 najzastupljeniji je katjonski (98,67%), dok su u manjem stepenu prisutni cviterjonski (0,93%) i neutralni oblici (0,39%) dopamina [48].

Dopamin ima nekoliko važnih uloga u CNS-u kao npr. kontrola motorike, motivacija, laktacija i mučnina. U krvnim sudovima, dopamin inhibira oslobađanje norepinefrina i deluje kao lokalni vazodilatator, u bubrezima povećava izlučivanje natrijuma, u pankreasu smanjuje proizvodnju insulina, u crevima smanjuje gastrointestinalni motilitet, dok u imunološkom sistemu smanjuje aktivnost limfocita. Sa izuzetkom krvnih sudova, dopamin se u svakom od perifernih sistema sintetisuje lokalno i ispoljava svoje efekte u blizini ćelija koje ga oslobađaju. Nastaje dekarboksilacijom molekulskog prekursora levodope (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin, L-DOPA), koji se biosintetisuje u mozgu i bubrezima.

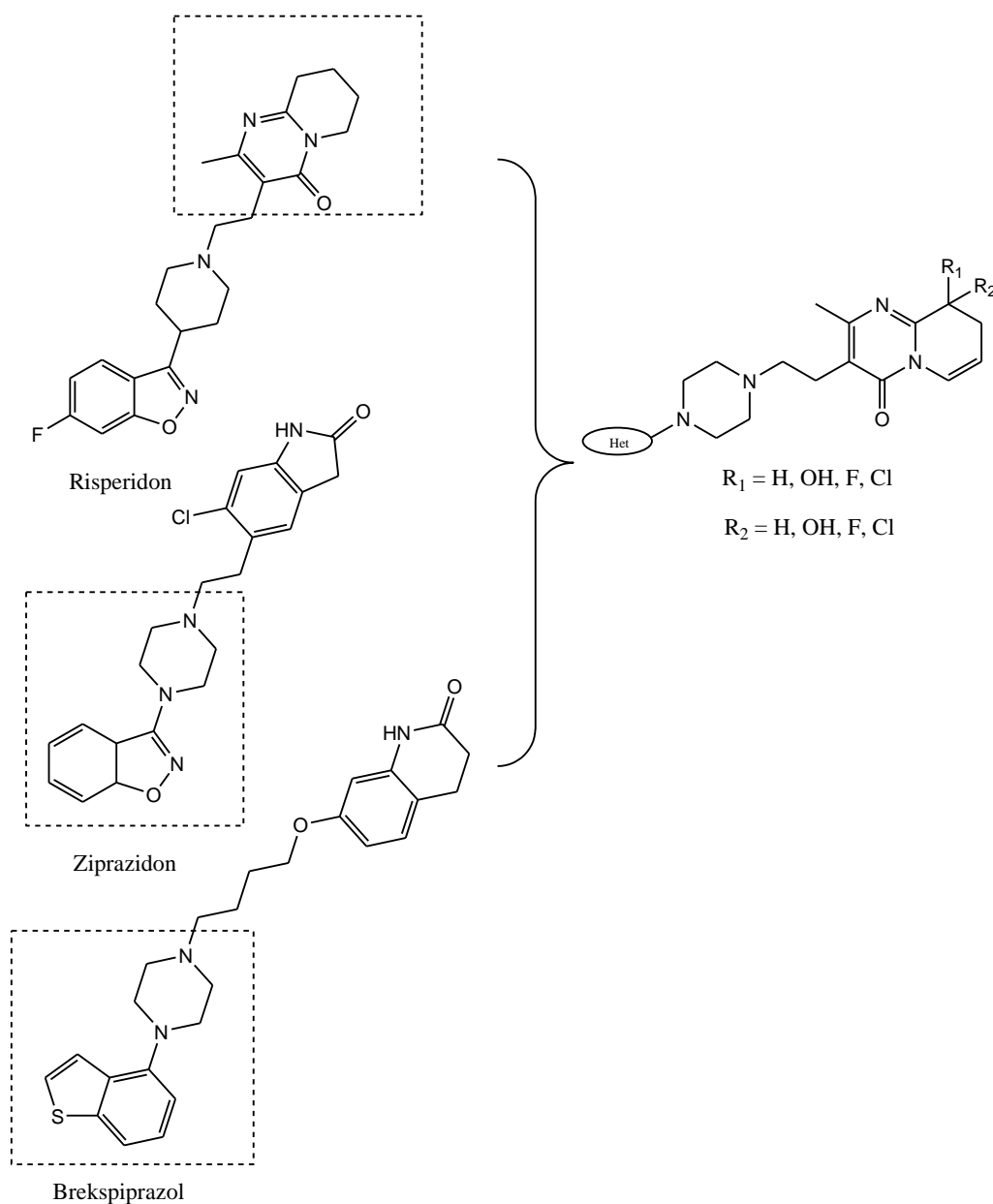


Slika 12. Hemijska struktura dopamina.

Dopaminski receptori pripadaju G-protein receptorima i dele se na D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub>) i D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) receptorske familije. Lekovi koji se koriste u tretmanu šizofrenije, Parkinsonove bolesti, depresije, *Tourette*-ovog sindroma, kao i poremećaja pažnje kod dece (ADHD) ispoljavaju dejstvo na dopaminskim receptorima.

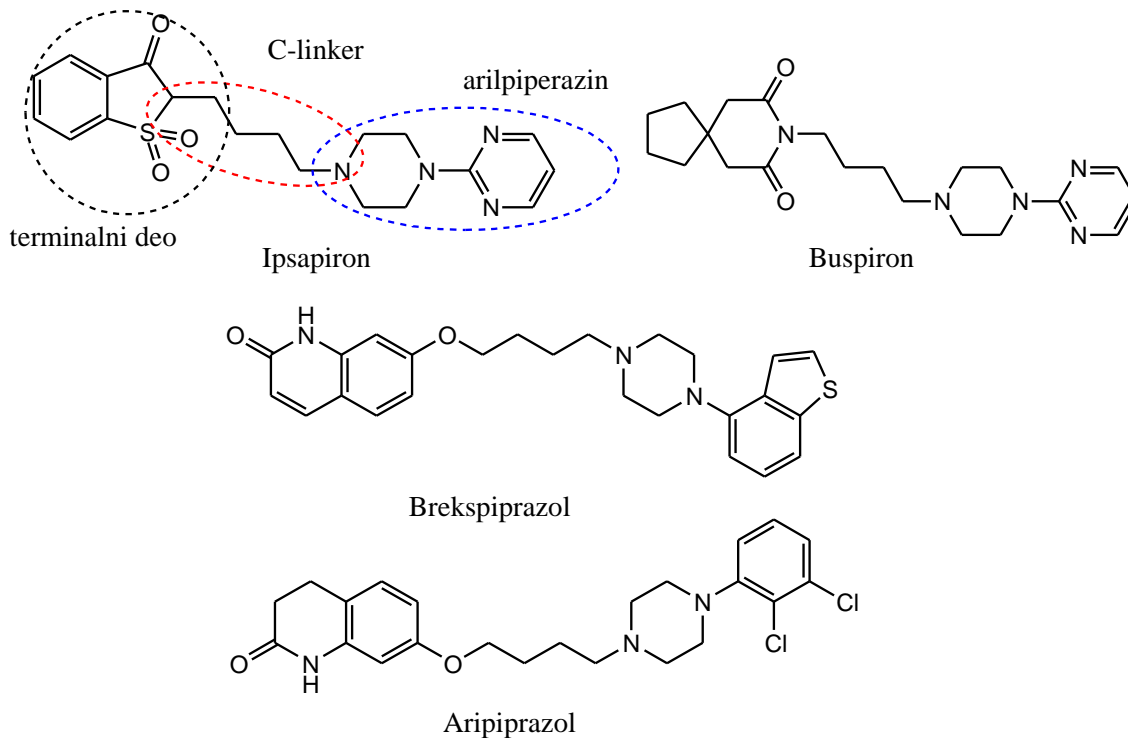


Značajan nedostatak u terapiji oboljenja CNS-a je receptorska neselektivnost lekova, koja rezultira brojnim neželjenim efektima. Sa druge strane, terapija šizofrenije, depresije, anksionznosti, bipolarnog poremećaja podrazumeva složene i ukrštene biohemijske i fiziološke mehanizme npr. u tretmanu šizofrenije koriste se lekovi koji deluju i na serotoninske 5-HT<sub>1A</sub> i dopaminske D<sub>2</sub> receptore. Ravnoteža između okupiranosti 5-HT<sub>1A</sub> i D<sub>2</sub> receptora je osnovna za smanjenje ekstrapiramidalnih simptoma i poboljšanje efikasnosti kod terapijski rezistentnih oblika šizofrenije [82-83]. Na osnovu toga, dualni 5-HT<sub>1A</sub>/D<sub>2</sub> antagonisti sa smanjenim sporednim efektima se mogu uspešno koristiti u terapiji šizofrenije [84]. Pokazano je da derivati piridopirimidinona (Slika 13), koji predstavljaju hibridne molekule izvedene na osnovu hemijske strukture risperidona, ziprazidona i brekspirazola, poseduju dualni 5-HT<sub>1A</sub>/D<sub>2</sub> receptorski antagonizam [85].



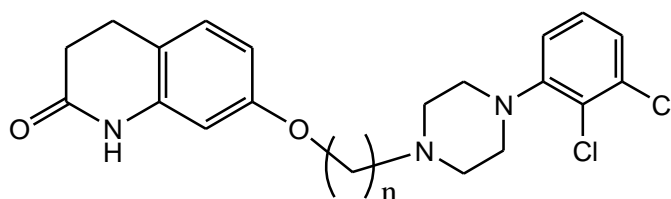
Slika 13. Dizajniranje novih piridopirimidininskih derivata [85].

Pored derivata piridopirimidinona i dugolančani derivati arilpiperazina (*Long Chain Arylpiperazines*, LCAPs) deluju na strukture u CNS-u. Nastaju vezivanjem arilpiperzinskog heterociklusa za pogodan ugljovodonični linker sa imidnim, amidnim, sulfonamidnim ili heterocikličnim prstenom (Slika 14) [86-87]. Reprezentativni LCAP derivat je ipsapiron, analog buspirona, koji je anksiolitik i antidepresiv [88].



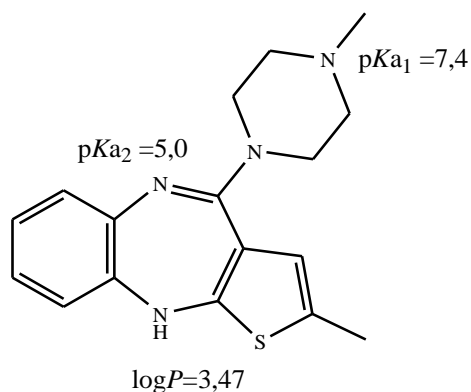
Slika 14. Hemijske strukture tipičnih derivata LCAP-a [87].

Dugolančani arilpiperazini, koji se koriste u terapiji oboljenja CNS-a, najčešće sadrže četvoročlani ugljovodonični *linker*. Istraživanja su pokazala da ekstenzija ugljovodoničnog niza kod arilpiperazina pozitivno utiče na aktivnost i selektivnost na serotoninskim i dopaminskim receptorima. Za liganade kod kojih je  $n = 3$  i  $n = 4$  pronađen je maksimalan afinitet ka  $5\text{-HT}_1$  receptorima, dok je slabija aktivnost prisutna u slučaju  $n = 1$  [89-90] (Slika 15).



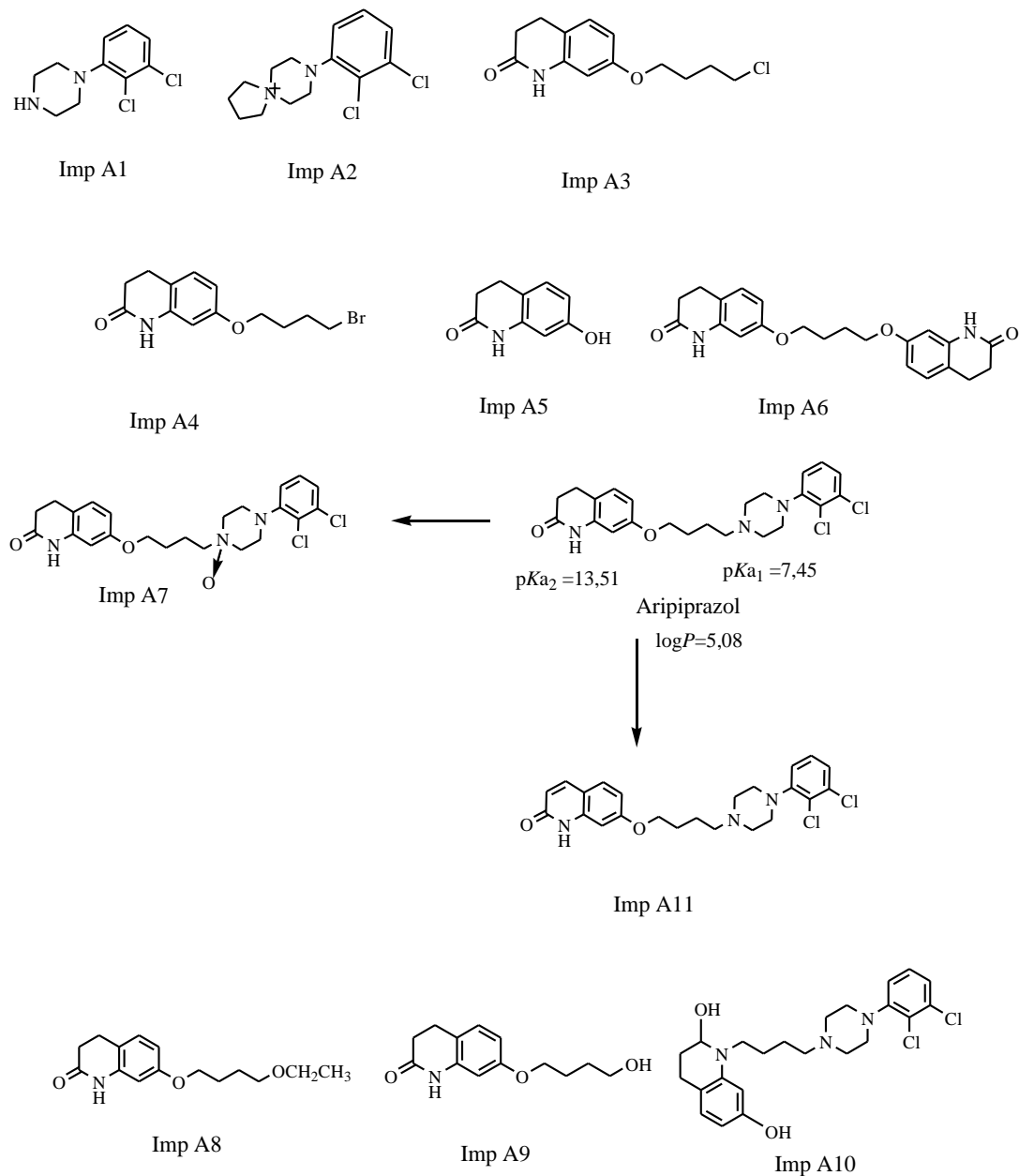
Slika 15. Hemijska struktura derivata arilpiperazina, dualnih liganada  $5\text{-HT}_{1A}/D_2$  receptora [89].





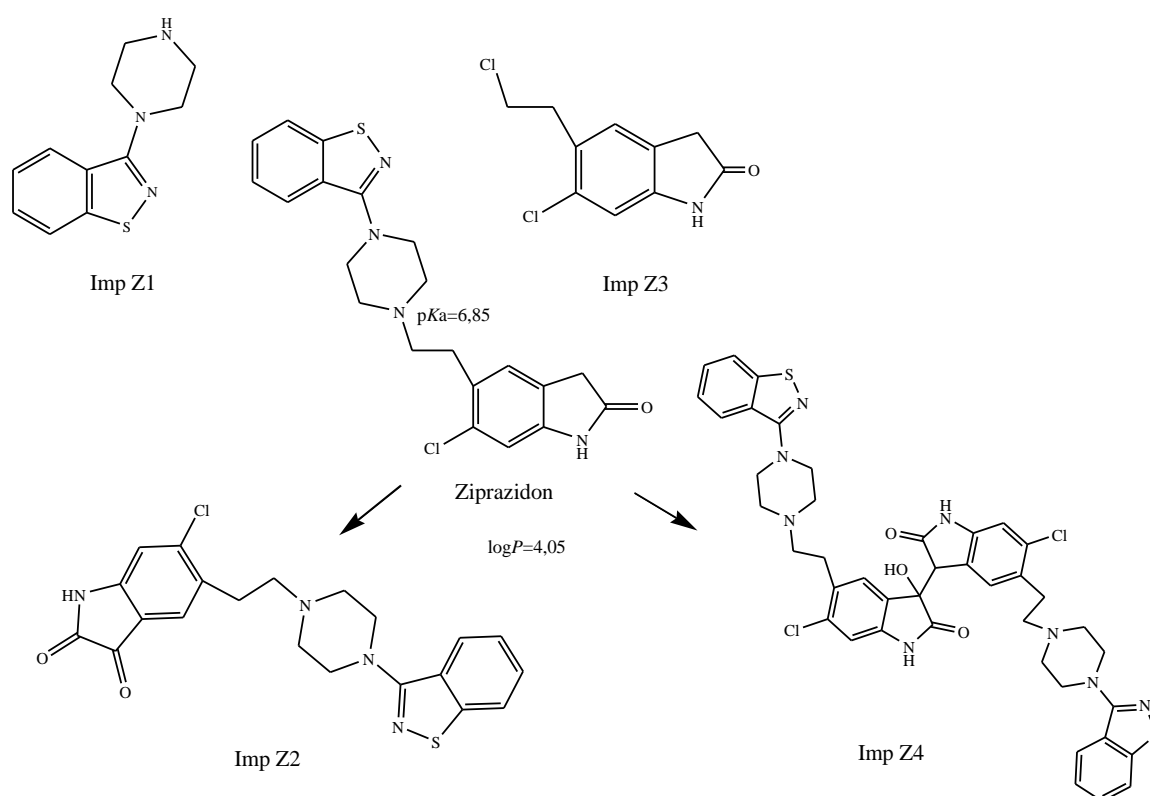
Slika 17. Hemijska struktura olanzapina.

Aripiprazol (7-{4-[4-(2,3-dihlorofenil)piperazin-1-il]butoksi}-1,2,3,4-tetrahidrohinolin-2-on) je derivat hinolinona sa slabo baznim i izrazito lipofilnim osobina ( $\log P = 5,08$ ) [48]. Vrednost parametra jonizacije su  $pK_{a1} = 7,45$  (amino grupa, piperazina) i  $pK_{a2} = 13,51$  (laktam, parcijalno hidriranog hinolinona) [94]. Na pH 7,40 najzastupljeniji je katjonski (53,51%), a u manjem procentu je prisutan neutralni oblik (46,49%) aripiprazola. Oksidacijom aripiprazola nastaje dehidroaripiprazol (Imp A11) koji je aktivan metabolit. U zavisnosti od tipa supstituenta na položaju 7 u strukturi 3,4-dihidrohinolona, kao sporedni proizvod sinteze aripiprazola mogu nastati strukturno srodna jedinjenja (Imp A1, Imp A2, Imp A3, Imp A4, Imp A5, Imp A6, Imp A8, Imp A9, Imp A10). U postupku čuvanja, N-oksidacijom aripiprazola nastaje Imp A7 (Slika 18). Aripiprazol je parcijalni agonista na  $D_2/5-HT_{1A}$  receptorima i antagonista na  $5-HT_{2A}$  receptora. Blokada  $\alpha_1$ -adrenergičkih,  $H_1$ -histaminskih receptora doprinosi terapijskim, ali i sporednim efektima aripiprazola (ortostatska hipotenzija, somnolencija) [95-96].



Slika 18. Hemijske strukture aripiprazola i srodnih jedinjenja.

Ziprazidon (5-{2-[4-(1,2-benzotiazol-3-il)piperazin-1-il]etil}-6-hloro-2,3-dihidro-1H-indol-2-on) je derivat benzoizotiazola ( $pK_a=6,85$  amino grupa, piperazinskog heterociklusa;  $\log P=4,05$ ) [48, 97]. Na fiziološkom pH 7,40 prisutni su neutralni (67,23%) i katjonski (32,77%) oblici ziprazidona. Reakcijom metaboličke oksidacije ziprazidona nastaje Imp Z2 koji predstavlja aktivan metabolit. Ziprazidon je 5-HT<sub>2A/D<sub>2</sub></sub> antagonista, koji ostvaruje interakciju i sa 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> receptorima. Na taj način ziprazidon suzbija negativne simptome šizofrenije, poboljšava raspoloženje, kognitivnu funkciju i redukuje motornu disfunkciju. Neželjena dejstva su posledica vezivanja za  $\alpha_1$ -adrenergičke i H<sub>1</sub>-histaminske receptore. U toku sinteze ziprazidona, kao sporedni proizvodi mogu nastati Imp Z1 i Imp Z4. U zavisnosti od uslova čuvanja, kao degradacione nečistoće se javljaju Imp Z3, Imp Z2 i Imp Z4 (Slika 19) [98-100].



Slika 19. Hemijske strukture ziprazidona i srodnih jedinjenja.

### 1.3. Podela hromatografskih uslova u tečnoj hromatografiji

Reverzno-fazni sistem (RP) tečne hromatografije visokih performansi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) se najčešće koristi u farmaceutskim ispitivanjima. Retencija u RP sistemu je uslovljena rastvorljivošću jedinjenja u mobilnoj fazi, dok je razdvajanje zasnovano na karakteristikama kovalentnih interakcija između nepolarnih funkcionalnih grupa analita i stacionarne faze. Uprkos napretku u razvoju hromatografskih kolona/stacionarnih faza, koje omogućavaju analizu jedinjenja sa izraženim polarnim osobinama, njihovo ispitivanje u RP sistemu nije pokazalo zadovoljavajuću primenljivost. U takvim slučajevima, uvedena je hromatografija hidrofiličnih interakcija (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) kao pogodna alternativa koja nudi komplementarnu selektivnost u odnosu na RP sistem [101-103].

Iako se poreklo hromatografije hidrofiličnih interakcija vezuje za razdvajanje šećera [104], rani počeci hromatografskih razdvajanja koja su slična HILIC mehanizmu, zabeleženi su 1941. godine kada su *Martin* i *Synge* ispitivali razdvajanje aminokiselina na silika gel stacionarno fazi. Tada je kao mobilna faza korišćena voda zasićena hloroformom, a mehanizam razdvajanja je objašnjen raspodelom analita između vodenog sloja adsorbovanog na stacionarnoj fazi i ostatka mobilne faze [105-106].

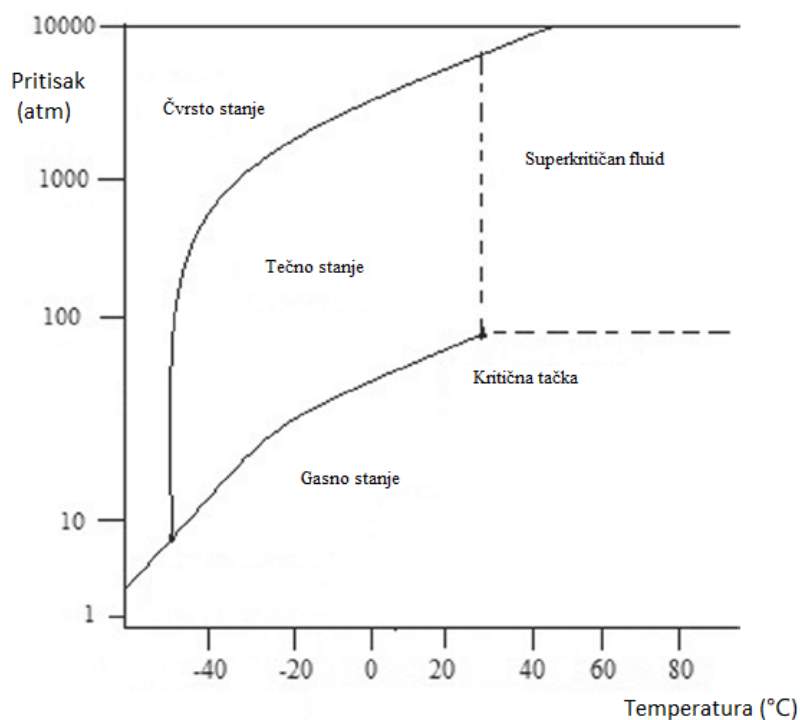
Zbog niske viskoznosti mobilne faze kao posledice velikog zapreminskog udela organskog rastvarača, u HILIC uslovima je nizak spoljašnji pritisak. Bazna jedinjenja su obično jonizovana i pokazuju zadovoljavajuće retencione karakteristike u tipičnim HILIC sistemima [107]. Zadovoljavajući oblik pika, mogućnost za analizu jonizovanih jedinjenja baznih karakteristika, kao i smanjena visina teorijskog platoa kao posledica smanjene viskoznosti mobilne faze, neke su od prednosti HILIC razdvajanja. Pored toga, vreme izvođenja hromatografske analize je skraćeno i olakšana je upotreba kolona većih dimenzija [108].

Retencioni mehanizam u HILIC sistemu je kompleksan. Particioni mehanizam se može pojaviti istovremeno sa adsorpcionim mehanizmom, jonskim interakcijama i hidrofobnim interakcijama. Kompleksnost HILIC mehanizma rezultuje različitom selektivnošću na različitim HILIC stacionarnim fazama. Iako je za HILIC sistem karakteristična kombinacija polarne stacionarne faze i vodeno-organske mobilne faze sa visokim udelom organskog rastvarača (najčešće acetonitrila), nevodeni HILIC sistemi (*Non-Aqueous Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, NA-HILIC) sa mobilnim fazama koje sadrže acetonitril/metanol se takođe koriste [109]. Nije u potpunosti razjašnjeno koji retencioni mehanizam je prisutan u vodenom HILIC (*Aqueous Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, AQ-HILIC) i NA-HILIC sistemu kao ni koliki je doprinos partitionog i adsorpcionog mehanizma u ukupnom procesu retencije. Smatra se da relativni udeo pojedinačnog mehanizma zavisi od sastava mobilne faze, vrste stacionarne faze i strukture ispitivanog jedinjenja [110]. Studijama molekulske dinamike izvršena je simulacija adsorpcije različitih binarnih smeša, komponenata HILIC mobilne faze, na hidrofilnu površinu silika stacionarne faze. Dobijeni rezultati su pokazali da se karakteristike adsorbovanog vodenog sloja (npr. profil gustine rastvarača, lokalna orijentacija adsorbovanog rastvarača, kompozicija adsorbovanog sloja) značajno razlikuju od karakteristika adsorbovanog organskog sloja zbog čega se mogu očekivati i nešto drugačiji retencioni mehanizmi u AQ-HILIC i NA-HILIC sistemima [111].

Superkritična fluidna hromatografija (*Supercritical Fluid Chromatography*, SCF) je nastala 1960. godine sa uvođenjem superkritičnih fluida u sastav mobilne faze [112]. U početku primene, SFC tehnika je prepoznata kao hibrid HPLC i gasne hromatografije (*Gas*

*Chromatography*, GC) koji omogućava brže razdvajanje u poređenju sa HPLC-om, kao i ispitivanje jedinjenja sa visokom tačkom ključanja što je onemogućeno u GC sistemu.

SFC tehnika zahteva preciznu kontrolu eksperimentalnih uslova kao što su temperatura, pritisak, brzina protoka i sastav mobilne faze [113-114]. Poslednjih godina ulaganja kompanija u razvoj robusnih instrumenata, proširila je upotrebu SFC tehnike u farmaceutskoj industriji. Osnovna razlika između HPLC i SFC tehnike je u sistemu pritiska koji obezbeđuje pumpanje komprimovanog fluida, dok se druga razlika odnosi na regulaciju izlaznog protoka kroz kolonu i formiranje povratnog pritiska u sistemu [115]. Navedene karakteristike SFC hromatografa su neophodne kako bi se održao odgovarajući sastav SFC mobilne faze kao što je niska viskoznost i visoka difuznost. Moderni instrumenti sadrže pumpe, specijalno dizajnirane da omoguće stabilan pritisak, protok i temeperaturu u sistemu. Takođe, obezbeđuju mešanje kompresibilnih fluida i tečnosti u procesu razvoja odgovarajuće metode. Superkritičan fluid je element ili jedinjenje na temperaturi i pritisku iznad kritičnih vrednosti (Slika 20). Superkritični fluid nastaje na temperaturama i pritisku gde gasno i tečno stanje nije moguće odvojiti. Osobine superkritičnog fluida (gustina, viskoznost, difuznost) se menjaju sa promenom pritiska i temperature u sistemu i predstavljaju karakteristike tečnog (dobra rastvorljivost) i gasnog stanja (dobra difuznost) [112-114].



Slika 20. Fazni dijagram ugljen-dioksida.

Poželjne osobine superkritičnih fluida su niska kritična konstanta, niska hemijska reaktivnost, komercijalna dostupnost (niska cena) i kompatibilnost sa detektorima.

Primeri gasova koji se mogu koristiti kao superkritični fluidi su prikazani u Tabeli 1.



Tabela 1. Fizičko-hemijske osobine prikazanih superkritičnih fluida.

Fluid	Kritični parametri			gustina na 400 atm (g/ml)
	Temperatura (°C)	Pritisak (atm)	Gustina (g/ml)	
Ugljen-dioksid	31,30	72,90	0,47	0,96
Azot-monoskid	36,50	72,50	0,45	0,94
Sumpor-heksafluorid	45,50	37,10	0,74	1,61
Ksenon	16,60	58,40	1,10	2,30
Butan	152,00	37,50	0,23	0,50
Pentan	196,60	33,30	0,23	0,50
Voda	374,40	226,80	0,34	/
Metanol	240,50	78,90	0,27	/
Acetonitril	274,70	47,70	0,24	/

Ustanovljeno je da samo ugljen-dioksid zadovoljava predviđene zahteve. Oksidi azota imaju sličnu snagu rastvaranja kao ugljen-dioksid, ali veoma jak potencijal stupanja u oksido-redukcijske reakcije. Sumpor-heksafluorid je slabiji eluent u odnosu na ugljen-dioksid i teško se dobija u čistom stanju. Ksenon kao rastvarač ima nisku snagu eluiranja i komercijalno je nepristupačan. N-alkani male molekulske mase su takođe slabi eluenti sa relativno visokim kritičnim konstantama i ne mogu se koristiti sa plamenim-detektorima, dok su tečnosti (voda, metanol, acetonitril) zapaljive i zahtevaju oprez tokom upotrebe. Ugljen-dioksid ima slične osobine rastvaranja kao ugljovodonici i ostvaruje intermolekulske interakcije kao što su disperzija i indukcija, s obzirom da ne poseduje dipolni momenat. Polarne supstance ostvaruju nešto veći broj intermolekulskih interakcija i imaju visoke kritične konstante, koje su inkompatibilne sa stabilnim eksperimentalnim uslovima [112].

Karakteristike superkritičnog CO<sub>2</sub> daju SFC-u niz prednosti u odnosu na RP, kao što je brzo kondicioniranje i kraće vreme trajanja analize. SFC sistem ima niže operativne troškove i po svojim karakteristikama se razlikuje u odnosu na RP-LC sistem [116-117]. Nisku potrošnju rastvarača, prati i zanemarljivo stvaranje otpada zbog korišćenja smeše malih količina organskog rastvarača i CO<sub>2</sub> koji brzo isparava [118]. Navedene prednosti utiču na porast primene SFC tehnologije, što je potvrđeno i većim brojem naučnih publikacija.

Zajednička karakteristika HPLC i SFC tehnike je korišćenje mobilne i stacionarne faze u sistemu razdvajanja. SFC se može smatrati tehnikom koja je bliska normalno-faznom (*Normal-Phase*, NP) sistemu, jer je ugljen-dioksid nepolarna supstanca [119-120]. Pokazano je da sve stacionarne faze koje se koriste u HPLC-u, mogu se koristiti i u SFC-u. Polarnost CO<sub>2</sub> se može povećati dodatkom polarnih organskih rastvarača, od kojih se metanol najčešće koristi. Sa druge strane, SFC je ekološki prihvatljiva metoda. Dozvoljava velike protoke mobilne faze i može se koristiti kao zamena za RP-LC pre svega zbog brzine razvoja odgovarajućeg analitičkog postupka i mogućnosti korišćenja mobilne faze koja ne sadrži vodu, što je od značaja u preparativnoj hromatografiji. Dodatkom organskog modifikatora u mobilnu fazu (2–40%; v/v), povećana je rastvorljivost jedinjenja i tako omogućena i analiza polarnih supstanci. Gustina mobilne faze se smatra ključnom karakteristikom u SFC-u, a

veliki značaj imaju temperatura i pritisak. Izbor stacionarne faze kombinovan sa različitim modifikatorima mobilne faze rezultuje velikim brojem mogućnosti koje se danas koriste kao polazna tačka prilikom razvoja željene hromatografske metode [121].

Upotreba HILIC-e u tečnoj hromatografiji je u porastu, zbog komplementarnosti sa RP sistemom i razvoja sve većeg broja komercijalno dostupnih HILIC stacionarnih faza. Zbog složenosti HILIC i SFC retencionih mehanizama, zasnovanih na kombinovanom uticaju particije i adsorpcije, ispitivanje upotrebe HILIC stacionarnih faza u SFC uslovima daje bolji uvid u hemijski indukovane razlike u retencionom ponašanju.

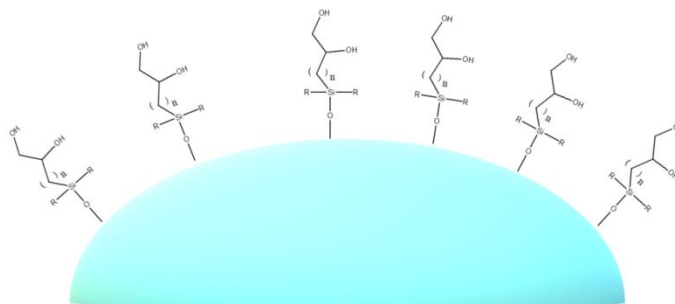
Još uvek, u potpunosti nije razjašnjeno koliki je doprinos procesa adsorpcije i particije u SFC-u i HILIC-i, kao i kakav je uticaj prirode organskog modifikatora na retenciono ponašanje jedinjenja.

U literaturi još uvek nema dovoljno dostupnih podataka o uporednoj analizi SFC i NA-HILIC sistema.

### 1.3.1. *Mixed-mode* stacionarna faza

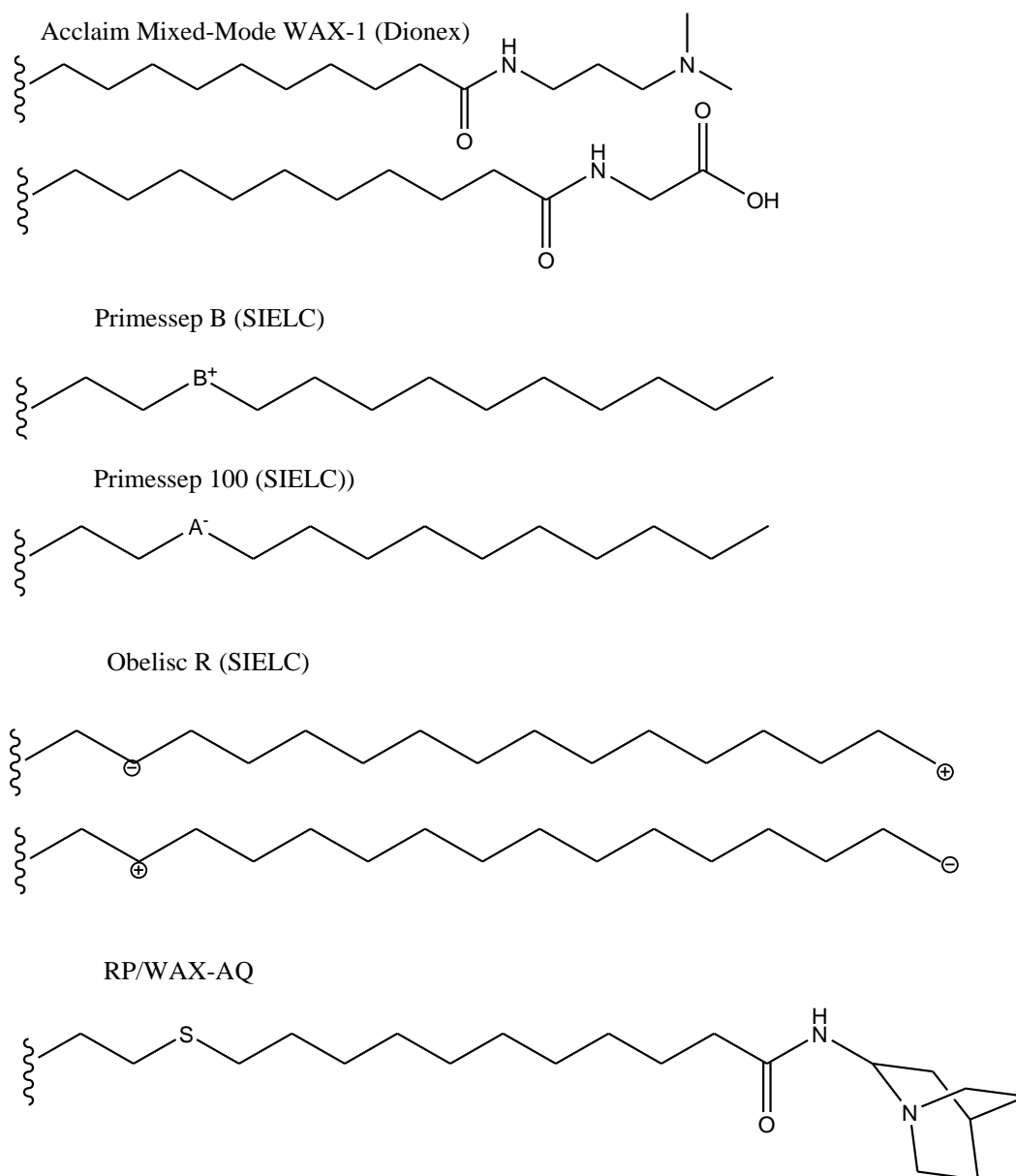
Kako bi se obezbedilo razdvajanje kompleksnih smeša, značajna pažnja je usmerena na obezbeđivanje kombinovanih interakcija u sistemu i razvoj *mixed-mode* hromatografskih uslova (*mixed-mode chromatography*, MMC).

U MMC-u, primenjuju se različite kombinacije hromatografskih sistema kao što je RP/jonoizmenjivačka hromatografija (*Ion Exchange Chromatography*, IEC) [122], hromatografija hidrofobnih interakcija/IEC [123], hromatografija RP/HILIC interakcija [124], HILIC/IEC [125] itd. U osnovi, kombinovani hromatografski sistemi se dopunjuju i obezbeđuju veliku fleksibilnost, visoku selektivnost i analizu uzorka sa velikim brojem jedinjenja na jednoj hromatografskoj koloni [126-127]. Pojedinačna MMC kolona može zameniti korišćenje dve kolone u dvo-dimenzionalnim hromatografskim sistemima (2D LC), čime je izbegnuto rasipanje, prekomerna potrošnja hromatografskog materijala, smanjene su operativne faze i sprečena je kontaminacija [128]. U MMC-u, stacionarne faze koje sadrže najmanje dve vrste strukturnih modifikacija stacionarne faze, pokazale su fleksibilnost i pogodnost u istovremenom razdvajanju različitih hemijskih klasa analita [124-126] npr. *mixed-mode* HILIC/RP kombinacija za razdvajanje nepolarnih i polarnih jedinjenja u uzorku (Slika 21) [128-129].



Slika 21. *Mixed-mode* HILIC/RP stacionarna faza.

Zahvaljujući novim generacijama *mixed-mode* stacionarnih faza i boljem razumevanju kombinovanih retencionih mehanizama raste primena MMC u farmaceutskim ispitivanjima. Primeri hemijski modifikovanih MMC stacionarnih faza su prikazani na Slici 22.



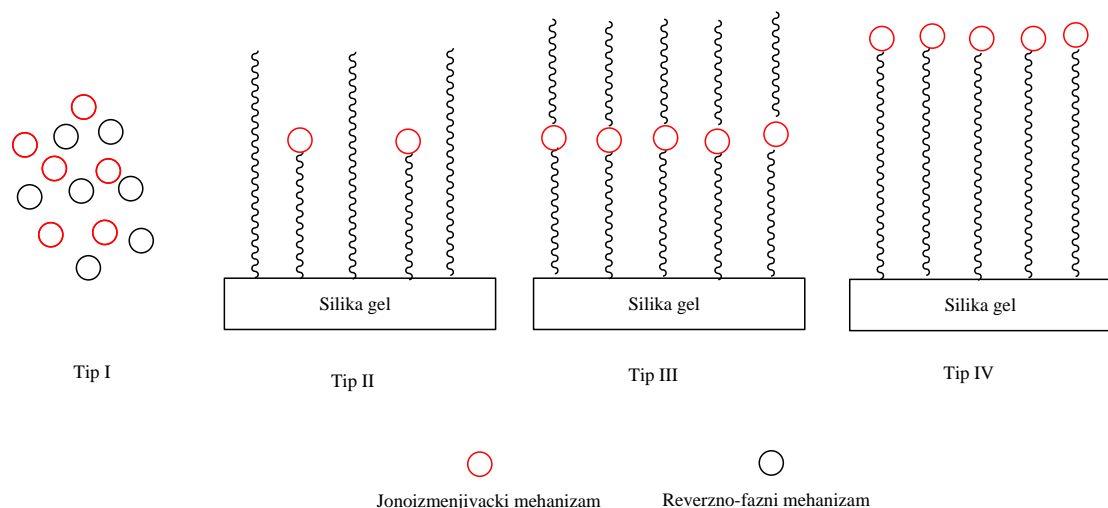
Slika 22. Hemijske strukture *mixed-mode* stacionarnih faza [125].

Pored kolona sa dualnim sistemima, komercijalno su dostupne i kolone sa trimodalnim sistemima razdvajanja koje npr. mogu da uključuju istovremeno prisustvo mehanizma razmene anjona, mehanizma razmene katjona, kao i hidrofилnog (ili hidrofobnog) retencionog mehanizma. Na ovaj način se postiže efikasno ispitivanje u toku istovremene hromatografske analize kompleksnih farmaceutskih smeša koje se sastoje iz katjona, anjona i neutralnih molekula. Prema tome, u zavisnosti od vrste farmaceutske smeše mogu se primeniti *mixed-*

*mode* kolone sa dualnim (RP/razmena anjona, RP/razmena katjona, HILIC/razmena katjona) i trimodalnim sistemima (razmena katjona/razmena anjona/RP, razmena katjona/razmena anjona/HILIC) razdvajanja. Prema svojim hemijskim karakteristikama kolone sa dualnim mehanizmima razdvajanja se mogu podeliti na 4 kategorije:

- i) Tip I predstavljaju kolone sa celinama koje sadrže hemijski različite strukture, odvojeno upakovane u strukturu punjenja jedne kolone.
- ii) Tip II predstavljaju kolone sa ligandima različitih hemijskih struktura, koje se nalaze na površini punjenja kolone.
- iii) Tip III predstavljaju kolone sa hidrofobnim lancem u koji je ugrađen ligand sa jonoizmenjivačkim osobinama.
- iv) Tip IV predstavljaju kolone sa hidrofobnim lancem i ligandom sa jonoizmenjivačkim osobinama koji je vezan na kraju hidrofobnog lanca.

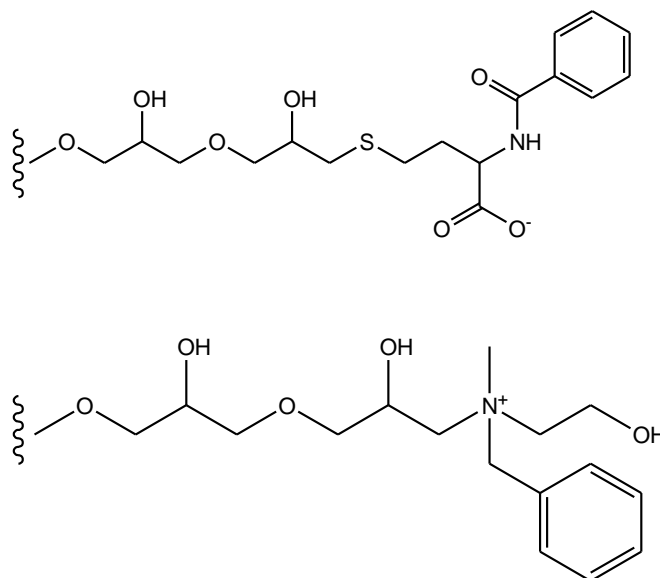
Kolone Tipa IV imaju bolju reproduktivnost jer je ligand sa jonoizmenjivačkim osobinama hemijski kuplovan, a ne sintetisan *in situ* u toku proizvodnje (Slika 23).



Slika 23. Tipovi RP/jonoizmenjivačkih *mixed-mode* kolona [130].

Stacionarne faze sa trimodalnim mehanizmima razdvajanja koje kombinuju jonske, hidrofobne interakcije, vodonične veze i dr. koriste se za hromatografsku analzu biomolekula (Slika 24). *Mixed-mode* smole mogu direktno da vezuju protein sa visokim koncentracijama soli u mobilnoj fazi, koje su često neophodne kako bi stimulisale hidrofobne interakcije između proteina i hidrofobne površine kolone. Takođe, prilikom kombinovanja mehanizma razmene katjona, hidrofobnih interakcija, vodoničnih veza i tiofilnih interakcija (Slika 24) dobija se novi tip selektivnosti koji je otporan na visoke koncentracije soli u sistemu.

Pored toga, statičke i dinamičke energije vezivanja, adsorpciona kinetika, adsorpciona selektivnost, dizajn liganda utiču na retenciju odabranog biomolekula.



Slika 24. MMC stacionarne faze za razdvajanje biomolekula [130].

*Mixed-mode* hromatografija je efikasna u analizi farmaceutske čistoće aktivnih farmaceutskih supstanci jer obezbeđuje jedinstvenu selektivnost zahvaljujući mnogobrojnim hemijskim interakcijama. Uticaj faktora na retenciono ponašanje jedinjenja je složeniji na *mixed-mode* koloni u odnosu na kolonu sa jednim tipom hemijske modifikacije. Na taj način, usložen je proces razvoja odgovarajuće hromatografske metode, pa je i razumevanje retencionih karakteristika (retencionih mehanizma, fizičko-hemijske osnove) na *mixed-mode* stacionarnoj fazi ključno za postizanje odgovarajućih uslova u procesu optimizacije i validacije željenog hromatografskog razdvajanja [130].

#### 1.4. Modelovanje retencionog ponašanja u tečnoj hromatografiji

Modelovanje retencionog ponašanja u hromatografskim sistemima najčešće se zasniva na primeni nekoliko različitih metodoloških pristupa koji mogu da uključuju analizu specifičnih retencionih mehanizama, primenu kvantitativnih odnosa strukture i retencije, kao i korišćenje metode eksperimentalnog dizajna.

##### 1.4.1. Modelovanje retencionog ponašanja zasnovano na retencionim mehanizmima

Promena retentionog faktora ( $\log k$ ) u odnosu na zapreminski udeo modifikatora mobilne faze je najčešći model u tečnoj hromatografiji kojim se opisuje retentiono ponašanje,  $\log k = f(\varphi)$ . Koeficijenti funkcije  $f(\varphi)$  predstavljaju eksperimentalne deskriptore i na određeni način reflektuju fizičko-hemijsku osnovu hromatografskog procesa [131-133].

Najjednostavniji opis hromatografskog ponašanja postiže se na stacionarnim fazama čiji aktivni centri omogućuju jasno izdvajanje dominantnog retencionog mehanizma kao što je npr. silika gel stacionarna faza. Tom prilikom, funkcija  $f(\varphi)$  je veoma bliska linearnoj [134-141]. Reticioni proces se tada može opisati jednostavnom linearnom jednačinom  $\log k = f(\varphi)$  ili njenim logaritmom  $\log k = f(\log \varphi)$ . Kada particioni ili adsorpcioni mehanizmi utiču na

retenciju, osnovna veza između retencionog ponašanja i elucione snage rastvarača opisuje se korišćenjem:

- i) Teorije linearnog modelovanja u odnosu na elucionu snagu rastvarača (*Linear Solvent Strength*, LSS). LSS model opisuje proces *raspodele* (particije) na osnovu pretpostavke da postoji linearna zavisnost između retencionog faktora i sastava mobilne faze. Ovaj model definiše glavni mehanizam razdvajanja u RP sistemima, na osnovu raspodele analita između polarne stacionarne i nepolarne mobilne faze [133-136]. Takođe u RP uslovima za opisivanje particionog procesa, može se primeniti i kvadratna zavisnost koju su predložili *Schoenmakers* i saradnici [142].
- ii) Jednačine *Snyder-Soczewinski*, koja definiše linearnu zavisnost između logaritma retencionog faktora i logaritma zapreminskog udela modifikatora mobilne faze. Opisana zavisnost odgovara adsorpcionom procesu, koji je zasnovan na pretpostavci da je celokupna površina stacionarne faze prekrivena monoslojem molekula analita i molekula mobilne faze. Tom prilikom, određena zapremina analita se zadržava na površini stacionarne faze kada se sa nje ukloni ista zapremina molekula mobilne faze [137-138].

LSS model se najčešće koristi kao osnova retencionog modelovanja u RP sistemu [134-136]. Za opisivanje nevodene NP sistema u kojima je retencija zasnovana na lokalizovanoj površinskoj adsorpciji, najčešće se primenjuje *Snyder-Soczewinski* jednačina [143]. Važan nedostatak upotrebe linearnih modela je primena koja je ograničena na uzak interval promene  $\phi$  vrednosti.

U slučajevima kada je proširen interval  $\phi$  vrednosti, može se uočiti nelinearno retenciono ponašanje. Dualnu prirodu retencionog ponašanja u RP sistemu na hidrofobnim stacionarnim fazama, karakterišu hidrofobne i specifične interakcije između eluenta i dostupnih silanolnih grupa stacionarne faze [144]. U tom slučaju, retencija se definiše primenom složenijih matematičkih funkcija npr. kvadratnom vezom retencije i zapreminskog udela modifikatora mobilne faze (*Schoenmakers* i saradnici) [142].

Kada je reč o sistemima hidrofilnih interakcija, posebno se ističe uloga adsorbovane vode u cilju razumevanja HILIC retencije [139-141, 145]. Zbog toga, svaka polarna stacionarna faza koja zadržava molekule vodene faze, može se primeniti u HILIC sistemu. Nelinearna retencija u HILIC-i se definiše korišćenjem višeparametarskih funkcija, koje su zasnovane na kombinaciji linearnih aproksimacija. Uspešno se primenjuju particione i adsorpcione jednačine, kao i kombinovane particiono-adsorpcione funkcije (*multi-modal*) [146-148]. Značaj kompleksnih matematičkih funkcija u opisivanju izokratskog HILIC ponašanja (kvadratna funkcija, *multi-modal* funkcija, empirijska *Neue-Kuss* funkcija) su citirane u referenci [131], dok u uslovima HILIC gradijenta, postoji bolja primenljivost LSS i *multi-modal* funkcije u odnosu na primenu kompleksnije *Neue-Kuss* ili primenu kvadratne funkcije [131, 139].

U SFC sistemima, mobilna faza se obično sastoji od CO<sub>2</sub> i određenog udela metanola. U slučaju korišćenja polarnih stacionarnih faza (silika gel, diol, amino, cijano itd.) može se očekivati retenciono ponašanje slično NP mehanizmu, dok se u slučaju korišćenja nepolarnih stacionarnih faza (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, fenil itd.) očekuje sličnost sa RP mehanizmom. Korišćenje metanola u SFC mobilnoj fazi dovodi do pojave dodatnih interakcija kao što su vodonične veze, dipol-dipol interakcije, kao i interakcije uslovljene adsorpcijom rastvarača [149-151]. Posledično i u modelovanju retencije u SFC-u, uspešno se koriste višeparametarske funkcije [152].

Pored promene širine intervala  $\phi$  vrednosti, nelinearnost u retencionom ponašanju je uslovljena i karakteristikama stacionarne faze. Na stacionarnim fazama na čijoj površini je

prisutno više od jednog hemijski aktivnog centra, vidljivo je nelinearno retenciono ponašanje. Na hemijski modifikovanim silika gel stacionarnim fazama (oktadecil silika) u RP sistemima, *Kaczarski* i saradnici su predložili višeparametarski model za opisivanje dualnog retencionog procesa, koji je pokazao bolje performanse u poređenju sa standardnim modelom *Shoenmakers*-a [153]. Na stacionarnim fazama sa kombinovanim HILIC i RP mehanizmima razdvajanja, relativni značaj pojedinačnog mehanizma određen je i sastavom mobilne faze. Promena iz HILIC-a u RP mehanizam u odnosu na zapreminski udeo modifikatora mobilne faze grafički predstavlja zakrivljenu krivu „U“ oblika. Smatra se da HILIC dominira u nižim zapreminskim udelima modifikatora u mobilnoj fazi, dok sa porastom udela modifikatora u mobilnoj fazi retenciju primarno kontrolišu RP interakcije. Minimum U-krive je *prevojna tačka*, odnosno tačka u kojoj dolazi do smene iz HILIC-a u RP retencioni mehanizam [154-158].

#### 1.4.1.1. Hromatografski parametri u proceni kvaliteta razdvajanja

Matematički opis prisutnih retencionih mehanizama je jedna od osnovnih faza u definisanju optimalnih uslova razdvajanja. Razvoj i optimizacija hromatografskog razdvajanja sve više se oslanja na metode matematičkog modelovanja sa ciljem uštede troškova i postizanja boljeg kvaliteta rezultata. Kriterijumi na osnovu kojih se određuje kvalitet hromatografskog procesa su različiti. Većina njih definiše uslove u kojima se postiže maksimalna razdvojenosti ciljanih analita, tako da su hromatografski parametri poput retencionog vremena, visine pika, površine pika i asimetrije pika najčešće korišćeni u optimizacijom proračunima. Kriterijumi koji opisuju razdvojenost dva ciljna pika mogu se osloniti na primenu i tumačenje vrednosti: separacionog faktora ( $S$ ), faktora selektivnosti ( $\alpha$ ) i vrednosti parametra rezolucije ( $R_s$ ).

Separacioni faktor  $S$  i faktor selektivnosti  $\alpha$  su veličine koje ne zavise od efikasnosti kolone i za njihovo izračunavanje potrebne su samo vrednosti retencionih vremena, dok  $R_s$  vrednosti uzimaju u obzir efikasnost hromatografskog razdvajanja (broj teorijskih platoa). Kako broj teorijskih platoa može da varira (u slučaju optimizacije pH vrednosti) ili u slučajevima kada je potrebno uporediti primenljivost različitih stacionarnih faza, daje se prednost korišćenju  $R_s$  parametra. *Shoenmakers* i saradnici su uveli parametar  $R_i$  koji opisuje vrednost efektivne rezolucije. U neidealnim situacijama, kada hromatogram sadrži asimetrične pikove ili pikove čije se površine međusobno razlikuju, primenjuje se funkcija  $R_i$  koja uzima u obzir pojedinačnu širinu oba pika, faktor asimetrije i visinu pika [159-162].

U odnosu na vrstu stacionarne faze, tip mobilne faze i hemijske karakteristike analita, primenom navedenih faktora i matematičkom procenom retencionih mehanizama postiže se klasifikacija uslova razdvajanja i omogućava njihova dalja aproksimacija na srodne hromatografske sisteme.

#### 1.4.2. Modelovanje retencionog ponašanja zasnovano na kvantitativnoj vezi strukture i retencije

QSRR (*Quantitative Structure Retention Relationship*) su empirijski izvedene zavisnosti za hromatografski sistem koji se može koristiti u cilju predviđanja retencionog ponašanja novih jedinjenja, razumevanja molekulskih mehanizama koji utiču na retenciju, ili procene karakteristika stacionarne faze. Najstariji tip QSRR analize dovodi u korelaciju retencione parametre sa  $\log P$  vrednostima [163]. Drugi tip se zasniva na solvatomornoj

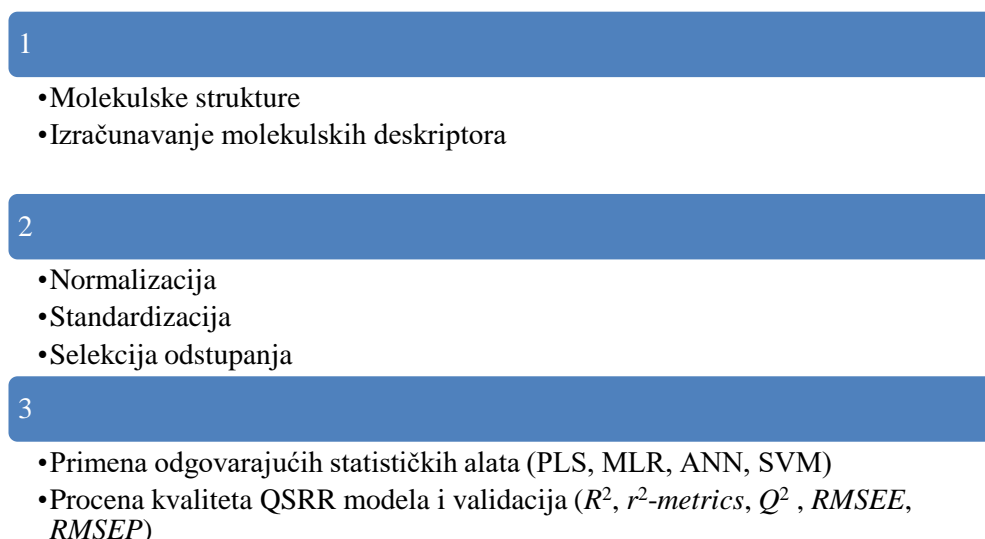
metodi poređenja i tzv. *Linear Solvation Energy Relationships* (LSERs) [164] i treći tip QSRR-a uspostavlja korelaciju između retencionih parametara serije ispitivanih jedinjenja i njihovih molekulskih parametara odnosno izračunatih fizičko-hemijskih i strukturnih osobina (molekulskih deskriptora) [165].

#### 1.4.2.1. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori opisuju specifičnu informaciju o molekulu. Predstavljaju numeričke vrednosti koje su povezane sa hemijskom strukturom, fizičko-hemijskim osobinama ili biološkom aktivnošću molekula. Na osnovu toga, odgovarajući odgovor (aktivnost, toksični potencijal, retencija) se posmatra kao funkcija kvantitativnih vrednosti koje opisuju fizičko-hemijske osobine molekula:

$$\text{Odgovor} = f(\text{fizičko-hemijske osobine molekula}) = f(\text{molekulski deskriptori}).$$

Tip deskriptora koji se koreliše sa retencijom, od kritične je važnosti za kvalitet QSRR modela. Deskriptori mogu biti fizičko-hemijski (hidrofobnost, sterni efekti, elektronske osobine), strukturni (zasnovani na karakteristikama određenih podfragemenata), topološki, elektronski (zasnovani na karakteristikama molekulskih orbitala), geometrijski (zanovani na molekulskoj površini), ili jednostavni indikatori (fiktivni parametri). Postupak konstruisanja odgovarajućeg QSRR modela na osnovu izračunatih deskriptora prikazana je na Slici 25.



Slika 25. Postupak razvoja QSRR modela [165].

U obliku matematičkih odnosa na osnovu hemijskih informacija o molekulu, obezbeđuje se odgovarajuća kvantitativna analiza. Hemijske informacije su predstavljene deskriptorima koji definišu ponašanje molekula. Deskriptori su numeričke vrednosti dobijene primenom odgovarajućih algoritama i koriste se kao nezavisno promenljive u razvoju prediktivnog

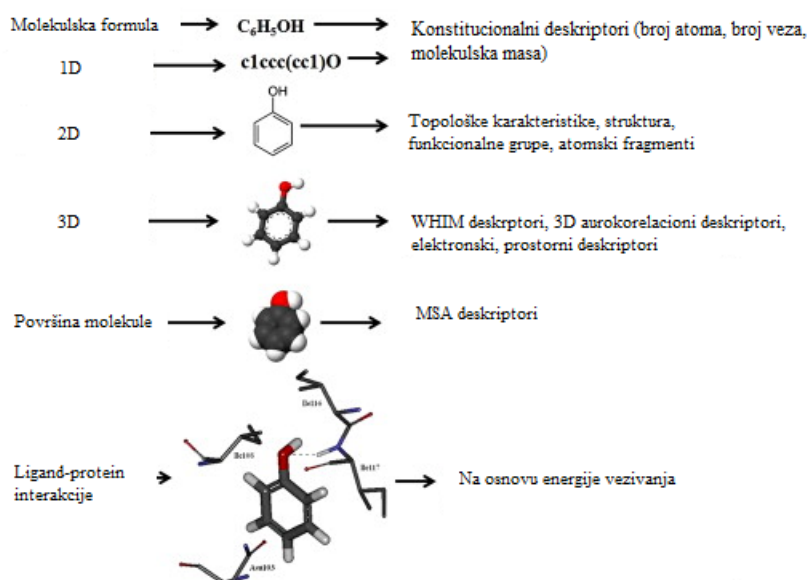


modela. Bilo koja odgovarajuća strukturna informacija koja kvantitativno opisuje fizičko-hemijske osobine, biološku aktivnost, toksičnost može se definisati kao molekularni deskriptor. Prema tome, molekularni deskriptori mogu biti jednostavni atomski brojevi od molekularne mase do kompleksne prostorne ili geometrijske karakteristike.

Poželjne osobine jednog deskriptora su:

- korelacija sa strukturnim karakteristikama molekula i vrlo mala korelacija sa drugim deskriptorima
- primenljivost za široku klasu jedinjenja
- pružanje pouzdane informacije zasnovane na eksperimentalnim podacima
- kontinuiranost tj. male strukturne promene molekula dovode do promene u vrednostima deskriptora
- interpretabilnost na osnovu koje bi se objasnio posmatrani hromatografski/biološki sistem.

Dimenzionalnost deskriptora zavisi od tipa primenjenog algoritma i definiše prirodu QSRR modela. U zavisnosti od načina prikazivanja, deskriptori se mogu podeliti na nulte (0D), jednodimenzionalne (1D), dvodimenzionalne (2D), trodimenzionalne (3D), četvorodimenzionalne (4D) (Slika 26).



Slika 26. Podela deskriptora na osnovu njihove molekulske mase [163] .

- Nulti (0D) deskriptori su najjednostavniji i dobijaju se iz molekulske formule nezavisno od hemijske strukture npr. broj određenih atoma, molekulska masa, van der Waals-ov radijus.
- Jednodimenzionalni deskriptori (1D) opisuju molekul u vidu liste strukturnih molekularnih fragmenata npr. broj funkcionalnih grupa (amino grupe, fenolne grupe).
- Dvodimenzionalni deskriptori (2D) su topološki deskriptori i daju informacije o povezanosti atoma u molekuli uzimajući u obzir i tip veze i interakciju između atoma npr. Randićev indeks, Balaban indeks, Wiener indeks.

- Trodimenzionalni deskriptori (3D) se zasnivaju na geometrijskoj strukturi i celokupnoj konformaciji molekule npr. (3D MoRSE deskriptori, GETAWAY deskriptori, van der Waals-ova zapremina).
- Četvorodimenzionalni deskriptori (4D) se dobijaju iz stereoelektronskog prikazivanja molekule.

Pored navedenog, deskriptori mogu da opisuju: lipofilnost ( $\log P$ ,  $\log D$ ), sposobnost građenja vodoničnih veza, elektronske osobine molekula (naelektrisanje, polarizabilnost, dipolni moment, različite vrste energija), sterne karakteristike, topološke karakteristike (atomske veze u molekulu, veličina simetrije, račvanje, oblik molekula), termodinamičke osobine.

U farmaceutskim istraživanjima posebno su značajni deskriptori koji opisuju lipofilne karakteristike,  $\log P$  vrednost i koeficijent distribucije ( $\log D$ ), s obzirom da lipofilnost utiče na penetraciju jedinjenja kroz biološke membrane, apsorpciju, stepen vezivanja za proteine plazme i proces distribucije. Prema metodologiji, izračunavanje  $\log P$  vrednosti može biti zasnovano na:

- uticaju svakog atoma na  $\log P$  vrednost tako da je ukupni doprinos aditivan ( $A\log P$ ,  $X\log P$ ,  $S\log P$ )
- doprinosu podfragemnata ili funkcionalnih grupa na  $\log P$  vrednost ( $C\log P$ ,  $K\log P$ ,  $ACD/\log P$ ) (fragmentacioni model)
- fizičko-hemijskim karakteristikama ispitivane molekule ( $M\log P$ ,  $V\log P$ ,  $Mc\log P$ ,  $T\log P$ ).

U zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika ispitivanog seta jedinjenja i vrste eksperimentalnih podataka, zavisi i odabir odgovarajuće metodologije i stepen slaganja sa dobijenim ekperimentalnim podacima.

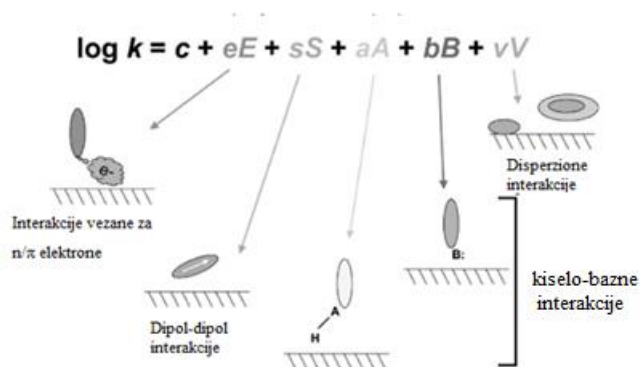
Na osnovu raznolike klasifikacije deskriptora, može se uočiti da se jedan molekul matematički može definisati na mnogo načina. Moguće je izračunati hiljade deskriptora za dato jedinjenje. Mnogi deskriptori su blisko povezani i mogu da opisuju iste hemijske karakteristike. Izbor odgovarajućih deskriptora zahteva iskustvo i poznavanje prirode hemijske strukture npr. skup deskriptora koji opisuje male molekule ne odgovara proteinskim strukturama i polimerima. Pored prostog izračunavanja, izbor prikladnih deskriptora zahteva mnogo znanja i iskustava u razvoju pouzdanog QSRR modela [163-165].

#### 1.4.2.2. Modelovanje retencionog ponašanja na osnovu linearne korelacije solvacionih energija

Najšire korišćen metod interpretacije kvantitativne veze strukture i retencije je LSER model zasnovan na deskriptorima *Abraham-a*:

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

U jednačini (1),  $SP$  je zavisno promenljiva, u hromatografskim ispitivnjima mera raspodele supstance ( $\log k$ ), dok  $E$ ,  $S$ ,  $A$ ,  $B$ , i  $V$  predstavljaju strukturno-zavisne molekulske deskriptore. Svaki deskriptor u jednačini opisuje specifičnu intermolekulsku interakciju. Grafički prikaz interakcije analita sa hromatografskim sistemom je prikazan na Slici 27.



Slika 27. Fizičko-hemijske interakcije LSER modela [164].

Parametar  $E$  predstavlja *polarizabilnost* u višku (izračunat na osnovu indeksa refraktivnosti molekula);  $S$  su *dipolne* karakteristike;  $A$  opisuje *proton donorske* osobine;  $B$  *proton akceptorske* osobine i  $V$  je *McGowan zapremina*. Poželjno je da testirane hemijske supstance sadrže različite funkcionalne grupe (*proton-donorske*, *proton-akceptorske*), kako bi se i vrednosti izračunatih deskriptora razlikovale. Na taj način se omogućava kvantitativna procena fizičko-hemijskih interakcija koje utiču na retenciono ponašanje jedinjenja.

Malim slovima u jednačini su opisani koeficijenti modela ili sistemske konstante. Koeficijent  $c$  je odsečak u modelu. Konstante ( $e$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $v$ ) se dobijaju analizom retencionih podataka za skup analita poznatih vrednosti deskriptora i kvantifikuju uticaj fizičko-hemijskih interakcija na retenciju (sistemska konstanta =  $Interakcija_{\text{stacionarna faza}} - Interakcija_{\text{mobilna faza}}$ ) npr. pozitivan znak koeficijenata ukazuje na jaču interakciju sa stacionarnom u odnosu na mobilnu fazu, kao i na efekat interakcije koji je srazmeran porastu retencije [166-168]. LSER studije se sprovode kako bi se ispitale intermolekulske interakcije koje utiču na retenciju, i na taj način uporedili različiti hromatografski sistemi:

- Pozitivna vrednost koeficijenta  $v$  ukazuje da sa porastom veličine molekula raste i njegova retencija, što je u saglasnosti sa transferom molekula iz više kohezivne mobilne faze u manje kohezivnu stacionarnu fazu.
- Negativna vrednost koeficijenta  $b$  ukazuje da je stacionarna faza mnogo slabiji *donor vodonika* u odnosu na mobilnu fazu.
- Interakcija  $s$  predstavlja *dipolne* osobine. Veličina  $s$  interakcije se zasniva na kapacitetu analita da postane stabilan ili da se stabilizuje obližnje naelektrisanje ili dipol zbog nespecifične dielektrične interakcije.
- Interakcija  $a$  ukazuje na relativnu snagu *proton akceptorskih* karakteristika stacionarne faze. Vezani alkil lanci na stacionarnoj fazi nemaju potencijal građenja vodoničnih veza. S toga vrednost parametra  $a$  zavisi od adsorbovane komponente mobilne faze, ali i od rezidualnih silanolnih grupa na stacionarnoj fazi.

Variranjem jednog sistemskog parametra, stacionarne faze ili udela modifikatora u mobilnoj fazi, na osnovu rezultata LSER analize, moguća je interpretacija fizičko-hemijske osnove retencionog mehanizma i poređenje različitih hromatografskih sistema [166, 169-171].

### 1.4.2.3. Modelovanje retencionog ponašanja zasnovano na primeni metode potpornih (podržavajućih) vektora

Algoritam metode podržavajućih vektora (*Support Vector Machine*, SVM) je tehnika mašinskog učenja koja predstavlja podatke kao tačke u prostoru i potom gradi model gde raspodeljuje podatke u jednu od dve definisane kategorije. Svaki podatak (tačka) predstavlja  $n$ -dimenzionalni vektor. Raspodela podataka se vrši konstruisanjem  $n - 1$  dimenzionalne hiperravni koja deli podatke na dve klase sa maksimalnim rastojanjem između hiperravni i podataka. SVM algoritam teži da pronađe najbolju hiperravan za razdvajanje podataka. U SVM analizi, podaci su predstavljeni u sledećem obliku:

$$(\vec{x}_1, y_1), \dots, (\vec{x}_n, y_n) \quad (2)$$

$y_i$  ima vrednost  $+1$  ili  $-1$  i ukazuje kojoj klasi  $x_i$  pripada ( $i = 1 - n$ ). Hiperravan koja najbolje odvaja grupu  $x_i$  vektora gde je  $y_i = 1$  od grupe  $x_i$  vektora gde je  $y_i = -1$  je:

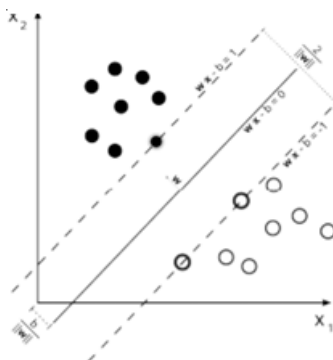
$$\vec{w} \cdot \vec{x} - b = 0 \quad (3)$$

$\vec{w}$  je vektor koji se nalazi u normalnom položaju u odnosu na hiperravan, a  $b$  je odstupanje hiperravni od početka koordinate. Ako su podaci linearno odvojivi margine hiperravni se mogu definisati sledećim jednačinama:

$$\vec{w} \cdot \vec{x} - b = 1 \quad (4)$$

$$\vec{w} \cdot \vec{x} - b = -1 \quad (5)$$

Slika 28 prikazuje marginu koja razdvaja linearno odvojive podatke. Podaci (tačke) koje se nalaze na margini se nazivaju vektori podrške (*support vectors*).



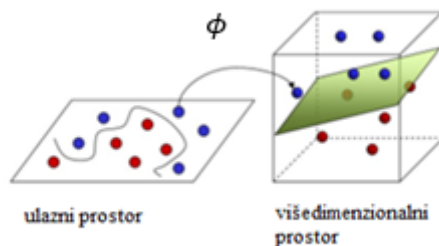
Slika 28. Maksimalna margina hiperravni [172].

Za podatke koji nisu linearno odvojivi uvodi se funkcija gubitka,  $C$ , u cilju grupisanja podataka  $x_i$  sa odgovarajuće strane hiperravni. SVM koristi i funkciju sličnosti između parova vektora koja se naziva *kernel* (jezgro) i koja omogućava maksimizaciju margina hiperravni. Na taj način, podaci se raspoređuju (transformišu) u višedimenzionalni prostor (Slika 29).

Opšti oblik *kernel* funkcije se može prikazati:

$$K(\vec{x}_i, \vec{x}_j) = \phi(\vec{x}_i) \times \phi(\vec{x}_j) \quad (6)$$

$K$  predstavlja *kernel* funkciju, a  $\phi$  transformaciju ulaznog prostora  $\vec{x}_i$  u prostor  $\vec{x}_j$



Slika 29. *Kernel*-ova transformacija prostora [172].

Primeri uobičajnih *kernel* funkcija su:

-Polinomska funkcija:

$$K(\vec{x}_i, \vec{x}_j) = (c + \vec{x}_i \cdot \vec{x}_j)^d \quad (7)$$

-RBF (*Radial Basis Function*, osnovna radijalna funkcija):

$$K(\vec{x}_i, \vec{x}_j) = \exp\left(-\gamma \|\vec{x}_i - \vec{x}_j\|^2\right) \quad (8)$$

gde  $\gamma$  predstavlja debljinu *Gaussian kernel*-a; parameter  $d$  je stepen polinoma;  $\vec{x}_i \cdot \vec{x}_j$  je skalarni proizvod vektora  $\vec{x}_i$  i  $\vec{x}_j$ ;  $c$  je koeficijent polinoma ( $c \geq 0$ ).

U toku optimizacije *kernel* funkcije razmatra se vrednost parametra  $\gamma$  i bira najbolja  $C/\gamma$  kombinacija [172-173].

Prednost SVM tehnike je u tome što ne zahteva veliki broj uzoraka. U QSRR analizi, primena SVM metode na retencione podatke omogućuje uspešno opisivanje i predviđanje retencionog ponašanja jedinjenja.

#### 1.4.2.4. Analiza glavnih komponenti

Analiza glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA) predstavlja jednu od najjednostavnijih multivariacionih tehnika. Koristi se u cilju smanjenja dimenzija skupa koji se sastoji od velikog broja povezanih promenljivih koje se odnose na istu dimenziju i ne pružaju nikakvu dodatnu informaciju koja nije obuhvaćena nekom drugom promenljivom. Geometrijski gledano, u koliko u prostoru od  $k$  dimenzija imamo  $p$  promenljivih, pri čemu je  $k < p$ , očekuje se da će  $k$  najvećih promenljivih biti dovoljno da objasni varijabilitet podataka u skupu. Cilj analize glavnih komponenti je na osnovu  $p$  promenljivih ( $X_1, X_2, \dots, X_p$ ), pronaći kombinaciju istih da bi se izračunale nove promenljive ( $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$ ), koje predstavljaju glavne komponente. Potrebno je da promenljive ( $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$ ) međusobno nisu u korelaciji i da opisuju varijacije podataka. Nepostojanje korelacije znači da promenljive mere

međusobno različite dimenzije „podataka“. Ako originalne promenljive nisu u korelaciji, analizom glavnih komponenti se njihov broj ne može smanjiti na mali broj izvedenih promenljivih  $Z$ . Najbolji rezultat se postiže kada su originalne promenljive u visokoj korelaciji, pozitivnoj ili negativnoj.

Prema tome, analiza glavnih komponenti koristi ortogonalnu transformaciju u cilju pretvaranja skupa  $p$  promenljivih  $(X_1, X_2, \dots, X_p)$  u skup vrednosti linearno nekorelisanih promenljivih  $(Z_1, Z_2, \dots, Z_p)$  koje se nazivaju glavnim komponentama (Slika 30). Prva glavna komponenta  $Z_1$  se dobija linearnom kombinacijom originalnih promenljivih  $(X_1, X_2, \dots, X_p)$ :

$$Z_1 = a_{11} X_1 + a_{12} X_2 + \dots + a_{1p} X_p \quad (9)$$

koje variraju što je moguće više pod uslovom da je:

$$a_{11}^2 + a_{12}^2 + \dots + a_{1p}^2 = 1 \quad (10)$$

i varijansa izvedene promenljive  $Z_1$  maksimalna. Na taj način, prvom glavnom komponentom se opisuje najveća varijacija podataka.

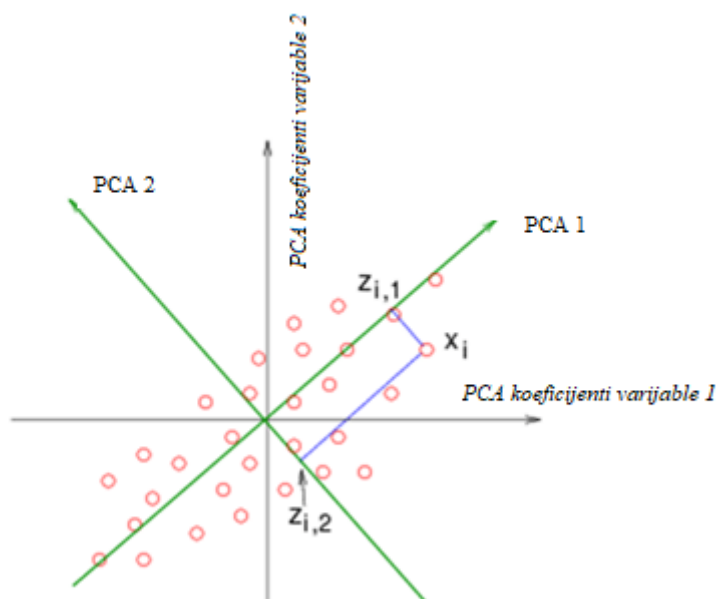
Druga glavna komponenta se dobija na sličan način:

$$Z_2 = a_{21} X_1 + a_{22} X_2 + \dots + a_{2p} X_p \quad (9a)$$

$$a_{21}^2 + a_{22}^2 + \dots + a_{2p}^2 = 1 \quad (10a)$$

pri čemu važi i dodatan uslov, da je korelacija između  $Z_1$  i  $Z_2$  jednaka nuli, odnosno druga glavna komponenta pripada pravcu koji je ortogonalan na prethodni. Ako postoji  $p$  promenljivih u sistemu onda će postojati i  $p$  komponenti.

Konstante  $a_{ip}$ ,  $i = (1 - p)$ , se nazivaju PCA koeficijenti i predstavljaju meru uticaja svake promenljive na varijansu u glavnoj komponenti. PCA koeficijenti se koriste za interpretaciju značaja rezultata (velika ili mala korelacija) i načina (pozitivna ili negativna korelacija) na koji merene promenljive doprinose rezultatima. Grafički prikaz projekcije PCA koeficijenata na dve glavne komponente se naziva grafikom PCA koeficijenata (*eng. loading plot*) (Slika 30).



Slika 30. Grafikon PCA koeficijenata (*loading plot*) [174].

Promenljive koje na sličan način doprinose informaciji su grupisane zajedno i korelisane pozitivno, dok se negativno korelisane promenljive nalaze suprotno u odnosu na centar grafikona.

Analiza glavnih komponenti se često primenjuje i prilikom korišćenja drugih metoda:

- regresione analize
- klasterovanja
- faktorske analize [174-175].

#### 1.4.2.5. Selekcija promenljivih primenom višestruke linearne regresione analize

Višestruka linearna regresiona analiza (*Multiple Linear Regression Analysis*, MLR) je metoda koji se koristi za uspostavljanje linearne veze između zavisno promenljive i jedne, ili više nezavisno promenljivih. Daje mogućnost procene uticaja nezavisno promenljivih na vrednost posmatranog odgovora.

Selekcija je postupak koji omogućava konstrukciju optimalne jednačine zajedno sa procenom uticaja nezavisno promenljivih. Cilj selekcije je smanjenje skupa nezavisno promenljivih na one koje su neophodne, na osnovu nivoa značajnosti svake pojedinačne promenljive. Selekcija pomaže u preciznoj proceni efekta svake promenljive kada se statistički manje značajne eliminišu. Okolnosti istraživanja, zajedno sa prirodom istraživačkih pitanja određuju način i vrstu selekcije.

Kako bi se odabrala najprikladnija regresiona jednačina može se koristiti:

- metoda „unapred” selekcije (eng. *forward*)
- metoda „unazad” selekcije (eng. *backward*)
- metoda „postepene” selekcije (eng. *stepwise*)

- metoda „selekcije u blokovima” (eng. *block-wise* ).

*Forward* selekcija počinje praznom jednačinom u koju se postepeno dodaje jedna po jedna promenljiva najveće značajnosti i najveće korelacijom sa zavisno promenljivom. Jednom selektovana promenljiva, zadržava se u jednačini.

*Backward* selekcija je obrnuti proces. Sve nezavisno promenljive se unose u jednačinu i potom postepeno udaljuju na osnovu statističke značajnosti.

*Stepwise* selekcija se smatra varijacijom predhodne dve metode. Na osnovu doprinosa nezavisno promenljive koja je ranije uneta u jednačinu, promenljive se mogu izbrisati ili uneti. Na taj način je moguće razumeti doprinos predhodnih promenljivih kada je nova promenljiva uneta u jednačinu.

*Block-wise* selekcija se postiže blokovima ili skupovima. Promenljive se grupišu u blokove, nakon čega se primenjuje stepenasta selekcija. Svaki blok se testira odvojeno, dok se ostale promenljive zanemaruju. Ukoliko ne doprinose predviđanju, promenljive se mogu ukoloniti. Redosled unosa promenljivih utiče na njihovu selekciju. Promenljive testirane u prvim fazama imaju veće šanse da se zadrže u ispitivanju.

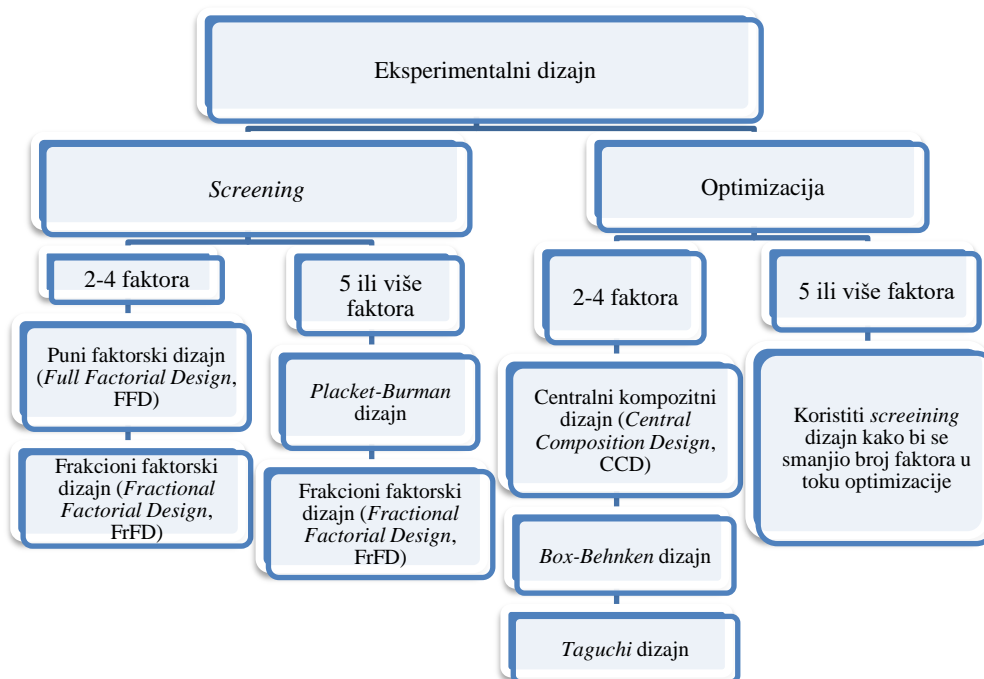
Proces selekcije višestrukom linearnom regresionom analizom omogućava dobijanje redukovanog skupa promenljivih iz većeg broja deskriptora, eliminišući nepotrebne promenljive, pojednostavljujući podatke i poboljšavajući preciznost predviđanja. Na taj način, omogućava se uspešna kvantitativna analiza podataka [176].

#### 1.4.3. Modelovanje retencionog ponašanja primenom metodologije eksperimentalnog dizajna

Proces pronalaženja optimalnih hromatografskih uslova zasnovanih na pouzdanim teorijskim predviđanjima je važan korak u racionalnom razvoju metode. Mogućnost predviđanja retencije sa dovoljnom tačnošću, u odsustvu velikog broja predhodnih eksperimenata, značajan je segment teorijskih i eksperimentalnih ispitivanja. S tim u vezi, posebno se ističu mogućnosti *Quality-by-Design* (QbD) koncepta u postavljanju odgovarajućeg plana eksperimenata (*Design of Experiments*, DoE). Različite statističke strategije se mogu koristiti u pronalaženju najpreciznijih zavisnosti između eksperimentalno dobijenih retencionih parametara i parametara hromatografskog sistema. DoE metodologija se često primenjuje u RP sistemu [177-178], ali je njena upotreba zabeležena i u hromatografiji hidrofilnih interakcija [179], kao i u superkritičnoj fluidnoj hromatografiji [180-183].

Jedna od ključnih komponenata DoE primene je ugradnja svih eksperimenata u odgovarajuću strukturu dizajna, kako bi se dobilo što više informacija. Odgovarajućim dizajnom eksperimenata, primenjuje se minimalan broj eksperimenata koji je neophodan da bi se razumelo retenciono ponašanje jedinjenja u funkciji parametara hromatografskog sistema. U DoE pristupu, zavisne veličine (npr. retencioni faktor) se najčešće posmatraju u lineranoj ili kvadratnoj funkciji u odnosu na izabrane parametre hromatografskog sistema. U zavisnosti od cilja eksperimenta, eksperimentalni plan se može prilagoditi preliminarnim ispitivanjima uticaja faktora (*Screening Designs*) ili ispitivanjima u cilju optimizacije hromatografskih uslova (*Response Surface Designs*) [184-185]. Tipovi eksperimentalnog dizajna su prikazani na Slici 31.





Slika 31. Tipovi eksperimentalnog dizajna.

Puni faktorski dizajn (*Full Factorial Design*, FFD), frakcioni faktorski dizajn (*Fractional Factorial Design*, FrFD) i *Plackett-Burman*-ov dizajn se najčešće koriste u *screening* eksperimentima, koji omogućavaju brzo ispitivanje uticaja velikog broja faktora i odabir onih najznačajnijih. Raspored eksperimenata u okviru *response surface* dizajna (optimizacioni dizajn) može biti simetričnog i asimetričnog oblika, dok trofaktorski centralni složeni (kompozitni) dizajn (*Central Composite Design*, CCD), *Box-Benken*, *Taguchi* dizajn i *Doehlert* dizajn imaju simetričan domen sa centralnim tačkama koje omogućavaju procenu eksperimentalne greške. D-optimalni dizajn i hibridini dizajn imaju asimetričan raspored eksperimenata [184].

Kako bi se procenili uticaji ispitivanih faktora na retenciono ponašanje i definisali njihovi optimalni nivoi, zavisno od cilja istraživanja, eksperimentalni plan se prilagođava tipu najpouzdanijeg eksperimentalnog dizajna (Slika 31).

Bez obzira na napredak u polju fundamentalnog razumevanja retencije i dalje ne postoji opšti obrazac koji bi pomogao razvoju odgovarajuće metode. Pored standardnih RP i HILIC sistema, SFC tehnika se sve više koristi i postaje komplementarna primenama tečne i gasne hromatografije. Kako je robusnost SFC instrumenata poboljšana, rutinska primena SFC tehnike je uvedena i u regulatorne farmaceutske propise (npr. dobra proizvođačka praksa; *Good Manufacturing Practice-GMP*) [186]. U cilju uspostavljanja odgovarajućeg hemometrijskog modela, mogu se ispitivati uticaji različitih faktora na SFC retenciju npr. pritisak, temperatura i nagib gradijenta. Metodologija eksperimentalnog dizajna se može primeniti u cilju izdvajanja faktora sa najznačajnijim uticajem na reticioni proces i bližeg određivanja/kvantifikacije njihovog efekta. Konstruisani modeli bi trebali da omoguće individualno predviđanje retencionog ponašanja u okviru testiranih hromatografskih uslova.

## 2. CILJ RADA

U literaturi nema podataka o retencionom ponašanju liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u HPLC (*mixed-mode* HILIC/RP, AQ-HILIC, NA-HILIC, RP) i SFC sistemima. Uzimajući u obzir nedovoljno ispitane retencione mehanizme i selektivnost u uslovima *mixed-mode* HILIC/RP i SFC hromatografije, ciljevi ove doktorske disertacije su obuhvatili:

- Ispitivanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih/ $\alpha$ -adrenergičkih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u HPLC (*mixed-mode* HILIC/RP, RP, AQ-HILIC, NA-HILIC) i SFC sistemima.
- Definisane retencionih mehanizama na osnovu fizičko-hemijskih osobina mobilne faze (zapreminski udeo modifikatora mobilne faze, polarnost) i procenu retencionog ponašanja ispitivanih jedinjenja na osnovu parametara hromatografskog sistema (temperatura, koncentracija pufera) na diol i *mixed-mode* stacionarnoj fazi.
- Uvođenje novih retencionih parametara u opisivanju retencije u *mixed-mode* HILIC/RP uslovima i definisanje tačke prelaska iz sistema sa hidrofilnim u sistem sa dominantnim reverzno-faznim interakcijama.
- Formiranje QSRR modela primenom metode vektora podrške (*Support Vector Machine*), višestruke linearne regresione analize, *Box-Cox* transformacije i *Abraham*-ove jednačine (*Linear Solvation Retention Relationship*).

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

### 3.1. Hemikalije i oprema

#### 3.1.1. Standardi ispitivanih supstanci

- Amilorid-hidrohlid, antazolin-fosfat, benazolin-oksalat, brimonidin-hidrohlid, cirazolin-hidrohlid, klonidin-hidrohlid, detomidin-hidrohlid, efaroksan-hidrohlid, gvanabenzacetat, gvanfacin-hidrohlid, harman, harmin-hidrohlid, idazoksan-hidrohlid, metformin-hidrohlid, nafazolin-hidrohlid, oksimetazolin-hidrohlid, fentolamin-hidrohlid, RX 821002, tetrahidrozolin-hidrohlid, tizanidin-hidrohlid, ksilometazolin-hidrohlid, *Sigma-Aldrich (St. Louis MO, SAD)*
- Moksonidin i strukturno srodna jedinjenja (Imp M1 (4,6-dihloro-N-(imidazolidin-2-iliden)-2-metilpirimidin-5-amin), Imp M2 (N-(imidazolidin-2-iliden)-4,6-dimetoksi-2-metilpirimidin-5-amin), Imp M3 (5-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)amino]-6-metoksi-2-metil-4(3H)-pirimidinon), Imp M4 (6-hloro-5-[(imidazolidin-2-ilidien)amino]-2-metilpirimidin-4-ol)); *Worwag Pharma (Boblingen, Nemačka)*
- Trimazolin-hidrohlid, *Zdravlje-Actavis (Leskovac, Srbija)*
- Sitagliptin, *Merck & Co (SAD)*
- Olanzapin, aripiprazol i strukturno srodna jedinjenja (Imp A1 (4-(2,3-dihlorofenil)piperazin), Imp A2 (8-aza-5-azoniaspiro[4.5]dekan-bromid), Imp A3 (7-(4-hlorobutoksi)-3,4-dihidro-C2(1H)-hinolin, Imp A4 (7-(4-brombutoksi)-3,4-dihidro-C2(1H)-hinolin, Imp A5 (3,4-dihidro-7-hidroksi-2(1H)-hinolin, Imp A6 (7,7'-[1,4-butanediilbis(oksi)]bis[3,4-dihidro-2(1H)-hinolinon), Imp A7 (7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)-1-oksido-1-piperazinil]butoksi]-3,4-dihidro-2(1H)-hinolinon), Imp A8 (7-(4-etoksibutoksi)-3,4-dihidro-2(1H)-hinolinon), Imp A9 (7-(4-hidroksibutoksi)-2(1H)-hinolinon), Imp A10 (1-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)piperazin-1-il]butil]-7-hidroksi-3,4-dihidro-karbostril)), Imp A11 (7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)piperazin-1-il]butoksi]hinolin-2(1H)-on)); *Hemofarm (Vršac, Srbija)*
- Ziprazidon i strukturno srodna jedinjenja: Imp Z1(1-(1,2-benzizotiazol-3-il)piperazin), Imp Z2 ((5-(2-(4-(benzo[d]izotiazol-3-il)piperazin-1-il)etil)-6-hloroindolin-2,3-dion), Imp Z3 (6-hloro-5-(2-hloroetil)indolin-2-on), Imp Z4 (5,5'-bis[2-[4-(1,2-benzizotiazol-3-il)piperazin-1-il]etil]-6,6'-dihloro-3-hidroksi-1,1',3,3'-tetrahidro-2H,2'H-3,3'-biindol-2,2'-dion)); *Pfizer (Ilertisen, Nemačka)*

#### 3.1.2. Oprema

- Tečni hromatograf *Agilent Technologies 1200* (Santa Klara, Kalifornija, SAD): binarna pumpa, degazer, termostat za kolonu, UV detektor
- Tečni hromatograf *Dionex Ultimate 3000*. Masena detekcija sa elektrosprej jonizacijom (ESI) u pozitivnom režimu (*AB Sciex Q trap 3200*, Kanada). Uslovi disocijacije (*Low Energy Collision Dissociation-Tandem Mass Spectrometry, CID-MS/MS*):
  - napon jonskog raspršivanja, 5500 V
  - gasni izvor jona (N<sub>2</sub>) za sušenje rastvarača, 40psi
  - protivstrujni gas (N<sub>2</sub>), 15psi
  - potencijal deklasterizacije, +45V
  - izlazna energija sudara, +10V.

Stupnjevi reakcije (*Multiple Reaction Monitoring Mode, MRM*) u ESI-CID-MS/MS analizi: ekstrakcija prekursor jona iz metotreksata i aminoptera u Q1 kvadrupolu, disocijacija indukovana kolizijom (*Collision Induced Dissociation, CID*) u Q2 kvadrupolu, detekcija spektra sa produkt jonima u Q3 kvadrupolu u okviru opsega  $m/z$  100–480 na brzini skeniranja 300 amu/s. Kolizione energije: + 43 V za  $m/z$  266 →  $m/z$  91 antazolin; + 32 V za  $m/z$  449 →  $m/z$  286 aripiprazol; + 36 V za  $m/z$  164,2 →  $m/z$  91 Imp A5; + 33 V za  $m/z$  381

→  $m/z$  176 Imp A6; + 30 V za  $m/z$  447 →  $m/z$  286 Imp A11; + 35 V za  $m/z$  197,2 →  $m/z$  153,9 benazolin; + 33 V za  $m/z$  293 →  $m/z$  213 brimonidin; + 26 V za  $m/z$  187,7 →  $m/z$  81 detomidin; + 24 V za  $m/z$  217 →  $m/z$  147 efaroksan; + 42 V za  $m/z$  183 →  $m/z$  115 harman; + 55 V za  $m/z$  213 →  $m/z$  169 harmin; + 30 V za  $m/z$  205 →  $m/z$  97 idazoksan; + 28 V za  $m/z$  313 →  $m/z$  282 olanzapin; + 26 V za  $m/z$  235,2 →  $m/z$  177 RX 821002; + 58 V za  $m/z$  254 →  $m/z$  184 tizanidin; + 30 V za  $m/z$  203 →  $m/z$  133 trimazolin; + 40 V za  $m/z$  413 →  $m/z$  194 ziprazidon; +32V za  $m/z$  220 →  $m/z$  136 Imp Z1; + 54 V za  $m/z$  427,9 →  $m/z$  180 Imp Z2; + 40 V za  $m/z$  230 →  $m/z$  145 Imp Z3; + 115 V za  $m/z$  839 →  $m/z$  413 Imp Z4. Vreme zadržavanja: 100ms za svaki produkt jon.

- SFC hromatograf *Acquity UPC<sup>2</sup>* (Waters Corp., Milford, Masačutes, SAD): *Acquity ccBMS* pumpa za CO<sub>2</sub>, dodatne pumpe za korastvarače, *Acquity UPLC* injektor sa injektorskom petljom, *Acquity column manager* za dve kolone (do 15 cm dužine), *Acquity convergence manager*, *Acquity UPC<sup>2</sup> PDA* detektor sa protočnom ćelijom. Masena detekcija, *Acquity QDa single quadrupole*, sa elektrospej jonizacijom (ESI). Za isporuku uzorka u detektor mase: *Acquity ISM* pumpa. Maseno-spektrometrijska podešavanja u SFC-u:
  - $m/z$  opseg 150-600 Da
  - temperatura proba 600°C
  - kapilarni napon 0,8 kV, napon konusa 10V
  - režim prikupljanja podataka – centroid, brzina uzorkovanja – 20 points/sec
  - rastvarač za dopunjavanje, metanol/voda 9:1 (v/v) sa 20 mM amonijum-formijatom i brzinom protoka 0,05 mL/min.

[ $M+H$ ]<sup>+</sup> joni u SFC analizi:  $m/z$  266 anatazolin;  $m/z$  449 aripiprazol;  $m/z$  164,2 Imp A5;  $m/z$  381 Imp A6;  $m/z$  447 Imp A11;  $m/z$  197,2 benazolin;  $m/z$  293 brimonidin;  $m/z$  187,7 detomidin;  $m/z$  217 efaroksan;  $m/z$  183 harman;  $m/z$  213 harmin;  $m/z$  205 idazoksan;  $m/z$  313 olanzapin;  $m/z$  235,2 RX 821002;  $m/z$  254 tizanidin;  $m/z$  203 trimazolin;  $m/z$  413 ziprazidon;  $m/z$  220 Imp Z1;  $m/z$  427,9 Imp Z2;  $m/z$  230 Imp Z3;  $m/z$  413 Imp Z4.

### 3.1.2.1. Kolone

*Acclaim Mixed Mode HILIC-1*; 150 mm × 4,6 mm; veličina čestica 5 μm (*Thermo Scientific*; SAD)

*Kinetex HILIC*; 150 mm × 4,6 mm; veličina čestica 2,6 μm (*Phenomenex*; SAD).

### 3.1.3. Hemikalije

HPLC mobilna faza (AQ-HILIC, RP):

- acetonitril, HPLC čistoće (*J.T. Baker, Deventer, Holandija*)
- dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje, *Niderelbert, Nemačka*)
- amonijum-acetat (*Merck, Darmstadt, Nemačka*).

SFC mobilna faza:

- CO<sub>2</sub> (*Linde Gas Rus, Balashikha, Rusija*)
- metanol (*Panreac, Barselona, Španija*)
- amonijum-formijat, visoke čistoće (*Acros, Geel, Belgija*)
- mravlja kiselina (*Acros, Geel, Belgija*).

NA-HILIC mobilna faza:

- acetonitril, HPLC čistoće (*Panreac*, Barselona, Španija)
- metanol (*Panreac*, Barselona, Španija)
- amonijum-formijat, visoke čistoće (*Acros*, *Geel*, Belgija)
- mravlja kiselina (*Acros*, *Geel*, Belgija).

#### 3.1.4. Priprema mobilne faze

- HPLC mobilna faza: smeša acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata, podešena na pH 6 rastvorom sirćetne kiseline. Brzina protoka mobilne faze: 1 mL/min, temperatura kolone 25 °C.
- SFC mobilna faza: smeša CO<sub>2</sub> i metanola. Modifikatori SFC mobilne faze: *i*) metanolni rastvor 20 mM amonijum-formijata; *ii*) metanolni rastvor 20 mM amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline. Brzina protoka mobilne faze: 3 mL/min, regulatorni pritisak 160 bar, temperatura kolone 25 °C.
- NA-HILIC mobilna faza: smeša acetonitrila i metanola. Modifikatori NA-HILIC mobilne faze: *i*) 20 mM amonijum-formijat; *ii*) 20 mM amonijum-formijat sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline. Brzina protoka mobilne faze: 1 mL/min, temperatura kolone 25°C.

#### 3.1.5. Priprema rastvora uzoraka

- HPLC analiza (AQ-HILIC, RP):

Standardni rastvori ispitivanih jedinjenja su pripremljeni u metanolu, u koncentraciji 1 mg/mL i potom razblaženi sa mobilnom fazom (acetonitril : 20 mM amonijum-acetat, pH 6; 50:50, v/v) do finalne koncentracije 0,25 mg/mL. Kako bi se sprečila degradacija ispitivanih jedinjenja uzorci su čuvani na temperaturi od 4 °C.

- SFC i NA-HILIC analiza:

Standardni rastvori ispitivanih jedinjenja su pripremljeni u smeši (acetonitril : metanol; 50:50, v/v) u koncentraciji 1 mg/mL i potom razblaženi sa metanolom do finalne koncentracije 0,01 mg/mL. Kako bi se sprečila degradacija ispitivanih jedinjenja, uzorci su čuvani na temperaturi od 4 °C.

## 3.2. Modelovanje retencionog ponašanja

### 3.2.1. Retencioni parametri

Retenciono vreme ( $t_r$ ) ispitivanih jedinjenja je izračunato kao srednja vrednost tri merenja. Na osnovu  $t_r$  izračunat je logaritam retencionog faktora ( $\log k$ ) prema sledećoj jednačini:

$$\log k = \log ((t_r - t_0)/t_0) \quad (11)$$

$t_0$  je mrtvo vreme izmereno kao vreme prve perturbacije bazne linije.

Parametar selektivnosti,  $\alpha$ , izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$\alpha = k_1/k_2 \quad (12)$$

gde  $k_i$  ( $i = 1, 2$ ) predstavlja retencioni faktor ispitivanog jedinjenja.

### 3.2.2. Kompjuterske metode

U statističkoj obradi eksperimentalnih podataka korišćeni su sledeći programi:

-*RStudio* (verzija 3.5.2; Boston, Masačutes, SAD) [187]

-*Statistica data analysis system* (verzija 7; StatSoft; Tulsa, Oklahoma, SAD) [188].

### 3.2.3. Opšti retencioni modeli

Sa aspekta matematičkog opisa retencionog mehanizma, efekat zapreminskog udela modifikatora mobilne faze ( $\varphi$ ) na retencioni faktor ( $k$ ) se može definisati korišćenjem *Snyder-ovog* [136,189-192] i *Snyder-Soczewinski* retencionog modela [137, 143, 193].

Mehanizam raspodele odgovara *Snyder-ovom* retencionom modelu [136, 192], koji je definisan sledećom jednačinom:

$$\log k = \log k_w - n \cdot \varphi \quad (13)$$

gde je  $\varphi$  zapreminska frakcija modifikatora mobilne faze, a  $n$  efekat koncentracije modifikatora mobilne faze na stopu opadanja faktora retencije.

U AQ-HILIC sistemu, kao modifikator mobilne faze korišćen je vodeni rastvor 20 mM amonijum-acetata ( $\varphi(\text{aq})$ ). Tom prilikom ekstrapolisani retencioni parametar,

$k_w^{\text{AQ-HILIC}}(\text{ACN})$ , odgovara retenciji jedinjenja pri 100% sadržaju acetonitrila u mobilnoj fazi. U RP sistemu,  $\varphi(\text{org})$  je zapreminski udeo organskog eleuenta, dok  $k_w^{\text{RP}}(\text{aq})$  opisuje retenciju u 100% vodenom eluentu kao mobilnoj fazi.

U NA-HILIC i SFC-u kao modifikator mobilne faze je korišćen metanol,  $\varphi(\text{metanol})$ . Parametar  $k_w^{\text{NA-HILIC}}(\text{ACN})$  definiše retenciju ispitivanih jedinjenja u 100% acetonitrilu, dok  $k_w^{\text{SFC}}(\text{CO}_2)$  odgovara retenciji u 100%  $\text{CO}_2$  kao mobilnoj fazi.

Adsorpcioni model (*Snyder-Soczewinski* model) se matematički opisuje sledećom jednačinom [137, 143, 193]:

$$\log k = \log k_b - n \cdot \log \varphi \quad (14)$$



gde je  $\varphi$  zapreminska frakcija modifikatora mobilne faze.

Parametar  $\log k_b(\text{aq})$  opisuje retenciju ispitivanih jedinjenja u 100% vodenom eluentu kao mobilnoj fazi u AQ-HILIC sistemu, dok  $\log k_b(\text{metanol})$  odgovara retenciji u 100% metanolu kao mobilnoj fazi u NA-HILIC i SFC-u.

U širokom opsegu promene zapreminskog udela modifikatora mobilne faze,  $\varphi(\text{aq})$ , ispitana je nelinearna  $\log k = f(\varphi(\text{aq}))$  zavisnost. Grafik koji opisuje logaritmovanu vrednost retencionog faktora ( $\log k$ ) u odnosu na zapreminski udeo vodenog eluenta ( $\varphi(\text{aq})$ ) je U-oblika i matematički se može predstaviti sledećom jednačinom [194-196]:

$$\log k = a_3 + m_3 \cdot \varphi(\text{aq}) - m_4 \cdot \log \varphi(\text{aq}) \quad (15)$$

Parametri  $a_3$ ,  $m_3$ , i  $m_4$  jednačine (15) se mogu odrediti nelinearnom regresionom analizom u *Statistica data analysis system*-u [188]. Parametar  $m_3$  opisuje efekat koncentracije vodenog eluenta u mobilnoj fazi na retenciju ispitivanih jedinjenja u RP sistemu, dok je  $m_4$  mera doprinosa HILIC interakcija na promenu njihovog retencionog ponašanja. Koeficijent  $a_3$  predstavlja empirijsku konstantu. Zapreminski udeo vodene komponente mobilne faze koji odgovara promeni iz RP u HILIC retencioni mehanizam je minimalna vrednost  $\log k = f(\varphi(\text{aq}))$  funkcije i matematički je definisana sledećom jednačinom:

$$\varphi_{\min}(\text{aq}) = 0,434 m_4/m_3 \quad (16)$$

gde  $m_3$  i  $m_4$  predstavljaju regresione koeficijente jednačine (15).

U slučaju ispitivanja niskih zapreminskih udela vodenog eluenta u mobilnoj fazi na retenciju jedinjenja, ( $\varphi(\text{aq}) < 0,02$ ), primenjuju se sledeće jednačine [194]:

$$\log k = a_3 + m_3 \cdot \varphi(\text{aq}) - m_4 \cdot \log(1 + b\varphi(\text{aq})), b > 1 \quad (17)$$

$$\varphi_{\min}(\text{aq}) = 0,434 m_4/m_3 - 1/b \quad (18)$$

gde je  $\varphi_{\min}(\text{aq})$  prevojna tačka iz RP u HILIC retencioni mehanizam, a  $b$  predstavlja regresionu konstantu.

Retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja se može posmatrati i kao funkcija ukupne polarnosti mobilne faze,  $\log k = f(P_{\text{tot}})$ , koja za dvokomponenti voda/acetoni-tril sistem iznosi:

$$P_{\text{tot}} = P_{\text{ACN}} \cdot \varphi(\text{ACN}) + P_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \varphi(\text{aq}) \quad (19)$$

$P_{\text{tot}}$  je ukupni indeks polarnosti mobilne faze,  $P_{\text{ACN}} = 5,8$  je *Snyder*-ov indeks polarnosti za acetoni-tril, dok  $P_{\text{H}_2\text{O}} = 10,2$  predstavlja *Snyder*-ov indeks polarnosti vodene faze. Parametar  $\varphi(\text{ACN})$  predstavlja zapreminski udeo acetoni-trila, dok je  $\varphi(\text{aq})$  zapreminski udeo vodenog eluenta u mobilnoj fazi [197].

U cilju preciznije procene pogodnosti predloženog modela u opisivanju retencionog ponašanja primenjen je *Akaike*-ov informacioni kriterijum (*Akaike Information Criterion*, AIC) [198]. AIC se koristi za procenu relativnog kvaliteta jednog statističkog modela u odnosu na drugi model, nezavisno od broja parametara u sistemu. Koeficijent AIC je izvedena veličina na osnovu broja parametara u sistemu ( $p$ ), broja izvedenih eksperimenata ( $n$ ) i vrednosti rezidualnog zbira kvadrata ( $RSS$ ):

$$\text{AIC} = 2p + n [\ln(2\pi RSS/n) + 1] \quad (20)$$

Niže vrednosti AIC koeficijenta odgovaraju boljoj primenljivosti konstruisanog modela u opisivanju retencionog ponašanja.

### 3.2.4. Primena *Box-Cox* transformacije u modelovanju retencionog ponašanja

Eksperimentalni podaci koji se statistički obrađuju često odstupaju od normalne raspodele. Jedan od načina za poboljšavanje normalnosti raspodele podataka je njihova transformacija. Vrsta transformacije podataka koja se najčešće koristi je *Box-Cox* transformacija ( $B(\varphi)$ ).

U programu *RStudio* [187] je primenjena *Box-Cox* metodologija na retencione podatke, koji su dobijeni na *mixed-mode* stacionarnoj fazi, u cilju definisanja odgovarajuće  $\log k = f(\varphi)$  zavisnosti. *Box-Cox* transformacija se matematički može predstaviti:

$$B(\varphi) = (\varphi - 1)^\lambda / \lambda \quad (21)$$

gde je  $\lambda$  parametar transformacije [199-200],  $\varphi$  zapreminski udeo modifikatora u mobilnoj fazi.

### 3.2.5. Parametar selektivnosti, $S$

Dobijeni retencioni podaci predstavljaju posledicu kombinacije različitih hromatografskih uticaja npr. vrste mobilne i stacionarne faze, pH, strukture analita. Grafičkom interpretacijom retencionih podataka jednog sistema naspram retencionih podataka dobijenih u drugom sistemu može se uporediti selektivnost. Razlike u selektivnosti se kvantifikuju korišćenjem parametra  $S$  koji je zasnovan na koeficijentu korelacije,  $r$ , između dobijenih retencionih podataka:

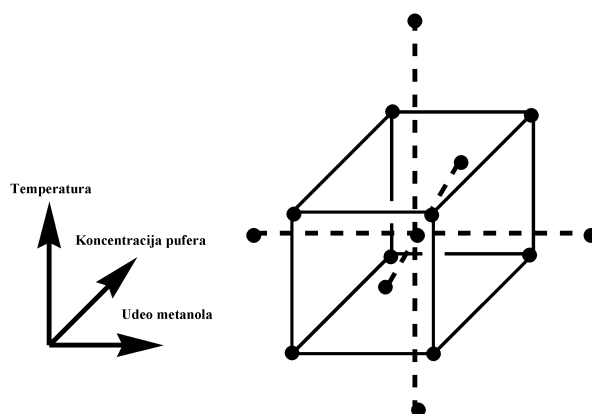
$$S = (1 - r^2)^{1/2} \cdot 100 \quad (22)$$

gde  $r$  predstavlja koeficijent korelacije između posmatranih retencionih parametara ( $\log k$ ). Vrednosti  $S$  koje su bliske nuli odgovaraju sistemima u kojima se postiže skoro identično razdvajanje, dok vrednosti bliske 100 odgovaraju sistemima sa značajnim razlikama u retencionom ponašanju [201-202].

### 3.3. Primena metodologije eksperimentalnog dizajna u modelovanju retencionog ponašanja

Metodologija eksperimentalnog dizajna je iskorišćena za ispitivanje razlika u selektivnosti NA-HILIC i SFC sistema na osnovu razdvajanja ziprazidona, aripiprazola i srodnih jedinjenja na diol stacionarnoj fazi.

Promene hromatografskih faktora su definisane eksperimentalnim planom koji odgovara trofaktorskom centralnom kompozitnom (složenom) dizajnu (*Central Composite Design*, CCD). Kompozitni dizajn je najčešće korišćen dizajn za procenu koeficijenata u polinomu drugog reda. CCD metoda je poseban tip dizajna *površinskog odgovora* (*response surface*), koji se može uklopiti u kvadratni model i s toga predstavlja efektivan drugostepeni dizajn. CCD dizajn se sastoji iz frakcionog faktorskog dizajna sa centralnim tačkama koje su uvećane i grupom aksijalnih tačaka. U odnosu na broj ispitivanih faktora, broj aksijalnih tačaka u CCD dizajnu je dva puta veći (Slika 32) [203].



Slika 32. Trofaktorski centralni kompozitni dizajn.

Tokom ispitivanja, nivoima (-1, 0, +1) je redom obeležena minimalna, srednja i maksimalna vrednost svake promenljive (Tabela 2). Zbog toga, CCD metoda zahteva veliki broj eksperimenata i trebala bi da bude izabrana u kasnijoj fazi istraživanja, kada je ukupan broj promenljivih sveden na prihvatljivu cifru.

Vrednosti parametra selektivnosti ( $\alpha$ ) su ispitane u zavisnosti od uskog opsega promene temperature ( $T$ ), koncentracije pufera ( $C_{\text{pufer}}$ , metanolnog rastvora amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% mravlje kiseline,  $v/v$ ) i zapreminskog udela metanola (metanol, %  $v/v$ ) na diol stacionarnoj fazi (Tabela 2).

Tabela 2. Eksperimentalni faktori i njihovi nivoi.

Eksperimentalni nivoi	$T$ (°C)	metanol (% v/v)	$C_{\text{pufer}}$ (mM)
-1	20	15	15
0	25	20	20
1	30	25	25

Statistička značajnost i primenljivost dobijenih modela procenjena je na osnovu rezultata analize varijanse, ANOVA testa.

### 3.3.1. Modelovanje retencionog ponašanja u SFC sistemu

Uticaj zapreminskog udela metanola, koncentracije pufera i temperature na retenciju odabranih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora u SFC-u na *mixed-mode* stacionarnoj fazi je ispitan prema planu CCD dizajna (Tabeli 2). Opšti oblik CCD jednačine je:

$$E(y) = \beta_0 + \sum_i^n \beta_i X_i + \sum_i^n \sum_j^n \beta_{ij} X_i X_j + \sum_i^n \beta_{ii} X_i^2 \quad (23)$$

gde je  $n$  broj ispitivanih faktora i konstanta  $\beta_0$  odsečak. Koeficijenti  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$ ,  $\beta_{ii}$  gde je  $i \neq j$  kvantifikuju uticaj odgovarajućih  $X_i$ ,  $X_i X_j$ ,  $X_i^2$  interakcija na vrednost zavisne promenljive  $E(y)$  tj. retencionog faktora ispitivanog jedinjenja ( $k$ ) [180-183]. Hromatografski faktori i njihove interakcije sa najizraženijim uticajem na retenciono ponašanje su izdvojene *step-wise* postupkom u višestrukoj linearnoj regresionoj analizi (*Multiple Linear Regression, MLR*) [188]. Njihova statistička značajnost je procenjena primenom ANOVA testa.

### 3.4. Modelovanje retencionog ponašanja na osnovu fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja

#### 3.4.1. Izračunavanje molekulskih deskriptora

Dominantni tautomerni oblici ispitivanih jedinjenja (pH 6 za AQ-HILIC, neutralne forme za NA-HILIC i SFC) su odabrani korišćenjem *Chem Axon Marvin Sketch 6.1.0.* programa [48]. Optimizacija odabranih jedinjenja je urađena primenom:

- semi-empirijske PM3 metode [204-205] (softver *Gaussian09* [206], programa *ChemBio3D Ultra 13.0* [207])
- *Hartree-Fock/3-21G* metode.

Molekulski deskriptori optimizovanih struktura su izračunati korišćenjem:

- *ChemBio3D Ultra 13.0.* [207]
- *Dragon* [208]
- *Gaussian09* [206]
- *Marvin Sketch 6.1.0.* [48]
- *Molinspiration* [209]
- *Virtual Computational Chemistry Laboratory* [210]
- *ACD/i-Lab* softvera [211].

Predikcioni QSRR modeli su napravljeni korišćenjem deskriptora koji imaju najveći uticaj na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja, kao i interkorelaciju nižu od 0,9.

#### 3.4.2. QSRR modelovanje

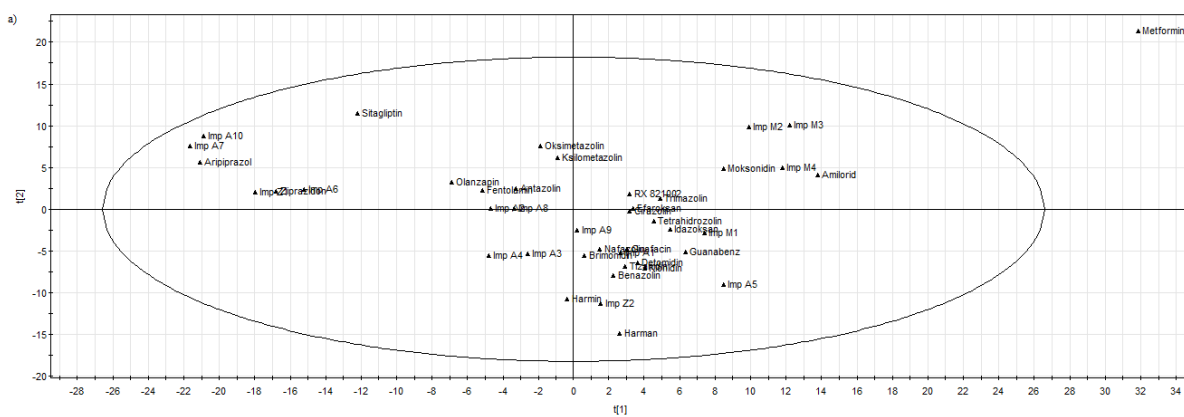
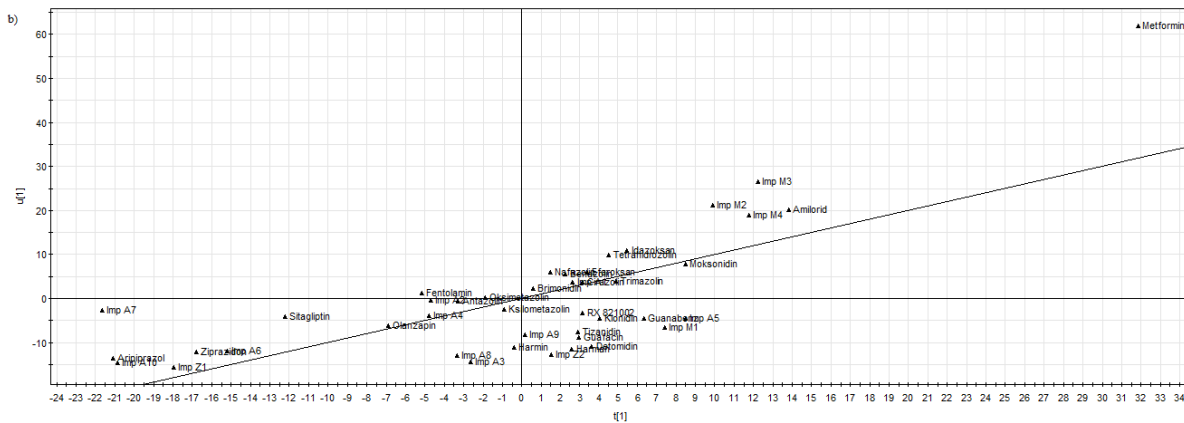
Kako bi se objasnile fizičko-hemijske interakcije koje utiču na retenciju u ispitivanim hromatografskim sistemima (RP, AQ-HILIC, NA-HILIC i SFC), primenjene su metode kvantitativne analize, veze između strukture i retencije.

##### 3.4.2.1. QSRR modelovanje u AQ-HILIC i RP sistemima

U AQ-HILIC i RP sistemima na *mixed-mode* stacionarnoj fazi ispitana je korelacija između ekstrapolisanih retencionih faktora ( $\log k_w^{\text{AQ-HILIC}}(\text{ACN})$ ,  $\log k_w^{\text{RP}}(\text{aq})$ ,  $\log k_b^{\text{AQ-HILIC}}(\text{aq})$ , prevojne tačke ( $\phi_{\min}(\text{aq})$ ) kao zavisno promenljivih i molekulskih osobina jedinjenja kao nezavisno promenljivih (Tabela 1, Prilog A).

S obzirom da je cilj prediktivne QSRR analize izrada modela koji pouzdano predviđaju vrednosti novog skupa podataka, napravljene modele je potrebno testirati na podacima koji nisu predhodno poznati i očekivana predviđanja proveriti u odnosu na dobijene rezultate. Glavna ideja je podela analiziranog skupa podataka na dva podskupa; jedan pod nazivom *training* skup koji se koristi za konstruisanje modela, a drugi *testing* skup za proveru tačnosti modela. Kako je model izgrađen na osnovu skupa *training* (pre korišćenja skupa *testing*), *testing* skup služi kao nezavisni izvor podataka za objektivno testiranje tačnosti predviđanja. Validacija testa podrazumeva uklapanje novih podataka u model i simulaciju buduće primene modela u praksi na novim podacima. Kako bi se obezbedila odgovarajuća tačnost predviđanja, odabir *training* i *test* skupa je urađen na osnovu PCA grafika ( $t_1$  vs.  $t_2$ ,  $t_1$  vs.  $u_1$ ), tako da broj jedinjenja u svakom *training* skupu iznosi 28. Jedinjenja raspoređena u *test* i *training* skupove su prikazana u Tabeli 3. U cilju identifikacije jedinjenja čije retenciono ponašanje odstupa u odnosu na izabrane fizičko-hemijske karakteristike (*outlayer*),

primenjena je analiza glavnih komponentata (*Principal Component Analysis, PCA*), korišćenjem *SIMCAP+ 12.0* programa [212-213] (Slika 33).



Slika 33. PCA grafik (*score plot*) na primeru prevojnje tačke:

a)  $t_1 = f(t_2)$

b)  $t_1 = f(u_1)$

Tabela 3. *Training* i *test* skupovi u MLR/QSRR i SVM/QSRR analizi.

Zavisno promenljiva	<i>Training</i> skup	<i>Test</i> skup	Isključeno jedinjenje ( <i>outlier</i> )
$\log k_w^{RP}(\text{aq})$	amilorid, antazolin, aripiprazol, Imp A1, Imp A2, Imp A5, Imp A7, Imp A8, Imp A9, Imp A10, benazolin, cirazolin, klonidin, gvanabenz, harman, idazoksan, metformin, moksonidin, Imp M2, Imp M3, Imp M4, nafazolin, oksimetazolin, RX 821002, sitagliptin, ksilometazolin, tizanidin, Imp Z3	Imp A3, Imp A6, brimonidin, detomidin, efaroksan, gvanfacin, harmin, Imp M1, olanzapin, fentolamin, tetrahidrozolin, trimazolin, Imp Z2	Imp A4, ziprazidon
$\log k_w^{AQ-HILIC}(\text{org})$	amilorid, antazolin, aripiprazol, Imp A1, Imp A4, Imp A5, Imp A8, Imp A9, Imp A10, cirazolin, klonidin, detomidin, efaroksan, gvanabenz, harmine, harman, idazoksan, metformin, moksonidin, Imp M1, Imp M3, olanzapin, fentolamin, RX 821002, sitagliptin, tetrahidrozolin, ksilometazolin, ziprazidon	Imp A2, Imp A6, benazolin, brimonidin, gvanfacin, Imp M2, Imp M4, nafazolin, oksimetazolin, trimazolin, tizanidin, Imp Z2, Imp Z3	Imp A7, Imp A3
$\log k_b^{AQ-HILIC}(\text{aq})$	amilorid, antazolin, aripiprazol, Imp A1, Imp A4, Imp A5, Imp A8, Imp A9, Imp A10, cirazolin, klonidin, detomidin, efaroksan, gvanabenz, harmin, harman, idazoksan, metformin, moksonidin, Imp M1, Imp M3, olanzapin, fentolamin, RX 821002, sitagliptin, tetrahidrozolin, ksilometazolin, ziprazidon	Imp A2, Imp A3 Imp A6, benazolin, brimonidin, gvanfacin, Imp M2, Imp M4, nafazolin, oksimetazolin, trimazolin, tizanidin, Imp Z2, Imp Z3	Imp A7
$\varphi_{\min}(\text{aq})$	antazolin, aripiprazol, Imp A1, Imp A3, Imp A4, Imp A5, Imp A6, Imp A7, Imp A8, Imp A10, klonidin, efaroksan, gvanfacin, harmin, idazoksan, metformin, moksonidin, Imp M1, Imp M2, Imp M4, olanzapin, fentolamin, sitagliptin, tetrahidrozolin, tizanidin, trimazolin, Imp Z2, Imp Z3	amilorid, Imp A2, Imp A9, benazolin, brimonidin, cirazoline, detomidin, guvanabenz, harmin, Imp M3, nafazolin, oksimetazolin, RX 821002, ksilometazolin, ziprazidon	/

U oba QSRR postupka (MLR/QSRR, SVM/QSRR) korišćen je isti *training* skup za konstruisanje modela, kao i isti *test* skup za procenu tačnosti njegovog predviđanja. Kvalitet dobijenih QSRR modela je procenjen na osnovu parametara unutrašnje (koeficijent korelacije ( $r$ ), srednja kvadratna greška procene ( $RMSEE$ ), kvadratni regresioni koeficijent ukrštene validacije ( $Q^2_{\text{LOO}}$ )) i parametra spoljašnje validacije ( $Q^2_{\text{ext}}$ , srednja kvadratna greška predviđanja ( $RMSEP$ )) [213-214] koji su definisani sledećim jednačinama:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_i^2 \quad (24)$$

$$RMSEE = (PRESS/n)^{1/2}_{\text{training set}} \quad (25)$$

$$Q^2_{\text{LOO}} = 1 - PRESS/(\sum(Y_{\text{obs}}(\text{training}) - \bar{Y}(\text{training}))^2) \quad (26)$$

$$Q^2_{\text{ext}} = 1 - PRESS/(\sum(Y_{\text{obs}}(\text{test}) - \bar{Y}(\text{training}))^2) \quad (27)$$

$$RMSEP = (PRESS/n)^{1/2}_{\text{test set}} \quad (28)$$

gde  $e_{(i)}$  predstavlja razliku između posmatrane i predviđene  $Y$  vrednosti.  $Y_{\text{obs}}(\text{training})$  je zavisno promenljiva ( $Y$ ) *training* skupa, dok je  $\bar{Y}(\text{training})$  srednja vrednost ( $Y$ ) *training* skupa.  $Q^2_{\text{ext}}$  je eksterni validacioni parametar.  $Y_{\text{obs}}(\text{test})$  je vrednost zavisno ( $Y$ ) promenljive *test* jedinjenja. Smatra se da QSRR modeli sa vrednostima parametara  $Q^2_{\text{LOO}}$  i  $Q^2_{\text{ext}}$  većim ili jednakim od 0,5 imaju dobre prediktivne osobine [213-214].

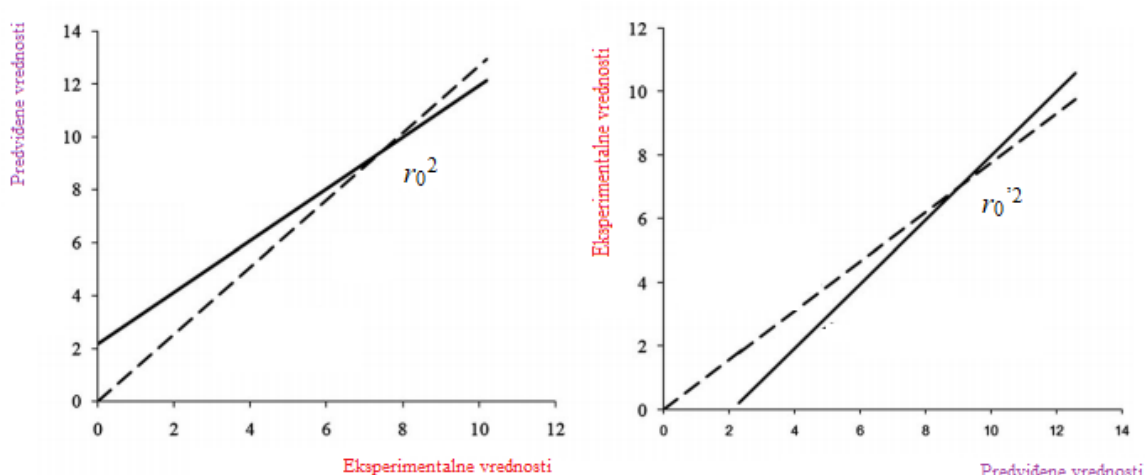
Kvalitet QSRR predviđanja je procenjen i na osnovu vrednosti  $r_m^2$  parametara *test* skupa ( $r_m^2$ , srednja vrednost  $r_m^2$  ( $\bar{r}_m^2$ ), relativna vrednost  $r_m^2$  ( $rr_m^2$ )). Parametri  $r_m^2$  su iskorišćeni kao dodatni validacioni kriterijum koji potvrđuje kvalitet QSRR modelovanja, na osnovu korelacije između predviđenih i eksperimentalno dobijenih podataka ( $r^2$ ). Korelacija  $r^2$  je umanjena za vrednost  $r_0^2$  koja je dobijena metodom najmanjih kvadrata:

$$r_m^2 = r^2 (1 - \sqrt{r^2 - r_0^2}) \quad (29)$$

$$\bar{r}_m^2 = \frac{r_m^2 + r_m'^2}{2} \quad (30)$$

Analogno jednačini (29), može se izračunati i parametar  $r_m'^2$ ,  $r_m'^2 = r^2 (1 - \sqrt{r^2 - r_0'^2})$ , dok je odsečak  $r_0'^2$  dobijen zamenom koordinatnih osa u sistemu (Slika 34).





Slika 34. Regresioni grafici za izračunavanje  $r_m^2$  parametra.

QSRR modeli se mogu smatrati prihvatljivim ukoliko su ispunjeni sledeći uslovi:

- i) vrednosti parametara  $r_m^2$ ,  $rr_m^2$ ,  $\bar{r}_m^2$  veće od 0,5
- ii) razlika između  $rr_m^2$  and  $\bar{r}_m^2$  ( $\Delta r_m^2$ ) niža od 0,2 [215-217].

U MLR analizi je primenjen *stepwise* postupak (*Statistica data analysis system*) [188] u cilju izdvajanja najznačajnijih deskriptora koji utiču na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja, prema sledećoj jednačini:

$$y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + \dots + a_n \cdot x_n \quad (31)$$

gde je  $y$  zavisno promenljiva, ( $\log k_w^{\text{RP}}(\text{aq})$ ,  $\log k_w^{\text{AQ-HILIC}}(\text{org})$ ,  $\log k_b^{\text{AQ-HILIC}}(\text{aq})$ ,  $\varphi_{\text{min}}(\text{aq})$ ),  $a_0$ - $a_n$  su regresioni koeficijenti, dok je  $x_i$  ( $i = 1 - n$ ) vrednost odabranog molekuskog deskriptora.

Molekulski deskriptori, izdvojeni MLR analizom, iskorišćeni su kao ulazni podaci u SVM/QSRR modelovanju. Karakteristike dobijenih SVM/QSRR modela u zavisnosti od vrste *kernel* funkcije (osnovna radijalna funkcija, kvadratna funkcija), vrednosti kapaciteta  $C$  i parametra  $\varepsilon$  su prikazane u Tabeli 4.

Vrednosti molekuskih deskriptora ispitivanih jedinjenja su prikazane u Prilogu A, u Tabeli 1 i Tabeli 2.

Tabela 4. Optimizacione karakteristike SVM/QSRR modela.

Zavisno promenljiva	Kernel funkcija	Stepen polinoma ( $d$ )	Koeficijent polinoma ( $e$ )	Parametar kapaciteta ( $C$ )	$\epsilon$	$\gamma$	Broj vektora Podrške
$\log k_w^{\text{RP}}(\text{aq})$	Polinom	2	0	10	0,1	0,7	24
	Osnovna radijalna	/	/	3	0,1	0,9 2,0	24
$\log k_w^{\text{HILIC}}(\text{org})$	Polinom	2	0	29	0,1	0,9 0,0	23
	Osnovna radijalna	/	/	12	0,3	0,9 0,0	12
$\log k_b^{\text{HILIC}}(\text{aq})$	Polinom	2	0	4	0,1	0,2 4,0	24
	Osnovna radijalna	/	/	4	0,1	0,1 5,0	20
$\varphi_{\text{min}}(\text{aq})$	Polinom	2	0	2	0,1	0,9 0,0	14
	Osnovna radijalna	/	/	4	0,1	0,5 4,0	18

Kapacitet,  $C$ , od 10 do 30. Parametar  $\epsilon$  od 0,1 do 5,0.

### 3.4.2.2. QSRR modelovanje u NA-HILIC i SFC sistemima

U NA-HILIC i SFC-u, uticaj molekulskih osobina na retenciono ponašanje jedinjenja ispitan je korišćenjem jednačine Abraham-a (*Linear Solvation Energy Relationship, LSER*):

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1a)$$

gde su  $E$ ,  $S$ ,  $A$ ,  $B$  i  $V$  strukturni deskriptori molekula (deskriptori Abraham-a), dok su koeficijenti  $c$ ,  $e$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $v$  dobijeni MLR analizom. Deskriptor  $V$  opisuje *McGowan molekulska zapreminu*,  $S$  *dipolarnost*,  $A$  *proton-donorske osobine*,  $B$  *proton-akceptorske osobine*,  $E$  *polarizabilnost* u višku [218-221]. Vrednosti deskriptora Abraham-a ispitivanih jedinjenja su prikazane u Tabeli 5.

Tabela 5. Izračunate vrednosti deskriptora *Abraham-a*.

Jedinjenje	LSER deskriptori				
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>V</i>
Antazolin	0,13	1,13	1,52	1,89	2,18
Aripiprazol	0,41	1,75	2,53	2,63	3,28
Imp A5	0,91	0,97	1,46	1,40	1,20
Imp A6	0,82	1,81	2,54	2,46	2,86
Imp A11	0,41	1,70	2,82	2,71	3,23
Benazolin	0,13	0,75	1,10	1,83	1,56
Brimonidin	0,42	1,55	1,58	2,34	1,75
Detomidin	0,35	0,60	1,34	1,27	1,57
Efaroksan	0,13	0,92	0,90	1,36	1,70
Harman	0,31	0,67	1,50	2,01	1,41
Harmin	0,31	0,88	1,60	2,07	1,61
Idazoksan	0,13	1,16	1,51	1,44	1,48
Olanzapin	0,13	1,45	1,59	2,30	2,37
RX 821002	0,13	1,38	1,62	1,45	1,68
Tizanidin	0,42	1,34	1,57	2,33	1,62
Trimazolin	0,13	0,70	0,61	1,18	1,76
Ziprazidon	0,48	1,65	2,67	3,38	2,92
Imp Z1	0,16	0,91	1,58	1,99	1,62
Imp Z2	0,43	1,80	3,15	3,56	2,94
Imp Z3	0,48	1,90	3,57	4,82	3,78

Eksperimentalno dobijeni retencioni faktori u NA-HILIC i SFC sistemima su linerano korelisani sa izračunatim LSER deskriptorima primenom MLR analize.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

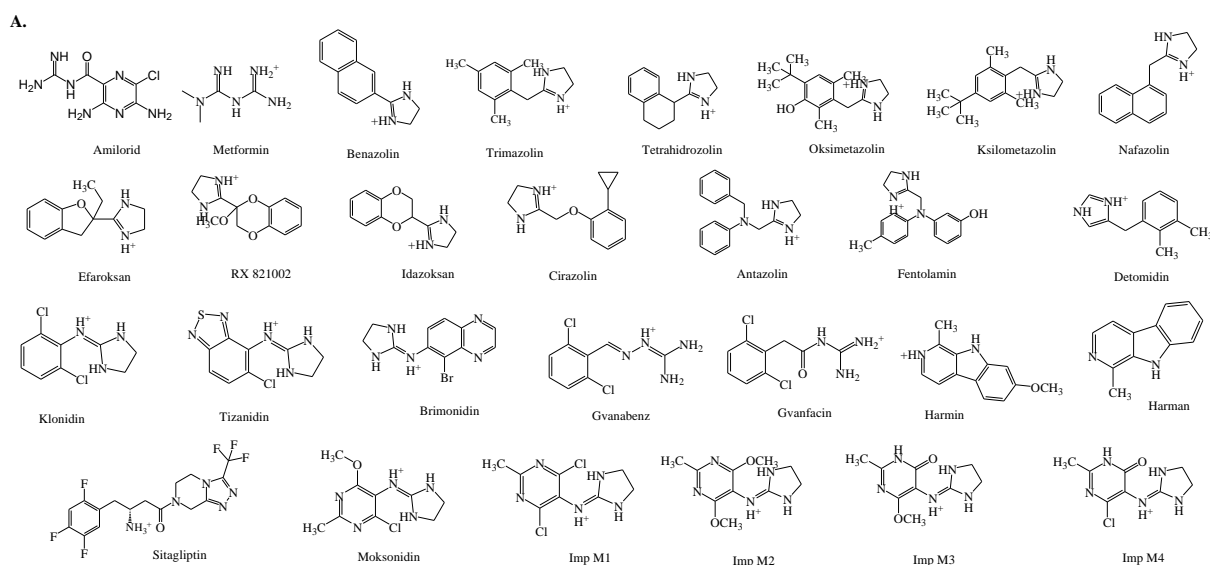
Modelovanjem retencionog ponašanje liganada imidazolinskih i serotoniniskih receptora i strukturno srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim uslovima, na osnovu uticaja fizičko-hemijskih karakteristika mobilne i stacionarne faze, kao i molekulskih osobina odabranog seta jedinjenja, omogućuje se:

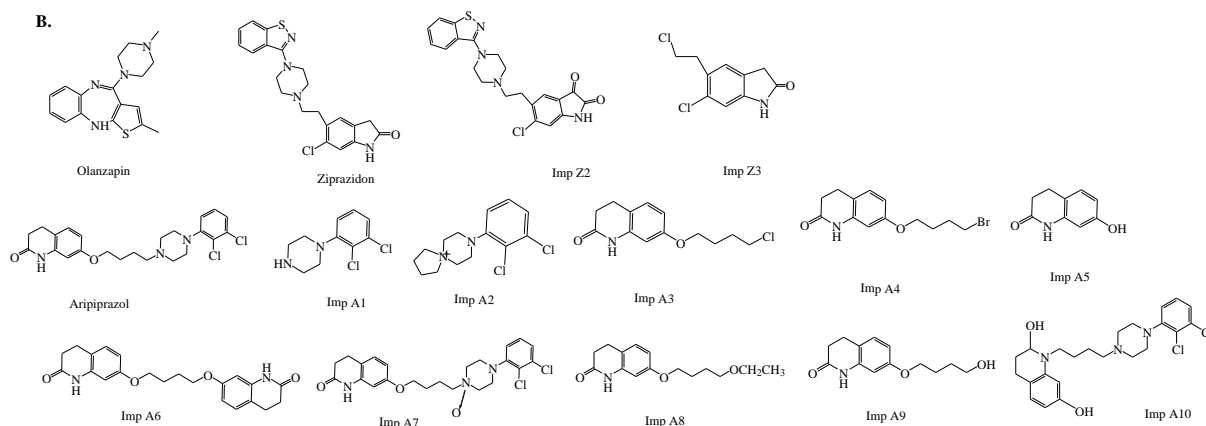
- i) hromatografsko ispitivanje strukturno sličnih, ali i terapijski raznorodnih grupa jedinjenja sa dejstvom na CNS
- ii) odabir i klasifikacija strukturnih karakteristika, kao i fizičko-hemijskih osobina koje utiču na retenciono ponašanje
- iii) razvoj pouzdanog predikcionog modela koji se može primeniti na nosintetisane supstance i njihova strukturno srodna jedinjenja.

U literaturi nema dovoljno podataka koji opisuju retencione karakteristike liganada imidazolinskih i serotoniniskih receptora i njihovih strukturnih analoga na polarnim stacionarnim fazama (*mixed-mode* HILIC/RP, diol) u NA-HILIC i SFC sistemima. Retencioni mehanizmi na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi su složeniji u odnosu na mehanizme koji su prisutni na stacionarnim fazama sa jednom strukturnom modifikacijom. S toga, opisivanje retencionog ponašanja u dualnom sistemu RP/HILIC interakcija zahteva primenu nelinearnih retencionih modela, kao i složenijih kvantitativnih zavisnosti između strukture i parametara retencije (QSRR).

#### 4.1. Modelovanje retencionog ponašanja u AQ-HILIC i RP sistemima

Na *mixed-mode* HILIC/RP (*mixed-mode diol*) stacionarnoj fazi, ispitano je retenciono ponašanja liganada imidazolinskih i serotoniniskih receptora i srodnih jedinjenja u RP i AQ-HILIC sistemima korišćenjem mobilne faze koja je smeša acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata (pH 6). Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja su prikazane na Slici 35.





Slika 35. Dominantni hemijski oblici A) liganada imidazolinskih receptora B) liganada serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja na pH 6 u AQ-HILIC i RP sistemima.

#### 4.1.1. Uticaj zapreminskog udela modifikatora mobilne faze na retenciono ponašanje

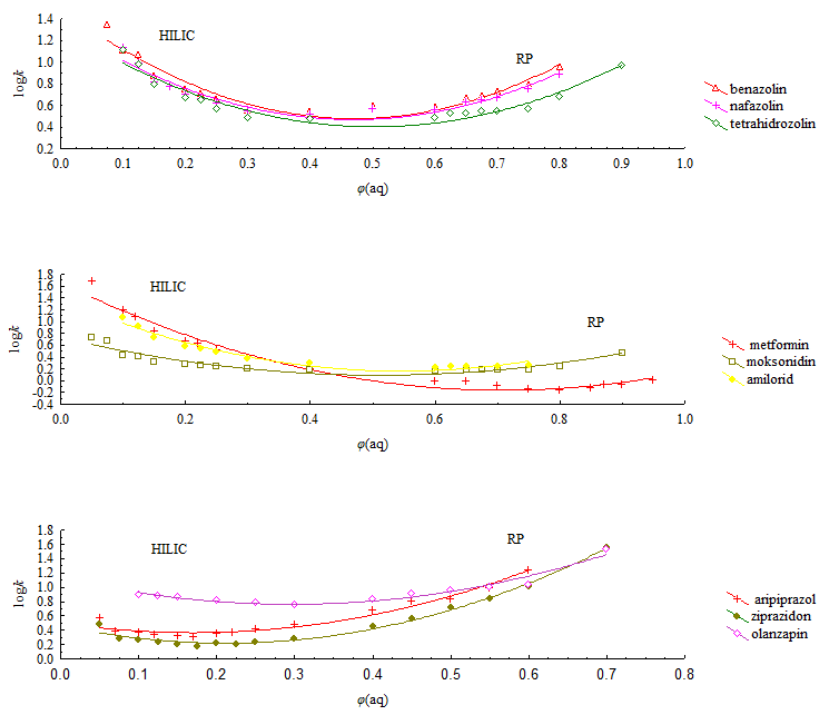
Retenciono ponašanje 43 jedinjenja (Slika 35) je ispitano na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi, korišćenjem smeše acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata (pH 6) kao mobilne faze. Zbog kisele prirode mobilne faze (pH 6) smanjena je jonizacija slobodnih diol grupa na površini kolone. Posledično, smanjen je uticaj elektrostatičkih, a povećan uticaj hidrofilnih i hidrofobnih interakcija na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja. Trend promene logaritma retencionog faktora u funkciji zapreminskog udela modifikatora mobilne faze,  $\log k = f(\varphi(aq))$ , prikazan je na Slici 36.

Retenciono ponašanje na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi uslovljeno je strukturnim karakteristikama liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora. Sa Slike 36, može se uočiti da polarna jedinjenja kao što su metformin, amilorid i moksonidin (ligandi imidazolinskih receptora) imaju veće vrednosti  $\log k$  parametra u AQ-HILIC sistemu, dok u RP sistemu veće  $\log k$  vrednosti imaju jedinjenja sa lipofilnim osobinama kao što su aripiprazol, ziprazidon i olanzapin (ligandi serotoninskih receptora). Takođe, vrednosti retencionog faktora olanzapina, derivata benzodiazepina, na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi su više u odnosu na ziprazidon i aripiprazol koji su strukturni analozi arilpiperazina. Retenciono ponašanje metformina (derivata bigvanidina) se značajno razlikuje u odnosu na moksonidin i amilorid. Grafik  $\log k = f(\varphi(aq))$  funkcije strukturnih analoga naftilimidazolina (benazolin, nafazolin, tetrahidrozolin) ima simetričan U-oblik, koji ukazuje na sličnosti u njihovim retencionim karakteristikama u AQ-HILIC i RP sistemima (Slika 36A).

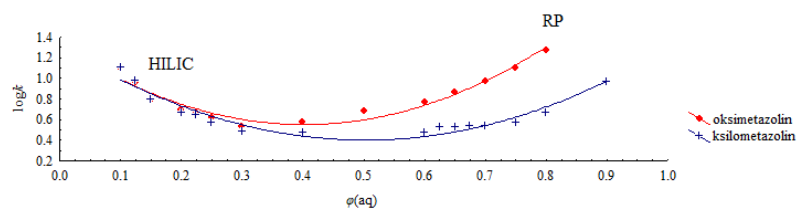
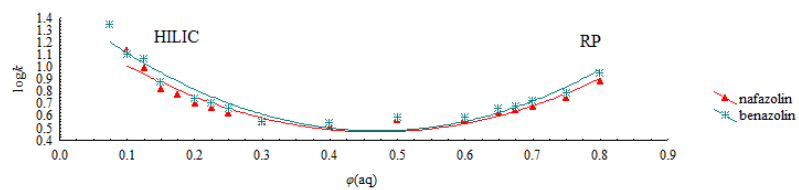
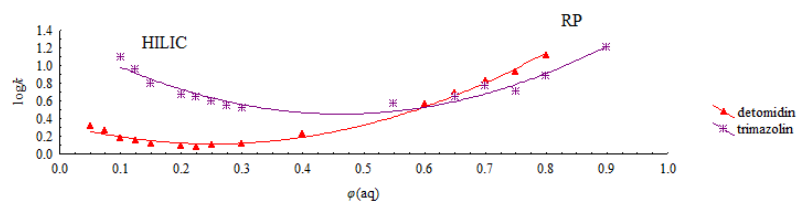
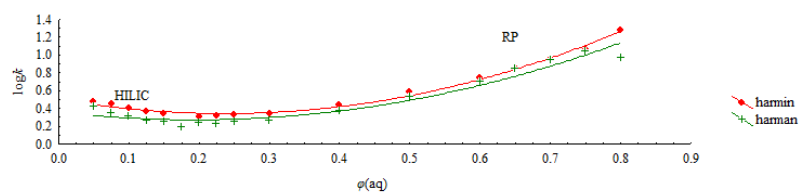
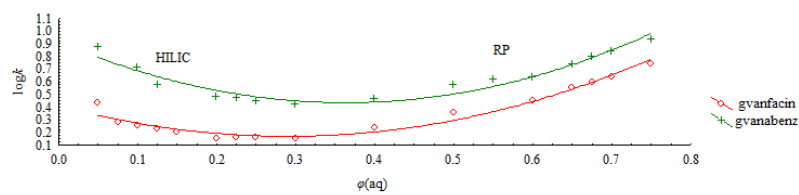
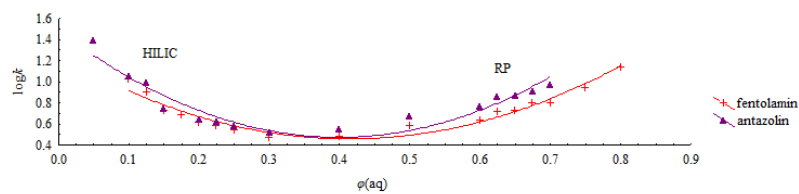
Male strukturne razlike imaju značajan uticaj na vrednosti retencionog faktora u AQ-HILIC i RP regionima. Na Slici 36B grafički je prikazano retenciono ponašanje strukturno srodnih hemijskih parova kao što su: gvanabenz-gvanfacin, fentolamin-antazolin, harman-harmin, ksilometazolin-oksimetazolin, detomidin-trimazolin, benazolin-nafazolin. Oksidovani derivati (antazolin, oksimetazolin, harmin) formiraju jače dipolne i vodonične interakcije sa stacionarnom fazom, koje utiču na njihovo duže zadržavanje u koloni i dobijanje većih  $\log k$  vrednosti kao npr:  $\log k(\text{antazolin}) > \log k(\text{fentolamin})$ ,  $\log k(\text{harmin}) > \log k(\text{harman})$ ,  $\log k(\text{oksimetazolin}) > \log k(\text{ksilometazolin})$ . Koliko je retencioni proces u *mixed-mode* HILIC/RP sistemu složen, potvrđuju razlike u retencionim karakteristikama koje nisu posledica dominantnog uticaja lipofilnih osobina nego i ostalih molekularnih karakteristika

(aromatičnost, oblik molekule, broj akceptorskih mesta vodonika):  $\log k(\text{gvanabenz}) > \log k(\text{gvanfacin})$  suprotno većoj polarnosti gvanfacina,  $\log k(\text{trimazolin}) > \log k(\text{detomidin})$  u AQ-HILIC regionu, iako je detomidin hidrofilnije jedinjenje u odnosu na trimazolin.

A.

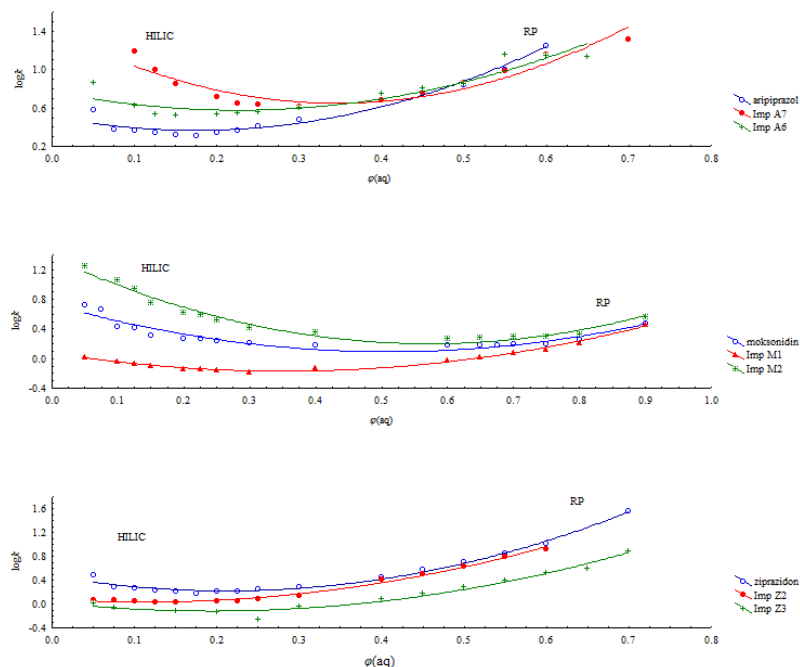


## B.





C.



Slika 36. Promena retencije u funkciji zapreminskog udela modifikatora mobilne faze,  $\log k' = f(\varphi(aq))$  A. Derivata imidazolina/gvanidina i piperazina B. Strukturno srodnih hemijskih parova C. Derivata arilpiperazina (ziprazidon, aripiprazol) i derivata 2-amino(aril)imidazolina (moksonidin) i strukturnih analoga.

Na Slici 36C, prikazani su grafici  $\log k' = f(\varphi(aq))$  funkcije liganada serotoninskih (ziprazidon, aripiprazol) i imidazolinskih receptora (moksonidin) i njihovih strukturnih analoga. Srazmerno izraženijim lipofilnim karakteristikama, kod ziprazidona i aripiprazola uočava se porast  $\log k'$  vrednosti u RP i njihov pad u AQ-HILIC regionu. Takođe u slučaju ziprazidona i strukturno srodnih jedinjenja (Imp Z2, Imp Z3),  $\log k'$  vrednosti rastu sa porastom vrednosti parametra lipofilnosti ( $\log P$ ) tako da je  $\log k'(\text{Imp Z3}) < \log k'(\text{Imp Z2}) < \log k'(\text{ziprazidon})$  za  $\log P(\text{Imp Z3})=2,24 < \log P(\text{Imp Z2})=4,26 < \log P(\text{ziprazidon})=4,67$ .

Kako su N-oksidi polarna jedinjenja, može se smatrati da aripiprazol-N-oxid (Imp A7) u sistemu hidrofilnih interakcija, formira jače dipolne interakcije sa stacionarnom fazom u odnosu na dehidroaripiprazol (Imp A6) i aripiprazol. Posledično, u AQ-HILIC je  $\log k'(\text{aripiprazol}) < \log k'(\text{Imp A6}) < \log k'(\text{Imp A7})$ , dok je u RP-u redosled zadržavanja aripiprazola i njegovih nečistoća obrnut:  $\log k'(\text{aripiprazol}) > \log k'(\text{Imp A6}) > \log k'(\text{Imp A7})$ .

U slučaju liganada imidazolinskih receptora (derivata moksonidina) uočava se pad  $\log k'$  vrednosti u RP, ali i njihov porast u AQ-HILIC regionu. Tom prilikom, srazmerno rastućoj polarnosti derivata moksonidina, raste i njihovo zadržavanje na *mixed-mode* stacionarnoj fazi tj.  $\log k'(\text{Imp M2}) < \log k'(\text{moksonidin}) < \log k'(\text{Imp M1})$ .

Minimum  $\log k' = f(\varphi(aq))$  funkcije razdvaja sistem hidrofilnih od sistema reverzno-faznih interakcija. Uslovi u kojima dolazi do smene iz HILIC-a u RP mehanizam označeni su kao

*prevojna tačka* ( $\varphi_{\min}(\text{aq})$ ), i za svako ispitivano jedinjenje su određeni primenom jednačine (15) i jednačine (16). Dobljene  $\varphi_{\min}(\text{aq})$  vrednosti su prikazane u Tabeli 6.

Tabela 6. Regresioni koeficijenti ( $a_3$ ,  $m_3$  i  $m_4$ ) (jednačina (15)), prevojna tačka ( $\varphi_{\min}$  (aq)) (jednačina (16)) i AIC vrednosti (jednačina (20)) ispitivanih jedinjenja. Standardne devijacije parametara ( $a_3$ ,  $m_3$  and  $m_4$ ) su prikazane u zagradama.

Jedinjenje	$a_3$	$m_3$	$m_4$	$\varphi_{\min}$ (aq)	$R^2$	Adj $R^2$	$S.E$	$S$	$RSS$	$p$	AIC
Amilorid	-1,165 (0,08)	1,557 (0,10)	2,072 (0,08)	0,58	0,9956	0,9947	0,0205	0,9482	0,0806	2,31E-07	-20,0
Antazolin	-1,363 (0,14)	2,826 (0,20)	2,065 (0,13)	0,32	0,9553	0,9478	0,0535	0,7343	0,0344	8,01E-09	-42,6
Aripiprazol	-1,256 (0,11)	3,577 (0,17)	1,257 (0,09)	0,15	0,9867	0,9845	0,0357	1,1401	0,0153	5,42E-12	-54,7
Imp A1	-1,282 (0,26)	2,681 (0,34)	2,291 (0,27)	0,37	0,8826	0,8630	0,0624	0,3516	0,0468	2,62E-06	-38,0
Imp A2	-1,403 (0,15)	3,150 (0,19)	2,320 (0,14)	0,32	0,9661	0,9582	0,0323	0,2883	0,0104	5,15E-08	-49,8
Imp A3	-1,398 (0,13)	2,968 (0,19)	0,966 (0,11)	0,14	0,9816	0,9788	0,0498	1,7152	0,0322	5,29E-12	-47,9
Imp A4	-1,376 (0,06)	2,681 (0,09)	1,688 (0,06)	0,27	0,6694	0,5960	0,1363	0,1078	0,1672	0,006863	-11,2
Imp A5	-0,998 (0,25)	1,221 (0,37)	0,754 (0,22)	0,27	0,9244	0,9128	0,0260	2,0469	0,0088	5,14E-08	-68,7
Imp A6	-1,953 (0,17)	3,891 (0,25)	1,542 (0,15)	0,17	0,9594	0,9351	0,0969	0,7151	0,1220	7,52E-09	-26,6
Imp A7	-2,490 (0,11)	4,790 (0,15)	3,195 (0,11)	0,29	0,9900	0,9880	0,0256	0,6453	0,0065	1,01E-10	-55,9
Imp A8	-1,325 (0,16)	2,649 (0,23)	0,969 (0,14)	0,16	0,9594	0,9531	0,0602	1,1129	0,0472	9,12E-10	-41,8
Imp A9	-1,990 (0,34)	3,106 (0,45)	1,579 (0,31)	0,22	0,8139	0,7873	0,1580	1,5287	0,3496	7,74E-06	-11,8
Imp A10	-1,142 (0,12)	3,487 (0,18)	1,117 (0,10)	0,14	0,9869	0,9847	0,0394	1,3975	0,0186	5,17E-12	-51,8
Benazolin	-1,311 (0,13)	2,435 (0,16)	2,216 (0,13)	0,39	0,9688	0,9641	0,0430	0,7484	0,0241	1,61E-10	-52,6
Brimonidin	-0,946 (0,21)	1,587 (0,27)	1,293 (0,20)	0,35	0,7732	0,7354	0,0938	0,3603	0,1057	0,000136	-22,7
Cirazolin	-1,381 (0,07)	2,577 (0,09)	2,201 (0,07)	0,37	0,9900	0,9885	0,0221	0,6296	0,0063	9,72E-14	-74,0
Klonidin	-0,492 (0,11)	1,223 (0,13)	0,752 (0,10)	0,27	0,8982	0,8798	0,0470	0,2143	0,0243	3,48E-06	-43,3
Detomidin	-1,360 (0,10)	2,848 (0,13)	1,229 (0,09)	0,19	0,9883	0,9864	0,0407	1,6864	0,0199	2,52E-12	-50,8
Efaroksan	-1,482 (0,20)	2,498 (0,24)	2,297 (0,21)	0,40	0,9051	0,8906	0,0621	0,4780	0,0501	2,24E-07	-40,9
Gvanabenz	-0,871 (0,09)	2,122 (0,13)	1,303 (0,09)	0,27	0,9563	0,9490	0,0381	0,3817	0,0174	6,96E-09	-52,8
Gvanfacin	-0,968 (0,06)	2,062 (0,08)	1,006 (0,05)	0,21	0,9851	0,9828	0,0257	0,5656	0,0086	1,36E-12	-69,1
Harman	-0,947 (0,10)	2,405 (0,13)	0,986 (0,09)	0,18	0,9813	0,9786	0,0437	1,4009	0,0267	8,02E-13	-55,5
Harmin	-0,944 (0,11)	2,509 (0,16)	1,057 (0,11)	0,18	0,9767	0,9731	0,0502	1,3740	0,0328	2,46E-11	-47,6
Idazoksan	-2,771 (0,29)	3,508 (0,40)	3,740 (0,26)	0,46	0,9640	0,9589	0,1291	6,2525	0,2334	7,81E-11	-18,7
Metformin	-1,544 (0,16)	1,517 (0,19)	2,741 (0,15)	0,78	0,9891	0,9875	0,0722	6,6116	0,0731	1,87E-14	-34,8

Moksonidin	-0,751 (0,11)	1,151 (0,14)	1,120 (0,10)	0,42	0,9171	0,9053	0,0528	0,4322	0,0391	2,69E-08	-49,1
Imp M1	-1,002 (0,13)	1,430 (0,17)	0,791 (0,13)	0,24	0,8954	0,8780	0,0598	0,3677	0,0429	1,31E-06	-35,3
Imp M2	-0,687 (0,17)	1,123 (0,22)	1,534 (0,16)	0,59	0,9458	0,9368	0,0769	1,2382	0,0709	2,53E-08	-28,3
Imp M3	-1,857 (0,21)	2,012 (0,25)	3,052 (0,23)	0,66	0,9784	0,9754	0,0706	3,1678	0,0698	2,17E-12	-35,6
Imp M4	-2,661 (0,21)	2,783 (0,24)	3,609 (0,21)	0,56	0,9779	0,9748	0,0685	2,9088	0,0657	2,57E-12	-40,2
Nafazolin	-1,404 (0,11)	2,493 (0,14)	2,289 (0,11)	0,40	0,9722	0,9679	0,0306	0,0188	0,0122	7,66E-11	-58,2
Olanzapin	-1,162 (0,38)	3,208 (0,53)	1,818 (0,37)	0,25	0,8603	0,8293	0,0845	0,3962	0,0643	0,000142	-22,7
Oksimetazolin	-1,936 (0,12)	3,596 (0,16)	2,699 (0,13)	0,33	0,9782	0,9748	0,0355	0,6373	0,0139	6,46E-10	-51,1
Fentolamin	-1,920 (0,15)	3,370 (0,19)	2,638 (0,15)	0,34	0,9590	0,9532	0,0409	0,5492	0,0235	1,94E-10	-57,7
RX 821002	-0,798 (0,09)	1,620 (0,11)	1,054 (0,09)	0,28	0,9220	0,9090	0,0486	0,3349	0,0283	2,25E-07	-45,5
Sitagliptin	-1,594 (0,19)	2,838 (0,24)	1,774 (0,18)	0,27	0,9123	0,8998	0,0885	1,1415	0,1097	3,97E-08	-25,2
Tetrahidrozolin	-1,550 (0,18)	2,521 (0,21)	2,434 (0,18)	0,42	0,9377	0,9282	0,0532	0,5551	0,0368	1,45E-08	-37,4
Tizanidin	-0,807 (0,17)	1,612 (0,20)	0,849 (0,16)	0,23	0,8971	0,8814	0,0815	0,7542	0,0864	3,79E-07	-28,8
Trimazolin	-1,712 (0,20)	2,965 (0,25)	2,544 (0,21)	0,37	0,9273	0,9141	0,0615	0,5316	0,0417	5,47E-07	-35,7
Ksilometazolin	-1,828 (0,11)	3,751 (0,15)	2,534 (0,10)	0,29	0,9807	0,9777	0,0467	1,4431	0,0284	7,15E-12	-50,0
Ziprazidon	-1,833 (0,18)	4,214 (0,27)	1,651 (0,16)	0,17	0,9697	0,9650	0,0711	2,0993	0,0657	1,36E-10	-36,5
Imp Z2	-1,271 (0,12)	3,260 (0,19)	0,945 (0,10)	0,13	0,9875	0,9853	0,0384	1,2822	0,0162	3,35E-11	-49,0
Imp Z3	-1,699 (0,18)	3,267 (0,27)	1,224 (0,16)	0,16	0,9673	0,9960	0,0668	1,3193	0,0446	3,74E-08	-30,9

$R^2$ : koeficijent determinacije,  $AdjR^2$ : prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$ : standardna greška,  $S$ : regresioni zbir kvadrata,  $RSS$ : rezidualni zbir kvadrata,  $p$ : statistička značajnost,  $AIC$ : Akaike-ov informacijski kriterijum.

Velike varijacije u vrednostima prevojne tačke ( $\varphi_{\min}(\text{aq})$ ) potvrđuju da fizičko-hemijske karakteristike (npr. lipofilnost) ispitivanog jedinjenja utiču na retencioni mehanizam. Uočava se da jedinjenja sa izraženim lipofilnim karakteristikama, npr. Imp Z2 ( $\log D = 4,42$ ) imaju manje  $\varphi_{\min}(\text{aq})$  vrednosti u poređenju sa polarnim jedinjenjima, npr. metformin ( $\log D = -5,74$ ) (Tabela 6).

Na osnovu dobijenih  $\varphi_{\min}(\text{aq})$  vrednosti, za svako jedinjenje određeni su regioni u kojima dominiraju HILIC i RP interakcije. Odabrani AQ-HILIC i RP regioni su predstavljeni u Tabeli 7.

Tabela 7. Zapreminski udeo vodenog konstituenta mobilne faze u RP i AQ-HILIC regionima.

Jedinjenje	RP region	AQ-HILIC region	Ukupni region
Amilorid	0,75; 0,7; 0,65; 0,625; 0,6	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,125	0,75; 0,70; 0,65; 0,625; 0,6, 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,125; 0,10
Antazolin	0,7; 0,675; 0,65; 0,625; 0,6	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,70; 0,675; 0,65; 0,625; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,05
Aripiprazol	0,6; 0,55; 0,5; 0,45; 0,4	0,175; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,2; 0,175; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp A1	0,7; 0,675; 0,65; 0,625; 0,6	0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125	0,70; 0,675; 0,65; 0,625; 0,60; 0,55; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Imp A2	0,675; 0,65; 0,55; 0,5; 0,45	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,675; 0,65; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Imp A3	0,6; 0,55; 0,50; 0,45; 0,4	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp A4	0,6; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075	0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp A5	0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50	0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075	0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp A6	0,6 0; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp A7	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10	0,70; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Imp A8	0,6 0; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp A9	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,90; 0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp A10	0,55; 0,50; 0,475; 0,45; 0,40	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,625; 0,55; 0,50; 0,475; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Benazolin	0,75; 0,7; 0,675; 0,65; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,80; 0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075
Brimonidin	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60	0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,10	0,90; 0,80; 0,75; 0,675; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,10; 0,05
Cirazolin	0,7; 0,675; 0,65; 0,625; 0,60	0,3, 0,25, 0,225, 0,2, 0,15	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,625; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075
Klonidin	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,10; 0,05
Detomidin	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Efaroksan	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60	0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10	0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Gvanabenz	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,125	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,125; 0,10; 0,05
Gvanfacin	0,75; 0,7; 0,675; 0,65; 0,60	0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Harman	0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,50	0,175; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05

Harmin	0,80; 0,75; 0,7; 0,65; 0,60	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Idazoksan	0,75; 0,70; 0,675; 0,625; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,75; 0,70; 0,675; 0,625; 0,60; 0,40; 0,35; 0,325; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Metformin	0,95; 0,90; 0,875; 0,85; 0,80	0,25; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10	0,95; 0,90; 0,875; 0,85; 0,8; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,25; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,05
Moksonidin	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp M1	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60	0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,05	0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,3; 0,225; 0,20; 0,15; 0,10; 0,15; 0,05
Imp M2	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,05
Imp M3	0,95; 0,90; 0,85; 0,80; 0,75	0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15	0,95; 0,90; 0,85; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Imp M4	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60	0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15	0,95; 0,85; 0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15; 0,125; 0,10
Nafazolin	0,75; 0,7; 0,675; 0,65; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175	0,80; 0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15; 0,10
Olanzapin	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,25; 0,2; 0,15; 0,125; 0,1	0,70; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Oksimetazolin	0,80; 0,75; 0,7; 0,65; 0,60	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Fentolamin	0,70; 0,675; 0,65; 0,625; 0,60	0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15	0,80; 0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,625; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15; 0,125; 0,10
RX 821002	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,6	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,875; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,05
Sitagliptin	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60	0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15	0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15; 0,125; 0,05
Tetrahidrozolin	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,625	0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15	0,75; 0,70; 0,675; 0,65; 0,625; 0,60; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,2; 0,15; 0,125; 0,1
Tizanidin	0,90; 0,85; 0,80; 0,75; 0,70	0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,10	0,95; 0,9; 0,85; 0,8; 0,75; 0,7; 0,65; 0,55; 0,4; 0,3; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,10
Trimazolin	0,90; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65	0,30; 0,275; 0,25; 0,225; 0,20	0,9; 0,8; 0,75; 0,70; 0,65; 0,55; 0,30; 0,275; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10
Ksilometazolin	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60	0,20; 0,175; 0,15; 0,125; 0,10	0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,50; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15; 0,125; 0,10; 0,05
Ziprazidon	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,175; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075	0,70; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,175; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp Z2	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,225; 0,20; 0,15; 0,125; 0,10; 0,075; 0,05
Imp Z3	0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40	0,25; 0,20; 0,15; 0,075; 0,05	0,70; 0,65; 0,6; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,075; 0,05

U AQ-HILIC i RP regionima, ispitana je primenljivost particionog (jednačina (13)) i adsorpcionog (jednačina (14)) modela u opisivanju retencionog ponašanja (Tabela 8). Na osnovu rezultata u Tabeli 8, može se uočiti da dobijeni retencioni modeli imaju visoke vrednosti koeficijenata determinacije ( $R^2 > 0,90$ ). Pored  $R^2$  vrednosti, korišćenjem *Akaike* informacionog kriterijuma (jednačina (20)) dodatno su kvantifikovane razlike u primenljivosti particione i adsorpcione jednačine za opisivanje HILIC retencije [198]. Tom prilikom, niže AIC vrednosti ukazuju na pouzdaniju primenu i bolje uklapanje retencionih podataka u testirani model. Na osnovu nižih AIC vrednosti, može se zaključiti da particioni model bolje opisuje HILIC retenciono ponašanje u odnosu na adsorpcioni model, posebno kod derivata piperazina i strukturno srodnih jedinjenja (Tabela 8).

Tabela 8. Regresioni koeficijenti dobijeni primenom jednačine (13) i jednačine (14) predstavljeni sa AIC vrednostima (jednačina (20)) za AQ-HILIC i RP regione.

Jedinjenje	$\log k = \log k_w^{\text{RP}}(\text{aq}) - m_1 \varphi(\text{org})$						$\log k = \log k_w^{\text{AQ-HILIC}}(\text{org}) - m_1 \varphi(\text{aq})$						$\log k = \log k_b^{\text{AQ-HILIC}}(\text{aq}) - m_2 \log \varphi(\text{aq})$					
	$\log k_w^{\text{RP}}(\text{aq})$	$m_1$	$R^2$	Adj $R^2$	S.E	AIC	$\log k_w^{\text{AQ-HILIC}}(\text{org})$	$m_1$	$R^2$	Adj $R^2$	S.E	AIC	$\log k_b^{\text{AQ-HILIC}}(\text{aq})$	$m_2$	$R^2$	Adj $R^2$	S.E	AIC
Amilorid	0,34	0,31	0,9341	0,9121	0,0057	-36,1	1,07	2,35	0,9952	0,9936	0,0105	-29,9	-0,22	1,16	0,9887	0,9849	0,0162	-25,6
Antazolin	1,54	1,91	0,9426	0,9235	0,0215	-22,8	0,95	1,49	0,9778	0,9704	0,0145	-26,7	0,12	0,75	0,9945	0,9927	0,0072	-33,7
Aripiprazol	2,33	2,64	0,9305	0,9073	0,0659	-11,6	0,44	0,75	0,9985	0,9980	0,0013	-50,8	0,16	0,20	0,9778	0,9705	0,0051	-37,2
Imp A1	1,55	1,88	0,9674	0,9565	0,0157	-25,9	1,40	2,36	0,9517	0,9356	0,0318	-18,9	0,22	0,99	0,9762	0,9682	0,0223	-22,4
Imp A2	1,47	1,13	0,9881	0,9841	0,0138	-27,2	1,21	1,70	0,9913	0,9884	0,0103	-30,2	0,27	0,84	0,9748	0,9664	0,0175	-24,8
Imp A3	1,55	7,41	0,9944	0,9925	0,0166	-25,4	-0,05	0,35	0,9738	0,9651	0,0026	-43,7	-0,16	0,07	0,9369	0,9159	0,0041	-39,3
Imp A4	-0,88	2,55	0,9954	0,9939	0,0159	-25,8	0,77	1,48	0,8901	0,8534	0,0289	-19,8	0,16	0,45	0,9632	0,9509	0,0167	-25,3
Imp A5	0,31	1,00	0,9769	0,9693	0,0141	-27,0	0,04	1,33	0,9937	0,9915	0,0059	-35,7	-0,49	0,39	0,9676	0,9567	0,0134	-27,5
Imp A6	1,71	2,67	0,9870	0,9826	0,0280	-20,1	0,18	1,39	0,9967	0,9956	0,0036	-40,6	-0,25	0,29	0,9885	0,9847	0,0068	-34,3
Imp A7	2,06	2,33	0,9754	0,9672	0,0339	-18,2	1,53	4,06	0,9404	0,9205	0,0612	-12,3	-0,33	1,49	0,9802	0,9736	0,0352	-17,8
Imp A8	1,21	1,92	0,9925	0,9900	0,0152	-26,3	0,00	0,57	0,9989	0,9986	0,0009	-55,0	-0,18	0,12	0,9703	0,9605	0,0045	-38,5
Imp A9	0,47	1,03	0,9907	0,9876	0,0091	-31,3	0,09	1,30	0,9930	0,9907	0,0050	-37,4	-0,32	0,27	0,9510	0,9347	0,0132	-27,7
Imp A10	2,13	2,45	0,9904	0,9871	0,0156	-26,0	0,48	1,17	0,9123	0,8830	0,0165	-25,4	0,10	0,25	0,9780	0,9707	0,0083	-32,3
Benazolin	1,12	1,34	0,9955	0,9940	0,0058	-35,9	1,18	2,11	0,9942	0,9923	0,0104	-30,0	0,02	1,05	0,9925	0,9900	0,0118	-28,8
Brimonidin	0,45	0,56	0,9808	0,9744	0,0050	-37,3	0,59	1,30	0,9774	0,9698	0,0138	-27,2	-0,02	0,49	0,9744	0,9658	0,0147	-26,6
Cirazolin	1,27	1,62	0,9928	0,9904	0,0063	-35,1	1,02	1,07	0,9863	0,9817	0,0127	-28,0	0,10	0,83	0,9912	0,9883	0,0102	-30,2
Klonidin	0,62	0,59	0,8869	0,8492	0,0192	-23,9	0,36	0,28	0,9632	0,9510	0,0036	-40,7	0,20	0,14	0,9185	0,8913	0,0053	-36,7
Detomidin	1,63	2,68	0,9903	0,9871	0,0242	-21,6	0,41	2,11	0,9601	0,9468	0,0196	-23,7	-0,26	0,45	0,9844	0,9792	0,0123	-28,4
Efaroksan	0,81	0,79	0,9760	0,9680	0,0080	-32,6	1,30	3,15	0,9905	0,9873	0,0185	-24,3	-0,13	1,13	0,9942	0,9922	0,0145	-26,7
Gvanabenz	1,45	2,03	0,9972	0,9962	0,0070	-34,0	0,68	0,90	0,9457	0,9276	0,0161	-25,6	-0,17	1,23	0,9630	0,9856	0,0072	-33,7
Gvanfacin	1,22	1,92	0,9995	0,9993	0,0029	-43,0	0,36	1,01	0,9990	0,9987	0,0018	-47,8	-0,02	0,29	0,9750	0,9666	0,0088	-31,7
Harman	1,57	2,10	0,9931	0,9908	0,0195	-23,7	0,46	1,53	0,9839	0,9786	0,0089	-31,6	-0,10	0,41	0,9565	0,9421	0,0147	-26,6
Harmin	1,75	2,56	0,9629	0,9506	0,0458	-15,2	0,01	1,46	0,9917	0,9889	0,0061	-35,3	0,09	0,30	0,9672	0,9563	0,0122	-28,5
Idazoksan	0,30	0,25	0,8670	0,8228	0,0067	-34,4	0,81	1,36	0,9818	0,9758	0,0119	-28,7	0,07	0,66	0,9466	0,9288	0,0204	-23,3

Metformin	0,07	1,24	0,9824	0,9766	0,0107	-29,7	1,63	4,72	0,9454	0,9272	0,0679	-11,3	-0,52	1,72	0,9718	0,9624	0,0488	-14,6
Moksonidin	0,23	0,14	0,9970	0,9961	0,0005	-60,2	0,42	0,73	0,9831	0,9775	0,0062	-35,2	0,02	0,36	0,9654	0,9538	0,0089	-31,6
Imp M1	0,42	1,12	0,9730	0,9908	0,0195	-23,7	0,08	1,10	0,9967	0,9955	0,0041	-39,3	-0,32	0,27	0,9662	0,9549	0,0131	-27,7
Imp M2	0,37	0,23	0,8459	0,7945	0,0089	-31,6	1,08	2,23	0,9957	0,9943	0,0094	-31,0	-0,15	1,10	0,9844	0,9792	0,0181	-24,5
Imp M3	0,33	1,75	0,8907	0,8542	0,0561	-13,2	1,62	4,43	0,9969	0,9959	0,0113	-29,2	-0,68	2,00	0,9978	0,9971	0,0095	-31,0
Imp M4	-0,13	0,17	0,7545	0,6726	0,0088	-31,7	1,37	4,42	0,9912	0,9883	0,0190	-24,0	-0,92	1,99	0,9916	0,9889	0,0185	-24,3
Nafazolin	1,05	1,23	0,9900	0,9866	0,0080	-32,7	1,07	1,79	0,9732	0,9643	0,0165	-25,4	0,03	0,97	0,9898	0,9864	0,0102	-30,3
Olanzapin	1,45	1,00	0,9749	0,9666	0,0147	-26,6	0,98	0,82	0,9868	0,9824	0,0066	-34,6	0,60	0,31	0,9628	0,9504	0,0111	-29,4
Oksimetazolin	1,74	2,47	0,9876	0,9834	0,0253	-21,1	1,04	1,69	0,9932	0,9910	0,0090	-31,5	0,11	0,84	0,9951	0,9935	0,0077	-33,1
Fentlamin	1,31	1,66	0,8872	0,8496	0,0270	-20,5	1,01	1,90	0,9825	0,9767	0,0116	-29,0	0,02	0,86	0,9895	0,9861	0,0089	-31,6
RX 821002	0,73	0,89	0,9342	0,9123	0,0216	-22,7	0,33	0,26	0,9106	0,8808	0,0052	-37,0	0,19	0,12	0,8490	0,7987	0,0067	-34,4
Sitagliptin	1,20	1,99	0,9952	0,9937	0,0126	-28,1	0,40	0,76	0,9817	0,9756	0,0047	-37,9	0,01	0,34	0,9689	0,9586	0,0062	-35,2
Tetrahidrozolin	0,65	0,35	0,9646	0,9528	0,0037	-40,2	1,09	2,04	0,9890	0,9853	0,0139	-27,1	-0,04	1,01	0,9872	0,9830	0,0150	-26,4
Tizanidin	1,36	2,17	0,8803	0,9926	0,0066	-34,6	0,23	0,41	0,9933	0,9910	0,0023	-45,0	0,04	0,90	0,9903	0,9952	0,0017	-48,1
Trimazolin	0,87	1,81	0,9311	0,8404	0,0887	-8,6	0,99	1,60	0,9961	0,9948	0,0046	-38,3	0,04	0,15	0,9964	0,9871	0,0072	-33,7
Ksilometazolin	2,07	2,92	0,9913	0,9884	0,0250	-21,3	1,55	4,53	0,9762	0,9682	0,0323	-18,7	-0,40	1,51	0,9836	0,9781	0,0268	-206
Ziprazidon	-0,67	278	0,9971	0,9963	0,0134	-27,5	0,37	1,11	0,9839	0,9839	0,0056	-36,2	-0,04	0,30	0,9491	0,9322	0,0115	-29,1
Imp Z2	1,95	2,60	0,9913	0,9884	0,0222	-22,4	0,08	0,32	0,9684	0,9579	0,0026	-43,7	-0,02	0,07	0,9123	0,9579	0,0026	-43,7
Imp Z3	0,06	1,16	0,8969	0,9960	0,0108	-29,7	0,06	1,16	0,8969	0,8626	0,0379	-17,1	-0,40	0,32	0,8512	0,8016	0,0456	-15,3

$p < 0,05$

$R^2$ : koeficijent determinacije,  $AdjR^2$ : prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$ : standardna greška, AIC: Akaike-ov informacijski kriterijum.



#### 4.1.2. Uticaj ukupne polarnosti mobilne faze na retenciono ponašanje

Osnovna podela na HILIC i RP sisteme određena je polarnošću mobilne i stacionarne faze. Polarna mobilna i polarna stacionarna faza odgovaraju HILIC, dok smanjena polarnost mobilne faze utiče na pojavu interakcija karakterističnih za RP sistem. Na osnovu toga, ukupna polarnost mobilne faze je značajna fizičko-hemijska karakteristika koja određuje vrstu retencionog ponašanja na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi. Kako bi se matematički definisao uticaj ukupne polarnosti na promenu retencije liganada serotoninskih i imidazolinskih receptora i srodnih jedinjenja, po analogiji sa *multi-modal* jednačinom (15), predložena je jednačina (32):

$$\log k = a_3' + m_3' P_{\text{tot}} - m_4' \log P_{\text{tot}} \quad (32)$$

gde  $\log k$  predstavlja logaritam retencionog faktora.  $\log P_{\text{tot}}$  je ukupni indeks polarnosti mobilne faze. Vrednost parametra  $P_{\text{tot}}$  je izračunata na osnovu zapreminskih udela modifikatora u mobilnoj fazi korišćenjem jednačine (19) (Tabela 9). Parametri  $a_3'$ ,  $m_3'$  i  $m_4'$  su regresioni koeficijenti koji kvantifikuju uticaj ukupnog indeksa polarnosti na retenciju ispitivanih jedinjenja u RP i AQ-HILIC sistemima.

Primenljivost jednačine (32) u opisivanju retencionog ponašanja na *mixed-mode* stacionarnoj fazi okarakterisana je visokim vrednostima koeficijenata determinacije ( $R^2$ ) i niskim AIC vrednostima (Tabela 9). Na osnovu toga, može se zaključiti da je predložena  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  funkcija, pogodnija za opisivanje retencije u preko 50% testiranih jedinjenja u poređenju sa standardnom  $\log k = f(\varphi_{\text{min}}(\text{aq}))$  funkcijom (Tabela 9, Tabela 6). S obzirom da ukupni indeks polarnosti utiče na jačinu rastvarača, tumačenje retencije u HILIC i RP sistemu u funkciji  $P_{\text{tot}}$  je preciznije i značajnije za razumevanje retencionih mehanizama koji određuju osnovne karakteristike retencionog ponašanja [222-223].

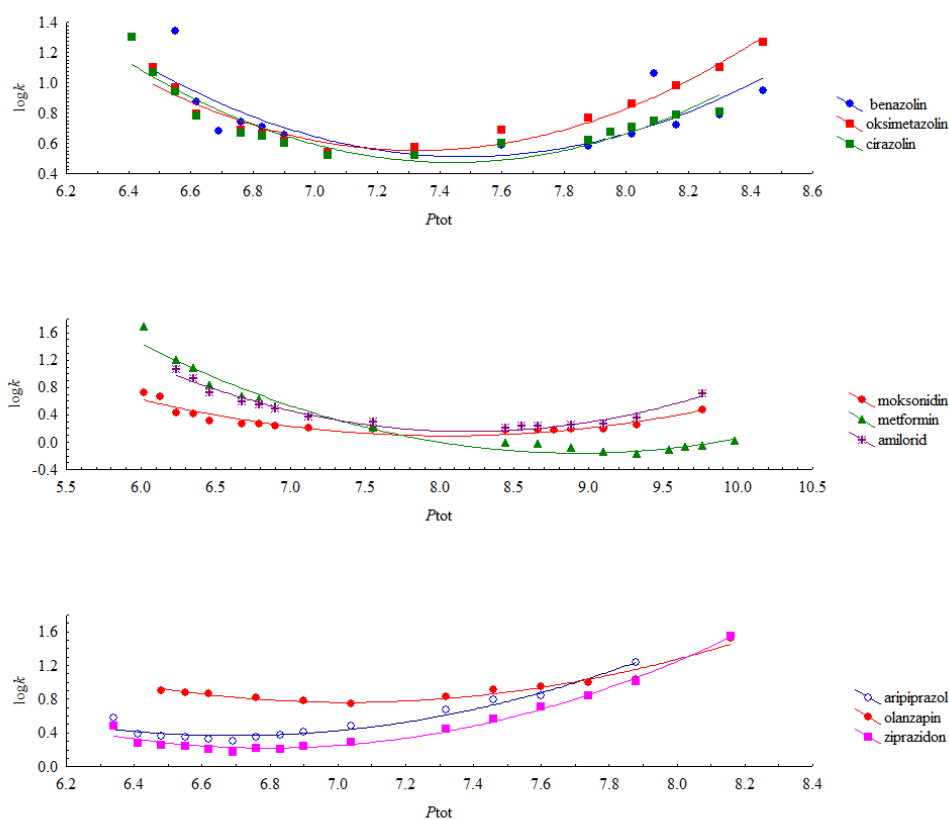
Na Slici 37 su prikazane  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  zavisnosti derivata piperazina (liganada serotoninskih receptora) i derivata imidazolina/gvanidina (liganada imidazolinskih receptora).

Tabela 9. Dobijene vrednosti regresionih koeficijenata ( $a_3'$ ,  $m_3'$  and  $m_4'$ ) (jednačina (32)),  $P_{\min}$  (jednačina (33)),  $P_{\text{tot}}(\varphi_{\min}(\text{aq}))$  (jednačina (19)) i vrednosti AIC koeficijenta (jednačina (20)). Standardne devijacije regresionih koeficijenta ( $a_3'$ ,  $m_3'$  and  $m_4'$ ) su prikazane u zagradama.

Jedinjenje	$a_3'$	$m_3'$	$m_4'$	$P_{\min}$	$P_{\text{tot}}(\varphi_{\min}(\text{aq}))$	$R^2$	Adj $R^2$	$S.E.$	$S$	$RSS$	$p$	AIC
Amilorid	27,020 (2,51)	2,983 (0,32)	56150 (5,60)	8,17	8,34	0,9752	0,9702	0,0488	0,9357	0,0238	9,38E-09	-34,6
Antazolin	36,984 (3,02)	4,803 (0,41)	82,888 (6,96)	7,49	7,20	0,9233	0,9105	0,0701	0,7097	0,059	2,04E-07	-34,5
Aripiprazol	23,143 (2,90)	3,919 (0,42)	59,361 (6,93)	6,57	6,47	0,9695	0,9644	0,0542	1,1202	0,0352	8,04E-10	-42,2
Imp A1	30,70 (2,57)	3,813 (0,34)	67,010 (5,86)	7,63	7,43	0,9247	0,9122	0,0500	0,3683	0,0300	1,82E-07	-44,7
Imp A2	28,915 (3,25)	3,775 (0,44)	64,546 (7,48)	7,42	7,21	0,8817	0,8580	0,0595	0,2634	0,0354	2,32E-05	-33,9
Imp A3	15,565 (0,91)	2,798 (0,13)	41,652 (2,12)	6,46	6,42	0,9961	0,9955	0,0228	1,7407	0,0067	2,06E-16	-72,9
Imp A4	13,119 (0,58)	1,857 (0,08)	31,190 (1,37)	7,29	7,00	0,9235	0,9065	0,0147	0,1139	0,0028	2,93E-11	-60,3
Imp A5	27,452 (1,23)	4,441 (0,17)	69,322 (2,89)	6,77	6,98	0,9942	0,9934	0,0310	2,1564	0,0125	2,78E-15	-63,1
Imp A6	20,606 (4,24)	3,224 (0,60)	50,405 (9,99)	6,79	6,56	0,8901	0,8701	0,0866	0,6680	0,0825	5,33E-06	-32,9
Imp A7	37,819 (4,14)	5,187 (0,56)	86,926 (9,57)	7,27	7,07	0,9086	0,8903	0,0772	0,5923	0,0596	6,39E-06	-27,1
Imp A8	16,844 (0,77)	2,832 (0,11)	43,467 (1,81)	6,66	6,50	0,9958	0,9951	0,0194	1,1552	0,0049	3,68E-16	-78,1
Imp A9	23,817 (1,28)	3,503 (0,24)	57,477 (4,15)	7,12	6,77	0,9639	0,9587	0,0696	1,8105	0,0678	7,99E-11	-39,7
Imp A10	20,483 (1,28)	3,595 (0,18)	53,513 (3,06)	6,46	6,41	0,9946	0,9936	0,0253	1,4084	0,0077	2,60E-14	-65,0
Benazolin	29,922 (2,08)	3,583 (0,27)	64,333 (4,71)	7,79	7,54	0,9473	0,9392	0,0559	0,7318	0,0407	4,89E-09	-44,2
Brimonidin	19,842 (2,06)	2,430 (0,26)	43,329 (4,60)	7,74	7,36	0,8725	0,8529	0,0678	0,4093	0,0598	1,53E-06	-30,7
Cirazolin	30,058 (3,03)	3,704 (0,40)	65,544 (6,90)	7,68	7,43	0,8934	0,8770	0,0722	0,5681	0,0678	4,79E-07	-36,0
Klonidin	10,885 (1,44)	1,436 (0,18)	24,449 (3,21)	7,39	6,97	0,9026	0,8849	0,0460	0,2153	0,0232	2,73E-06	-43,9
Detomidin	18,787 (0,95)	2,920 (0,12)	46,291 (2,11)	6,88	6,62	0,9947	0,9938	0,0274	1,6926	0,0090	2,16E-14	-62,8
Efaroksan	24,501 (1,54)	2,894 (0,19)	52,314 (3,39)	7,85	7,56	0,9492	0,9414	0,0454	0,5013	0,0268	3,88E-09	-50,8
Gvanabenz	21,272 (1,63)	2,879 (0,22)	48,489 (3,75)	7,31	6,97	0,9429	0,9341	0,0427	0,3920	0,0237	8,27E-09	-48,2
Gvanfacin	15,873 (1,23)	2,352 (0,16)	38,075 (2,83)	7,03	6,73	0,9747	0,9708	0,0335	0,5596	0,0145	4,21E-11	-60,6
Harman	13,227 (2,08)	2,139 (0,27)	33,042 (4,75)	6,70	6,58	0,9607	0,9551	0,0633	1,3715	0,0561	1,45E-10	-42,9
Harmin	16,119 (0,82)	2,506 (0,11)	39,431 (1,87)	6,83	6,60	0,9943	0,9934	0,0248	1,3988	0,0080	2,61E-15	-70,2
Idazoksan	58,604 (8,72)	6,894 (1,16)	126,039 (19,97)	7,93	7,84	0,8601	0,8402	0,2546	5,5787	0,9072	1,05E-06	4,4
Metformin	34,534 (4,99)	3,388 (0,61)	68,327 (10,96)	8,75	9,25	0,9296	0,9196	0,1833	6,2144	0,4703	8,53E-09	-5,0

Moksonidin	16,642 (1,82)	1,939 (0,23)	35,501 (4,07)	7,95	7,66	0,8888	0,8716	0,0623	0,4028	0,0504	6,32E-07	-44,7
Imp M1	12,001 (0,73)	1,702 (0,09)	28,496 (1,63)	7,27	6,86	0,9836	0,9808	0,0237	0,4039	0,0067	1,96E-11	-61,2
Imp M2	24,791 (1,54)	2,686 (0,19)	50,995 (3,45)	8,24	8,41	0,9770	0,9731	0,0501	1,2790	0,0301	1,49E-10	-40,2
Imp M3	32,262 (1,82)	3,259 (0,22)	64,591 (3,97)	8,60	8,70	0,9849	0,9828	0,0590	31889	0,0488	1,76E-13	-41,3
Imp M4	36,817 (2,03)	3,905 (0,24)	75,648 (4,43)	8,41	8,28	0,9796	0,9767	0,0659	2,9138	0,0607	1,48E-12	-41,6
Nafazolin	26,387 (2,10)	3,153 (0,27)	56,624 (4,69)	7,79	7,55	0,9318	0,9204	0,0497	0,4042	0,0296	1,01E-07	-44,9
Olanzapin	24,038 (2,93)	3,447 (0,39)	56,103 (6,74)	7,06	6,88	0,9387	0,9264	0,0546	0,4555	0,0298	8,68E-07	-31,9
Oksimetazolin	30,200 (1,93)	3,892 (0,25)	67,244 (4,34)	7,50	7,23	0,9577	0,9512	0,0463	0,6299	0,0278	1,18E-09	-41,4
Fentolamin	29,646 (1,92)	3,781 (0,24)	65,768 (4,32)	7,55	7,30	0,9479	0,9404	0,0462	0,5428	0,0299	1,05E-09	-53,6
RX 821002	14,993 (1,90)	1,968 (0,24)	33,743 (4,24)	7,44	7,04	0,8844	0,8651	0,0591	0,3212	0,0420	2,38E-06	-39,6
Sitagliptin	25,139 (2,00)	3,374 (0,25)	57,455 (4,49)	7,39	6,99	0,9450	0,9371	0,0701	1,1823	0,0689	1,53E-09	-32,2
Tetrahidrozolin	26,207 (2,84)	3,057 (0,37)	55,658 (6,39)	7,90	7,64	0,9319	0,9195	0,0551	0,4561	0,0334	3,84E-07	-38,8
Tizanidin	11,795 (1,56)	1,660 (0,18)	27,561 (3,41)	7,20	6,81	0,9480	0,9400	0,0580	0,7969	0,0437	4,49E-09	-39,0
Trimazolin	27,822 (2,22)	3,372 (0,27)	60,169 (4,89)	7,75	7,44	0,9347	0,9228	0,0583	0,5358	0,0374	3,04E-07	-37,2
Ksilometazolin	38,309 (3,06)	5,019 (0,46)	86,146 (8,12)	7,45	7,09	0,9075	0,8932	0,1023	1,3353	0,1362	1,91E-07	-24,9
Ziprazidon	28,247 (1,78)	4,600 (0,25)	71,250 (4,18)	6,72	6,55	0,9888	0,9871	0,0432	2,1408	0,0242	2,07E-13	-52,5
Imp Z2	17,673 (1,27)	3,269 (0,18)	47,835 (3,03)	6,35	6,35	0,9954	0,9945	0,0234	1,2924	0,0060	1,48E-13	-62,8
Imp Z3	19,300 (2,59)	3,250 (0,36)	49,883 (6,04)	6,66	6,52	0,9718	0,9662	0,0620	1,3255	0,0384	1,77E-08	-32,8

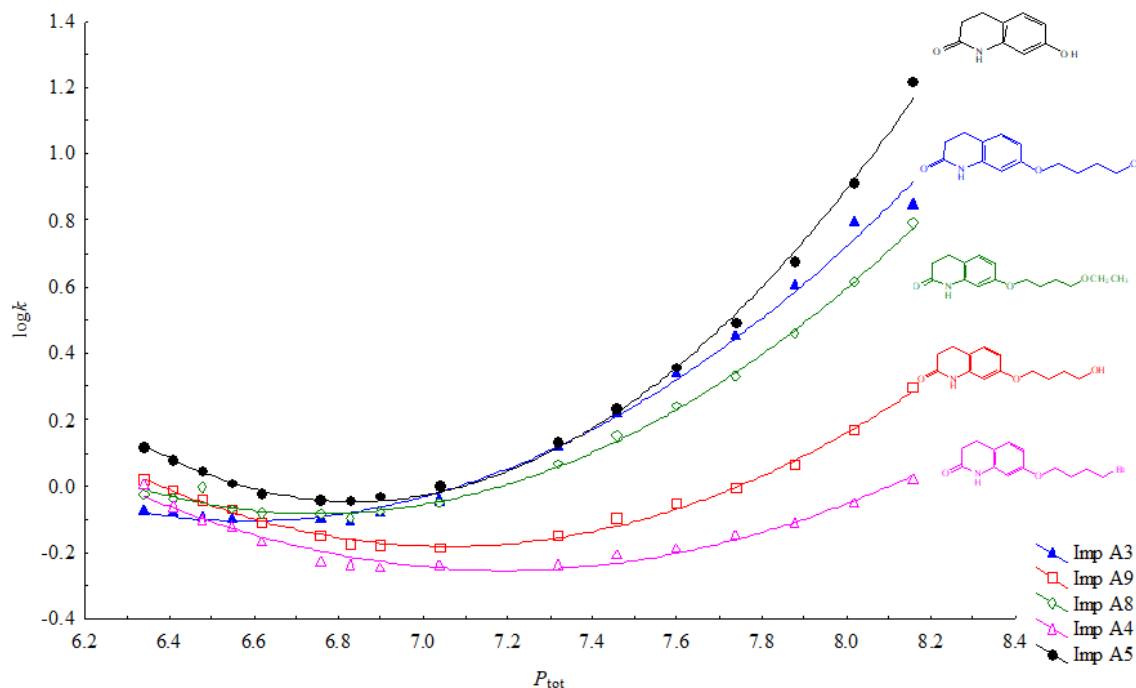
$R^2$ : koeficijent determinacije,  $AdjR^2$ : prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$ : standardna greška,  $S$ : regresioni zbir kvadrata,  $RSS$ : rezidualni zbir kvadrata,  $p$ : statistička značajnost, AIC: Akaike-ov informacijski kriterijum.

Slika 37. Reprezentativni  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  grafici.

Grafici zavisnosti retencije od ukupne polarnosti mobilne faze derivata imidazolina (benazolin, oksimetazolin, cirazolin) imaju simetričan U-oblik koji ukazuje na sličnosti retencionog ponašanja u AQ-HILIC i RP sistemima. U saglasnosti sa povećanim stepenom jonizacije u kiselim hromatografskim uslovima, kod derivata gvanidina (metformin, amilorid) je povećana retencija u AQ-HILIC regionima. U suprotnosti, derivati piperazina (aripiprazol, olanzapin, ziprazidon), imaju izraženije lipofilne osobine i povećano zadržavanje u RP uslovima (Slika 37).

Pored značajnog uticaja parametra lipofilnosti na retenciono ponašanje na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi, razlike u retencionim karakteristikama su često posledica i građenja vodoničnih veza i prisustva dipolnih interakcija.

Na Slici 38 je prikazan grafik  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  funkcije strukturnih derivata 3,4-dihidro-2(1H)-hinolina.



Slika 38. Grafici  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  funkcije strukturnih derivata 3,4-dihidro-2(1H)-hinolina.

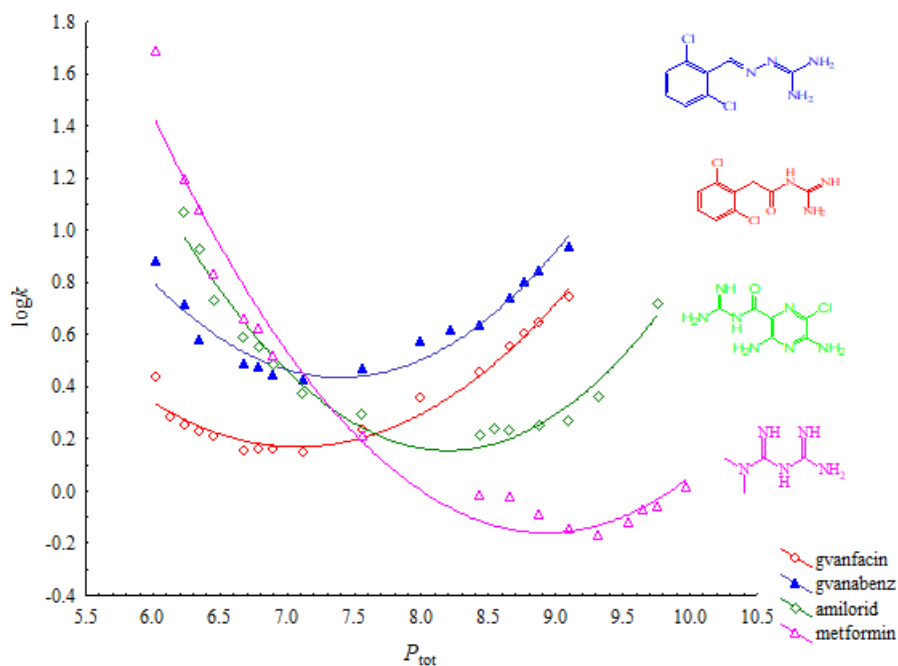
Sa Slike 38, može se uočiti da su vrednosti retencionog faktora strukturnih derivata 3,4-dihidro-2(1H)-hinolina veće u RP, u odnosu na AQ-HILIC region. Male strukturne razlike, kao što su promene u elektron donor/akceptorskim karakteristikama supstituenta u položaju 7 hinolinskog heterociklusa, značajno utiču na retencione karakteristike:

- $\log k(\text{Imp A4})$ , derivat 7-(4-bromobutoksi)hinolina,  $< \log k(\text{Imp A3})$ , derivat 7-(4-hlorobutoksi)hinolina
- $\log k(\text{Imp A9})$ , derivat 7-(4-hidroksibutoksi)hinolina,  $< \log k(\text{Imp A8})$ , derivat 7-(4-etoksibutoksi)hinolina
- najjače interakcije sa stacionarnom fazom i najviše vrednosti parametra  $\log k$  postiže Imp A5, derivat 7-hidroksihinolina.

Dipolni momenat C-Cl hemijske veze je veći u odnosu na dipolni momenat C-Br hemijske veze, zbog čega Imp A3 formira jače dipol-dipol interakcije sa stacionarnom fazom u odnosu na Imp A4. Pored toga, elektronski parovi halogena u strukturi Imp A3 i Imp A4 učestvuju u građenju vodoničnih veza u hromatografskom sistemu.

Proizvod etilovanja nečistoće Imp A9 je nečistoća Imp A8, koja se saglasno većoj lipofilnosti i duže zadržava u RP regionu. Nasuprot tome, nečistoća Imp 5, koja ima najnižu lipofilnost, postiže najveće vrednosti retencionog parametra.

Uticaj prirode aromatičnog heterociklusa na retenciono ponašanje u *mixed-mode* HILIC/RP uslovima je prikazan na Slici 39.

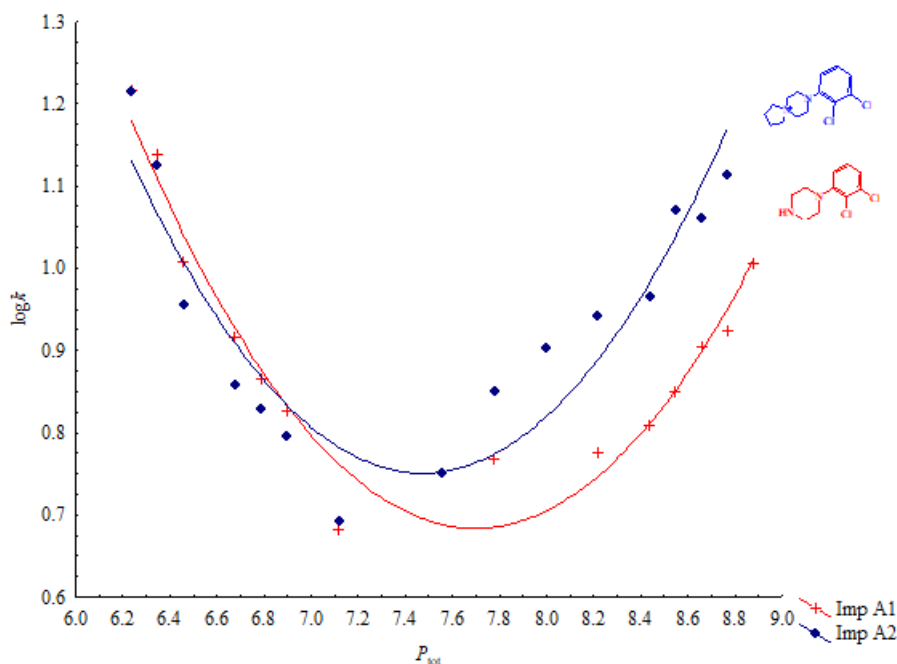


Slika 39. Grafici  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  funkcije strukturnih derivata gvanidina.

Sa Slike 39, lipofilne karakteristike nemaju dominantan uticaj na retenciono ponašanje derivata gvanidina s obzirom da je:  $\log k(\text{gvanabenz}) > \log k(\text{gvanfacin}) > \log k(\text{amilorid}) > \log k(\text{metformin})$  i  $\text{milogP}(\text{gvanabenz})=1,74 > \text{milogP}(\text{gvanfacin})=1,56 > \text{milogP}(\text{metformin})=-1,13 > \text{milogP}(\text{amilorid})=-1,24$ .

Na osnovu vrednosti ARR deskriptora koji matematički definiše aromatičnost molekula ( $\text{ARR}(\text{metformin})=0,000$ ;  $\text{ARR}(\text{amilorid})=0,400$ ;  $\text{ARR}(\text{gvanfacin})=0,400$ ;  $\text{ARR}(\text{gvanabenz})=0,429$ ), kao i broja akceptorskih mesta vodonika ( $\text{nH}(\text{metformin})=6$ ;  $\text{nH}(\text{amilorid})=8$ ;  $\text{nH}(\text{gvanfacin})=4$ ;  $\text{nH}(\text{gvanabenz})=4$ ), može se pretpostaviti da strukturne karakteristike u kombinaciji sa proton akceptorskim/donorskim osobinama određuju retenciono ponašanje strukturnih derivata gvanidina.

Na Slici 40 su prikazani grafici  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  funkcije strukturnih derivata N-fenilpiperazina.



Slika 40. Grafici  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  funkcije strukturnih derivata N-fenilpiperazina.

Iako se može očekivati da se Imp A2 kao kvaternerno amonijumovo jedinjenje, u odnosu na Imp A1, duže zadržava u sistemu hidrofilnih, a kraće u sistemu RP interakcija, sa Slika 40 se uočava da je: *i*)  $\log k(\text{Imp A2}) < \log k(\text{Imp A1})$  u AQ-HILIC; *ii*)  $\log k(\text{Imp A2}) > \log k(\text{Imp A1})$  u RP regionu. Može se pretpostaviti da je u dualnom HILIC/RP sistemu, cikloalkil grupa nečistoće Imp A2 uzrok izraženijih hidrofobnih interakcija, koje dovode do porasta vrednosti retencionog faktora u RP regionu.

Kako bi se odredili uslovi u kojima dolazi do smene između AQ-HILIC i RP retencionih mehanizama, izračunata je minimalna vrednost  $\log k = f(P_{\text{tot}})$  funkcije, odnosno minimalna vrednost ( $P_{\text{min}}$ ) predložene jednačine (32):

$$P_{\text{min}} = 0,434 m_4' / m_3' \quad (33)$$

Na osnovu predhodno dobijenih rezultata, izračunatih  $\varphi_{\text{min}}$  (aq) vrednosti (Tabela 6), može se odrediti ukupna polarnost mobilne faze u prevojnoj tački:

$$\varphi_{\text{min}}(\text{aq}) P_{\text{H}_2\text{O}} + (1 - \varphi_{\text{min}}(\text{aq})) P_{\text{ACN}} = P_{\text{tot}}(\varphi_{\text{min}}(\text{aq})) \quad (19a)$$

Parametar  $P_{\text{tot}}(\varphi_{\text{min}}(\text{aq}))$  opisuje ukupni indeks polarnosti mobilne faze u uslovima smene retencionih mehanizama.  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  predstavlja Snyder-ov indeks polarnosti vodene komponente mobilne faze (10,2), dok je  $P_{\text{ACN}}$  Snyder-ov indeks polarnosti acetonitrila (5,80).

Izračunate vrednosti  $P_{\text{min}}$  parametara su prikazane zajedno sa  $P_{\text{tot}}(\varphi_{\text{min}}(\text{aq}))$  vrednostima, (jednačina (16), jednačina (19a)) u Tabeli 9. Može se uočiti da između parametara  $P_{\text{min}}$  i  $P_{\text{tot}}(\varphi_{\text{min}}(\text{aq}))$  postoji visok stepen slaganja ( $r=0,96$ ) koji ukazuje da parametar  $P_{\text{min}}$  odgovara karakteristikama prevojne tačke na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi. Na osnovu toga, novopredložena jednačina (32) kao i njena minimalna vrednost  $P_{\text{min}}$  (jednačina (33)), mogu se uspešno primeniti za opisivanje retencionog ponašanja, kao i u karakterizaciji uslova smene između AQ-HILIC i RP retencionih mehanizama.

#### 4.1.3. Uticaj fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja na retenciono ponašanje

U cilju definisanja razlika u retencionom ponašanju u AQ-HILIC i RP sistemima, ekstrapolarisani retencioni faktori ( $\log k_w^{RP}(aq)$ ,  $\log k_w^{AQ-HILIC}(ACN)$ ,  $\log k_b^{AQ-HILIC}(aq)$ ) i prevojna tačka ( $\varphi_{min}(aq)$ ) su ispitani u funkciji molekulskih osobina testiranih jedinjenja.

Molekulske osobine sa najvećim uticajem na vrednosti retencionih parametara ( $\log k_w^{RP}(aq)$ ,  $\log k_w^{AQ-HILIC}(ACN)$ ,  $\log k_b^{AQ-HILIC}(aq)$ , ( $\varphi_{min}(aq)$ ) su izdvojene *stepwise* postupkom u MLR analizi i obuhvataju:

- hidrofobne interakcije
- uticaj geometrijskih osobina molekula
- uticaj aromatičnih funkcionalnih grupa
- molekulsku masu
- elektronske osobine (proton donor/akceptor svojstva)
- molarnu zapreminu.

Karakteristike napravljenih QSRR modela su prikazane u Tabeli 10, dok su vrednosti izračunatih deskriptora prikazane u Prilogu A, Tabela 1 i Tabela 2.



Tabela 10. Najznačajnije statističke karakteristike dobijenih QSRR modela.

Varijable	Model	Deskriptor	$Q^2_{LOO}$	$r_{train}$	greška ukrštene validacije	$RMSEE$	$RMSEP$	$Q^2_{ext}$	$r_{test}^2$	$r_m^2$	$rr_m^2$	$\bar{r}_m^2$	$\Delta r_m^2$
$\log k_w^{RP}(aq)$	MLR	$\log k_w^{RP}(aq) = 0,70072 + 0,3513 \text{ milogP} + 0,6932 \text{ ARR} - 0,3495 \text{ Chi\_D/dt} + 0,8270 \text{ G3m}$	0,9770	0,9596	/	0,1893	0,2128	0,8375	0,8324	0,7187	0,5325	0,6256	0,19
	SVM (polinomska)	milogP, ARR, Chi_D/Dt, G3m	0,8757	0,9040	0,074	0,2372	0,2021	0,8534	0,8446	0,7854	0,6369	0,7111	0,15
	SVM (RBF)		0,9168	0,9240	0,064	0,1941	0,2246	0,8189	0,8126	0,6902	0,4783	0,5842	0,22
$\log k_w^{AQ-HILIC}(org)$	MLR	$\log k_w^{AQ-HILIC}(org) = 1,1056 - 1,1326 \text{ GATS4m} - 0,2869 \text{ logD} + 0,2786 \text{ AlogPs} - 0,4148 \text{ HATS2s} + 0,4665 \text{ TDB06s} - 0,6191 \text{ R6s+}$	0,9614	0,9375	/	0,1663	0,2148	0,7879	0,8174	0,6772	0,8123	0,6256	0,13
	SVM (polinomska)	GATS4m, logD, AlogPs, HATS2s, TDB06s, R6s+	0,8791	0,9080	0,093	0,1645	0,2506	0,7112	0,7701	0,5853	0,7512	0,6693	0,17
	SVM (RBF)		0,8228	0,8970	0,132	0,1992	0,1948	0,8256	0,8363	0,8295	0,7024	0,7659	0,13
$\log k_b^{AQ-HILIC}(aq)$	MLR	$\log k_b^{AQ-HILIC}(aq) = -0,4932 + 0,3364 \text{ CMBL} + 0,5634 \text{ GATS2e} - 0,3934 \text{ Mor13p} - 0,8111 \text{ SPH} + 0,5383 \text{ Mor17v} - 0,4508 \text{ Mor28m}$	0,8362	0,9106	/	0,1110	0,1703	0,6300	0,6567	0,6112	0,6001	0,6256	0,01
	SVM (polinomska)	CMBL, GATS2e, Mor13p, SPH, Mor17v, Mor28m	0,8038	0,8790	0,050	0,119	0,1647	0,6536	0,6536	0,6506	0,5506	0,6006	0,10
	SVM (RBF)		0,8206	0,8860	0,048	0,1138	0,1668	0,645	0,6378	0,6233	0,5163	0,5698	0,11
$\varphi_{min}(aq)$	MLR	$\varphi_{min}(aq) = 0,3791 - 0,0683 \text{ logD} - 0,0390 \text{ HATS4s} + 0,0166 \text{ AS(pH 6)} + 0,1556 \text{ Mor23m}$	0,9245	0,9615	/	0,0425	0,0697	0,7379	0,7523	0,6919	0,6255	0,6587	0,07
	SVM (polinomska)	logD, HATS4s, AS(pH6), Mor23m	0,8978	0,9150	0,042	0,0494	0,0651	0,7713	0,7716	0,7587	0,5687	0,6637	0,19
	SVM (RBF)		0,9259	0,9290	0,041	0,0421	0,0686	0,7458	0,7475	0,7275	0,5703	0,6489	0,16

**logD** [48], **milogP** [209], **AlogPs** [210] (parametri lipofilnosti), **AS(pH 6)** (proton akceptorska mesta na pH 6, 2D deskriptor) [48], **Chi\_D/Dt** (Randićev index, 2D deskriptor), **G3m** (WHIM deskriptor), **ARR** (aromatičnost molekule, deskriptor prstena), **SPH** (sferičnost molekule, geometrijski deskriptor), **TDB06s** (3D autokorelacioni deskriptor), **CMBL** (broj konjugovanih veza u molekuli, geometrijski deskriptor), **GATS2e** (2D autokorelacioni deskriptor), **Mor13p** (3D MoRSE deskriptor), **Mor23m** (3D MoRSE deskriptor), **Mor28m** (3D MoRSE deskriptor), **Mor17v** (3D-MoRSE deskriptor), **HATS2s** (GETAWAY deskriptor), **HATS4s** (GETAWAY deskriptor), **R6s+** (GETAWAY deskriptor), **GATS4m** (2D autokorelacioni deskriptor) [208].

Iz Tabele 10, može se uočiti da su odabrane fizičko-hemijske karakteristike ispitivanih jedinjenja matematički definisane deskriptorima koji pripadaju: *i*) deskriptorima autokorelacije *ii*) deskriptorima koji se zasnivaju na 2D-matricama *iii*) geometrijskim deskriptorima *iv*) WHIM *v*) GETAWAY *vi*) 3D-MoRSE deskriptorima. Topološki prikaz molekulske strukture je najpopularniji i predstavlja dvodimenzionalni prikaz molekule koji pored atomskog sastava uključuje i informacije o povezanosti atoma u molekulu u vidu molekuskog grafa. Molekulski deskriptori koji su definisani na osnovu dvodimenzionalnog prikaza molekule označenu su kao 2D deskriptori. 2D deskriptori autokorelacije su zasnovani na raspodeli atomskih osobina duž molekulske strukture i najčešće se definišu na osnovu atomske mase (*m*), *van der Waals*-ove zapremine (*v*), atomske polarizabilnosti (*s*), elektronegativnosti (*e*) i unutrašnje energije (*s*). GETAWAY deskriptori su 3D deskriptori, koji sadrže informacije o uticaju svakog atoma na oblik molekula i interakcije sa drugim atomima, uzimajući u obzir njihov geometrijski položaj u trodimenzionalnom prostoru. WHIM deskriptori ne uzimaju u obzir veze između atoma, već samo njihov položaj u prostoru i sadrže informacije o veličini, obliku, simetriji i raspodeli atomskih svojstava. Geometrijski deskriptori se takođe zasnivaju na položaju atoma u trodimenzionalnom prostoru i zavise od prostorne konformacije molekula. U slučaju 3D-MoRSE deskriptora, fizičko-hemijska informacija se definiše na osnovu strukture molekula koja je dobijena difrakcijom elektrona. Atomske osobine koje se najčešće razmatraju pri definisanju 3D-MoRSE deskriptora obuhvataju atomsku masu (*m*), *van der Waals*-ovu zapreminu (*v*), elektronegativnost (*e*), polarizabilost (*p*) i unutrašnju energiju (*i*) [224].

Na osnovu vrste odabranih deskriptora (Tabela 10), može se zaključiti da na particioni proces ( $\log k_w^{\text{RP}}(\text{aq})$ ) u RP sistemu utiču lipofilnost, hidrofobne interakcije između analita i stacionarne faze, kao i atomske mase ispitivanih jedinjenja. U AQ-HILIC ( $\log k_w^{\text{AQ-HILIC}}(\text{ACN})$ ), particioni model zavisi od lipofilnosti ( $\log P$ ), raspodele jonizovanih oblika na pH 6 ( $\log D$ ) i elektronskih osobina, dok je u adsorpcionom/AQ-HILIC procesu kao najznačajnija izdvojena geometrija molekula (sferičnost, broj konjugovanih veza), elektronegativnost, polarizabilnosti, *van der Waals*-ova zapremina i atomske mase.

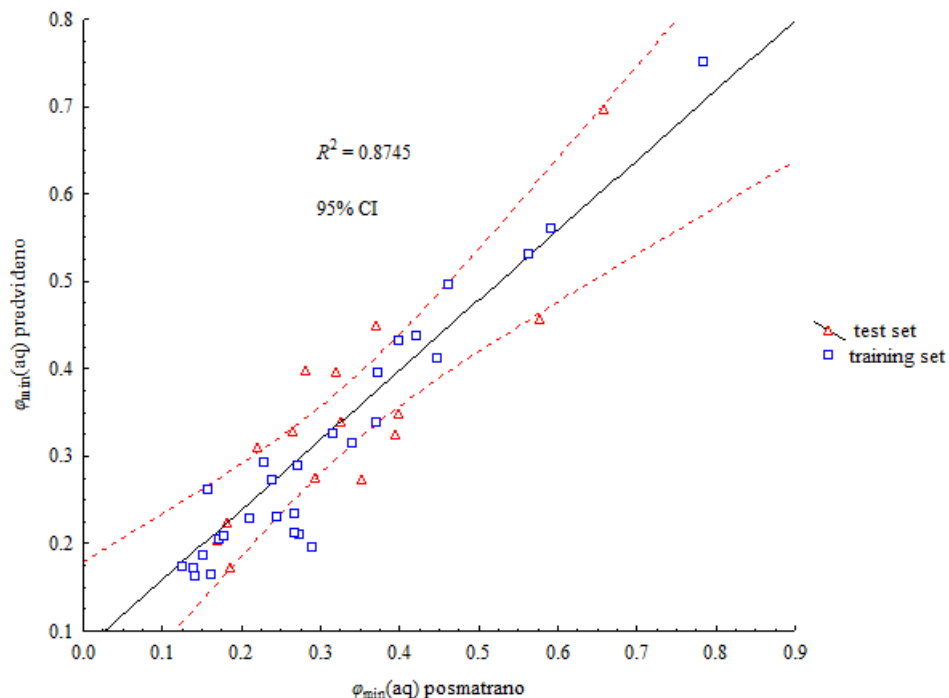
Rezultati QSRR studije pokazuju da prevojna tačka ( $\phi_{\text{min}}(\text{aq})$ ) zavisi od raspodele jonizovanih oblika na pH 6 ( $\log D$ ), sposobnosti vezivanja protona (AS(pH6)), elektronskih osobina i atomskih masa jedinjenja.

Statistički parametri (visoke vrednosti  $Q^2_{\text{LOO}}$ ,  $Q^2_{\text{ext}}$ , niske *RMSEP* vrednosti) dobijeni na osnovu unutrašnjeg i spoljašnjeg postupka validacije pokazuju da napravljeni MLR/QSRR i SVM/QSRR modeli zadovoljavaju predikcione kriterijume. QSRR modeli sa boljim predikcionim osobinama su:

- $\log k_w^{\text{RP}}(\text{aq})/\text{MLR}$  ( $Q^2_{\text{LOO}}=0,9770$ ;  $Q^2_{\text{ext}}=0,8375$ ;  $RMSEP=0,2128$ ;  $R^2_{\text{posmatrano/predvideno}} = 0,9019$ )
- $\log k_w^{\text{AQ-HILIC}}(\text{org})/\text{MLR}$  ( $Q^2_{\text{LOO}}=0,9614$ ;  $Q^2_{\text{ext}}=0,7879$ ;  $RMSEP=0,2148$ ;  $R^2_{\text{posmatrano/predvideno}} = 0,8543$ )
- $\log k_b^{\text{AQ-HILIC}}(\text{aq})/\text{MLR}$  ( $Q^2_{\text{LOO}}=0,8362$ ;  $Q^2_{\text{ext}}=0,6300$ ;  $RMSEP=0,1703$ ;  $R^2_{\text{posmatrano/predvideno}} = 0,7219$ )
- $\phi_{\text{min}}(\text{aq})/\text{SVM (RBF)}$  ( $Q^2_{\text{LOO}}=0,9259$ ;  $Q^2_{\text{ext}}=0,7458$ ;  $RMSEP=0,0686$ ;  $R^2_{\text{posmatrano/predvideno}} = 0,8745$ ) (Tabela 10).

Do sada, u literaturi nema podataka koji opisuju, ali i omogućuju predviđanje uslova u kojima dolazi do smene iz HILIC-a u RP mehanizam, tako da se posebno mogu istaći napravljeni  $\phi_{\text{min}}(\text{aq})/\text{QSRR}$  modeli. Njihovom primenom omogućeno je predviđanje sastava mobilne faze u prevojnoj tački na *mixed-mode* stacionarnoj fazi i kod novih liganada imidazolinskih i

serotoninskih receptora i strukturno srodnih jedinjenja. Na Slici 41 su grafički prikazane karakteristike izvojenog  $\varphi_{\min}(\text{aq})/\text{SVM (RBF)}$  QSRR modela.



Slika 41. Grafik dobijenih i predviđenih vrednosti u prevojnoj tački,  $\varphi_{\min}(\text{aq})/\text{SVM (RBF)}$  QSRR model.

Na Slici 41, uočava se visok stepen slaganja između predviđenih i dobijenih vrednosti prevojne tačke ( $R^2 = 0,87$ ). Takođe,  $\varphi_{\min}(\text{aq})$  vrednosti ulaze u 95% interval pouzdanosti. Na taj način, obezbeđena je visoka pouzdanost  $\varphi_{\min}(\text{aq})/\text{SVM (RBF)}$  QSRR modela za predviđanje uslova smene retencionih mehanizama na *mixed-mode* stacionarnoj fazi i u slučaju novih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i strukturno srodnih jedinjenja.

#### 4.1.4. Modelovanje retencionih mehanizama na *mixed-mode* stacionarnoj fazi

Retenciono ponašanje na *mixed-mode* stacionarnoj fazi se najčešće opisuje primenom *multi-modal* i kvadratne  $\log k=f(\varphi)$  funkcije. Kako retencioni mehanizmi zavise od karakteristika stacionarne i mobilne faze, kao i molekulskih osobina ispitivanih jedinjenja, opšti matematički oblik promene retencije u zavisnosti od zapreminskog udela modifikatora mobile faze ( $\log k=f(\varphi)$ ) nije utvrđen. S tim u vezi, potrebno je testirati različite oblike  $\log k=f(\varphi)$  zavisnosti, kako bi se pronašao najprecizniji opis retencionog ponašanja u primenjenim hromatografskim uslovima.

Sa ciljem pronalaženja najpreciznije  $\log k=f(\varphi)$  zavisnosti, na dobijene retencione podatke (Tabela 7) je primenjena *Box-Cox* transformacija ( $B(\varphi)$ ) [199-200]. Tom prilikom, potrebno je da novopredložene  $\log k=f(\varphi)$  jednačine budu jednostavnog matematičkog oblika (npr. troparametarski sistemi) i da poseduju jedan minimum zbog mogućnosti modelovanja konveksnog rasporeda podataka (određivanja tačke prelaska između HILIC i RP retencionog ponašanja). S tim u vezi, testirane su sledeće tri mogućnosti:

- i)  $\log k = \beta_0 + \beta' B(\varphi, \lambda_1) + \beta'' B(\varphi, \lambda_2)$
- ii)  $\log k = \beta_0 + \beta' B(\varphi, \lambda_1) + \beta'' B(\varphi+1, \lambda_2)$
- iii)  $\log k = \beta_0 + \beta' B(\varphi, \lambda_1) + \beta'' B(\varphi-1, \lambda_2)$

za vrednosti  $\lambda_1, \lambda_2$  u opsegu  $[-3, 3]$ .

Kvadratna  $\log k = \beta_0 + \beta' \varphi + \beta'' \varphi^2$  funkcija je poseban oblik *Box-Cox* transformacije za  $\lambda_1 = 1, \lambda_2 = 2$ ; kao i *multi-modal*  $\log k = \beta_0 + \beta' \varphi + \beta'' \log \varphi$  jednačina koja se dobija za vrednosti  $\lambda_1 = 1, \lambda_2 = 0$ . Na Slici A1, u Prilogu A, prikazane su vrednosti koeficijenata determinacije ( $R^2$ ), grupisane u odnosu na vrednost medijane. Najpreciznije jednačine su definisane u Tabeli 11.

Tabela 11. Jednačine dobijene primenom *Box-Cox* transformacije i odgovarajuće jednačine za prevojnu tačku ( $\varphi_m$ ).

	Jednačina	Prevojna tačka
XL	$\beta_L \ln(\varphi) + \beta_1 \varphi + \beta_0$	$-\frac{\beta_L}{\beta_1}$
XQ	$\beta_2 \varphi^2 + \beta_1 \varphi + \beta_0$	$-\frac{\beta_1}{2\beta_2}$
XR	$\sqrt{\varphi} \beta_R + \beta_1 \varphi + \beta_0$	$\frac{\beta_R^2}{4\beta_1^2}$
IQ	$\beta_2 \varphi^2 + \frac{\beta_{-12}}{\sqrt{\varphi}} + \beta_0$	$(\frac{\beta_{-12}}{4\beta_2})^{1/5}$
LQ	$\beta_L \ln(\varphi) + \beta_2 \varphi^2 + \beta_0$	$\frac{\sqrt{-\frac{\beta_L}{\beta_2}}}{\sqrt{2}}$
II	$\frac{\beta_{-1}}{\varphi} + \frac{\beta_{-11}}{\varphi - 1} + \beta_0$	$-\frac{\sqrt{-\beta_{-11}\beta_{-1}} - \beta_{-1}}{\beta_{-1} + \beta_{-11}}$
IR	$\frac{\beta_{-12}}{\varphi + 1} + \beta_1 \varphi + \beta_0$	$\frac{\sqrt{\beta_{-12}\beta_1} - \beta_1}{\beta_1}$

*Italik* slovima su označene novopredložene  $\log k=f(\varphi)$  zavisnosti.

Oznakom X je obeležena linearna zavisnost, L-logaritmovana zavisnost, Q-kvadratna zavisnost, I-inverzna zavisnost. U svakoj jednačini:

- $\beta_0$  označava odsečak
- $\beta_1$  je koeficijent uz promenljivu  $\varphi$
- $\beta_2$  je koeficijent uz promenljivu  $\varphi^2$
- $\beta_L$  je koeficijent uz promenljivu  $\log \varphi$
- $\beta_R$  je koeficijent uz promenljivu  $\sqrt{\varphi}$
- $\beta_{-1}$  je koeficijent uz promenljivu  $1/\varphi$
- $\beta_{-11}$  je koeficijent uz promenljivu  $1/(\varphi-1)$
- $\beta_{-12}$  je koeficijenti uz promenljivu  $1/(\varphi+1)$ .

Koeficijenti determinacije dobijenih ( $R^2$ ) modela za 43 ispitana jedinjenja su prikazani u Tabeli 12.

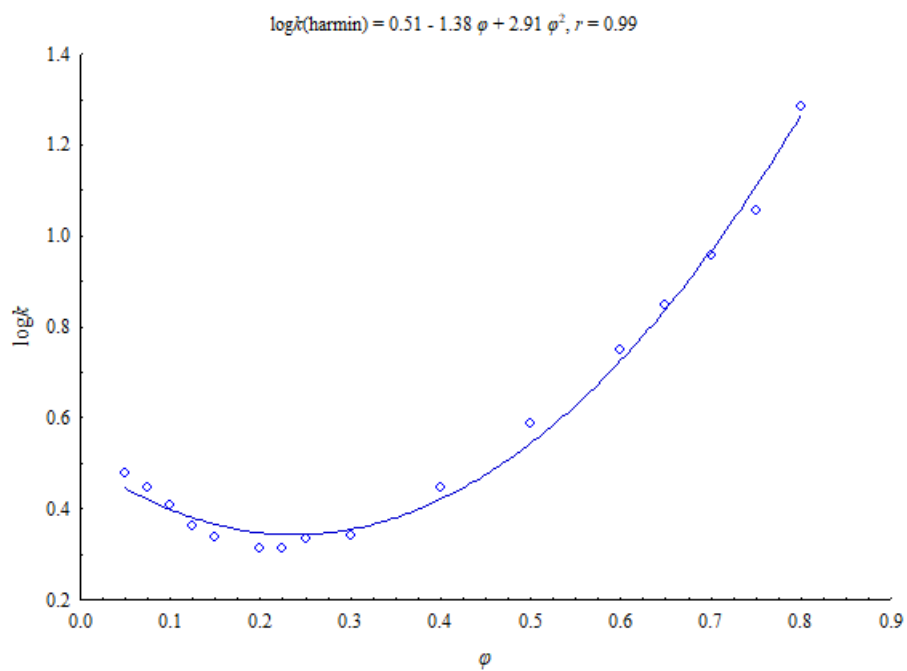
Tabela 12. Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) testiranih modela.

Jedinjenje	XQ	XL	XR	IQ	LQ	II	IR
Ziprazidon	0,9822	0,9696	0,9866	0,9922	0,9929	0,9959	0,9889
Imp Z2	0,9934	0,9876	0,9931	0,9947	0,9949	0,9875	0,9964
Imp Z3	0,9743	0,9673	0,9673	0,9755	0,9748	0,9642	0,9746
Olanzapin	0,8895	0,8599	0,9465	0,9042	0,9215	0,9525	0,9235
Aripiprazol	0,9857	0,9868	0,9638	0,9851	0,9792	0,9874	0,9736
Imp A1	0,9103	0,8830	0,9151	0,8906	0,9167	0,8771	0,9276
Imp A2	0,9555	0,9652	0,8430	0,9561	0,9360	0,9357	0,9100
Imp A3	0,9901	0,9817	0,9945	0,9946	0,9954	0,9795	0,9965
Imp A4	0,7700	0,6692	0,9430	0,7155	0,8197	0,6765	0,8978
Imp A5	0,966	0,9437	0,9974	0,9794	0,9883	0,9929	0,9896
Imp A6	0,9719	0,9244	0,9552	0,9452	0,9836	0,9189	0,9861
Imp A7	0,9794	0,9900	0,8708	0,9777	0,9550	0,9332	0,9357
Imp A8	0,9762	0,9592	0,9968	0,9869	0,9922	0,9896	0,9933
Imp A9	0,8757	0,8139	0,9822	0,9036	0,9374	0,9791	0,9432
Imp A10	0,9931	0,9869	0,9925	0,9967	0,9962	0,9942	0,9954
Moksonidin	0,9294	0,9172	0,8701	0,9214	0,9397	0,9504	0,9059
Imp M1	0,9378	0,8955	0,9873	0,9441	0,9695	0,9318	0,9754
Imp M2	0,9743	0,9459	0,9629	0,9185	0,9695	0,8554	0,9833
Imp M3	0,9877	0,9785	0,9777	0,9736	0,9888	0,9719	0,9882
Imp M4	0,9898	0,9779	0,9642	0,9752	0,9908	0,9730	0,9876
Gvanfacin	0,9916	0,9850	0,9633	0,9938	0,9905	0,9775	0,9817
Gvanabenz	0,9835	0,9566	0,9303	0,9711	0,9859	0,9525	0,9727
Klonidin	0,9135	0,8985	0,8935	0,9323	0,9320	0,9357	0,9060
Efaroksan	0,9400	0,9053	0,9355	0,9310	0,9569	0,9659	0,9522
Harman	0,9807	0,9812	0,9494	0,9713	0,9660	0,8797	0,9685
Ksilometazolin	0,9888	0,9806	0,8657	0,9881	0,9833	0,9643	0,9369
Fentolamin	0,9732	0,9591	0,9240	0,9759	0,9767	0,9722	0,9616
Brimonidin	0,8306	0,7752	0,8735	0,8167	0,8697	0,9768	0,8628
Amilorid	0,9932	0,9956	0,9647	0,9958	0,9936	0,9920	0,9822
Tizanidin	0,9203	0,8971	0,9553	0,9379	0,9471	0,8781	0,9400
RX 821002	0,9269	0,9217	0,8652	0,9477	0,9381	0,9619	0,8961
Trimazolin	0,9506	0,9271	0,9063	0,9524	0,9613	0,9186	0,9479
Detomidin	0,9962	0,9880	0,9898	0,9980	0,9985	0,9654	0,9972
Tetrahidrozolin	0,9573	0,9378	0,9131	0,9555	0,9664	0,9770	0,9502

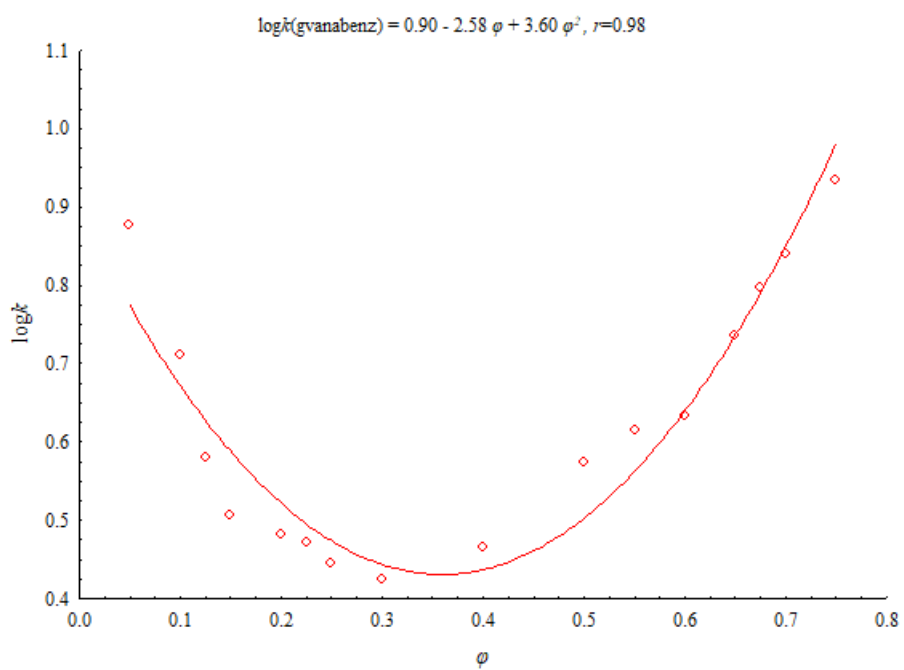
Antazolin	0,9781	0,9553	0,8872	0,9486	0,9727	0,9009	0,9480
Nafazolin	0,9744	0,9723	0,9020	0,9796	0,9744	0,9886	0,9482
Oksimetazolin	0,9849	0,9751	0,9338	0,9881	0,9849	0,9637	0,9716
Benazolin	0,9798	0,9687	0,9219	0,9727	0,9821	0,9722	0,9626
Cirazolin	0,9759	0,9899	0,8535	0,9891	0,9680	0,9783	0,9218
Harmin	0,9885	0,9766	0,9915	0,9932	0,9955	0,9735	0,9949
Idazoksan	0,9375	0,9640	0,8369	0,9741	0,9447	0,9789	0,8788
Metformin	0,9767	0,9891	0,9126	0,9915	0,9852	0,9545	0,9432
Sitagliptin	0,9491	0,9123	0,9281	0,9467	0,9652	0,9070	0,9531

Uočeno je da su koeficijenti determinacije (Tabela 12) u korelaciji sa ALOGP i XLOGP3 deskriptorima koji opisuju lipofilne osobine ( $r=0,7-0,8$ ), kao i sa AROM deskriptorom koji je zasnovan na geometrijskim karakteristikama ispitivanih jedinjenja ( $r=0,46$ ). Pored toga, vrednost koeficijenta determinacije XQ funkcije je u korelaciji ( $r=0,56$ ) i sa SPH deskriptorom (indeksom sferičnosti), koji slično AROM deskriptoru definiše oblik i geometriju jedinjenja. Poznato je da je grafik kvadratne XQ funkcije parabola (Slika 42) koja je simetričnog oblika i odgovara simetričnom rasporedu podataka. Može se zaključiti da je način distribucije  $\log k$  vrednosti na grafiku  $\log k = f(\varphi)$  funkcije uslovljen geometrijskim osobinama ispitivanih jedinjenja.

A.



B.



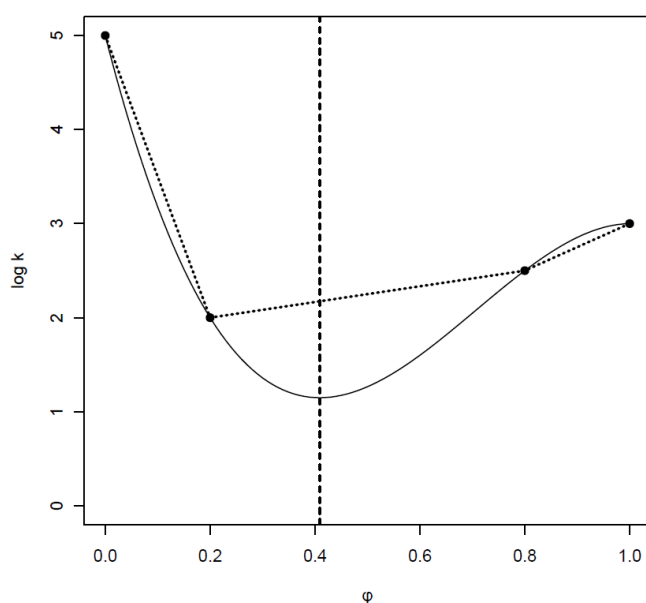
Slika 42. Grafik XQ funkcije za A. harmin B. gvanabenz



4.1.4.1. Određivanje prevojne tačke na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi

Prevojna tačka je novi retencioni deskriptor koji se koristi u *mixed-mode* hromatografiji i podržava razumevanje dualne prirode HILIC/RP retencije. Opisuje uslove u kojima dolazi do smene glavnih retencionih mehanizama, prelaska iz HILIC u RP mehanizam. U Tabeli 13 su predstavljene vrednosti prevojne tačke ( $\varphi_{\min}$ ) koje su izračunate kao minimum testiranih funkcija koje opisuju promenu retencije ( $\log k$ ) u odnosu na zapreminski udeo modifikatora mobilne faze.

Kao referentna, model-nezavisna metoda, predložena je kubna *spline* interpolacija ( $\varphi_{\min}(\text{splines})$ ) [225]. Metodom kubne interpolacije, susedne tačke se povezuju kubnom funkcijom tj. tačnim prolaskom funkcije kroz eksperimentalno dobijene vrednosti retencionih faktora (Slika 43).

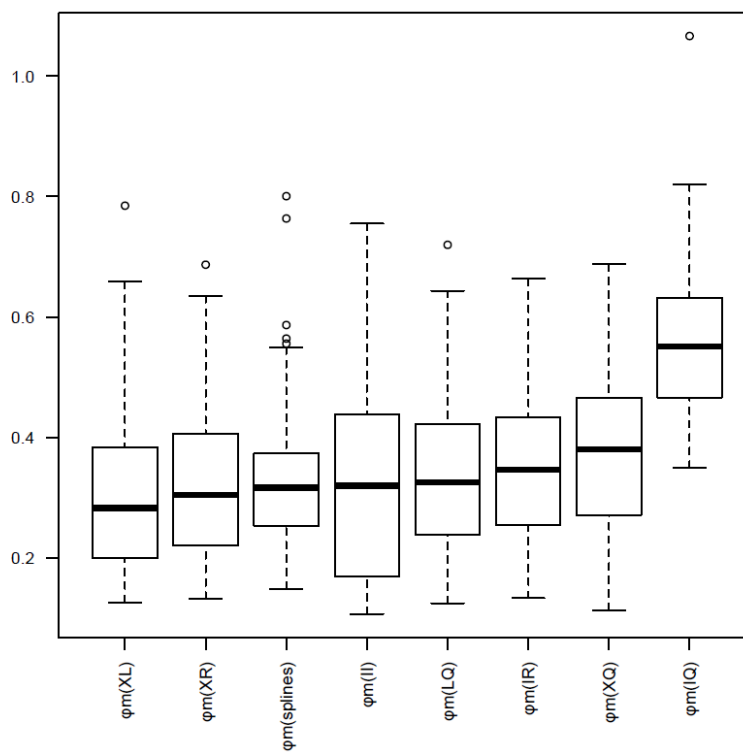
Slika 43. Kubna *spline* interpolacija

Vrednosti prevojne tačke ( $\varphi_{\min}$ ) za ispitivana jedinjenja prikazane su u sledećoj Tabeli 13.

Tabela 13. Izračunate vrednosti prevojnne tačke (XR, XL, XQ, IQ, LQ, II, IR, *spline* interpolacija).

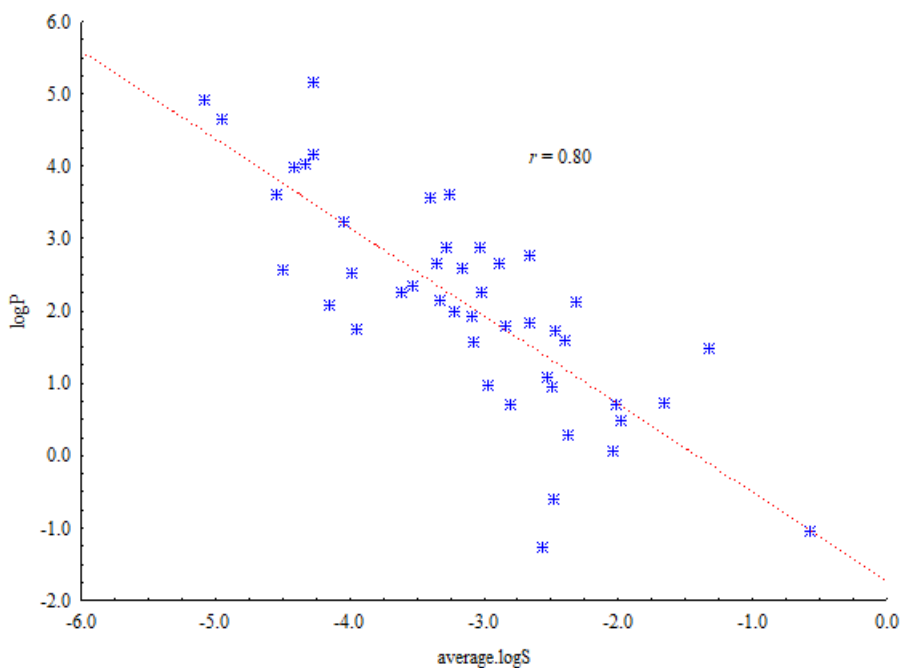
Jedinjenje	$\varphi_m(\text{XR})$	$\varphi_m(\text{XL})$	$\varphi_m(\text{XQ})$	$\varphi_m(\text{IQ})$	$\varphi_m(\text{LQ})$	$\varphi_m(\text{II})$	$\varphi_m(\text{IR})$	$\varphi_m(\text{splines})$
Ziprazidon	0,185	0,170	0,211	0,426	0,195	0,161	0,208	0,173
Imp Z2	0,131	0,126	0,113	0,349	0,124	0,107	0,133	0,148
Imp Z3	0,176	0,163	0,193	0,414	0,183	0,148	0,196	0,247
Olanzapin	0,260	0,246	0,296	0,507	0,271	0,250	0,281	0,310
Aripiprazol	0,162	0,153	0,175	0,403	0,170	0,146	0,177	0,172
Imp A1	0,386	0,371	0,429	0,617	0,398	0,392	0,406	0,374
Imp A2	0,336	0,320	0,381	0,577	0,350	0,339	0,359	0,331
Imp A3	0,150	0,141	0,137	0,372	0,144	0,106	0,157	0,156
Imp A4	0,293	0,273	0,348	0,532	0,306	0,270	0,324	0,382
Imp A5	0,189	0,172	0,227	0,428	0,200	0,160	0,217	0,220
Imp A6	0,292	0,268	0,354	0,531	0,308	0,272	0,328	0,259
Imp A7	0,305	0,290	0,346	0,551	0,318	0,307	0,327	0,307
Imp A8	0,173	0,159	0,196	0,407	0,179	0,139	0,195	0,224
Imp A9	0,248	0,221	0,315	0,487	0,265	0,223	0,289	0,316
Imp A10	0,147	0,139	0,142	0,376	0,146	0,123	0,155	0,154
Moksonidin	0,443	0,423	0,510	0,659	0,459	0,501	0,471	0,550
Imp M1	0,273	0,240	0,350	0,510	0,294	0,258	0,320	0,311
Imp M2	0,552	0,593	0,572	0,795	0,565	0,678	0,544	0,587
Imp M3	0,635	0,659	0,653	0,820	0,644	0,755	0,628	0,764
Imp M4	0,568	0,563	0,614	0,758	0,581	0,712	0,579	0,467
Gvanfacin	0,234	0,212	0,290	0,480	0,253	0,218	0,270	0,297
Gvanabenz	0,295	0,267	0,363	0,532	0,313	0,277	0,335	0,304
Klonidin	0,300	0,267	0,380	0,538	0,323	0,319	0,346	0,306
Efaroksan	0,422	0,399	0,486	0,644	0,439	0,492	0,450	0,350
Harman	0,192	0,178	0,194	0,436	0,201	0,156	0,210	0,227
Ksilometazolin	0,322	0,293	0,393	0,557	0,342	0,320	0,361	0,320
Fentolamin	0,360	0,340	0,413	0,596	0,376	0,378	0,386	0,344
Brimonidin	0,385	0,354	0,463	0,605	0,403	0,415	0,424	0,526
Amilorid	0,551	0,578	0,545	0,773	0,558	0,671	0,538	0,556
Tizanidin	0,261	0,229	0,334	0,500	0,282	0,169	0,307	0,279
RX 821002	0,315	0,283	0,393	0,551	0,337	0,331	0,358	0,305
Trimazolin	0,397	0,373	0,462	0,625	0,416	0,464	0,427	0,359
Detomidin	0,207	0,188	0,252	0,452	0,224	0,185	0,240	0,221
Tetrahidrozolin	0,441	0,419	0,502	0,659	0,457	0,518	0,466	0,526
Antazolin	0,341	0,317	0,399	0,574	0,356	0,327	0,373	0,332
Nafazolin	0,417	0,399	0,469	0,642	0,431	0,445	0,440	0,373
Oksimetazolin	0,348	0,328	0,401	0,586	0,364	0,363	0,375	0,330
Benazolin	0,415	0,395	0,471	0,638	0,429	0,438	0,440	0,349
Cirazolin	0,390	0,371	0,443	0,62	0,405	0,403	0,416	0,347
Harmin	0,201	0,183	0,237	0,443	0,214	0,169	0,230	0,213
Idazoksan	0,465	0,463	0,498	0,696	0,479	0,550	0,477	0,564

Metformin	0,687	0,785	0,688	1,067	0,720	/	0,664	0,801
Sitagliptin	0,303	0,271	0,381	0,540	0,325	0,322	0,347	0,309



Slika 44. Box-Cox grafik dobijenih  $\varphi_{\min}$  vrednosti.

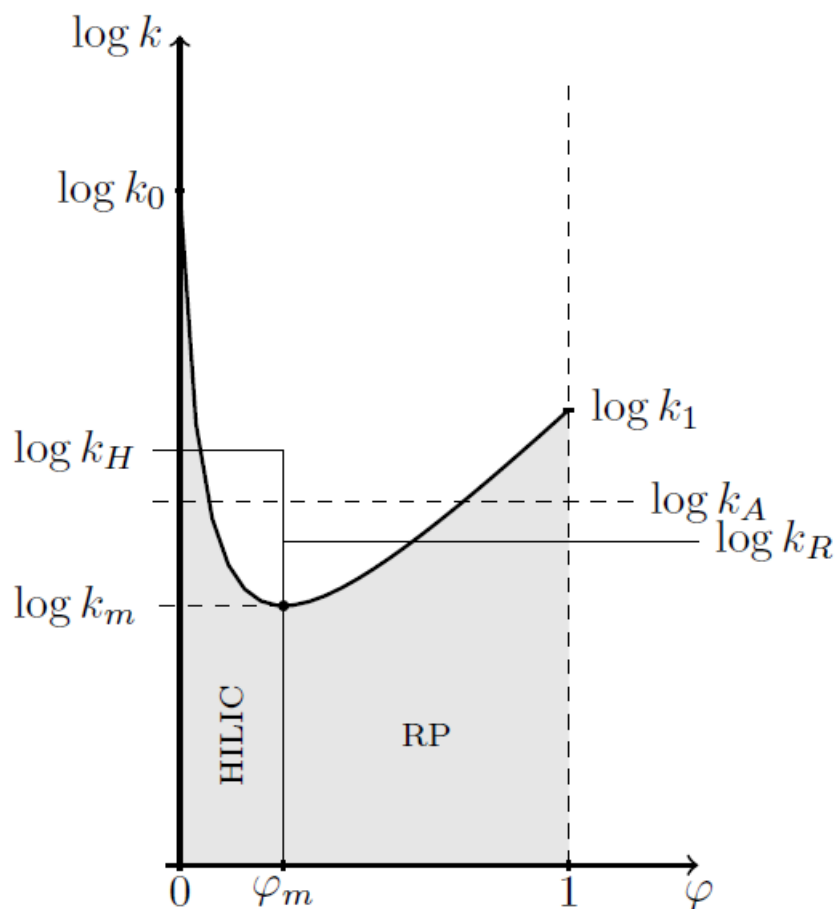
Statistička značajnost dobijenih vrednosti prevojne tačke ( $\varphi_{\min}$ ) na Slici 44 je procenjena primenom *Wilcoxon* testa. Vrednosti  $\varphi_{\min}(\text{IQ})$  jednačine IQ odstupaju u odnosu na ostale  $\varphi_{\min}$  vrednosti. Prevojna tačka XR, II, LQ i IR jednačina pokazuje male razlike u odnosu na referentnu  $\varphi_{\min}(\text{splines})$  vrednost dobijenu metodom kubne *spline* interpolacije, kao i vrednost  $\varphi_{\min}(\text{XL})$  izvedenu iz standardne *multi-modal* jednačine. Takođe, između parametra  $\varphi_{\min}$  i parametara rastvorljivosti (deskriptor average.logS) postoji pozitivna korelacija, dok između  $\varphi_{\min}$  i lipofilnih karakteristika ( $\log P$ ) ispitivanih jedinjenja postoji negativna korelacija. Dobijeni rezultati su očekivani, s obzirom na negativnu korelaciju ( $r=0,80$ ) između parametara lipofilnosti ( $\log P$ ) i parametara rastvorljivosti (average.logS) ispitivanih jedinjenja (Slika 45).



Slika 45. Korelacija između  $\log P$  i  $\text{average.logS}$  parametara.

#### 4.1.5. Izvođenje retencionih parametara na *mixed-mode* stacionarnoj fazi

Retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja je ispitano u širokom opsegu promene zapreminskog udela modifikatora mobilne faze na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi. Dobijene  $\log k$  vrednosti i prevojna tačka ( $\varphi_{\min}$ ) su iskorišćeni kao retencionni parametri u kvantifikaciji retencionog ponašanja. S obzirom da  $\log k$  i  $\varphi_{\min}$  vrednosti ne daju precizne informacije o retencionom ponašanju u regionima u kojima dominira HILIC ili RP mehanizam, potrebno je uvesti nove retencione parametre koji bi omogućili dodatno razumevanje dualne prirode HILIC/RP retencije. S tim u vezi, primenjena je metoda integracije kako bi se izračunala površina ispod HILIC i RP regiona grafika  $\log k = f(\varphi)$  funkcije. Grafički prikaz osnovne ideje izvođenja novih retencionih parametara na *mixed-mode* stacionarnoj fazi je prikazan na Slici 46.



Slika 46. Osnovna ideja izvođenja retencionih parametara na *mixed-mode* stacionarnoj fazi.

Na osnovu površine ispod grafika, funkcije koja opisuje promenu retencije u zavisnosti od zapreminskog udela modifikatora mobilne faze, izvedeni su sledeći reticioni parametri:

-Prosečna retencija u HILIC regionu ( $\log k_H$ ). Predstavlja površinu ispod HILIC regiona  $\log k=f(\varphi)$  funkcije:

$$\log k_H = \frac{\int_0^{\varphi_{min}} f(\varphi) d\varphi}{\varphi_{min}} \quad (34)$$

-Prosečna retencija u RP regionu ( $\log k_R$ ). Predstavlja površinu ispod RP regiona  $\log k=f(\varphi)$  funkcije:

$$\log k_R = \frac{\int_{\varphi_{min}}^1 f(\varphi) d\varphi}{1-\varphi_{min}} \quad (35)$$

gde je  $\varphi_{min}$  minimalna vrednost zapreminskog udela modifikatora mobilne faze pri promeni HILIC-a u RP reticioni mehanizam (prevojna tačka).

-Prosečna retencija na *mixed-mode* stacionarnoj fazi ( $\log k_A$ ). Predstavlja površinu ispod grafika  $\log k=f(\varphi)$  funkcije:

$$\log k_A = \int_0^1 f(\varphi) d\varphi \quad (36)$$

gde je  $\varphi$  zapreminski udeo modifikatora mobilne faze,  $\varphi \in [0-1]$ .

Takođe, pored novopredloženih hromatografskih parametara ( $\log k_A$ ,  $\log k_H$ ,  $\log k_R$ ), za svaku funkciju  $\log k = f(\varphi)$  moguće je izračunati:

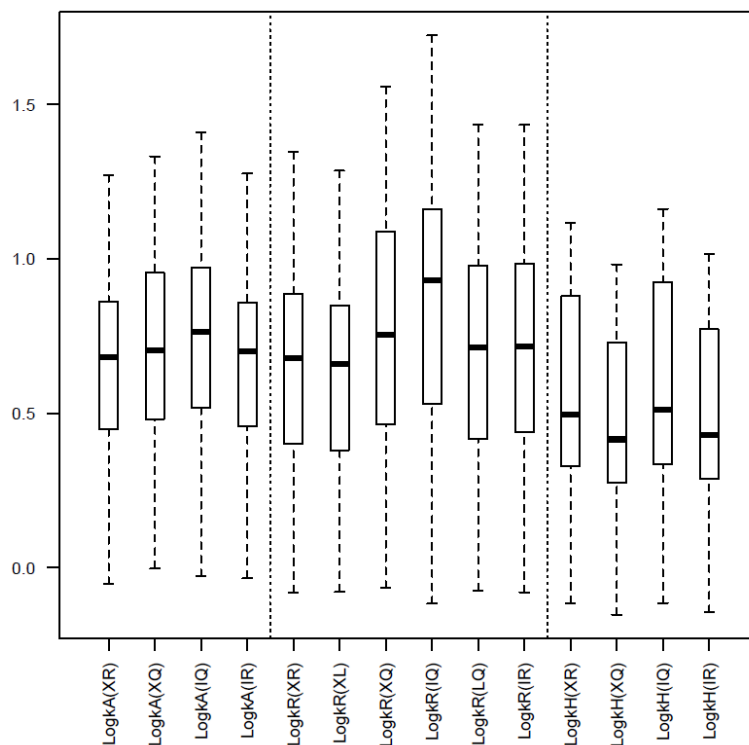
- ekstrapolisane retencione parametre za  $\varphi = 0$  ( $\log k_0$ ) i  $\varphi = 1$  ( $\log k_1$ )
- retenciju u prevojnoj tački ( $\log k_m$ ).

Integrali XL, XQ, XR, IQ, LQ, II, IR jednačina su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. Integrali testiranih jednačina za  $\varphi$  od 0 do 1.

	Jednačina	Integral
XL	$\beta_L \ln(\varphi) + \beta_1 + \beta_0$	$\beta_L(\varphi \ln(\varphi) - \varphi) + \frac{\beta_1 \varphi^2}{2} + \beta_0 \varphi$
XQ	$\beta_2 \varphi^2 + \beta_1 \varphi + \beta_0$	$\frac{\beta_2 \varphi^3}{3} + \frac{\beta_1 \varphi^2}{2} + \beta_0 \varphi$
XR	$\sqrt{\varphi} \beta_R + \beta_1 \varphi + \beta_0$	$\frac{2\varphi^{\frac{3}{2}} \beta_R}{3} + \frac{\beta_1 \varphi^2}{2} + \beta_0 \varphi$
IQ	$\beta_2 \varphi^2 + \frac{\beta_{-12}}{\sqrt{\varphi}} + \beta_0$	$\frac{\beta_2 \varphi^3}{3} + \beta_0 \varphi + 2\beta_{-12} \sqrt{\varphi}$
LQ	$\beta_L \ln(\varphi) + \beta_2 \varphi^2 + \beta_0$	$\beta_L(\varphi \ln(\varphi) - \varphi) + \frac{\beta_2 \varphi^3}{3} + \beta_0 \varphi$
II	$\frac{\beta_{-1}}{\varphi} + \frac{\beta_{-11}}{\varphi - 1} + \beta_0$	$\beta_{-1} \ln(\varphi) + \beta_0 \varphi + \beta_{-11} \ln(\varphi - 1)$
IR	$\frac{\beta_{-12}}{\varphi + 1} + \beta_1 \varphi + \beta_0$	$\beta_{-12} \ln(\varphi + 1) + \frac{\beta_1 \varphi^2}{2} + \beta_0 \varphi$

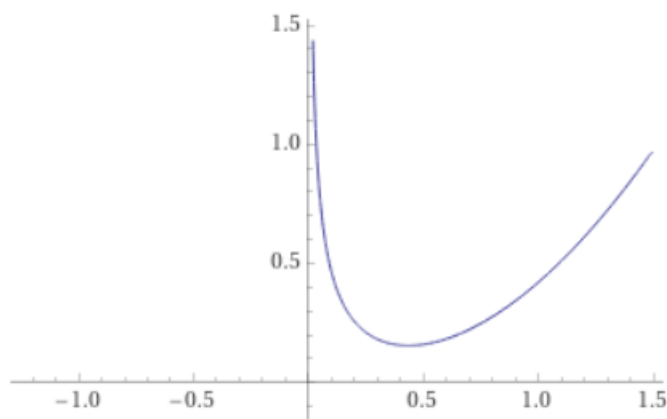
Stepen slaganja između  $\log k_H$ ,  $\log k_R$  i  $\log k_A$  parametara dobijenih integracijom površine ispod grafika XR, XQ, IQ, IR funkcija, prikazan je na Slici 47.



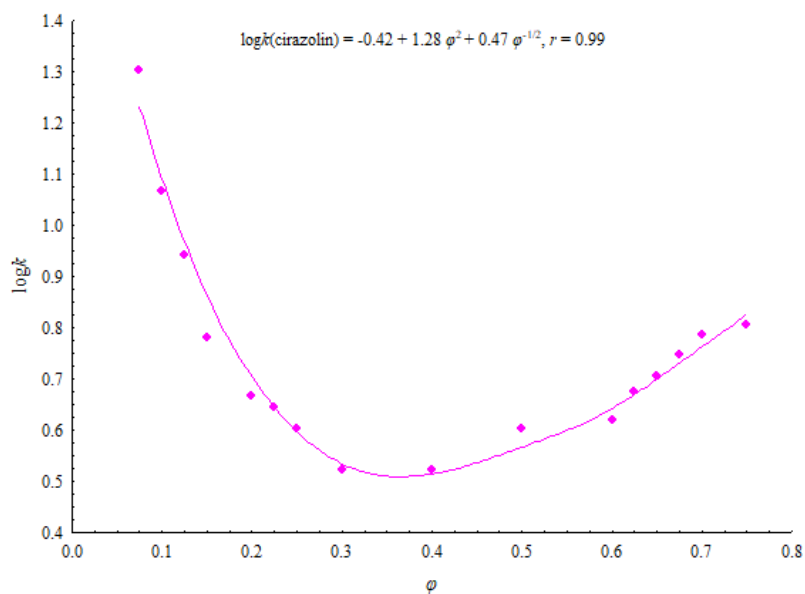
Slika 47. Boxplot grafik dobijenih vrednosti  $\log k_H$ ,  $\log k_R$  i  $\log k_A$  parametara ispitivanih jedinjenja na osnovu metode integracije za jednačine XR, XQ, IQ i IR.

Sa Slike 47, najveće  $\log k_H$ ,  $\log k_R$  i  $\log k_A$  vrednosti su dobijene integracijom IQ jednačine. U suprotnosti, najmanje razlike u vrednostima  $\log k_H$ ,  $\log k_R$  i  $\log k_A$  parametara su prisutne između jednačine XQ ( $\beta_2\varphi^2 + \beta_1\varphi + \beta_0$ ) i jednačine IR ( $\frac{\beta-12}{\varphi+1} + \beta_1\varphi + \beta_0$ ).

A.



B.



Slika 48. A. Grafik novopredložene IQ funkcije

B. Grafik  $\log k=f(\varphi)$  funkcije cirazolina

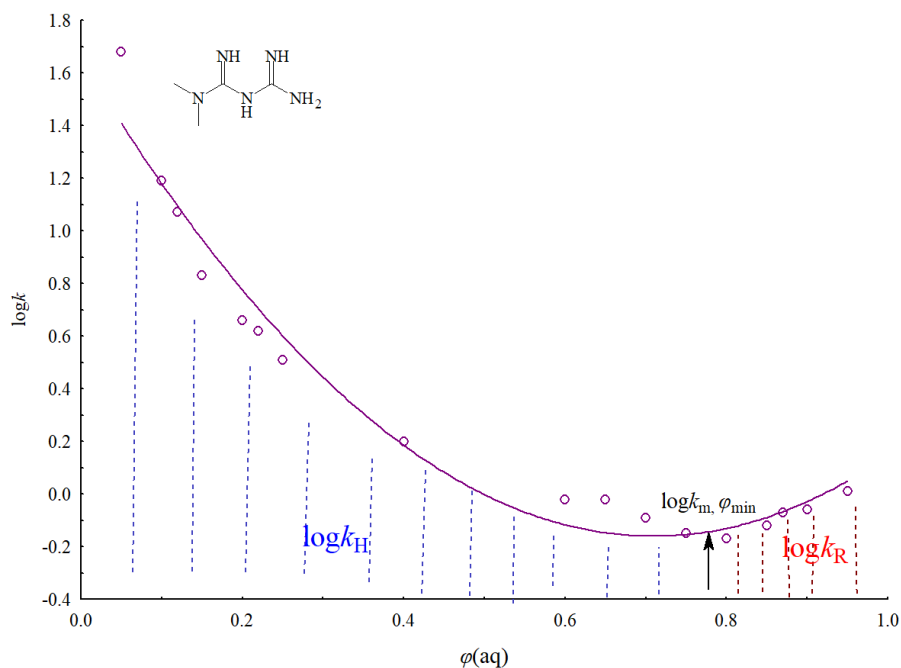
Sa Slike 48, može se uočiti da trend promene retencionih karakteristika cirazolina u zavisnosti od zapreminskog udela modifikatora mobilne faze odgovara obliku IQ funkcije ( $r=0,99$ ). Veća površina koju zauzima grafik IQ funkcije je uzrok i povećanih vrednosti  $\log k_H$ ,  $\log k_R$  i  $\log k_A$  parametara, u odnosu na ostale novopredložene jednačine.

Vrednosti novodefinisanih  $\log k_R$  i  $\log k_H$  parametara su u korelaciji sa molekulskim osobinama ispitivanih jedinjenja:

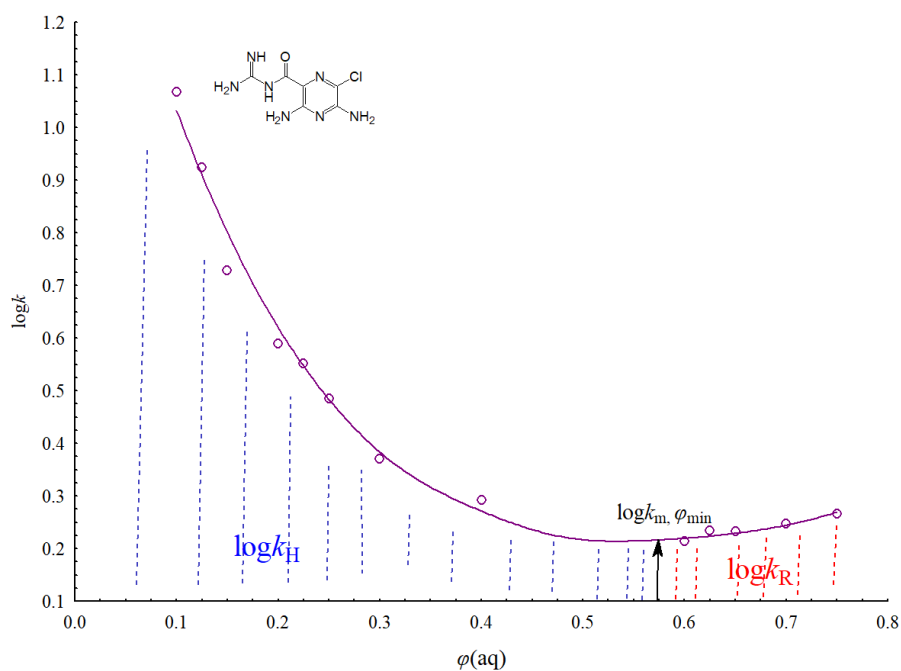


- i) zbog dominantnog uticaja hidrofilnih interakcija na retenciono ponašanje metformina (Slika 49A) i amilorida (Slika 49B),  $\log k_H > \log k_R$
- ii) u slučaju lipofilnih jedinjenja, prisutan je dominantan uticaj reverzno-faznih interakcija na ukupni reticioni mehanizam (liganada serotoniniskih receptora),  $\log k_R > \log k_H$  (Slika 49C-D).

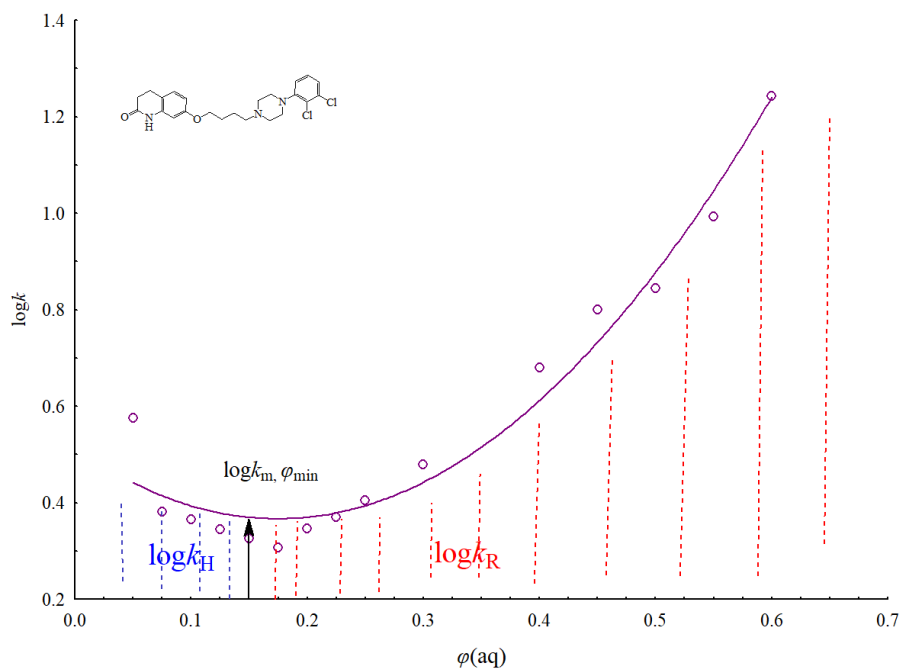
A.



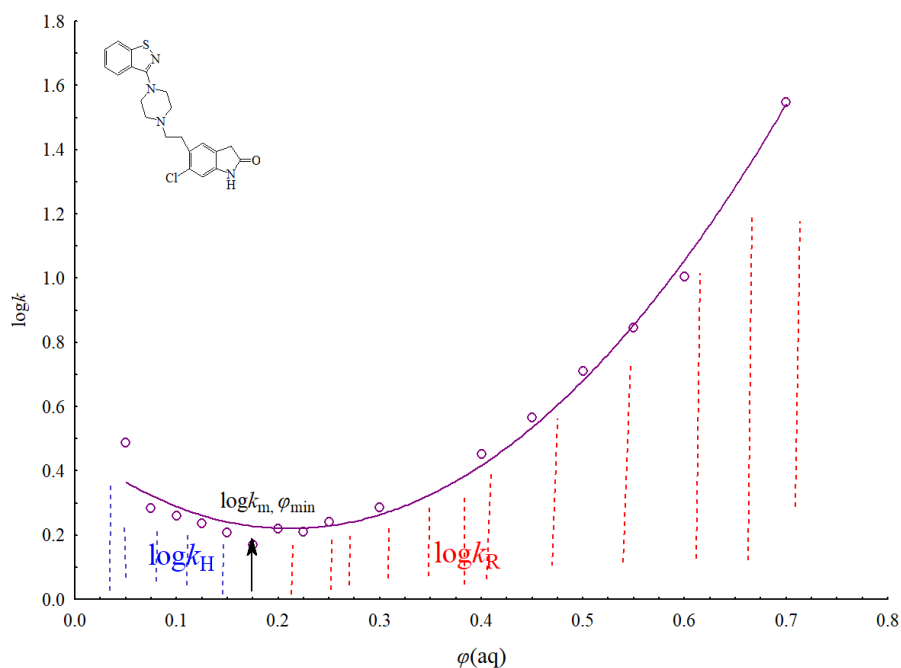
B.



C.



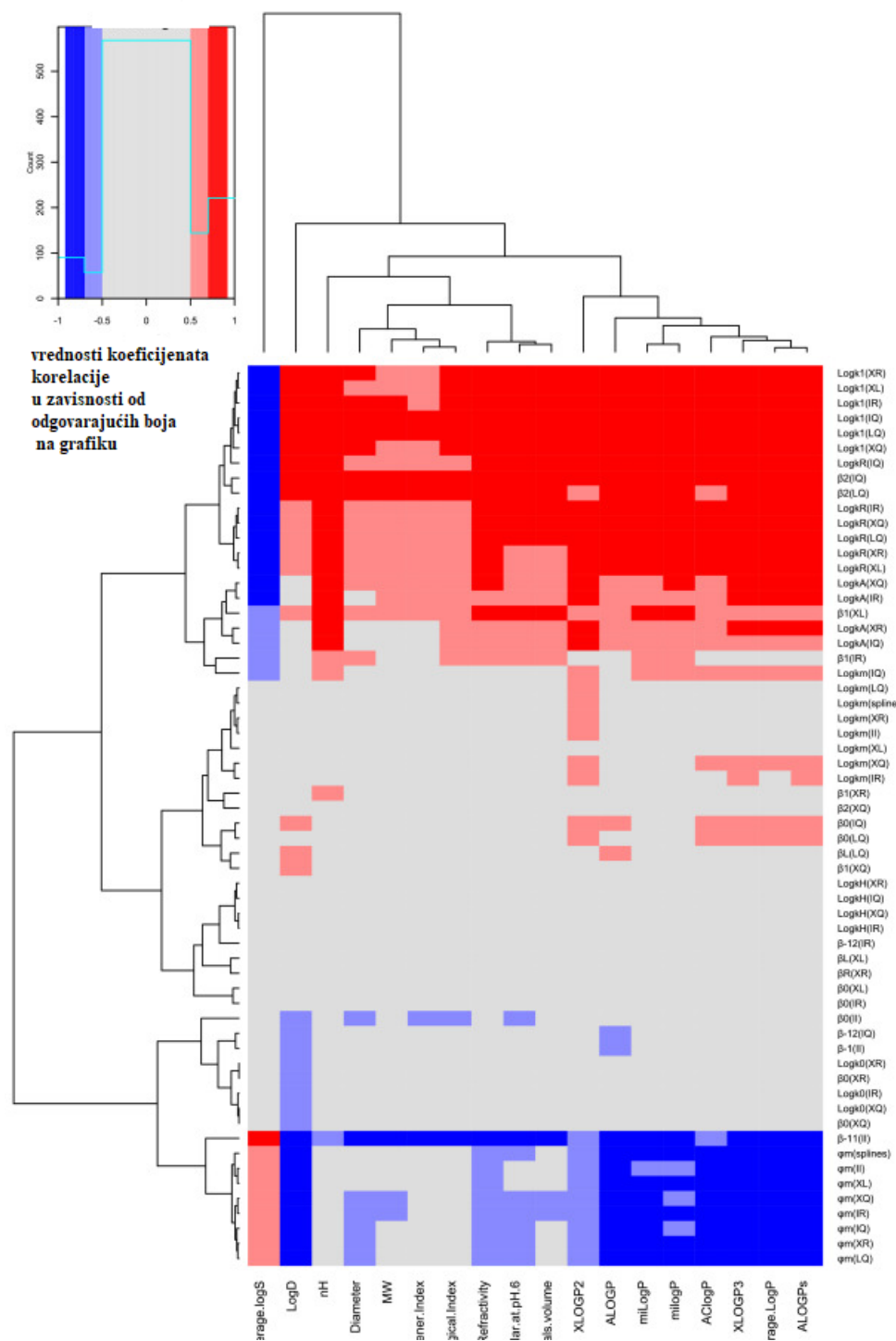
D.



Slika 49. HILIC i RP regioni odvojeni prevojnou tačkou ( $\log k_{\text{m}}, \varphi_{\text{min}}$ ) sa odgovarajućim parametrima retencije dobijenim metodom integracije površine ( $\log k_{\text{H}}, \log k_{\text{R}}$ ) za A. metformin B. amilorid C. aripiprazol, D. ziprazidon.

Korelacija retencionih deskriptora dualnog HILIC/RP sistema i fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja je grafički prikazana na Slici 50. Sa desne strane grafika, kao zavisno promenljive su prikazani deskriptori dualnog HILIC/RP sistema: regresioni parametri  $\beta_{-12}$ ,  $\beta_{-11}$ ,  $\beta_{-1}$ ,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_L$ , i  $\beta_R$  iz jednačina Tabele 11, ekstrapolisani retencioni parametri ( $\log k_1$ ,  $\log k_0$ ), retencija u prevojnoj tački ( $\log k_m$ ), vrednosti prevojne tačke ( $\varphi_{\min}$ ), novodefinisani retencioni parametri ( $\log k_H$ ,  $\log k_R$ ,  $\log k_A$ ), dok su na  $x$ -osi kao nezavisno premenljive prikazane odabrane molekulske osobine ispitivanih jedinjenja: lipofilne karakteristike, molarna refraktivnost, broj vodonikovih atoma, *van der Waals*-ov radijus, dijametar, molekulska težina i rastvorljivost.

Crvena boja odgovara korelaciji  $r > 0,7$ ; blago crvena za  $r = 0,5-0,7$ ; svetlo plava negativnoj korelaciji za  $r = 0,5-0,7$ ; tamno plava negativnoj korelaciji za  $r > 0,7$ ; dok siva boja odgovara slaboj korelaciji.



Slika 50. Grafički prikaz korelacije regresionih parametara  $\beta_{-12}$ ,  $\beta_{-11}$ ,  $\beta_{-1}$ ,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_L$ , i  $\beta_R$  iz jednačina Tabele 11, ekstrapolisanih retencionih parametara ( $\log k_1$ ,  $\log k_0$ ), retencije u prevojnoj tački ( $\log k_m$ ), vrednosti prevojne tačke ( $\varphi_{\min}$ ), novodefinisanih retencionih parametara ( $\log k_H$ ,  $\log k_R$ ,  $\log k_A$ ) i molekulskih osobina ispitivanih jedinjenja.

Najznačajniji uticaj na dualni HILIC/RP mehanizam su pokazali parametri lipofilnosti (XLOGP2, milogP, AClogP, XLOGP3, average.logP, ALOGPs), molarna refraktivnost, polarnost, broj vodonikovih atoma (nH) i dimenzije molekula (*van der Waals*-ova zapremina, dijametar, molekulska masa). Na osnovu toga, može se zaključiti da *van der Waals*-ove interakcije, kao i polarne interakcije između ispitivanih jedinjenja i polarnih grupa na

stacionarnoj fazi (vodonične veze, dipolne interakcije) predstavljaju osnovu retencionog ponašanja u mehanizmu dualnih HILIC/RP interakcija. Takođe, na osnovu korelacije retencionih deskriptora sa parametrom rastvorljivosti (average.logS), interakcije između ispitivane supstance i rastvarača u mobilnoj fazi imaju značajan uticaj na retencioni proces. Rastvorljivost ispitivane supstance zavisi od polarnosti rastvarača zbog čega se može smatrati da dipolni momenat, dielektrična konstanta i proton donor/akceptor osobine utiču na retenciono ponašanje u *mixed-mode* HILIC/RP sistemu.

Sa Slike 50, može se uočiti da lipofilnost negativno utiče na vrednosti  $\varphi_{\min}$ , pozitivno na ekstrapolisani retencioni faktor  $\log k_1$  (za  $\varphi=0$ ) i pozitivno na vrednost parametra  $\log k_R$  (saglasno uticaju lipofilnosti na retenciju u RP sistemu). Između lipofilnosti i parametara retencije u HILIC uslovima ( $\log k_0$ ,  $\log k_H$ ) je uočena slaba korelacija, koja potvrđuje složenost HILIC mehanizma i ukazuje na doprinos ostalih molekulskih karakteristika na retencioni proces u HILIC sistemu. Može se uočiti da  $\log D$  vrednosti korelišu sa vrednostima  $\log k_0$  i posedično imaju uticaj i na HILIC i na RP mehanizam.

Klasična HILIC tehnika podrazumeva upotrebu polarnih stacionarnih faza u kombinaciji sa mobilnim fazama koje sadrže visoke koncentracije organskog rastvarača (npr. acetonitrila) u vodi. Iako se voda najčešće koristi kao polarni modifikator mobilne faze, u literaturi se mogu naći i primeri upotrebe organskih modifikatora (npr. metanola) u ispitivanjima nevodnih HILIC sistema (NA-HILIC). Prednost HILIC-e je pogodnost u ispitivanju polarnih i jonizovanih jedinjenja, uz nedostatke koji obuhvataju visoku potrošnju organskih rastvarača i potencijalne ekološke rizike [101].

U suprotnosti, SFC je ekološki prihvatljiva tehnika, koja obuhvata upotrebu mobilne faze sa visokim koncentracijama ugljen dioksida. Izvorno, SFC pogoduje ispitivanju nepolarnih jedinjenja, ali se smatra da se modifikacijama mobilne i stacionarne faze prevazilaze potencijalni nedostaci i postiže razdvajanje i jedinjenja sa polarnim karakteristikama [166, 226].

Kako se potencijalne prednosti, ali i nedostaci NA-HILIC i SFC tehnike dopunjuju, retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja je ispitano na polarnim stacionarnim fazama (*mixed-mode diol*, diol stacionarna faza) u NA-HILIC i SFC sistemima.

#### 4.2. Modelovanje retencionog ponašanja u NA-HILIC i SFC sistemima

U NA-HILIC i SFC sistemima ispitano je retenciono ponašanje odabranih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja, Slika 51. Kao modifikatori mobilne faze koršćeni su: *i*) metanolni rastvor 20 mM amonijum-formijata *ii*) metanolni rastvor 20 mM amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (*v/v*) mravlje kiseline. Doprinos hidrofilnih i hidrofobnih interakcija na retenciono ponašanje ispitan je na klasičnoj diol i modifikovanoj *mixed-mode diol* koloni.

Dobijene vrednosti retencionog faktora  $\log k$ , u NA-HILIC i SFC sistemima na 15% i 35% zapreminskom udelu metanola u mobilnoj fazi, prikazane su u Tabeli 15.

Tabela 15. Vrednosti logk parametra za 15% i 35% udele modifikatora u mobilnoj fazi u NA-HILIC i SFC-u.

Jedinjenje	Diol stacionarna faza								Mixed-mode diol stacionarna faza							
	NH <sub>4</sub> COOH/MeOH				0,1%HCOOH, NH <sub>4</sub> COOH/MeOH				NH <sub>4</sub> COOH/MeOH				0,1%HCOOH, NH <sub>4</sub> COOH/MeOH			
	NA-HILIC		SFC		NA-HILIC		SFC		NA-HILIC		SFC		NA-HILIC		SFC	
	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%
Antazolin	0,17 (0,0004)	0,85 (0,0085)	1,95 (0,0606)	1,07 (0,0886)	-0,02 (0,0095)	0,75 (0,0055)	1,82 (0,0060)	0,82 (0,0084)	0,72 (0,0108)	-0,10 (0,0085)	1,49 (0,0128)	0,53 (0,0037)	0,28 (0,0067)	-0,32 (0,0071)	1,68 (0,0154)	0,68 (0,0137)
Aripiprazol	-0,68 (0,0016)	-0,09 (0,0063)	0,96 (0,0074)	0,33 (0,0107)	-0,38 (0,0044)	0,08 (0,0077)	0,98 (0,0058)	0,27 (0,0098)	0,44 (0,0256)	-0,19 (0,0091)	0,89 (0,0139)	0,23 (0,0299)	0,26 (0,0104)	-0,20 (0,0049)	0,92 (0,0098)	0,31 (0,0049)
Imp A5	-2,35 (0,0071)	-1,43 (0,0151)	0,12 (0,0067)	-0,44 (0,0076)	-2,34 (0,0078)	-1,29 (0,0135)	0,06 (0,0072)	-0,49 (0,0072)	-0,58 (0,0167)	-0,90 (0,0115)	0,29 (0,0053)	-0,25 (0,0087)	-0,72 (0,0079)	-0,84 (0,0182)	0,30 (0,0027)	-0,25 (0,0043)
Imp A6	-1,91 (0,0260)	-1,10 (0,0080)	0,30 (0,0056)	-0,33 (0,0058)	-2,56 (0,0347)	-1,43 (0,0164)	0,26 (0,0068)	-0,37 (0,0079)	-0,45 (0,0070)	-0,78 (0,0066)	0,60 (0,0245)	-0,04 (0,0065)	-0,63 (0,0084)	-0,48 (0,0079)	1,31 (0,0236)	0,52 (0,0219)
Imp A11	-0,37 (0,0019)	0,30 (0,0214)	1,30 (0,0103)	0,62 (0,0067)	-0,18 (0,0092)	0,42 (0,0100)	1,28 (0,0085)	0,48 (0,0063)	0,69 (0,0144)	0,0045 (0,0010)	1,18 (0,0103)	0,42 (0,0097)	0,43 (0,0062)	-0,13 (0,0088)	0,60 (0,0026)	-0,04 (0,0046)
Benazolin	0,30 (0,0029)	0,97 (0,0111)	1,86 (0,0096)	1,11 (0,0792)	0,09 (0,0032)	0,87 (0,0086)	1,91 (0,0090)	0,86 (0,0069)	0,87 (0,0067)	0,09 (0,0075)	1,60 (0,0056)	0,65 (0,0054)	0,40 (0,0078)	-0,27 (0,0064)	1,91 (7,9415E-05)	0,80 (0,0013)
Brimonidin	-0,0041 (0,0007)	0,45 (0,0074)	1,71 (0,0107)	0,95 (0,0063)	-0,02 (0,0014)	0,52 (0,0090)	1,58 (0,0078)	0,68 (0,0066)	0,71 (0,0103)	0,02 (0,0077)	1,36 (0,0069)	0,48 (0,0042)	0,41 (0,0093)	-0,33 (0,0086)	1,56 (0,0165)	0,64 (0,0107)
Detomidin	-0,92 (0,0011)	-0,30 (0,0094)	0,60 (0,0088)	0,0050 (0,0011)	-0,59 (0,0081)	-0,21 (0,0055)	0,58 (0,0096)	-0,06 (0,0111)	0,19 (0,0102)	-0,35 (0,0533)	0,49 (0,0079)	-0,09 (0,0060)	0,06 (0,0092)	-0,34 (0,0066)	0,61 (0,0217)	-0,0044 (0,0080)
Efaroksan	0,21 (0,0103)	0,88 (0,0086)	1,73 (0,0088)	0,93 (0,0069)	0,02 (0,0013)	0,81 (0,0140)	1,63 (0,0063)	0,70 (0,0264)	0,75 (0,0080)	-0,05 (0,0078)	1,25 (0,0112)	0,37 (0,0066)	0,29 (0,0055)	-0,37 (0,0077)	1,46 (0,0294)	0,53 (0,0046)
Harman	-0,81 (0,0078)	-0,28 (0,0213)	0,57 (0,0073)	0,05 (0,0112)	0,53 (0,0060)	-0,19 (0,0060)	0,59 (0,0106)	0,01 (0,0074)	0,25 (0,0052)	-0,21 (0,0082)	0,65 (0,0042)	0,07 (0,0042)	0,14 (0,0072)	-0,29 (0,0059)	0,74 (0,0158)	0,15 (0,008)
Harmin	-0,53 (0,0062)	-0,02 (0,0119)	0,91 (0,0142)	0,30 (0,0065)	-0,28 (0,0074)	0,12 (0,0151)	0,91 (0,0088)	0,22 (0,0098)	0,50 (0,0089)	-0,07 (0,0078)	0,84 (0,0109)	0,19 (0,0078)	0,29 (0,0067)	-0,27 (0,0088)	0,99 (0,0213)	0,30 (0,0094)
Idazoksan	0,18 (0,0039)	0,75 (0,0124)	1,71 (0,0075)	1,04 (0,0513)	0,05 (0,0041)	0,77 (0,0030)	1,63 (0,0099)	0,80 (0,0107)	0,75 (0,0084)	-0,0023 (0,0007)	1,27 (0,0169)	0,51 (0,0103)	0,31 (0,0069)	-0,40 (0,0108)	1,52 (0,0131)	0,70 (0,0091)
Olanzapin	0,32 (0,0054)	0,81 (0,0050)	1,87 (0,0052)	1,28 (0,0102)	0,34 (0,0050)	0,92 (0,0061)	1,85 (0,0133)	1,09 (0,0068)	0,82 (0,0081)	0,33 (0,0348)	1,49 (0,0069)	0,76 (0,0115)	0,65 (0,0066)	-0,02 (0,0010)	1,77 (0,0078)	0,99 (0,0249)
RX 821002	-0,14 (0,0095)	0,34 (0,0080)	1,47 (0,0069)	0,92 (0,0600)	-0,04 (0,0018)	0,52 (0,0108)	1,46 (0,0081)	0,73 (0,0074)	0,63 (0,0129)	-0,10 (0,0043)	1,00 (0,0070)	0,34 (0,0059)	0,26 (0,0077)	-0,41 (0,0066)	1,28 (0,0504)	0,56 (0,0044)
Tizanidin	-0,39 (0,0086)	0,01 (0,0016)	1,25 (0,0036)	0,49 (0,0059)	-0,24 (0,0040)	0,16 (0,0126)	1,17 (0,0536)	0,32 (0,0102)	0,50 (0,0072)	-0,14 (0,0063)	0,91 (0,0134)	0,12 (0,0079)	0,24 (0,0082)	-0,35 (0,0141)	1,07 (0,0207)	0,23 (0,0093)
Trimazolin	0,24 (0,0034)	0,91 (0,0171)	1,94 (0,0107)	1,06 (0,0414)	0,04 (0,0013)	0,82 (0,0082)	1,46 (0,0063)	0,81 (0,0058)	0,76 (0,0121)	-0,02 (0,0016)	1,45 (0,0145)	0,49 (0,0133)	0,32 (0,0067)	-0,31 (0,0082)	1,65 (0,0292)	0,65 (0,0072)
Ziprazidon	-1,33 (0,0065)	-0,53 (0,0095)	0,66 (0,0066)	-0,01 (0,0011)	-0,79 (0,0055)	-0,43 (0,0106)	0,66 (0,0057)	-0,02 (0,0102)	0,13 (0,0091)	-0,32 (0,0071)	0,85 (0,0092)	0,18 (0,0068)	0,08 (0,0085)	-0,25 (0,0144)	0,89 (0,0085)	0,21 (0,0110)
Imp Z1	0,33 (0,0092)	0,87 (0,0090)	1,10 (0,0146)	0,59 (0,0083)	0,08 (0,0034)	0,83 (0,0101)	1,04 (0,0903)	0,41 (0,0090)	0,93 (0,0088)	0,16 (0,0111)	0,98 (0,0109)	0,40 (0,0024)	0,44 (0,0077)	-0,30 (0,0098)	1,13 (0,0226)	0,51 (0,0115)
Imp Z2	/	/	0,53	-0,18	/	/	0,51	-0,23	-0,26	-0,62	0,72	0,03	0,08	-0,25	0,75	0,04

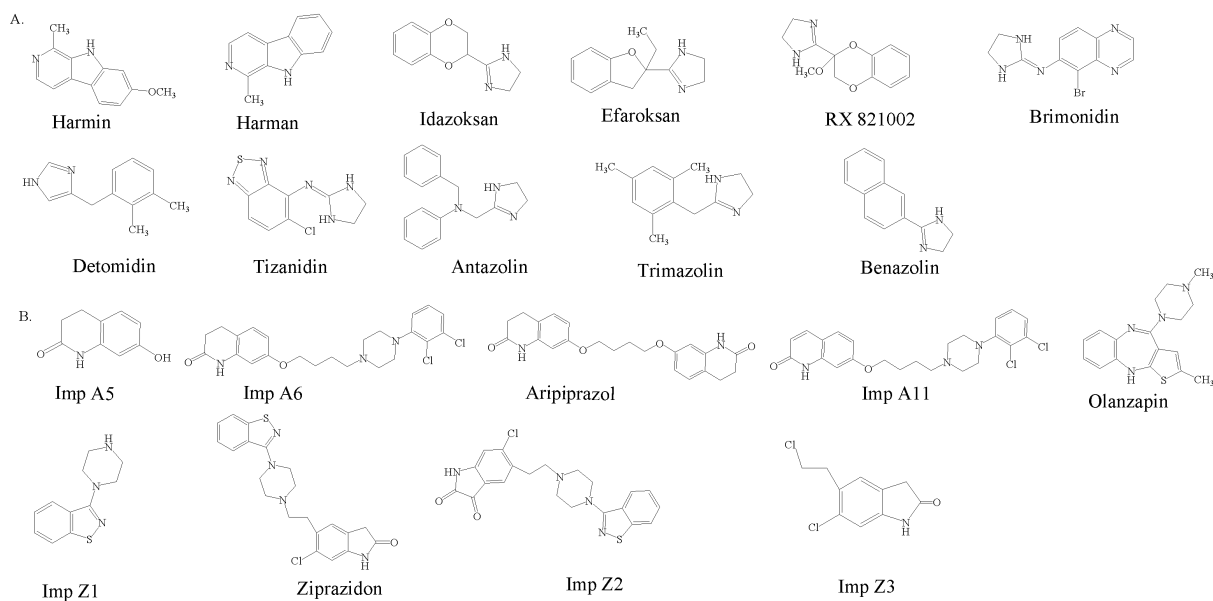
---

	(0,0075)	(0,0053)			(0,0047)	(0,0060)	(0,0082)	(0,0108)	(0,0054)	(0,0060)	(0,0062)	(0,0094)	(0,0063)	(0,0066)
Imp Z3	0,46	-0,22	-1,63	-1,19	0,49	-0,18	0,10	-0,24	1,20	0,47	0,16	0,04	1,20	0,46
	(0,0088)	(0,0067)	(0,0124)	(0,0059)	(0,0057)	(0,0070)	(0,0115)	(0,0070)	(0,0065)	(0,0046)	(0,0075)	(0,0040)	(0,0026)	(0,0026)

---

Standardne devijacije za tri ponovljena merenja su prikazane u zagradama.





Slika 51. Hemijske strukture odabranih A. liganda imidazolinskih B. liganada serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja ispitanih u NA-HILIC i SFC sistemima.

Dobijene  $\log k$  vrednosti na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi su veće u poređenju sa vrednostima dobijenim na diol stacionarnoj fazi. Na osnovu toga, može se zaključiti da nepolarni alifatični niz *mixed-mode* stacionarne faze značajno utiče na retenciju ispitivanih jedinjenja (Tabela 15).

Na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi, vrednosti  $\log k$  parametra u SFC sistemu su generalno više u odnosu na NA-HILIC sistem, posebno na 15% udela metanola u mobilnoj fazi. Ovakav efekat je očekivan, s obzirom da je CO<sub>2</sub> mnogo slabiji eluent u odnosu na acetonitril. Na diol stacionarnoj fazi, na 35% udela metanola u mobilnoj fazi, nekoliko jedinjenja pokazuje nešto drugačije retencione karakteristike u NA-HILIC i SFC sistemima. Vrednosti  $\log k$  parametara derivata imidazolina (benazolol, trimazolol, efaroksan) i derivata piperazina (Imp Z1) su niže u SFC-u u odnosu na NA-HILIC (Tabela 15).

Uticaj dodatka kiseline mobilnoj fazi na vrednosti  $\log k$  parametara je izraženiji u SFC-u u odnosu na NA-HILIC.

Na diol stacionarnoj fazi u NA-HILIC sistemu, za jedinjenja koja su jake baze sa sterno dostupnim baznim grupama prisutna je pravilnost u retencionom ponašanju npr.  $\log k$  vrednosti antazolol, benazolol, trimazolol, idazoksana, efaroksana (derivati imidazolol) i Imp Z1 (derivat benzimidazolol) značajno rastu sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi.

Sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi, ne dolazi do značajnih promena retencionog ponašanja na *mixed-mode* stacionarnoj fazi. U suprotnosti, retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja je značajno promenjeno na diol stacionarnoj fazi, gde dodakom kiseline u mobilnu fazu dolazi do opadanja  $\log k$  vrednosti u NA-HILIC i njihovog porasta u SFC sistemu.

U SFC sistemu (na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi) jedini izuzetak je Imp A11, čija se vrednost parametara  $\log k$  značajno povećava nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi, dok je u NA-HILIC sistemu, to slučaj sa  $\log k$  vrednostima Imp Z3. Povećanje u vrednostima  $\log k$  parametara nakon dodatka kiseline u mobilnu fazu za Imp A11 i Imp Z3, može se objasniti

modifikacijom jačine interakcije ispitivanih jedinjenja sa slobodnim diol grupama stacionarne faze, kao posledicom građenja vodoničnih veza.

#### 4.2.1. Procena retencionog ponašanja na osnovu parametra selektivnosti, $S$

Razlike između retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninских receptora i srodnih jedinjenja u NA-HILIC i SFC sistemima se mogu najjednostavnije objasniti na osnovu vrednosti  $S$  parametra, izračunatog korišćenjem jednačine (22). Dobijene  $S$  vrednosti su prikazane u Tabeli 16.

Tabela 16. Razlike retencionog ponašanja odabranih jedinjenja u NA-HILIC i SFC sistemima na 15% i 35% udelu metanola u mobilnoj fazi, izražene kao  $S$  vrednost.

Hromatografski uslovi			SFC								
			Diol		Diol (sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi)		Mixed-mode diol		Mixed-mode diol (sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi)		
			15	35	15	35	15	35	15	35	
NA-HILIC	Diol	15	40								
		35		33							
	Diol (sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi)	15		54,35							
		35			33,23						
	Mixed-mode diol	15				61					
		35					51				
	Mixed-mode diol (sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi)	15						87			
		35							94		

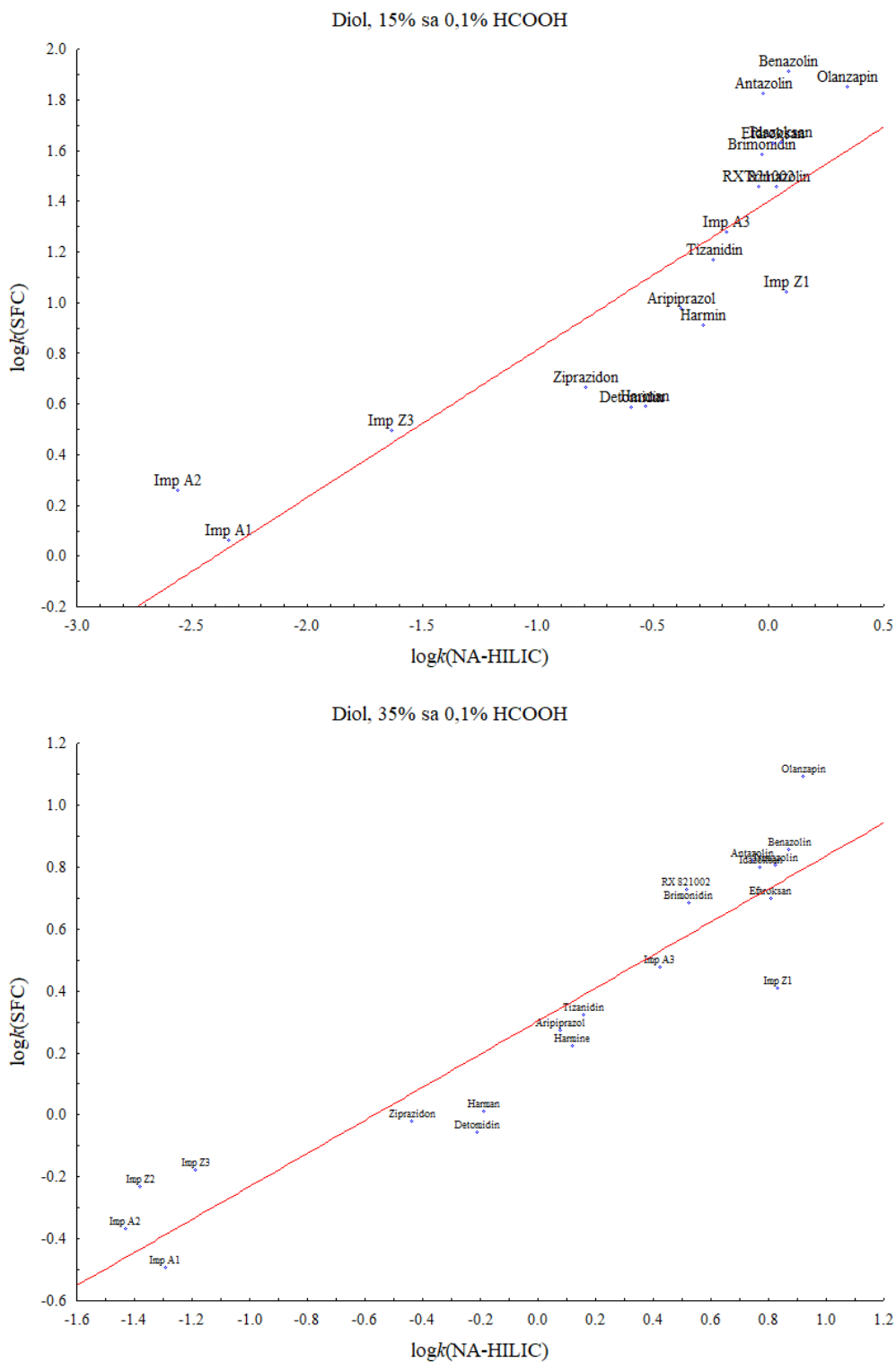
Vrednosti obojene plavo ( $S \geq 70$ ) opisuju značajne razlike između retencije u NA-HILIC i SFC sistemima. Vrednosti obojene zeleno odgovaraju intermedijernim razlikama ( $35 < S < 70$ ). Vrednosti obojene ljubičastom bojom ( $S \leq 35$ ) ukazuju na sličnosti u retencionom ponašanju u NA-HILIC i SFC sistemima.

Na osnovu dobijenih  $S$  vrednosti, može se uočiti da dodatak mravlje kiseline mobilnoj fazi povećava razlike između vrednosti parametara  $\log k$  dobijenih na diol i *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi. Teorijski, na diol stacionarnoj fazi, dodatak kiseline mobilnoj fazi bi mogao da utiče na prelazak jedinjenja sa slobodnim baznim grupama iz neutralne forme u formu soli ili formu jonskog para. Na taj način, dolazi do porasta mase jedinjenja, kao posledice dodatka kiselog protiv jona. Dodatno, visoki dipolni momenat između suprotnih naelektrisanja dovodi i do porasta polarnosti. Na umereno polarnim stacionarnim fazama, porast mase i porast polarnosti je uzrok povećanog zadržavanja zbog povećanih intermolekulskih interakcija sa polarnim grupama na površini stacionarne faze. Navedeni efekat je posebno vidljiv na klasičnoj diol stacionarnoj fazi u NA-HILIC sistemu (Tabela 15, Tabela 16).

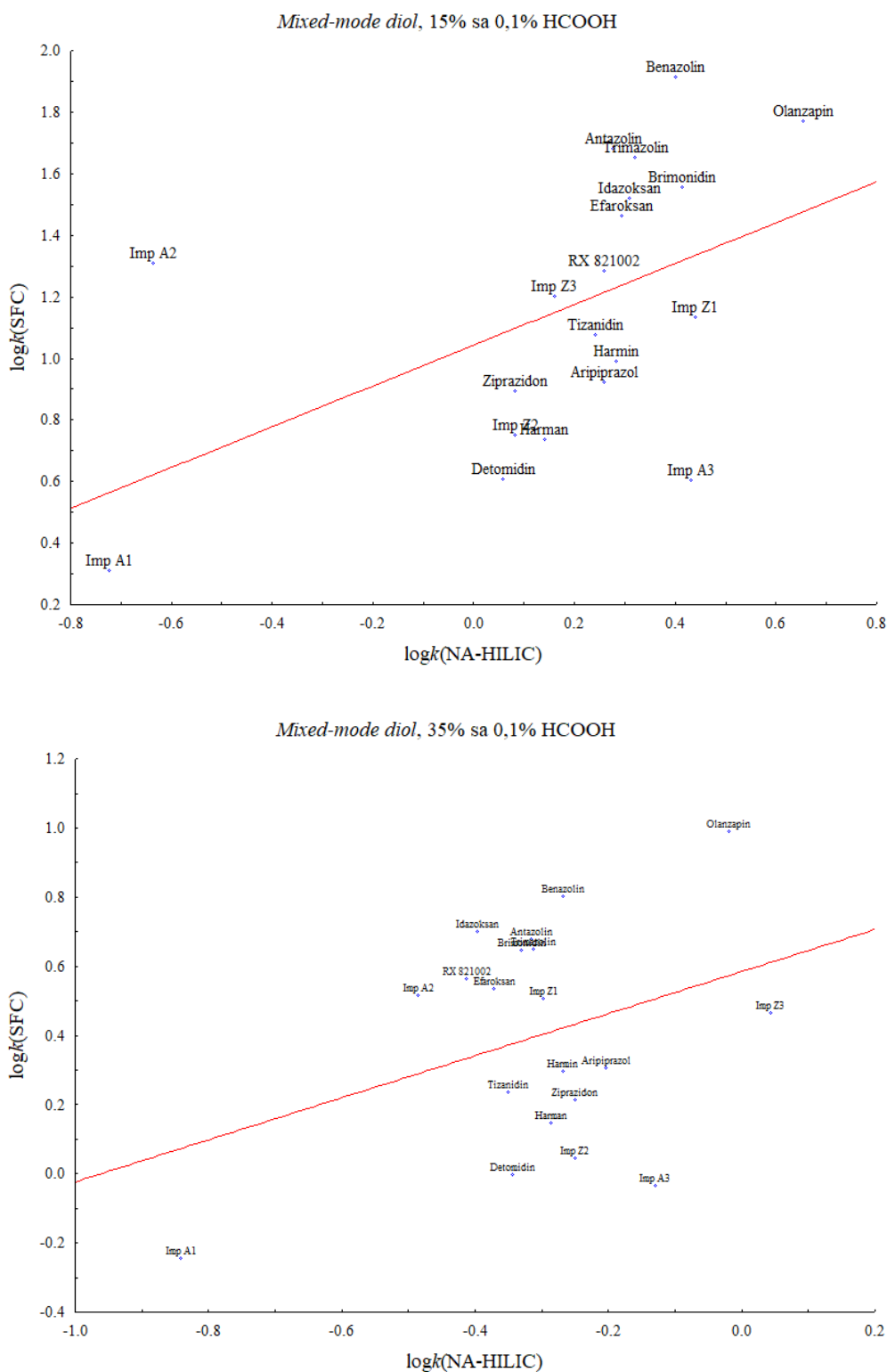
U SFC-u zbog kisele prirode smeše CO<sub>2</sub>-metanol, dolazi do promene jonskog stanja ispitivanih jedinjenja koja poseduju funkcionalne grupe sa protom akceptorskim osobinama (derivati imidazolina i derivati piperazina). Na osnovu toga, efekat dodatka mravlje kiseline mobilnoj fazi u SFC sistemu je suprotan efektu dodatka mravlje kiseline mobilnoj fazi u NA-HILIC sistemu. Smatra se da u SFC sistemu ispitivana jedinjenja već postoje u obliku jonskih

parova ili da ne menjaju svoje jonsko stanje sa dodatkom mravlje kiseline mobilnoj fazi zbog kiselog učinka smeše CO<sub>2</sub>-metanol [226]. Razlike između vrednosti  $\log k$  parametra u NA-HILIC i SFC sistemima, nastale nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi, prikazane su na Slici 52.

A.



B.



Slika 52. Korelacija između  $\log k(\text{SFC})$  i  $\log k(\text{NA-HILIC})$  vrednosti na A. Diol B. *Mixed-mode diol* stacionarnoj fazi, na 15% i 35% udelima 20 mM metanolnog rastvora amonijum-formijata sa 0,1% dodatkom mravlje kisline (v/v).

Sa Slike 52, može se uočiti da su razlike između  $\log k(\text{SFC})$  i  $\log k(\text{NA-HILIC})$  vrednosti veće kod derivata piperazina (liganada serotoninskih receptora) u odnosu na derivate imidazolina. Derivati piperazina imaju izraženije proton akceptorske karakteristike (Tabela 5), pa dodatak kiseline u mobilnu fazu u većem stepenu utiče na promenu njihovog retencionog ponašanja npr. olanzapin, Imp Z3, aripiprazol i ziprazidon.

Na osnovu  $S$  vrednosti koje su prikazane u Tabeli 16, najveće razlike između  $\log k(\text{SFC})$  i  $\log k(\text{NA-HILIC})$  parametara su prisutne na *mixed-mode* stacionarnoj fazi. U tom slučaju, nakon dodatka kiseline u mobilnu fazu, u većem stepenu dolazi do modifikacije površine stacionarne faze, u odnosu na modifikaciju jačine njene interakcije sa ispitivanim jedinjenjima.

Može se pretpostaviti da se na površini *mixed-mode* stacionarne faze nalaze protonizabilne funkcionalne grupe i da dodatkom kiseline u mobilnu fazu, dolazi do njihovog protonovanja u NA-HILIC sistemu. Detaljna struktura ovih funkcionalnih grupa nije poznata od strane proizvođača, ali se očekuje da takva grupa zauzima važnu ulogu u retencionom ponašanju. Kao posledica njihovog protonovanja, dolazi do promene retencionog mehanizma, odgovornog za pojavu razlika u retencionom ponašanju.

Efekat dodatka kiseline mobilnoj fazi u SFC sistemu je suprotan u odnosu na NA-HILIC zbog kisele prirode SFC mobilne faze. Smatra se da dodatak kiseline mobilnoj fazi dovodi do pretvaranja ispitivanih jedinjenja u formu jonskog para i posledično povećanog zadržavanja u sistemu. U SFC-u, protonizabilne grupe na *mixed-mode* stacionarnoj fazi su već protonovane zbog kisele prirode mobilne faze, pa dodatak kiseline mobilnoj fazi ne dovodi do promena u vrsti fizičko-hemijskih interakcija.

#### 4.2.2. Primena LSS modela u definisanju retencionog ponašanja

Retenciono ponašanje u NA-HILIC i SFC sistemima liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja je opisano primenom jednačine (13) i jednačine (14) za 35-15% (35, 30, 25, 20, 15) zapreminske udele metanola u mobilnoj fazi, na diol i *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi. Kao modifikatori mobilne faze korišćeni su:

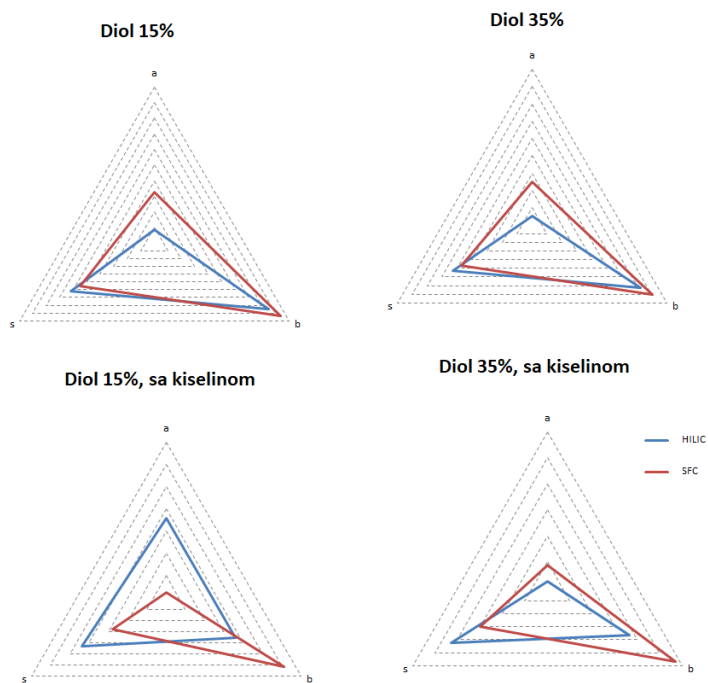
- i) 20 mM amonijum-formijat
- ii) 20 mM amonijum-formijat sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline.

Dobijeni rezultati su prikazani u Tabelama 3A - 10A u Prilogu A. Na osnovu  $R^2 > 0,90$ ;  $S.E. < 0,04$ ;  $p < 0,05$  može se zaključiti da primenjene jednačine pouzdano opisuju retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u NA-HILIC i SFC sistemima. U SFC sistemu, prisutna je nešto bolja primenljivost adsorpcionog u odnosu na primenljivost particionog modela u opisivanju retencionog procesa.

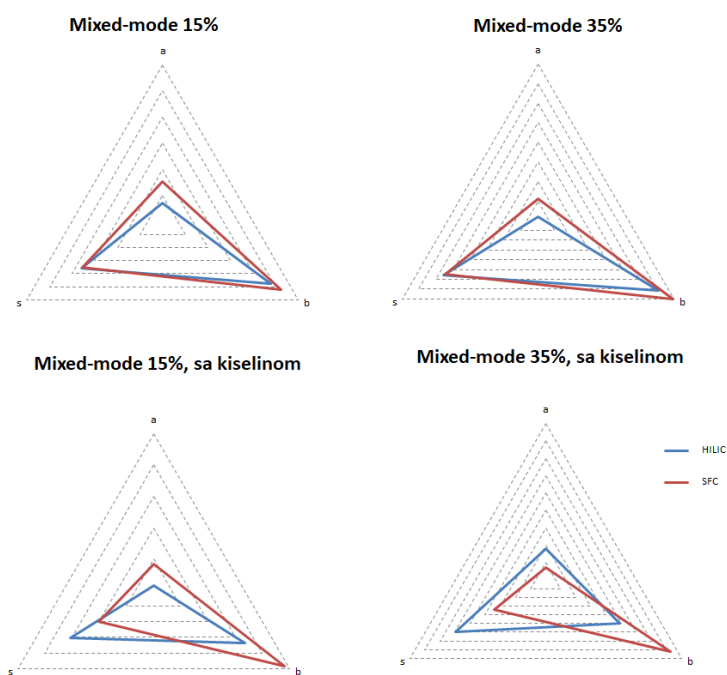
#### 4.2.3. Primena LSER modela u definisanju retencionog ponašanja

*Step-wise* postupkom u MLR analizi, uočeno je da polarne interakcije između ispitivanih jedinjenja i funkcionalnih grupa na stacionarnoj fazi, kao i vodonične veze imaju značajan efekat na NA-HILIC i SFC retencioni proces. Promena  $\log k$  vrednosti u zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika ispitivanih jedinjenja definisana je pomoću LSER modela. Statistički podaci dobijenih modela su prikazani u Tabeli 17. Velikim slovima  $S$  su označene dipolne interakcije,  $A$  označava proton donorske osobine (kiselost vodoničnih veza), a  $B$  proton akceptorske osobine (baznost vodoničnih veza). Mala slova ( $a$ ,  $b$ ,  $s$ ) opisuju vrednosti komplementarnih ( $A$ ,  $B$ ,  $S$ ) interakcija u dobijenim modelima. Vrednost koeficijenta  $s$  odgovara efektu dipolnih interakcija,  $b$  opisuje jačinu proton akceptorskih interakcija, dok vrednost koeficijenta  $a$  opisuje jačinu proton donorskih interakcija. Odnos  $a$ ,  $b$ ,  $s$  koeficijenata u NA-HILIC/LSER i SFC/LSER modelima je prikazan na Slici 53 korišćenjem *Tanaka*-radar plotova.

A.



B.



Slika 53. Poređenje retencionog ponašanja u NA-HILIC i SFC sistemima na osnovu LSER koeficijenta na A. diol stacionarnoj fazi B. *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi.

Nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi dolazi do značajnih promena u jačini intermolekulskih interakcija. Karakteristike izdvojenih 15% i 35% modela u SFC i NA-HILIC sistemima su sledeće (Slika 53, Tabela 17):

- Dipolne interakcije ( $s$ ) i vodonične veze ( $b$ ) utiču da se NA-HILIC sistem sa 35% udelom metanola u mobilnoj fazi razlikuje od ostalih sistema zbog *i*) pozitivne vrednosti  $s$  koeficijenta 0,13 i negativne vrednosti  $b$  koeficijenta -0,18 na diol stacionarnoj fazi *ii*) pozitivne vrednosti  $s$  koeficijenta 0,19 i negativne vrednosti  $b$  koeficijenta -0,01 na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi.
- Na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi, sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi u 35% sistem korastvarača, vrednost koeficijent  $b$  raste od 0,40 do 0,65 u SFC-u; dok u 35% NA-HILIC sistemu opada od 0,22 do -0,01.
- U SFC-u sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi u 35% sistem korastvarača, vrednost koeficijenta  $s$  opada od -0,11 do -0,33, dok u NA-HILIC sistemu  $s$  vrednost raste od -0,09 do 0,19.
- Sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi u sistem sa 15% udelom metanola, vrednost  $b$  koeficijenta u NA-HILIC opada od 0,38 do 0,19; dok vrednost koeficijenta  $s$  raste od -0,22 do 0,03. U SFC sistemu sa 15% udelom metanola u mobilnoj fazi,  $b$  raste od 0,61 do 0,91; dok  $s$  opada od -0,23 do -0,50.



Tabela 17. LSER modeli za 15% i 35% udele metanola u mobilnoj fazi.

		<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>s</i>	<i>No</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>S.E.</i>	
Hromatografski uslovi										
Diol, sa kiselinom u mobilnoj fazi	Diol	15% NA-HILIC	0,40	-3,08	0,74	-0,41	18	0,9521	1,89E-07	0,2641
		35% NA-HILIC	0,97	-2,74	0,62	-0,37	18	0,9434	5,84E-07	0,2588
		15% SFC	1,67	-1,86	1,18	-0,74	20	0,9389	1,23E-07	0,2074
		35% SFC	1,00	-1,75	1,03	-0,66	20	0,9533	1,54E-08	0,1660
	Mixed-mode diol	15% NA-HILIC	1,94	-0,20	-0,20	0,18	19	0,8208	6,15E-04	0,2666
		35% NA-HILIC	1,26	-1,87	-0,18	0,13	19	0,8525	1,68E-04	0,2200
		15% SFC	1,52	-1,87	1,07	-0,61	20	0,9295	3,68E-07	0,2074
		35% SFC	0,75	-1,56	0,85	-0,51	20	0,9532	1,57E-08	0,1396
	Mixed-mode diol, sa kiselinom u mobilnoj fazi	15% NA-HILIC	0,93	-1,65	0,38	-0,22	20	0,9006	4,94E-06	0,1918
		35% NA-HILIC	0,10	-1,16	0,22	-0,09	20	0,8622	5,50E-05	0,1516
		15% SFC	1,11	-1,23	0,61	-0,23	20	0,8058	6,33E-04	0,2156
		35% SFC	0,34	-0,97	0,40	-0,11	20	0,8312	2,37E-04	0,1450
	Mixed-mode diol, sa kiselinom u mobilnoj fazi	15% NA-HILIC	0,39	-1,43	0,19	0,03	20	0,8922	9,04E-06	0,1475
		35% NA-HILIC	-0,42	-0,64	-0,01	0,19	20	0,8272	2,79E-04	0,0992
		15% SFC	1,32	-1,09	0,91	-0,50	20	0,7810	1,45E-03	0,2738
		35% SFC	0,47	-0,86	0,65	-0,33	20	0,7851	1,27E-03	0,1949

*No* je broj jedinjenja u MLR analizi, *S.E.* standardna greška LSER koeficijenata, *r* je koeficijent korelacije.

U slučaju diol stacionarne faze, može se primetiti da se nakon dodatka kiseline u mobilnu fazu, redukuje *b* i povećava vrednost *s* koeficijenta u oba hromatografska sistema (NA-HILIC, SFC). U NA-HILIC, uticaj vodoničnih *b* interakcija značajno opada: *i*) od 0,74 do -0,02 u 15% sistemu korastvarača *ii*) od 0,62 do -0,18 u 35% sistemu korastvarača. Vrednosti *s* dipolnih interakcija rastu: *i*) od -0,41 do 0,18 u 15% sistemu korastvarača *ii*) od -0,37 do 0,13 u 35% sistemu korastvarača (Tabela 17).

Razlike u  $\log k$  vrednostima koje nastaju nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi, mogu se objasniti različitom aktivnošću mravlje kiseline u kiselo-baznim reakcijama u NA-HILIC i SFC sistemima:

-U NA-HILIC sistemu, u smeši ACN-MeOH, mravlja kiselina ima jak efekat na protonovanje baznih jedinjenja. Tom prilikom, dolazi do prelaska baznih oblika ispitivanih jedinjenja iz neutralne forme u formu soli.

-U SFC sistemu, smeša CO<sub>2</sub>-MeOH poseduje kisele osobine [227-229], tako da kiselost mobilne faze smanjuje interakcije mravlje kiseline sa baznim jedinjenjima. Poreklo kiselosti nije u potpunosti razjašnjeno [230], ali je pronađeno da kiselost utiče na reticioni mehanizam [231].

#### 4.2.4. Faktori selektivnosti u NA-HILIC i SFC sistemima

Strukturno srodna jedinjenja kao što su ziprazidon-Imp Z2, Imp A11-aripiprazol predstavljaju kritične parove za razdvajanje u farmaceutskim ispitivanjima. Imp Z2 i Imp A11 su proizvodi oksidacije ziprazidona i aripiprazola, koji se najčešće mogu naći kao degradacione nečistoće u farmaceutskim sistemima [99-100]. Pored toga, Imp A11 je metabolit koji poseduje i antipsihotičnu aktivnost [232]. Razdvajanje četiri strukturno srodna hemijska para: ziprazidon-Imp Z2, Imp A11-aripiprazol, harmin-harman, idazoksan-RX 821002 u NA-HILIC i SFC-u je definisano vrednostima faktora selektivnosti ( $\alpha$ ), Tabela 18.

Tabela 18. Vrednosti parametra selektivnosti,  $\alpha$ .

Kritični parovi	Diol stacionarna faza								<i>Mixed-mode diol</i> stacionarna faza							
	NH <sub>4</sub> COOH/MeOH				0,1% HCOOH, NH <sub>4</sub> COOH/MeOH				NH <sub>4</sub> COOH/MeOH				0,1% HCOOH, NH <sub>4</sub> COOH/MeOH			
	NA-HILIC		SFC		NA-HILIC		SFC		NA-HILIC		SFC		NA-HILIC		SFC	
	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%	15%	35%
Imp A11-Aripiprazol	2,04	2,43	2,17	1,96	1,58	2,21	2,00 (inverzija)	1,60 (inverzija)	1,76	1,55	1,96	1,56	1,49	1,19	2,08 (inverzija)	2,22 (inverzija)
Ziprazidon-Imp Z2	/	/	1,35	1,50	/	/	1,42	1,62	2,47	1,96	1,35	1,42	1,00	1,00	1,39	1,48
Idazoksan-RX 821002	2,10	2,55	1,75	1,30	1,25	1,81	1,49	1,18	1,33	1,24	2,00	1,50	1,12	1,04	1,71	1,37
Harmin-Harman	1,91	1,81	2,18	1,80	1,80	2,02	2,11	1,63	1,78	1,38	1,56	1,31	1,39	1,04	1,78	1,40

Vrednosti obojene crveno ukazuju na inverziju elucionih redosleda.

Visoke  $\alpha$  vrednosti pokazuju da se u NA-HILIC i SFC-u postiže zadovoljavajuće razdvajanje strukturno srodnih hemijskih parova (harmin-harman, idazoksan-RX 821002, Imp A11-aripirazol). Za razdvajanje kritičnog para ziprazidon-Imp Z2, najviše odgovara NA-HILIC i *mixed-mode diol* stacionarna faza ( $\alpha \geq 1,96$ ), dok se zadovoljavajuće razdvajanje Imp A11-aripirazol i ziprazidon-Imp Z2 postiže i u NA-HILIC i u SFC sistemima. Promena u retenciji kao inverzija elucionih redosleda između Imp A11 i aripirazola ( $\alpha \geq 2,08$ ) se javlja u SFC-u na diol i *mixed-mode* koloni nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi.

Karakteristike sistema sa *mixed-mode* stacionarnom fazom, nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi su sledeće (Tabela 17):

- Niska vrednost parametra selektivnosti ( $\alpha = 1,00$ ) za ziprazidon i Imp Z2 u NA-HILIC sistemu se može objasniti niskim vrednostima  $b$  i  $s$  koeficijenata. Molekulske osobine ziprazidona i Imp Z2, kao što su sposobnost vezivanja protona ( $B$ ) i dipolne karakteristike ( $S$ ) značajno utiču na vrednost parametra  $\log k$ . Posledično, niske vrednosti komplementarnih  $b$  i  $s$  koeficijenta dovode do smanjenih razlika između retencije ziprazidona i retencije Imp Z2.

- Niska  $\alpha$  vrednost ( $\alpha = 1,04$ ) u 35% NA-HILIC sistemu za idazoksan i RX 821002 se može objasniti niskom vrednošću  $b$  koeficijenta ( $b = - 0,01$ ) koja umanjuje razlike u retenciji uslovljene baznim osobinama idazoksana ( $B = 1,16$ ) i RX 821002 ( $B = 1,38$ ).

Karakteristike sistema sa diol stacionarnom fazom, nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi su sledeće (Tabela 17):

- Prisutne su visoke vrednosti parametara selektivnosti ( $\alpha = 2,17$ ;  $\alpha = 2,00$  sa dodatkom kiseline mobilnoj fazi) za harmin i harman u 15% SFC sistemu. Visoke vrednosti  $b$  koeficijenta povećavaju razlike u retenciji ispitivanih jedinjenja koje su uslovljene razlikama u baznim osobinama; harman ( $B = 0,67$ ), harmin ( $B = 0,88$ ).

Rezultati u Tabeli 18 prikazuju primenljivost NA-HILIC i SFC sistema za razdvajanje strukturno srodnih jedinjenja. Male razlike u molekulske osobinama (proton donorske/akceptorske karakteristike, polarnost) dovode do značajnih razlika u retencionim parametrima, tako da se testirani hromatografski sistemi mogu uspešno primeniti u farmaceutskim ispitivanjima.

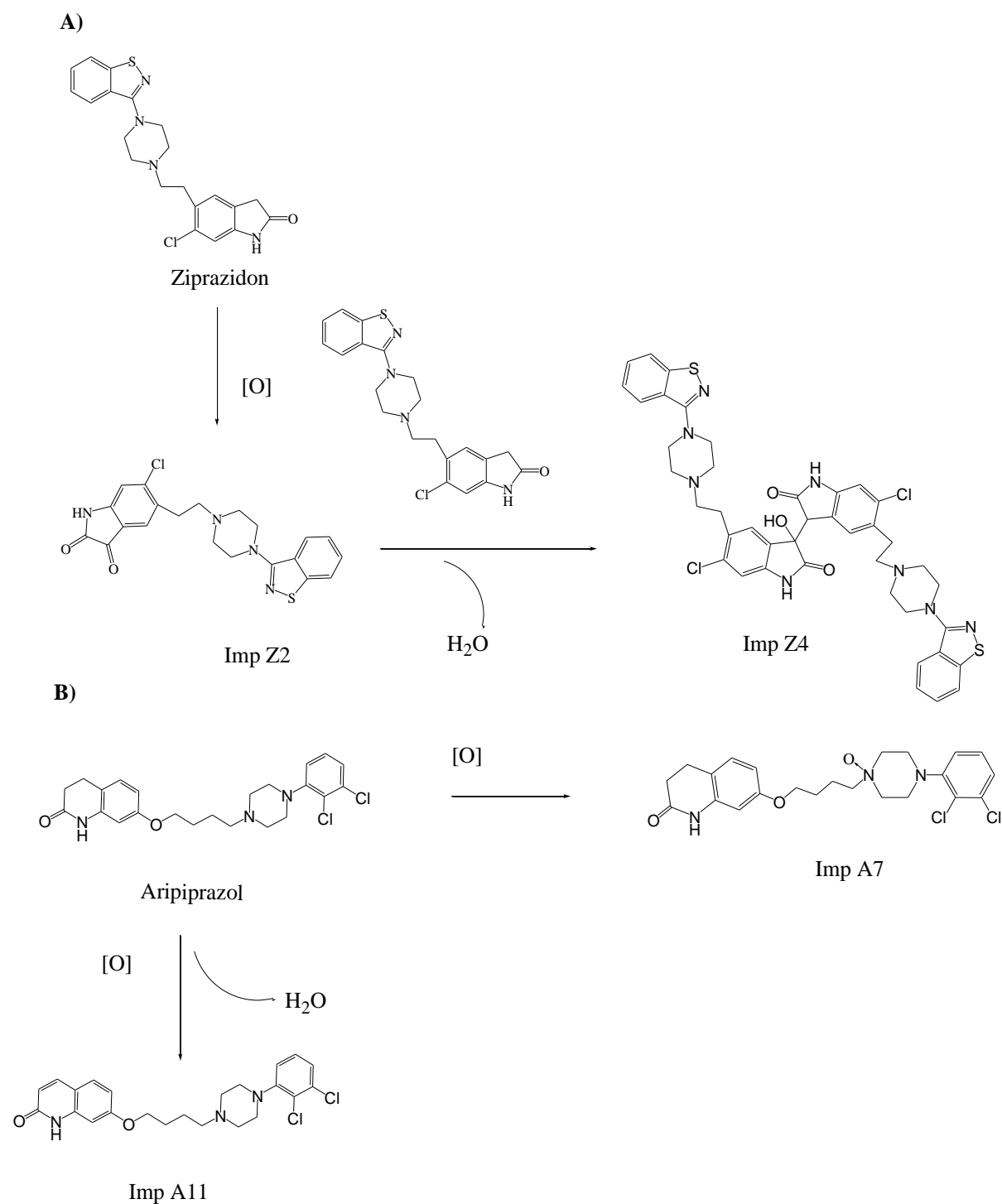
#### 4.2.5. Uticaj parametara hromatografskog sistema na retenciono ponašanje

Na diol stacionarnoj fazi ispitan je uticaj parametara hromatografskog sistema (temperatura, zapreminski udeo metanola, koncentracija pufera) na retenciono ponašanje u NA-HILIC i SFC-u. Dobijene vrednosti retencionih faktora ( $k$ ) derivata piperazina (ziprazidona, aripirazola) i strukturno srodnih jedinjenja (Imp Z2, Imp Z4, Imp A11, Imp A7) su prikazane u Tabeli 19. Promena eksperimentalnih uslova odgovara planu centralnog složenog dizajna.

Tabela 19. Vrednosti retencionih faktora ( $k$ ) i odgovarajući eksperimentalni uslovi.

Eksperimentalni uslovi			Jedinjenje													
$T$ (°C)	Metanol (%, v/v)	$C_{\text{pufer}}$ (mM)	Aripiprazol	Antazolin	Brimonidin	Benazolin	Detomidin	Efaroksan	Idazoksan	Harman	Harmin	RX 821002	Trimazolin	Tizanidin	Olanzapin	Ziprazidon
20	20	15	3,20	11,15	8,47	16,11	1,26	6,96	8,45	1,27	2,87	7,00	10,20	3,13	15,43	2,55
30	20	15	3,36	12,98	9,79	18,81	1,44	8,23	10,19	1,94	3,20	6,68	12,22	3,47	19,07	2,69
20	30	15	1,51	3,81	3,16	5,07	0,64	2,63	3,45	1,06	1,38	2,51	3,47	1,22	6,84	1,20
30	30	15	1,52	3,86	3,22	5,18	0,69	2,68	3,59	1,03	1,40	2,47	3,55	1,28	6,87	1,21
20	20	25	3,01	9,70	7,52	14,28	1,25	6,12	7,66	1,80	2,80	5,05	8,82	2,90	14,01	2,52
30	20	25	2,92	9,40	7,38	13,92	1,21	6,01	7,39	1,74	2,64	4,68	8,67	2,81	13,10	2,48
20	30	25	1,46	3,56	2,99	4,81	0,65	2,46	3,38	1,06	1,37	1,92	3,28	1,18	6,53	1,22
30	30	25	1,57	3,47	2,93	4,70	0,62	2,41	3,30	1,10	1,33	2,26	3,23	1,16	6,22	1,19
20	25	20	2,15	7,26	6,38	10,34	0,97	5,86	6,37	1,36	2,14	4,36	6,87	2,13	11,87	1,75
30	25	20	2,15	7,24	5,87	10,30	0,96	5,85	6,34	1,36	2,13	4,32	6,84	2,13	11,75	1,75
25	20	20	3,29	13,43	10,36	19,87	1,42	8,60	11,30	1,97	3,29	6,76	12,67	3,63	19,37	2,66
25	30	20	1,51	4,25	3,65	5,82	0,70	2,97	4,11	1,00	1,49	2,94	3,99	1,37	7,78	1,23
25	25	15	1,94	5,98	4,76	8,43	0,86	3,95	5,01	1,25	1,94	3,45	5,57	1,76	9,61	1,66
25	25	25	2,00	5,46	4,51	7,70	0,87	3,68	4,78	1,25	1,90	3,41	5,12	1,77	9,06	1,64
25	25	20	2,13	6,90	5,66	9,91	0,95	4,69	6,10	1,32	1,50	4,01	6,60	2,10	11,38	1,74
25	25	20	2,13	6,91	5,66	9,92	0,94	4,69	6,11	1,33	1,50	4,15	6,61	2,07	11,40	1,73
25	25	20	2,12	6,90	5,64	9,90	0,94	4,63	6,03	1,33	1,50	4,09	6,52	2,07	11,35	1,72

Na Slici 54 prikazane su hemijske strukture ispitivanih liganada serotonininskih receptora (aripiprazol, ziprazidon) i šema nastajanja strukturno srodnih jedinjenja.



Slika 54. Hemijske strukture A) ziprazidona B) aripiprazola i strukturno srodnih jedinjenja.

Reaktivnost  $\alpha$  položaja indolne strukture molekula ziprazidona doprinosi hemijskoj nestabilnosti i posledičnom formiranju degradacionih proizvoda. Alfa položaj ziprazidona je pogodan napadu nukleofila i u rastvoru lako formira oksidacioni proizvod (Imp Z2). Karbonilna grupa Imp Z2 je reaktivnija u odnosu na keto grupu i može učestvovati u reakciji aldolne kondenzacije sa drugom molekulom ziprazidona, kada nastaje Imp Z4 [98-100]. Imp A11 je aktivni metabolit aripiprazola koji nastaje *in vivo*, ali i *in vitro* oksidacijom aripiprazola. Oksidacijom atoma azota piperazinskog prstena aripiprazola nastaje aripiprazol N-oksid (Imp A7) koji se može naći u doziranim farmaceutskim oblicima [95-96].

RP-HPLC i TLC tehnike se najčešće koriste za razdvajanje ziprazidona, aripiprazola i srodnih jedinjenja [95-96, 99-100, 232-234]. Do sada, njihova retencija nije ispitivana u NA-HILIC i SFC sistemima.

Izračunate vrednosti  $\alpha$  parametra u NA-HILIC i SFC-u su prikazane u Tabeli 20.

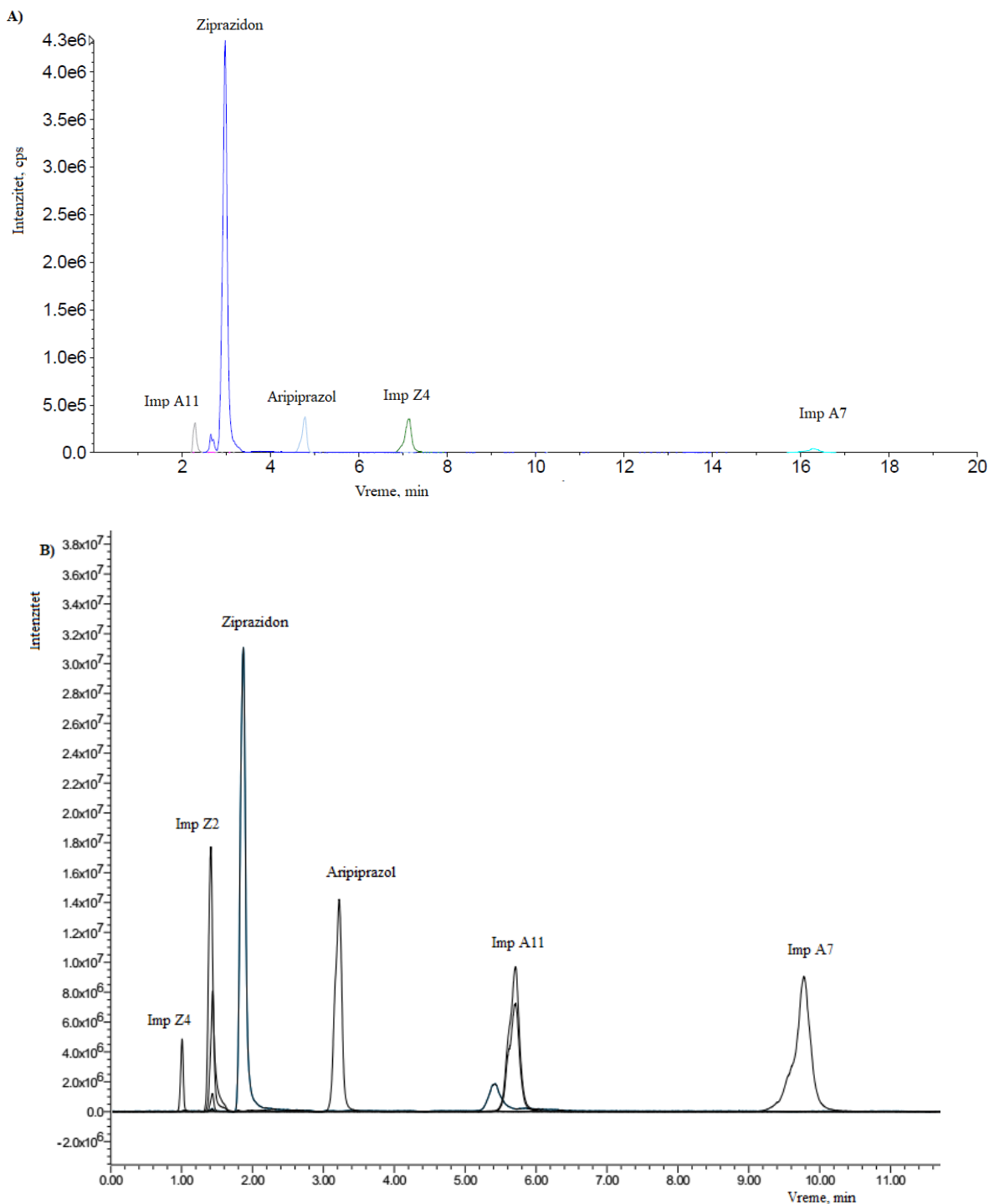
Tabela 20. Vrednosti parametra  $\alpha$  ispitivanih hemijskih parova.

Parametri			NA-HILIC				SFC			
$T$ (°C)	metanol (%, v/v)	$C_{\text{pufer}}$ (mM)	aripiprazol-Imp A11	ziprazidon-Imp Z2	ziprazidon-Imp Z4	Imp A7- aripiprazol	Imp A11- aripiprazol	ziprazidon-Imp Z2	ziprazidon-Imp Z4	Imp A7- aripiprazol
20	20	15	1,90	/	1,62	5,38	1,93	1,55	2,75	3,60
30	20	15	1,56	/	1,62	5,38	1,88	1,57	2,63	3,57
20	30	15	1,88	/	1,42	3,16	1,72	1,71	2,32	2,97
30	30	15	1,57	/	1,76	6,97	1,72	1,70	2,30	2,98
20	20	25	2,10	/	2,17	4,02	1,91	1,46	2,67	3,40
30	20	25	1,67	/	1,97	6,36	1,97	1,47	2,88	3,42
20	30	25	2,03	/	1,56	3,74	1,73	1,62	2,36	2,84
30	30	25	1,71	/	1,82	7,96	1,74	1,60	2,41	2,86
20	25	20	1,93	/	2,29	4,98	1,85	1,56	2,60	3,12
30	25	20	1,65	/	1,50	6,56	1,82	1,56	2,57	3,20
25	20	20	1,75	/	2,10	4,02	1,88	1,55	2,64	2,37
25	30	20	1,72	/	2,17	4,45	1,68	1,63	2,26	2,83
25	25	15	1,74	/	2,67	5,62	1,81	1,65	2,48	3,21
25	25	25	1,83	/	2,33	4,71	1,83	1,68	3,44	3,08
25	25	20	1,71	/	2,25	5,08	1,79	1,60	2,49	3,15
25	25	20	1,72	/	2,25	5,09	1,79	1,60	2,48	3,15
25	25	20	1,73	/	2,25	5,04	1,79	1,60	2,48	3,15

Stacionarna faza: diol kolona, Mobilna faza: metanolni rastvor amonijum-formijata sa 0,1% (v/v) dodatkom mravlje kiseline/ACN (NA-HILIC); metanolni rastvor amonijum-formijata sa 0,1% (v/v) dodatkom mravlje kiseline/CO<sub>2</sub> (SFC)



Na Slici 55 su prikazani NA-HILIC i SFC hromatogrami ispitivanih jedinjenja:



Slika 55. A) NA-HILIC hromatogram. Stacionarna faza: diol kolona, Mobilna faza: metanolni rastvor 25 mM amonijum-formijata sa 0,1% (v/v) dodatkom mravlje kiseline/ACN = 20 / 80 (v/v), 20°C. B) SFC hromatogram. Stacionarna faza: diol kolona, Mobilna faza: metanolni rastvor 25 mM amonijum-formijata sa 0,1% (v/v) dodatkom mravlje kiseline/CO<sub>2</sub> = 20 / 80 (v/v), 20 °C.

Sa Slike 55, u SFC-u se uočava inverzija elucionog redosleda između aripiprazola i Imp A11, koja nije prisutna u NA-HILIC sistemu. Takođe, postiže se i zadovoljavajuća razdvojenost ziprazidona i Imp Z2 ( $\alpha \geq 1,49$ ), kao i ziprazidona i Imp Z4 ( $\alpha \geq 2,36$ ) u poređenju sa NA-HILIC sistemom (Tabela 20).

Vrednosti faktora selektivnosti u Tabeli 20, pokazuju da se testirani NA-HILIC i SFC sistemi mogu iskoristiti za istovremeno hromatografsko ispitivanje i određivanje liganada serotoninskih receptora (ziprazidon, aripiprazol) i strukturno srodnih jedinjenja.

### 4.3. Modelovanje retencionog ponašanja u SFC sistemu na *mixed-mode* stacionarnoj fazi primenom metodologije eksperimentalnog dizajna

Retenciono ponašanje 14 odabranih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora je ispitano na *mixed-mode* stacionarnoj fazi u SFC sistemu primenom mobilne faze, smeše CO<sub>2</sub> i metanolnog rastvora amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline. Hromatografski uslovi odgovaraju planu centralnog složenog dizajna. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 19.

Primenom MLR analize, kao najznačajniji faktori koji utiču na parametar  $k$  izdvojeni su metanol i koncentracija pufera, kao i njihove kvadratne vrednosti:

$$k = \beta_0 + \beta_1 V_{\text{metanol}} + \beta_2 C_{\text{pufer}} + \beta_3 V_{\text{metanol}}^2 + \beta_4 C_{\text{pufer}}^2 \quad (23a)$$

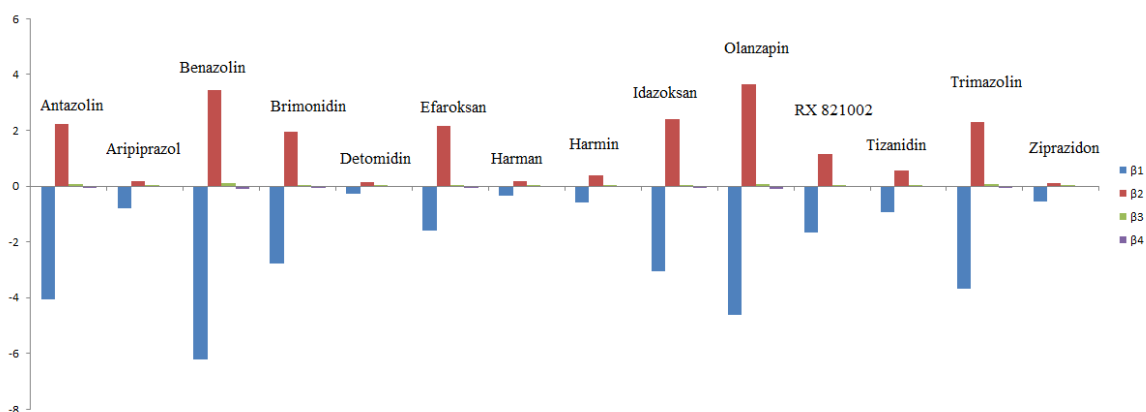
gde  $k$  predstavlja retencioni faktor ispitivanog jedinjenja,  $V_{\text{metanol}}$  opisuje zapreminski udeo metanola u mobilnoj fazi,  $C_{\text{pufer}}$  je koncentracija pufera,  $\beta_0$  odsečak. Koeficijent  $\beta_1$  kvantifikuje efekat zapreminskog udela metanola ( $V_{\text{metanol}}$ ),  $\beta_2$  efekat koncentracije pufera ( $C_{\text{pufer}}$ ),  $\beta_3$  efekat kvadratne vrednosti zapreminskog udela metanola ( $V_{\text{metanol}}^2$ ), dok  $\beta_4$  kvantifikuje efekat kvadratne vrednosti koncentracije pufera ( $C_{\text{pufer}}^2$ ) na retencioni faktor  $k$ . Dobijene zavisnosti su prikazane u Tabeli 21.

Tabela 21. Najznačajniji statistički parametri dobijenih jednačina.

Jedinjenje	$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$r$	Adj $R^2$	S.E.
Antazolin	46,252	-4,061	2,226	0,066	-0,059	0,9803	0,9480	0,7265
Aripiprazol	12,257	-0,784	0,183	0,012	-0,005	0,9924	0,9800	0,0950
Benazolin	68,994	-6,191	3,453	0,101	-0,090	0,9821	0,9527	1,0500
Brimonidin	28,562	-2,758	1,949	0,044	-0,051	0,9800	0,9473	0,5351
Detomidin	4,035	-0,286	0,137	0,004	-0,004	0,9875	0,9670	0,0489
Efaroksan	17,723	-1,977	1,855	0,030	-0,048	0,9649	0,9080	0,5972
Harman	4,674	-0,340	0,170	0,005	-0,004	0,9034	0,7549	0,1544
Harmin	15,194	-0,971	0,087	0,016	-0,003	0,9474	0,8635	0,2542
Idazoksan	28,202	-3,063	2,397	0,050	-0,062	0,9698	0,9206	0,6646
Olanzapin	46,168	-4,616	3,661	0,074	-0,096	0,9617	0,9153	1,1782
RX 821002	19,124	-1,666	1,136	0,026	-0,031	0,9733	0,9297	0,4143
Tizanidin	11,598	-0,976	0,534	0,016	-0,014	0,9890	0,9709	0,1371
Trimazolin	39,541	-3,664	2,293	0,059	-0,060	0,9760	0,9369	0,7483
Ziprazidon	9,616	-0,579	0,112	0,009	-0,003	0,9977	0,9939	0,0432

$r$ : koeficijent korelacije, Adj  $R^2$ : prilagođeni koeficijent determinacije,  
S.E.: standardna greška,  
statistička značajnost  $p < 0,05$ .

Na osnovu vrednosti koeficijenta korelacije ( $r > 0,90$ ), može se zaključiti da jednačine u Tabeli 21 pouzdano opisuju retenciono ponašanje odabranih liganada u uskom opsegu promene: temperature 20-30 °C, koncentracije pufera 15-25 mM, zapreminskog udela metanola 20-30%. Zapreminski udeo metanola i kvadratna vrednost koncentracije pufera imaju negativan efekat na vrednost parametra  $k$ . Pozitivan efekat na retenciju imaju koncentracija pufera i kvadratna vrednost zapreminskog udela metanola, dok male promene temperature (20-30 °C) nisu statistički značajne. Takođe, najveći uticaj na vrednost parametra  $k$  imaju zapreminski udeo metanola i koncentracija pufera (Slika 56).



Slika 56. Uticaj zapreminskog udela metanola ( $\beta_1$ ), temperature ( $\beta_2$ ) i njihovih kvadratnih vrednosti ( $\beta_3, \beta_4$ ) na retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora.

Teorijski predviđene log $k$  vrednosti se mogu uporediti sa eksperimentalno dobijenim vrednostima na sledećim hromatografskim uslovima:

*i*) zapreminski udeo metanola 15%, koncentracija pufera 20 mM, temperatura 25 °C

*ii*) zapreminski udeo metanola 35%, koncentracija pufera 20 mM, temperatura 25 °C.

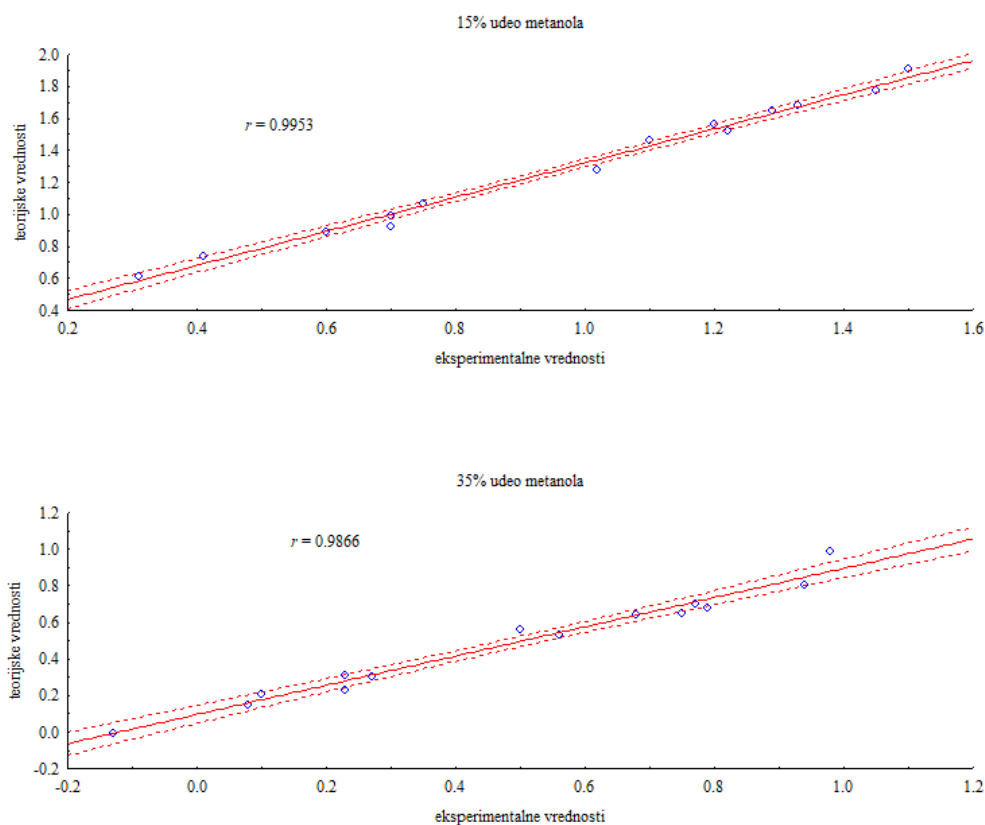
Teorijski predviđene vrednosti retencionog faktora ( $k$ ) su izračunate na osnovu jednačina prikazanih u Tabeli 21 i potom upoređene sa eksperimentalno dobijenim rezultatima u Tabeli 22.

Tabela 22. Poređenje eksperimentalno dobijenih i teorijski predviđenih vrednosti parametra log $k$ : *i*) zapreminski udeo metanola 15%, koncentracija pufera 20 mM, temperatura 25 °C *ii*) zapreminski udeo metanola 35%, koncentracija pufera 20 mM, temperatura 25 °C.

Jedinjenje	15%		35%	
	Teorijski predviđene vrednosti	Eksperimentalne vrednosti	Teorijski predviđene vrednosti	Eksperimentalne vrednosti
Antazolin	1,33	1,68	0,79	0,68
Aripiprazol	0,70	0,92	0,23	0,31
Benazolin	1,50	1,91	0,94	0,80
Brimonidin	1,20	1,56	0,68	0,64
Detomidin	0,31	0,61	-0,13	-0,004
Efaroksan	1,10	1,46	0,56	0,53
Harman	0,41	0,74	0,08	0,15
Harmin	0,70	0,99	0,27	0,30
Idazoksan	1,22	1,52	0,77	0,70
Olanzapin	1,45	1,77	0,98	0,99
RX 821002	1,02	1,28	0,50	0,56
Tizanidin	0,75	1,07	0,23	0,23
Trimazolin	1,29	1,65	0,75	0,65
Ziprazidon	0,60	0,89	0,10	0,21
<i>MEP</i>	0,32		0,07	
<i>r</i>	0,9953		0,9866	

*r*: koeficijent korelacije između teorijski predviđenih vrednosti i eksperimentalnih vrednosti, *MEP*: srednja vrednost greške predviđanja

Na Slici 57 prikazano je slaganje između teorijskih i predviđenih vrednosti parametra log $k$ .



Slika 57. Rezultati slaganja između teorijski predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti parametra  $\log k$ .

Na testiranim 35% zapreminskim udelima metanola postoji podudarnost između teorijski predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti parametra  $\log k$  ( $MEP = 0,08$ ), dok je na 15% zapreminskom udelu prisutno neslaganje u predviđenom i eksperimentalno dobijenom retencionom ponašanju ( $MEP = 0,32$ ). Zaključuje se da na zapreminskim udelima metanola većim od 20% postoji sličnost u retencionom ponašanju, dok pri nižim vrednostima ( $< 20\%$ ) dolazi do promene retencionog mehanizma.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Definisani hromatografski uslovi se uspešno mogu primeniti u istovremenom farmaceutskom ispitivanju liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i njihovih strukturnih analoga.
2. Na *mixed-mode* stacionarnoj fazi u HPLC sistemu, potvrđeno je prisustvo dualnog mehanizma razdvajanja zasnovanog na kombinovanom uticaju reverzno-faznih i hidrofилnih interakcija. Hromatografski uslovi, prilikom prelaska iz sistema sa dominantnim hidrofилnim interakcijama u sistem sa dominantnim reverzno-faznim interakcijama, označeni su kao *prevojna tačka* ( $\varphi_{\min}$ ) i uspešno su određeni za sva testirana jedinjenja. U zavisnosti od strukturnih karakteristika jedinjenja, reverzno-fazne ili hidrofилne interakcije dominiraju u ukupnom retencionom mehanizmu. Kod liganada serotoninskih receptora vrednosti  $\log k$  parametara u RP regionu su više u odnosu na  $\log k$  vrednosti u HILIC regionu, dok je  $\varphi_{\min} < 0,5$ . Kod liganada imidazolinskih receptora je  $\varphi_{\min} > 0,5$  i vrednosti  $\log k$  parametara u RP regionu su niže u odnosu na  $\log k$  vrednosti u HILIC regionu. Pokazano je da se ukupna polarnost mobilne faze može iskoristiti kao zavisna promenljiva u pouzdanom opisivanju retencionog ponašanja i određivanju tačke prelaska iz HILIC u RP retencioni mehanizam. Kod više od polovine testiranih jedinjenja, za opisivanje dualnog retencionog mehanizma, primena ukupne polarnosti kao zavisne promenljive pokazala je bolje statističke rezultate u odnosu na primenu zapreminskog udela modifikatora mobilne faze. Dobijeni retencioni modeli se mogu primeniti za pouzdano predviđanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u funkciji fizičko-hemijskih karakteristika mobilne faze (ukupna polarnost, zapreminski udeo modifikatora mobilne faze).
3. Na *mixed-mode* stacionarnoj fazi uspešno su definisani retencioni deskriptori. Za regione u kojima dominira HILIC ( $\log k_H$ ), RP ( $\log k_R$ ) i dualni HILIC/RP ( $\log k_A$ ) mehanizam, metodom integracije su dobijeni novi parametri retencije. Novopredloženi parametri su pokazali visoku korelaciju sa lipofilnim karakteristikama, geometrijom molekula i njegovim aromatičnim osobinama. Vrednosti retencionih parametara su  $\log k_H > \log k_R$  za ligande imidazolinskih receptora i  $\log k_H < \log k_R$  za ligande serotoninskih receptora. Primenom *Box-Cox* transformacije definisano je pet tipova novih matematičkih zavisnosti između retencionog faktora i zapreminskog udela modifikatora mobilne faze (XR, XQ, IQ, IR, II), koje se mogu primeniti u preciznom opisivanju retencionog ponašanja, a njihova minimalna vrednost iskoristiti u definisanju smene iz HILIC u RP retencioni mehanizam. Najpouzdaniju primenu u određivanju vrednosti prevojne tačke u odnosu na referentnu vrednost dobijenu metodom kubne *spline* interpolacije, kao i najveći stepen slaganja između definisanih parametara retencije ( $\log k_H$ ,  $\log k_R$  i  $\log k_A$ ) pokazale su novopredložene XR i LQ funkcije. Novopredložene funkcije i definisani parametri retencije omogućuju precizniju karakterizaciju retencionog ponašanja u dualnim HILIC/RP sistemima u odnosu na standardne XL i XQ jednačine, zbog čega se uspešno mogu primeniti u definisanju hromatografskih uslova, prilikom ispitivanja nosintetisanih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja.
4. Na polarnim stacionarnim fazama (*mixed-mode diol*, diol) uspešno je opisano retenciono ponašanje testiranih jedinjenja u dva komplementarna hromatografska sistema kao što su superkritična fluidna hromatografija i nevodeni sistem hromatografije hidrofилnih interakcija. Rezultati su pokazali da se modifikacijama mobilne faze i odabirom stacionarne faze u SFC-u postiže adekvatno razdvajanje strukturno srodnih hemijskih parova. Slično standardnim HPLC sistemima, primenom metode eksperimentalnog dizajna u SFC sistemu, zapreminski udeo i vrsta modifikatora mobilne faze je takođe pokazala značajan uticaj na retencioni mehanizam. Dobijeni modeli se mogu primeniti u predikciji retencionih parametara liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora, sa ciljem optimizacije hromatografskih uslova za uspešno razdvajanje strukturno srodnih hemijskih parova.

5. Lipofilnost liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja značajno utiče na osnovnu prirodu hromatografskog procesa, dominantnost reverzno-faznih ili hidrofilnih interakcija u ukupnom mehanizmu zadržavanja u HPLC uslovima. Kod jedinjenja sa izraženim lipofilnim osobinama kao što su derivati piperazina (ligandi serotoninskih receptora), reverzno-fazne interakcije dominiraju u ukupnom procesu retencije, dok u slučaju polarnijih jedinjenja, derivata amidina/gvanidina (ligandi imidazolinskih receptora), dominiraju hidrofilne interakcije. U RP regionu, retenciono ponašanje je primarno određeno parametrima lipofilnosti i jonizacionim karakteristikama ispitivanih jedinjenja, dok je kod HILIC sistema uočena veća složenost i fizičko-hemijska heterogenost u odnosu na RP sistem. U HILIC sistemu, na retencione karakteristike značajno utiče prisustvo vodoničnih, dipolnih interakcija, jonizacione karakteristike, aromatičnost molekula i njegove strukturne karakteristike (molekulska masa, *van der Waals*-ov radijus, dijametar). U superkritičnoj fluidnoj hromatografiji i nevodenom sistemu hromatografije hidrofilnih interakcija uočeno je da vodonične veze (proton donorske/akceptorske osobine molekula) i polarnost imaju najznačajniji efekat na retenciono ponašanje. Primenom linearnih modela (metode višestruke linearne regresione analize, *Abraham*-ovog modela) kao i tehnike mašinskog učenja (metode podržavajućih vektora) pouzdano je kvantifikovan uticaj fizičko-hemijskih osobina testiranih jedinjenja na njihovo retenciono ponašanje. Konstruisani modeli se mogu uspešno primeniti u predikciji retencionih parametara i kod novosintetisanih jedinjenja koja su strukturno srodna ligandima imidazolinskih i serotoninskih receptora.



## 6. LITERATURA

- [1] Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action. *Pharmacol Ther.* 2002; 93:1-35.
- [2] Dardonville C, Rozas I. Imidazoline binding sites and their ligands: an overview of the different chemical structures. *Med Res Rev.* 2004; 24: 639-661.
- [3] Lui H, Du DM. Recent advances in the synthesis of 2-imidazolines and their applications in homogenous catalysis. *Adv Synth Catal.* 2009; 351: 489-519.
- [4] Meyerson BJ, Lewander T. Serotonin synthesis inhibition and estrous behaviour in female rats. *Life Sci. I.* 1970; 9: 661-671.
- [5] Darmon M, Awabdh SA, Emerit MB, Masson J. Insights into serotonin receptor trafficking: cell membrane targeting and internalization. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015; 132: 97-126.
- [6] Meltzer HY. Role of serotonin in the action of atypical antipsychotic drugs, *Clin Neurosci.* 1995; 3: 64-75.
- [7] Roth BL, Craigo SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma FJ, Meltzer HY, Sibley DR. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 268: 1403-1410.
- [8] Nelson DL, Herbert A, Bourgoin S, Glowinski J, Hamon M. Characteristics of central 5-HT receptors and their adaptive changes following intracerebral 5,7-dihydroxytryptamine administration in the rat. *Mol Pharmacol.* 2000; 14: 429-435.
- [9] Mahieu LM, Rooman RP, Goossens E. Imidazoline intoxication in children. *Eur Pediatr.* 1993; 152: 944-946.
- [10] Tobias JD. Central nervous system depression following accidental ingestion of visine eye drops. *Clin Pediatr.* 1996; 35: 539-540.
- [11] Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984; 230: 232-236.
- [12] Bousquet P, Feldman J, Bloch R, Schwartz J. The nucleus reticularis lateralis, a region highly sensitive to clonidine. *Eur J Pharmacol.* 1981; 69:389-92.
- [13] Ernsberger PR, Meeley MP, Mann JJ, Reis DJ. Clonidine binds to imidazole binding sites as well as  $\alpha_2$ -adrenoreceptors in the ventrolateral medulla. *Eur J Pharmacol.* 1987; 134:1-13.
- [14] Khan ZP, Ferguson CN, Jones RM. Alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia* 1999; 54: 146-165.
- [15] Sener A, Lebrun P, Blachier F, Mallaise WJ. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: insulinotropic action of agmatine. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 327-330.
- [16] Kalra SP, Pearson E, Sahu A, Karla SP. Agmatine, a novel hypothalamic amine, stimulates pituitary luteinizing hormone release in vivo and hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release in vitro. *Neurosci Lett.* 1995; 194: 165-168.
- [17] Halaris A, Plietz J. Agmatine metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs* 2007; 21: 885-900.
- [18] Reis DJ, Regunathan S. Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors may be a novel neurotransmitter in brain. *J Auton Nerv Syst.* 1998; 72: 80-85.
- [19] Chan CK, Burke SL, Zhu H, Piletz JE, Head GA. Imidazoline receptors associated with noradrenergic terminals in the rostral ventrolateral medulla mediate the hypotensive responses of moxonidine but not clonidine. *Neuroscience* 2005; 132: 991-1007.
- [20] Bousquet P. Identification and characterization of 11 imidazoline receptors: their role in blood pressure regulation. *Am J Hypertens.* 2000; 13: 84S-88S.
- [21] Wang WZ, Yuan WJ, Ren AJ, Pan YX, Tang CS, Su DF. Role of I1-imidazoline receptors within the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular responses to clonidine in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42: 1-9.

- [22] Ernsberger P. The I1-imidazoline receptor and its cellular signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 881: 35-53.
- [23] Zhu H, Hayes J, Chen M, Baldwin J, Piletz JE. Relationship between platelet imidazoline receptor-binding peptides and candidate imidazoline-1 receptor. *IRAS Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1009: 439-446.
- [24] Su CH, Lui IM, Chung HH, Cheng JT. Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neurosci Lett.* 2009; 457: 125-128.
- [25] Morgan NG, Chan SL. Imidazoline binding sites in the endocrine pancreas: can they fulfil their potential as targets for the development of new insulin secretagogues? *Curr Pharm Des.* 2001; 7: 1413-1431.
- [26] Parker CA, Anderson NJ, Robinson ES, Price R, Tyacke RJ, Husbands SM, Dillon MP, Eglen RM, Hudson AL, Nutt DJ, Crump MP, Crosby J. Harmane and harmalan are bioactive components of classical clonidine-displacing substance. *Biochemistry* 2004; 43: 16385-16392.
- [27] Lowry JA, Brown JT. Significance of the imidazoline receptors in toxicology. *Clin Toxicol.* 2014; 52: 454-469.
- [28] Nikolić K, Agbaba D. Pharmacophore development and SAR studies of imidazoline receptor ligands. *Mini Rev Med Chem.* 2012; 14: 1542-1555.
- [29] Carrieri A, Brasili L, Leonetti F, Pignini M, Giannella M, Bousquet P, Carotti A. 2-D and 3-D modelling of imidazoline receptor ligands insights into pharmacophore. *Bioorg Med Chem.* 1997; 5: 843-856.
- [30] Garcia-Sevilla JA, Escriba PV, Sastre M, Walzer C, Busquets X, Jaquet G, Reis DJ, Guimon J. Immunodetection and quantitation of imidazoline receptor proteins in platelets of patients with major depression and brains of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry.* 1996; 53: 803-810.
- [31] Robert KG. Adrenergic receptors and drugs affecting adrenergic neurotransmission, In: Williams DA; Lemke TL (eds), *Foye's principles of medicinal chemistry*, 7<sup>th</sup>. Edn, Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [32] Lui S. Adrenergic agents. In: Beale JM, Block JH. *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry*, 12<sup>th</sup>. Edn, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [33] Nikolic K, Filipic S, Agbaba D. QSAR study of selective I<sub>1</sub>-imidazoline receptor ligands. *SAR QSAR Environ Res.* 2009; 20: 133-144.
- [34] Giusepponi ME, Cifani C, di Bonaventura MVM, Mattioli L, Hudson A, Diamanti E, del Bello F, Gianella M, Mammoli V, Paoletti CD, Piergentili A, Pignini M, Quaglia W. Combined interactions with I<sub>1</sub>-, I<sub>2</sub>-imidazoline binding sites and  $\alpha_2$ -adrenoceptors to manage opioid addiction. *ASC Med Chem Lett.* 2016; 7: 956-996.
- [35] Hamid HA, Ramli ANM, Yusoff MM. Indole alkaloids from plants as potential leads for antidepressant drugs: A mini review. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 1-7.
- [36] Husbands S, Glennon RA, Gorgerat S, Gough R, Tyacke R, Crosby J, Nutt DJ, Lewis JW, Hudson AL. Beta-carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend.* 2001; 64: 203-208.
- [37] Meeley M, Hensley M, Ernsberger P, Felsen D, Reis D. Evidence for a bioactive clonidine-displacing substance in peripheral tissues and serum. *Biochem Pharmacol.* 1992; 44: 733-740.
- [38] Wagstaff AJ, Bryson HM. Tizanidine, a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of spasticity associated with cerebral and spinal disorders. *Drugs* 1997; 53: 435-452.

- [39] Adkins JC, Balfour JA. Brimonidine, a review of its pharmacological properties and clinical potential in the management of open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 1998; 12: 225-241.
- [40] Parini A, Coupry I, Graham RM, Uzielli I, Atlas D, Lanier SM. Characterization of an imidazole/guanidinium receptive site distinct from the alpha 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1989; 264: 11874-11878.
- [41] Lanier SM, Ivković B, Singh I, Neumeyer JL, Bakthavachal V. Visualization of multiple imidazole/guanidinium-receptive sites. *J Biol Chem*. 1993; 268: 16047-16051.
- [42] Chen CT, Chen W, Chung HH, Cheng KC, Yan CH, Cheng JT. Activation of imidazole I-2B receptor by metformin to increase glucose uptake in skeletal muscle. *Horm Metab Res*. 2011; 10: 708-713.
- [43] Ruffolo RR, Waddell JE. Receptor interactions of imidazoles. IX. Cirazoline is an alpha-1 adrenergic agonist and an alpha-2 adrenergic antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982; 222: 29-36.
- [44] Wybraniec MT, Wróbel W, Wilkosz K, Wrona K, Bula K, Mizia-Stec K. Pharmacological cardioversion with antazoline in atrial fibrillation: The results of the CANT study. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7: 1-12.
- [45] Schwartz DD, Clark TP. Affinity of detomidine, medetomidine and xylazine for alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *J Vet Pharmacol Ther*. 1998; 21: 107-111.
- [46] Haenisch B, Walstab J, Herberhold S, Bootz F, Tschaikein M, Ramseger R, Bonisch H. Alpha adrenoreceptor agonistic activity of oxymetazoline and xylometazoline. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009; 24: 729-739.
- [47] Chazova I, Almazov VA, Shlyakho E. Moxonidine improves glycaemic control in mildly hypertensive, overweight patients: a comparison with metformin. *Diabetes Obes Metab*. 2006; 8: 456-465.
- [48] Chem Axon, MarvinSketch 6.1.0. Budapest, Hungary, 2013. <http://www.chemaxon.com/>
- [49] Turcani M. Biphasic dose-dependent modulation of cardiac parasympathetic activity by moxonidine, an imidazole I<sub>1</sub>-receptor agonist. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 52: 524-535.
- [50] Milovanovic S, Otasevic B, Zecevic M, Golubovic J, Zivanovic Lj, Protic A. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of moxonidine in the presence of its impurities. *J Pharm Biomed Anal*. 2012; 59: 151-168.
- [51] Otasević B, Miladinović S, Zecević M, Golubović J, Protić A. UPLC method for determination of moxonidine and its degradation products in active pharmaceutical ingredients and pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia* 2014; 77: 109-118.
- [52] Xuanfei L, Hao C, Zhujun Y, Yanming L, Jianping G. Imidazole I<sub>2</sub> receptor inhibitor idazoxan regulates the progression of hepatic fibrosis via Akt-Nrf2-Smad2/3 signaling pathway. *Oncotarget* 2017; 8:21015-21030.
- [53] Ernsberger P, Graves M, Graff L, Zakieh N, Nguyen P, Collins L, Westbrooks KL, Johnson GG. I<sub>1</sub>-Imidazole receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signalling. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 763: 22-42.
- [54] Chan SLE, Mourtada M, Morgan NG. Characterization of a K<sub>ATP</sub> channel-independent pathway involved in potentiation of insulin secretion by efaroxan. *Diabetes* 2001; 50: 340-347.
- [55] Abdel-Zaher A, Ahmed I, El-Din AEI-Koussi A. The potential antidiabetic activity of some alpha-2 adrenoceptor antagonists. *Pharmacol Res*. 2001; 44: 397-409.
- [56] Fam RD, Ramsden CA, Morgan NG. Preparation of analogues of efaroxan and KU14R as potential imidazole receptor subtype 3 ligands. *J Heterocycl Chem*. 2009; 45: 887-896.
- [57] Morgan NG. Imidazole receptors: new targets for antihyperglycaemic drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999; 8: 575-584.

- [58] Brigand LL, Manechez D, Godfroid JJ, Lemaitre BG, Gribble FM, Ashcroft FM, Bataille D. In vitro mechanism of action on insulin release of S-22068, a new putative antidiabetic compound. *Br J Pharmacol.* 2009; 128: 1021-1026.
- [59] Wang X, Rondu F, Lamouri A, Dokhan R, Marc S, Touboul E, Pfeiffer B, Manechez D, Renard P, Guadiola-Lemaitre B, Godfroid JJ, Ktorza A, Penicaud L. Effect of S-21663 (PMS 812), an imidazoline derivative, on glucose tolerance and insulin secretion in a rat model of type II diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 278: 82-89.
- [60] Guan X, Hu Y. Imidazoline derivatives: a patent review (2006 - present). *Expert Opin Ther Pat.* 2012; 22: 1353-1365.
- [61] D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Abbatecola AM, Ferraraccio F, Rossi F, Paolisso G. Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 in Alzheimer's prone mice. *Exp Gerontol.* 2010; 45: 202-207.
- [62] Bailey JC, Day C. Treatment of type 2 diabetes: future approaches. *Br Med Bull.* 2018; 126: 123-137.
- [63] Pratuangdejkul J, Nosoongnoen W, Gue'rin GA, Loric S, Conti M, Launay JM, Manivet P. Conformational dependence of serotonin theoretical pKa prediction. *Chem Phys Lett.* 2006; 420: 538-544.
- [64] Rudnick G, Clark J. From synapse to vesicle: The reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1144: 249-263
- [65] Ramu A, Levine M, Pollard H. Chemical evidence that catecholamines are transported across the chromaffin granule membrane as noncationic species. *Acad. Sci. USA* 1983; 80: 2107-2111.
- [66] Hill MN, Hillard CJ, Bambico FR, Patel S, Gorzalka BB, Bobbi G. The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30: 484-493.
- [67] Swathy B, Banerjee M. Understanding epigenetics of schizophrenia in the backdrop of its antipsychotic drug therapy. *Epigenomics* 2017; 9: 721-736.
- [68] Kimura KT, Asada H, Inoue A, Kadji FMN, Im D, Mori C, Arakawa T, Hirata K, Nomura Y, Nomura N, Aoki J, Iwata S, Shimamura T. Structures of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine. *Nat Struct Mol Biol.* 2019; 26: 121-128.
- [69] Haddad PM, Sharma SG. Adverse effects of atypical antipsychotics. *CNS Drugs* 2007; 21: 911-936.
- [70] Newcomer JW. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects. *CNS Drugs* 2005; 19: 1-93.
- [71] Taylor DM, McAskil R. Atypical antipsychotics and weightgain — a systematic review. *Acta Psychiatr Scand.* 2001; 101: 416-432.
- [72] Keltner NL, Johnson V. Aripiprazole: A third generation of antipsychotics begins? *Perspect Psychiatr Care.* 2002; 38: 157-159.
- [73] Daniel DG. Tolerability of ziprasidone: an expanding perspective. *J Clin Psychiatry* 2003; 64: 40-49.
- [74] Katzung BG. Basic and clinical pharmacology, antipsychotic agents and lithium. Lange medical Books/McGraw-Hill, San Francisco, USA, 2004.
- [75] Lanfmeijer L, Hamon M. Central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol.* 2000; 27: 429-435.
- [76] Conn PJ, Sanders-Bush E. Selective 5HT<sub>2</sub> antagonists inhibit serotonin stimulated phosphatidylinositol metabolism in cerebral cortex. *Neurpharmacol.* 1984; 23: 993-996.
- [77] Davenport JR, Yoder BK. An incredible decade for the primary cilium: a look at the once-forgotten organelle. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: 1159-1169.
- [78] Renner U, Zeug A, Woehler A, Niebert M, Dityater A, Dityateva D, Abdel-Galil D, Fronhich M, Doring F, Wischemeyer E, Richter DW, Neher E, Ponimaskin EG.

- Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci.* 2012; 125: 2486-2499.
- [79] Sherin DR, Geethu CK, Prabhakaran J, Mann JJ, Dileep Kumar JS, Manojkumar TK. Molecular docking, dynamics simulations and 3D-QSAR modelling of arylpiperazine derivatives of 3,5-dioxo-(2H,4H)-1,2,4-triazine as 5-HT<sub>1A</sub>R agonists. *Comput Biol Chem.* 2019; 78: 108-115.
- [80] Perry CK, Casey AB, Felsing DE, Vemula R, Zaka M, Herrington NB, Cui M, Kellogg GE, Canal CE, Booth RG. Synthesis of novel 5-substituted-2-aminotetralin analogs: 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> G protein-coupled receptor affinity, 3D-QSAR and molecular modeling. *Bioorg Med Chem.* 2020; 28: 115262.
- [81] Armstrong J, Barlow RB. The ionization of phenolic amines, including apomorphine, dopamine and catecholamines and an assessment of zwitterion constants. *Br J Pharmacol.* 1976; 57: 501-516.
- [82] Kelabian JW, Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1979; 277: 93-96.
- [83] Beaulieu JM, Espinoza S. Dopamine receptors-IUPHAR review 13. *Br J Pharmacol.* 2015; 172: 1-23.
- [84] Albizu, L, Holloway T, Gonzalez-Maeso J, Sealfon SC. Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Neuropharmacol.* 2011; 61: 770-777.
- [85] Xiamuxi H, Wang Z, Li J, Wang Y, Wu C, Yang, F, Shen, J. Synthesis and biological investigation of tetrahydropyridopyrimidinone derivatives as potential multireceptor atypical antipsychotics. *Bioorg Med Chem.* 2017; 25: 4904-4916.
- [86] Zhang C, Li Q, Meng L, Ren Y. Design of novel dopamine D<sub>2</sub> and serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors dual antagonists toward schizophrenia: An integrated study with QSAR, molecular docking, virtual screening and molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn.* 2020; 38: 860-885.
- [87] Kułaga D, Jaśkowska J, Satała G. Design, synthesis and biological evaluation of novel serotonin and dopamine receptor ligands being 6-bromohexyl saccharine derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2020; 28: 115262.
- [88] López-Rodríguez ML, José Morcillo M, Fernández E, Porrás E, Orensanz L, Beneytez ME, Manzanares J, Fuentes JA. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. Study of the physicochemical influence of the pharmacophore on 5-HT<sub>1A</sub>/α<sub>1</sub>-adrenergic receptor affinity: synthesis of a new derivative with mixed 5-HT<sub>1A</sub>/D<sub>2</sub> antagonist properties. *J Med Chem.* 2001; 44: 186-197.
- [89] Kowalski P, Jaśkowska J, Bojarski AJ, Duszyńska B, Bucki A, Kołaczkowski M. Evaluation of 1-aryl piperazine derivative of hydroxybenzamides as 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> serotonin receptor ligands: An experimental and molecular modeling approach. *J Heterocycl Chem.* 2011; 48: 192-198.
- [90] Bartolomeis A, Tomasetti C, Iasevoli F. Update on the mechanism of action of aripiprazole: Translational insights into antipsychotic strategies beyond dopamine receptor antagonism. *CNS Drugs* 2015;29:773-799.
- [91] Avram S, Duda-Seiman D, Borcan F, Wolschann P. QSAR-CoMSIA applied to antipsychotic drugs with their dopamine D<sub>2</sub> and serotonin 5HT<sub>2A</sub> membrane receptors. *J. Serb. Chem. Soc.* 2011; 76: 263-281.
- [92] Klose Nielsen MA, Johansen SS. Determination of olanzapine in whole blood using simple protein precipitation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2009; 33: 212-217.
- [93] Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37: 177-193.

- [94] Cuomo A, Beccarini Crescenzi B, Goracci A, Bolognesi S, Giordano N, Rossi R, Facchi E, Neal SM. Drug safety evaluation of aripiprazole in bipolar disorder. *Expert Opin Drug Saf.* 2018; 18: 455-463.
- [95] Đorđević-Filijović N, Pavlović A, Nikolić K, Agbaba D. Validation of an HPLC method for determination of aripiprazole and its impurities in pharmaceuticals. *Acta Chromatographica* 2014; 26: 13-28.
- [96] Nikolić K, Đorđević-Filijović N, Maričić B, Agbaba D. Development of a novel RP-HPLC method for the efficient separation of aripiprazole and its nine impurities. *J Sep Sci.* 2013; 36: 3165-3175.
- [97] Sutton SC, Nause R, Gandelman K. The impact of gastric pH, volume, and emptying on the food effect of ziprasidone oral absorption. *AAPS Pharm Sci.* 2017; 19: 1084-1090.
- [98] Harison TS, Scott LJ. Ziprasidone: A review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder. *CNS Drugs* 2009; 20: 1027-1052.
- [99] Nikolić K, Pavlović-Filijović M, Smolinski A, Agbaba D. The chemometric study and quantitative structure retention relationship modeling of liquid chromatography separation of ziprasidone components. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2012; 15: 730-744.
- [100] Pavlović M, Malešević M, Nikolić K, Agbaba D. Development and validation of an HPLC method for determination of ziprasidone and its impurities in pharmaceutical dosage forms. *J AOAC Int.* 2011; 94: 713-722.
- [101] Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 402: 231-247.
- [102] McCally DV. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2017; 1523: 49-71.
- [103] Zhang L, Dai Q, Qiao X, Yu C, Qin X, Yan H. Mixed-mode chromatographic stationary phases: recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *Trends Analyt Chem.* 2016; 82: 143-163.
- [104] Linden JC, Lawhead CL. Liquid chromatography of saccharides. *J Chromatogr.* 1975; 105: 125-133.
- [105] Martin AJP, Synge RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases, a theory of chromatography. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem J.* 1941; 35: 1358- 1368.
- [106] McCally DV, Neue UD. Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2008; 1192: 225-229.
- [107] McCally DV. Liquid chromatographic separations of basic compounds. *Adv Chromatogr.* 2008; 46: 305-50.
- [108] McCally DV. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J Chromatogr A* 2007; 1171: 46-55.
- [109] Soukup J, Jandera P. Comparison of nonaqueous hydrophilic interaction chromatography with aqueous normal-phase chromatography on hydrosilated silica-based stationary phases. *J Sep Sci.* 2013; 36: 2753-2759.
- [110] Guo Y. Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Analyst.* 2015; 140: 6452-6466.
- [111] Melnikov SM, Hölzel A, Seidel-Morgenstern A, Tallarek U. Evaluation of aqueous and nonaqueous binary solvent mixtures as mobile phase alternatives to water-acetonitrile mixtures for hydrophilic interaction liquid chromatography by molecular dynamics simulations. *J Phys Chem C* 2015; 119: 512-523.
- [112] Taylor LT. Supercritical fluid chromatography for the 21<sup>st</sup> century. *J Supercrit Fluids* 2009; 47: 566-573.

- [113] Sie ST, Rijnders GWA. Chromatography with supercritical fluids. *Anal Chim Acta* 1967; 38: 31-44.
- [114] Klesper E, Hartmann W. Apparatus and separations in supercritical fluid chromatography. *Eur Polym J.* 1978; 14: 77-88.
- [115] Welch CJ, Leonard WR Jr, Dasilva JO, Biba M, Albaneze-Walker J, Henderson DW, Laing B, Mathre DJ. Preparative chiral SFC as a green technology for rapid access to enantiopurity in pharmaceutical process research. *LCGC Asia Pacific* 2005; 8: 24-31.
- [116] Yan TQ, Orihuela C. Rapid and high throughput separation technologies-steady state recycling an supercritical fluid chromatography for chiral resolution of pharmaceutical intermediates. *J Chromatogr A* 2007; 1156: 220-227.
- [117] Majewski W, Valery E, Ludemann-Hombourger O. Principle and applications of supercritical fluid chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2005; 28: 1233-1252.
- [118] Taylor LT. Supercritical fluid chromatography. *Anal Chem.* 2010; 82: 4925-4935.
- [119] Lui Y, Berthod A, Mitchell CR, Xiao TL, Zhang B, Armstrong DW. Super/supercritical fluid chromatography chiral separations with macrocyclic glycopeptide stationary phases. *J Chromatogr A* 2002; 978: 185-204.
- [120] Zhang W. Fluorocarbon stationary phases for liquid chromatography applications. *J Fluorine Chem.* 2008; 129: 910-919.
- [121] West C, Lesellier E. Orthogonal screening system of columns for supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A* 2008; 1203: 105-113.
- [122] Nogueira R, Lammerhofer M, Lindner W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J Chromatogr A* 2005; 1089: 158-169.
- [123] Liu P, Yang H, Geng X. Mixed retention mechanism of proteins in weak anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 7497-7504.
- [124] Liu X, Pohl C. New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. *J Chromatogr A* 2008; 1191: 83-89.
- [125] Mant CT, Hodges RS. Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins. *J Sep Sci.* 2008; 31: 2754-2773.
- [126] Zhao K, Yang L, Wang X, Bai Q, Yang F, Wang F. Preparation of a novel dual function strong cation exchange/hydrophobic interaction chromatography stationary phase for protein separation. *Talanta* 2012; 98: 86-94.
- [127] Li Y, Feng Y, Chen T, Zhang H. Imidazoline type stationary phase for hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 5987-5994.
- [128] Geng X, Ke C, Chen G, Liu P, Wang F, Zhang H, Sun X. On-line separation of native proteins by two-dimensional liquid chromatography using a single column. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 3553-3562.
- [129] Voicu V, Sarbu C, Tache F, Micăle F, Rădulescu F, Sakurada K, Ohta H, Medvedovici A. Lipophilicity indices derived from the liquid chromatographic behavior observed under bimodal retention conditions (reversed phase/hydrophilic interaction): application to a representative set of pyridinium oximes. *Talanta* 2014; 122: 172-179.
- [130] Yhang K, Lui X. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *J Pharm Biomed Anal.* 128; 2016: 73-88.
- [131] Pirok WJ, Molenaar SRA, van Outersterp RE, Schoenmakers PJ. Applicability of retention modelling in hydrophilic-interaction liquid chromatography for algorithmic optimization programs with gradient-scanning techniques. *J Chromatogr A* 2017; 1530: 104-111.



- [132] Dorsey JG. The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography. *Chem Rev.* 1989; 89: 331-346.
- [133] Komsta L, Radan M, Rodikiewicz B, Skibinski R. Trilinear multiplicative modelling of thin layer chromatography retention as a function of solute, organic modifier and its concentration. *J Sep Sci.* 2011; 34: 59-63.
- [134] Soczewiński E. Mechanistic molecular model of liquid–solid chromatography retention–eluent composition relationships. *J Chromatogr A* 2002; 965: 109-116.
- [135] Soczewiński E, Wachtmeister CA. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and  $R_M$  values. *J Chromatogr A* 1962; 7: 311-320.
- [136] Snyder LR, Dolan JW. The linear–solvent–strength model of gradient elution. *Adv Chromatogr.* 38; 1998: 115-187.
- [137] Soczewinski E. Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel–electron donor solvent. *Anal Chem.* 1969; 41: 179-182.
- [138] Wang A, Tan LC, Carr PW. Global linear solvation energy relationships for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999; 848: 21-37.
- [139] Česla P, Vankova N, Krenkova J, Fischer J. Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labelled oligosaccharides. *J Chromatogr A* 2016; 1438: 179-188.
- [140] Jandera P. Stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J Sep Sci.* 2008; 31: 1421–1437.
- [141] Jovanović M, Rakić T, Jančić-Stojanović B, Ivanović D, Medenica M. Retention mechanism assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406: 4217-4232.
- [142] Schoenmakers PJ, Billiet HAH, Tijssen R, De Galan L. Gradient selection in reversed-phased liquid-chromatography. *J Chromatogr.* 1978; 149: 519-537.
- [143] Snyder LR. Principles of adsorption chromatography. Marcel Dekker, NY, USA; 1968.
- [144] Nahum A, Horvath C. Surface silanols in silica hydrocarbonaceous stationary phases I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. *J Chromatogr.* 1981; 203: 53-63.
- [145] Jandera P, Hájek T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction reversed-phase liquid chromatography mechanism. *J Sep Sci.* 2017; 4: 145-162.
- [146] Jin G, Guo Z, Zhang F, Xue X, Jin Y, Liang X. Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta* 2008; 76: 522-527.
- [147] Baczek T, Markuszewski M, Kaliszan R. Linear and quadratic relationships between retention and organic modifier content in eluent in reversed phase high-performance liquid chromatography: A systematic comparative statistical study. *J Sep Sci.* 2000; 23: 667-676.
- [148] Karatapanis AE, Fiamegos YC, Stalikas CD. A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 2871-2879.
- [149] West C, Lesellier E. Effects of modifiers in subcritical fluid chromatography on retention with porous graphitic carbon. *J Chromatogr A* 2005; 1087: 64-76.
- [150] Lesselier E. Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 1881-1890.
- [151] McCally DV. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica based stationary phases for separation of ionized solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 3408-3417.
- [152] Schoenmakers PJ. Thermodynamic model for supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr* 1984; 315: 1-18.

- [153] Kaczmarek K, Prus W, Kowalska T. Adsorption/partition model of liquid chromatography for chemically bonded stationary phases of the aliphatic cyano, reversed-phase C<sub>8</sub> and reversed-phase C<sub>18</sub> types. *J Chromatogr A* 2000; 869: 57-64.
- [154] Jandera P, Hajek T, Skevikava V, Soukup J. Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column. *J Chromatogr A* 2010; 33: 841-852.
- [155] Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acid and other polar compounds. *J Chromatogr A* 1990; 499: 177-196.
- [156] Naidong W. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *J Chromatogr B* 2003; 796: 209-224.
- [157] Nice EC. The separation sciences, the front end to proteomics: An historical perspective. *Biomed Chromatogr.* 2021; 35.
- [158] Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJR, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391: 1865-1867.
- [159] Vanbel PF, Tilquin BL, Schoenmakers PJ. Criteria for optimizing the separation of target analytes in complex chromatograms. *Chemometr Intell Lab Syst.* 1996; 35: 67-86.
- [160] Schoenmakers PJ, Strasters JK, Bartha A. Correction of the resolution function for non-ideal peaks. *J Chromatogr A* 1998; 458:355-370.
- [161] Sekulic S, Haddad PR. Effects of peak tailing on computer optimisation procedures for high-performance liquid chromatography: I. Characteristics of tailed peaks under optimisation conditions. *J Chromatogr A* 1988; 459: 65-77.
- [162] Sekulic S, Haddad PR. Effects of peak tailing on computer optimisation procedures for high-performance liquid chromatography: II. An optimisation routine for tailed peaks. *J Chromatogr A* 1988; 459: 79-90.
- [163] Roy K, Kar S, Das RN. Understanding the basics of QSAR for applications in pharmaceuticals sciences and risk assessment. Elsevier, Inc. 2015.
- [164] Tan LC, Carr PW, Abraham MH. Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships. I: the stationary phase. *J Chromatogr A* 1996; 752: 1-18.
- [165] Kaliszan R. QSRR: quantitative structure-chromatographic retention relationships. *Chem Rev.* 2007; 107: 3212-3246.
- [166] Galea C, Mangelings D, Heyden YV. Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC- a review. *Anal Chim Acta* 2015; 886: 1-15.
- [167] Perrenoud Grand-Guillaume A, Veuthey JL, Guilarme D. Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: From hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds. *J Chromatogr A* 1339; 2014: 174-184.
- [168] Abraham MH, Ibrahim A, Zissimos AM. Determination of the set of solute descriptors from chromatographic measurements. *J Chromatogr A* 2004; 1037: 29-47.
- [169] Park JH, Yoon MH, Ryu YK, Kim BE, Ryu JW, Jang MD. Characterization of some normal-phase liquid chromatographic stationary phases based on linear solvation energy relationships. *J Chromatogr A* 1998; 796: 249-258.
- [170] Kiridena W, Poole CF. Influence of solute size and site specific surface interactions on the prediction of the retention in liquid chromatography using the solvation parameter model. *Analyst* 1998; 123: 1265-1270.
- [171] Poole CF, Ahmed H, Kiridena W, DeKay C, Korizol WW. Contribution of steric repulsion to retention on an octadecylsiloxane-bonded silica stationary phase in reversed-phased liquid chromatography. *Chromatographia* 2005; 62: 553-561.

- [172] Khanna D, Sahu R, Baths V, Deshpande B. Comparative study of classification techniques (SVM, Logistic Regression, and Neural Networks) to predict the prevalence of heart decease. *Int J Mech Learn Comput.* 2015; 5: 414-419.
- [173] Schölkop B, Smola AJ. *Learning with kernels: support vector machines, regularization, optimization, and beyond.* MIT Press Cambridge, London, England, 2001.
- [174] Wold S. Principal Component Analysis. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 2; 1987: 37-52.
- [175] Joliffe T. *Principal Component Analysis.* Springer. New York 1986.
- [176] Montgomery D.C. *Design and analysis of experiment.* John Wiley and Sons, Inc. New Jersey 2006.
- [177] Zhang YP, Zhang YJ, Gong WJ, Gopalan AI, Lee KP. Rapid separation of Sudan dyes by reversed-phase high performance liquid chromatography through statistically designed experiments. *J Chromatogr A* 2005; 1098: 182-187.
- [178] Sahoo DK, Sahu PK. Chemometric approach for RP-HPLC determination of azithromycin, secnidazole, and fluconazole using response surface methodology. *J Liq Chromatogr Related Technol.* 2015; 38: 750-758.
- [179] Dejaegher B, Mangelings D, Heyden YV. Method development for HILIC assays. *J Sep Sci.* 2008; 31: 1438-1448.
- [180] Andri B, Dispas A, Marini Djang'Eing'a R, Hubert P, Sassiati P, Bakain RA, Thiebaut D, Vial J. Combination of partial least squares regression and design of experiments to model the retention of pharmaceutical compounds in supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A* 2017; 1491: 182-194.
- [181] Li JR, Li M, Xia B, Ding LS, Xu HX, Zhou Y. Efficient optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography separation of Rosa sericeably by response surface methodology. *J Sep Sci.* 2013; 35: 2114-2120.
- [182] Dispas A, Lebrun P, Andri B, Rozet E, Hubert P, Robust method optimization strategy-a useful tool for method transfer: the case of SFC. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 88: 519-524.
- [183] Losacco GL, Veathey JL, Guillarme D. Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry: Recent evolution and current trends. *Trends Analyt Chem.* 118; 2019: 731-738.
- [184] Sahu KP, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Sci.* 2018; 147: 590-611
- [185] Taraji M, Haddad PR, Amos, RIJ, Talebi M, Szucs R, Dolan JW, Pohl CA. Rapid method development in hydrophilic interaction liquid chromatography for pharmaceutical analysis using a combination of quantitative structure-retention relationships and design of experiments. *Anal Chem.* 80; 2017: 1870-1878.
- [186] Hicks MB, Regalado EL, Tan F, Gong X, Welch CJ. Supercritical fluid chromatography for GMP analysis in support of pharmaceutical development and manufacturing activities. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 117: 316-324.
- [187] RStudio Team (2020). *RStudio: integrated development for R.* RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- [188] Statistica data analysis system (version 7, Tulsa, OK, USA).
- [189] Bicker W, Wu L, Lämmerhoffer M, Lindner W. Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packing with noncharged polar bondings. *J Sep Sci.* 2008; 31: 2971-2987.
- [190] West C. Current trends in supercritical fluid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2018; 410: 6441-6457.
- [191] Lemasson E, Bertin S, Hennig P, Lesellier E, West C. Comparison of ultra-high performance methods in liquid and supercritical fluid chromatography coupled to

- electrospray ionization – mass spectrometry for impurity profiling of drug candidates. *J Chromatogr A* 2016; 1472: 117-128.
- [192] Scott RP, Kucera P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel. *J Chromatogr A* 1978; 149: 93-110.
- [193] Snyder LR, Dolan JW, Grant JR. Gradient elution in high-performance liquid chromatography I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *J Chromatogr.* 1979; 165: 3-30.
- [194] Jandera P, Janas P, Skerikova V, Urban J. Effect of water on the retention on diol and amide columns in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2017; 40: 1434-1448.
- [195] Jandera P, Churáček J. Gradient elution in liquid chromatography: I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width and resolution) in isocratic elution – theoretical considerations. *J Chromatogr A* 1974; 91: 207–221.
- [196] Jovanović M, Jančić-Stojanović B, Rakić T, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Five different columns in analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem.* 2013; 11: 1150-1162.
- [197] Snyder LR. Classification of solvent properties of common liquids. *J Chromatogr Sci.* 1978; 16: 223-234.
- [198] Akaike H. A new look at the statistical model identification, *IEEE Trans. Automat. Contr.* 1974; 19: 716-723.
- [199] Sakia RM. The Box-Cox transformation technique: a review. *J R Stat Soc Ser D Appl Stat.* 1992; 41: 169-178.
- [200] Komsta L. A new general equation for retention modeling from the organic modifier content of the mobile phase, *Acta Chromatogr.* 2010; 22: 267-279.
- [201] Romand S, Rudaz S, Guillarme D. Separation of substrates and closely related glucuronide metabolites using various chromatographic modes. *J Chromatogr A* 2016; 1435: 54–65.
- [202] Neue UD, O’Gara JE, Mendez A. Selectivity in reversed-phase separations. Influence of the stationary phase. *J Chromatogr A* 2006; 1127: 161-174.
- [203] Andri B, Lebrun P, Dispas A, Klinkenberg R, Strel B, Ziemons E, Marini RD. Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography method for the quantitative determination of vitamin D3 and its related impurities. *J Chromatogr A* 2017; 1491: 171-181.
- [204] Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J Comput Chem.* 1989; 10: 209-220.
- [205] Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J Comput Chem.* 1989; 10: 221-264.
- [206] Frich MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Honda M, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega H, Milliam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J,OMPerts R, Stratman RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas O, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009.
- [207] CambridgeSoft, Corporation. ChemBio3DUltra, Version 13.0. Cambridge, MA, USA , 2013.
- [208] Dragon 6, TALETE srl, Via V. Pisani, 13-20124 Milano – Italy, <http://www.talete.mi.it/>.
- [209] Molinspiration software or free molecular property calculation services, <http://www.molinspiration.com/>.

- [210] Tetko IV. Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org/>.
- [211] <http://www.acdlabs.com/resources/ilab/>
- [212] Tominag Y. Comparative study of class data analysis with PCA-LDA, SIMCA, PLS, ANNs, and  $k$ -NN. *Chemometr Intell Lab Syst.* 1999; 49: 105-115.
- [213] Umetrics AB, SIMCA P+ program, Version 12.0.0.0. Umeå, 2008. [www.umetrics.com/](http://www.umetrics.com/).
- [214] Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation and exploitation. *Mol Inform.* 2010; 29: 476–488.
- [215] Johansson E., Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S. Multi-and megavariate data analysis, basic principles and applications I, 2nd ed. Umetrics Academy, Umeå, Sweden, 2001.
- [216] Roy K, Supratik K, Pravin A. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2015; 145: 22-29.
- [217] Ojha PK, Mitra I, Das RN. Further exploring  $r_m^2$  metrics for validation of QSAR models data set. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2011; 107: 194-205.
- [218] Vitha M, Carr PW. The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. *J Chromatogr A* 2006; 1126: 143-194.
- [219] Andrić F, Šegan S, Dramićanin A, Majstorović H, Milojković-Opsenica D. Linear modeling of the soil-water partition coefficient normalized to organic carbon content by reversed-phase thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* 2016, 2458. 136-144.
- [220] Lagante AF, Bruno TJ. Modelling the water-supercritical CO<sub>2</sub> partition coefficients of organic solutes using a linear solvation energy relationship. *J Phys Chem B* 1998; 102: 907-909.
- [221] Poole CF, Poole SK. Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model. *J Chromatogr A* 2002; 965: 263-299.
- [222] Bosch E, Bou P, Rosés M. Linear description of solute retention in reversed-phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter. *Anal Chim Acta.* 1994; 299: 219-22.
- [223] Bakalyar SR, McIlwric R, Roggendorf E. Solvent selectivity in reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1997; 142: 353-365.
- [224] Mauri A, Consonni V, Todechini R. Molecular descriptors. Springer, Handbook of Computational Chemistry. 2016: 1- 29.
- [225] Spath H. Exponential spline interpolation. *Computing.* 1969; 4: 225-233.
- [226] Tarafder A. Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC: an overview. *TrAC Trends in Anal Chem.* 2016; 81: 3-10.
- [227] West C, Lesellier E. Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model III. Polar stationary phases. *J Chromatogr A* 2006; 1110: 200-213.
- [228] Ishihama Y, Asakawa N. Characterization of lipophilicity scale using vectors from solvation energy descriptors. *J Pharm Sci.* 1999; 88: 1305-1312.
- [229] Hutchenson KW, Scurto AM, Subramaniam B. Gas-expanded liquids and near-critical media. ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC, 2009.
- [230] Oparin RD, Krestyaninov MA, Vorobyev EA, Pokrovskiy OI, Parenago OO, Kiselev MG. An insight into possibility of chemical reaction between dense carbon dioxide and methanol. *J Mol Liq.* 2017; 239: 83-91.
- [231] Zheng J, Taylor LT, Pinkston JD. Elution of cationic species with/without ion pair reagents from polar stationary phases via SFC. *Chromatographia* 2006; 63: 267-276.
- [232] Espen M, Hilde L, Niclas L, Helge R. Pharmacokinetic variability of aripiprazole and the active metabolite dehydroaripiprazole in psychiatric patients. *Ther Drug Monit.* 2006; 28: 744-749.

- [233] Younes KM. Stability indicating spectrophotometric and TLC-densitometric methods for the determination of aripiprazole in bulk and dosage form. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014; 4: 542-548.
- [234] Obradović D, Filipić S, Nikolić K, Čarapić M, Agbaba D. Optimization of TLC method for separation and determination of ziprasidone and its impurities. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2013; 7: 926-942.

## 7.PRILOZI

## Prilog A:

Tabele sa izračunatim molekulskim deskriptorima za MLR/QSRR i SVM/QSRR modele (1A-2A).

Statistički podaci linearnih modela za NA-HILIC i SFC sisteme (3A-10A).

$\log k_w^{\text{SFC}}(\text{CO}_2)$  – ekstrapolisani retencioni parametar u SFC sistemu na 100% sadržaju  $\text{CO}_2$  u mobilnoj fazi.

$\log k_w^{\text{NA-HILIC}}(\text{ACN})$  – ekstrapolisani retencioni parametar u NA-HILIC sistemu na 100% sadržaju ACN-a u mobilnoj fazi.

$\log k_b^{\text{SFC}}(\text{metanol})$  – ekstrapolisani retencioni parametar u SFC sistemu na 100% sadržaju metanola u mobilnoj fazi.

$\log k_b^{\text{NA-HILIC}}(\text{metanol})$  – ekstrapolisani retencioni parametar u NA-HILIC sistemu na 100% sadržaju metanola u mobilnoj fazi.

Slika sa raspodelom  $R^2$  vrednosti za jednačine oblika  $\log k = \beta_0 + \beta' B(\varphi, \lambda_1) + \beta'' B(\varphi(\pm 1), \lambda_2)$  (1A).



Tabela 1A.

Deskriptori ispitivanih jedinjenja na pH 6.

Jedinjenje	AS	HATS2s	GATSm	TDB06s	R6s+	GATS2e	MOR13p	SPH	MOR17v	MOR28m	HATS4s	ARR	Chi_D/Dt	G3m	CMBL	Mor23m
Amilorid	8,0	1,140	1,046	3,995	0,494	0,476	-0,397	0,996	0,047	-0,062	2,049	0,400	1,555	0,310	1,413	0,038
Antazolin	2,0	0,690	0,949	1,539	0,060	1,415	-0,628	0,746	-0,268	0,094	0,542	0,545	1,851	0,171	1,390	-0,228
Aripiprazol	1,0	0,717	0,882	1,143	0,199	0,927	-0,820	0,876	-0,210	-0,378	0,814	0,364	1,878	0,154	1,398	-0,134
Imp A1	4,0	0,981	0,851	1,835	0,184	0,948	-0,381	0,718	0,028	-0,406	1,492	0,400	2,214	0,237	1,387	0,040
Imp A2	0,0	0,745	0,737	1,274	0,127	1,080	-0,413	0,749	-0,166	-0,409	1,285	0,236	2,200	0,175	1,388	0,036
Imp A3	3,0	0,979	0,976	1,646	0,169	0,869	-0,244	0,944	-0,060	-0,016	1,171	0,333	2,234	0,182	1,397	-0,366
Imp A4	4,0	1,042	0,802	1,559	0,332	0,860	-0,462	0,835	-0,018	-0,290	1,284	0,333	2,234	0,165	1,396	0,057
Imp A5	3,0	1,286	1,112	3,041	1,001	0,491	-0,351	0,907	0,099	-0,035	2,241	0,462	3,237	0,244	1,395	-0,259
Imp A6	3,0	0,739	1,144	1,296	0,119	0,841	-0,498	0,977	0,084	-0,056	0,954	0,387	2,140	0,149	1,397	-0,498
Imp A7	0,0	0,809	0,932	1,340	0,240	0,905	-0,620	0,873	-0,301	-0,486	1,025	0,353	1,847	0,181	1,396	-0,122
Imp A8	2,0	0,846	1,103	1,327	0,308	1,104	-0,358	0,882	-0,208	-0,040	1,037	0,300	2,003	0,171	1,396	-0,106
Imp A9	5,0	0,963	1,074	1,650	0,169	0,878	-0,265	0,948	-0,035	0,030	1,188	0,333	2,234	0,314	1,396	-0,140
Imp A10	3,0	0,682	0,858	1,340	0,486	0,875	-0,578	0,832	-0,172	-0,484	0,932	0,364	2,025	0,160	1,398	-0,008
Benazolin	1,0	0,782	1,052	1,438	0,063	1,100	-0,414	0,943	0,064	-0,014	0,780	0,647	3,074	0,255	1,420	-0,333
Brimonidin	4,0	0,964	1,506	1,717	0,120	0,927	-0,464	0,761	0,189	0,412	1,459	0,579	2,791	0,172	1,421	-0,734
Cirazolin	4,0	0,759	1,101	1,160	0,064	1,247	-0,022	0,722	-0,360	0,020	0,898	0,333	2,077	0,165	1,390	0,010
Klonidin	4,0	1,182	1,164	1,902	0,202	0,706	-0,284	0,665	-0,036	-0,215	2,915	0,400	2,080	0,179	1,383	-0,154
Detomidin	8,0	0,746	1,160	1,435	0,082	0,873	-0,141	0,624	-0,267	-0,077	1,130	0,733	2,048	0,190	1,400	-0,395
Efaroksan	7,0	0,739	1,208	1,595	0,059	1,083	-0,223	0,611	-0,430	0,016	0,822	0,333	2,743	0,197	1,389	0,065
Gvanabenz	6,0	1,258	1,110	1,952	0,185	0,626	-0,360	0,978	0,048	-0,307	3,248	0,429	1,594	0,207	1,391	-0,168
Gvanfacin	6,0	1,271	1,220	2,085	0,247	0,455	-0,520	0,672	-0,060	-0,200	3,515	0,400	1,553	0,201	1,385	-0,211
Harman	4,0	1,006	1,270	1,611	0,075	0,914	-0,273	0,98	-0,140	-0,112	0,792	0,938	4,468	1,000	1,454	-0,491
Harmin	5,0	0,893	1,173	1,577	0,065	1,255	-0,421	0,976	0,060	-0,193	0,680	0,833	3,848	0,735	1,420	-0,503
Idazoksan	1,0	0,995	1,111	1,326	0,079	1,288	-0,250	0,625	-0,031	0,115	1,159	0,353	3,074	0,212	1,387	-0,095

Metformin	5,0	0,814	0,945	1,680	0,148	0,579	-0,288	0,795	0,116	-0,192	1,630	0,000	1,000	0,211	0,000	0,014
Moksonidin	6,0	0,966	1,007	2,090	0,167	0,901	-0,189	0,734	-0,027	-0,169	1,213	0,353	1,945	0,190	1,398	-0,045
Imp M1	2,0	1,034	0,998	1,934	0,790	0,586	-0,032	0,854	-0,036	-0,247	2,315	0,375	1,986	0,177	1,414	-0,277
Imp M2	1,0	0,709	0,979	2,140	0,071	1,138	-0,122	0,919	-0,066	-0,039	0,439	0,333	1,909	0,165	1,398	0,025
Imp M3	3,0	0,823	0,903	2,291	0,206	0,846	-0,224	0,954	-0,020	-0,013	0,514	0,000	1,945	1,000	0,000	-0,067
Imp M4	4,0	1,157	0,956	2,035	0,356	0,561	-0,314	0,916	-0,029	-0,122	2,950	0,000	1,986	0,175	0,000	0,065
Nafazolin	1,0	0,764	0,963	1,434	0,071	1,088	-0,422	0,690	-0,072	0,066	0,927	0,611	2,937	0,168	1,429	-0,182
Olanzapin	7,0	0,620	0,778	1,445	0,047	1,339	-0,558	0,732	-0,213	-0,022	0,650	0,440	3,434	0,162	1,818	-0,229
Oksimetazolin	3,0	0,469	0,968	1,608	0,117	0,699	-0,161	0,663	-0,566	-0,213	0,884	0,300	1,756	0,155	1,395	-0,234
Fentolamin	7,0	0,735	0,932	1,818	0,108	0,917	-0,341	0,729	-0,027	0,112	0,687	0,522	1,865	0,157	1,394	-0,329
RX 821002	3,0	0,837	1,170	1,704	0,088	1,275	-0,269	0,722	-0,143	0,030	0,972	0,316	2,766	0,226	1,387	-0,175
Sitagliitin	4,0	4,172	0,883	2,834	0,396	0,527	-0,622	0,834	-0,048	-0,206	3,506	0,367	1,835	0,188	1,426	-0,751
Tetrahidrozolin	1,0	0,696	1,041	1,421	0,063	1,033	-0,057	0,738	-0,369	-0,069	0,845	0,353	3,239	0,184	1,395	-0,076
Tizanidin	4,0	1,235	1,130	2,018	0,176	0,723	-0,222	0,770	0,249	-0,167	1,961	0,556	2,798	0,201	1,740	-0,047
Trimazolin	6,0	0,578	1,012	1,412	0,058	1,015	-0,067	0,640	-0,593	-0,077	0,775	0,375	1,986	0,164	1,396	-0,010
Ksilometazolin	2,0	0,477	0,946	1,345	0,049	0,974	0,021	0,663	-0,691	-0,211	0,687	0,316	1,759	0,190	1,398	-0,118
Ziprazidon	4,0	0,818	1,001	1,317	0,423	0,812	-0,492	0,867	-0,348	-0,294	0,942	0,500	2,357	0,165	1,812	0,020
Imp Z2	8,0	1,063	1,028	1,590	0,507	0,759	-0,774	0,867	-0,150	-0,301	1,249	0,485	2,326	0,211	1,812	0,139
Imp Z3	7,0	1,573	0,992	2,598	0,690	0,613	-0,104	0,863	-0,204	0,097	1,783	0,400	2,597	0,233	1,401	-0,045

Tabela 2A.

Vrednosti parametara lipofilnosti testiranih jedinjenja.

Jedinjenje	logD	ALOGP	milogP	ALOGPs
Amilorid	-0,58	-0,78	-1,24	-0,48
Antazolin	0,52	1,44	3,01	3,22
Aripiprazol	3,43	3,44	5,08	5,21
Imp A1	0,07	1,51	2,60	2,73
Imp A2	-0,62	2,39	-0,38	2,61
Imp A3	2,60	2,57	2,81	2,79
Imp A4	2,79	2,71	2,94	3,33
Imp A5	1,21	1,01	1,12	0,52
Imp A6	3,12	2,98	3,55	3,35
Imp A7	3,78	4,96	5,04	3,43
Imp A8	2,25	2,12	2,56	2,75
Imp A9	1,25	1,36	1,57	1,36
Imp A10	3,65	3,84	48,1	4,74
Benazolin	-0,16	0,54	1,99	3,14
Brimonidin	-0,49	-0,06	1,17	1,40
Cirazolin	-0,69	0,50	1,86	2,62
Klonidin	0,63	1,06	1,92	1,92
Detomidin	2,27	2,43	2,93	2,79
Efaroksan	-0,23	0,51	2,49	2,98
Gvanabenz	-0,94	0,45	1,74	2,25
Gvanfacin	0,86	0,32	1,56	2,28
Harman	1,73	2,46	2,59	3,36
Harmin	1,48	2,34	2,63	3,05
Idazoksan	-1,44	-0,49	1,03	1,01
Metformin	-5,74	-3,42	-1,13	-1,83
Moksonidin	-0,31	1,00	-0,05	0,75
Imp M1	0,13	-0,34	0,57	1,30
Imp M2	-0,74	-1,05	-0,67	0,47
Imp M3	-3,43	-2,66	-1,41	-0,44
Imp M4	-2,96	-2,13	-0,79	-0,31
Nafazolin	-0,22	0,57	2,85	1,31
Olanzapin	2,12	1,65	3,47	3,61
Oksimetazolin	1,06	1,77	3,85	3,70
Fentolamin	0,59	1,67	3,25	2,91
RX 821002	0,29	-0,47	1,07	1,01
Sitaglitin	-1,33	1,14	2,06	1,95
Tetrahidrozolin	-0,17	0,70	2,26	3,11
Tizanidin	0,18	0,52	1,33	1,69
Trimazolin	0,33	1,12	2,89	3,02

---

Ksilometazolin	1,37	2,04	4,15	4,68
Ziprazidon	3,18	2,70	4,05	4,64
Imp Z2	4,42	2,55	3,77	4,13
Imp Z3	2,55	2,40	2,48	2,66

---

Tabela 3A.

Regresioni koeficijenti jednačine (13) dobijeni na diol stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/ACN.

Jedinjenje	Particija ( $\log k = \log k_w - n \varphi$ )											
	Diol stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_w^{\text{SFC}}(\text{CO}_2)$	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$	$\log k_w^{\text{HILIC}}(\text{ACN})$	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$
Antazolin	2,56	4,39	0,9842	0,9789	0,0508	8,50E-04	1,32	3,40	0,9814	0,9752	0,0427	1,08E-03
Aripiprazol	1,40	3,15	0,9829	0,9772	0,0379	9,56E-04	0,30	2,92	0,9733	0,9644	0,0442	1,87E-03
Imp A5	0,49	2,74	0,9776	0,9702	0,0379	1,43E-03	0,50	-5,38	0,8451	0,7935	0,2103	2,72E-02
Imp A6	0,73	3,14	0,9816	0,9755	0,0392	1,06E-03	-0,54	4,04	0,9865	0,9819	0,0432	6,72E-04
Imp A11	1,76	3,38	0,9763	0,9655	0,0481	1,56E-03	0,75	3,34	0,9750	0,9666	0,0488	1,69E-03
Benazolin	2,48	3,91	0,9894	0,9859	0,0369	4,63E-04	1,43	3,34	0,9794	0,9725	0,0443	1,26E-03
Brimonidin	2,23	3,77	0,9840	0,9787	0,0438	8,60E-04	0,76	2,28	0,9731	0,9642	0,0346	1,88E-03
Detomidin	1,01	2,97	0,9811	0,9748	0,0376	1,11E-03	0,15	3,17	0,9824	0,9765	0,0387	1,00E-03
Efaroksan	2,30	3,99	0,9928	0,9904	0,0309	2,58E-04	1,34	3,33	0,9820	0,9760	0,0411	1,03E-03
Harman	0,92	2,57	0,9723	0,9631	0,0396	1,97E-03	0,11	2,71	0,9851	0,9802	0,0304	7,74E-04
Harmin	1,33	3,03	0,9853	0,9804	0,0338	7,61E-04	0,35	2,62	0,9805	0,9740	0,0338	1,16E-03
Idazoksan	2,19	3,34	0,9943	0,9924	0,0230	1,83E-04	1,14	2,84	0,9783	0,9711	0,0386	1,36E-03
Olanzapin	2,28	2,92	0,9902	0,9870	0,0265	4,10E-04	1,13	2,35	0,9800	0,9734	0,0306	1,21E-03
RX 821002	1,85	2,70	0,9940	0,9920	0,0191	1,97E-04	0,68	2,43	0,9786	0,9715	0,0328	1,34E-03
Tizanidin	1,78	3,78	0,9866	0,9822	0,0401	6,57E-04	0,29	2,03	0,9716	0,9621	0,0317	2,05E-03

Trimazolin	2,56	4,36	0,9915	0,9886	0,0369	3,35E-04	1,37	3,34	0,9822	0,9763	0,0410	1,01E-03
Ziprazidon	1,12	3,29	0,9899	0,9899	0,0312	4,33E-04	0,09	4,36	0,9470	0,9293	0,0941	5,26E-03
Imp Z1	1,45	2,53	0,9793	0,9725	0,0336	1,27E-03	1,24	2,67	0,9798	0,9730	0,0350	1,23E-03
Imp Z2	1,01	3,54	0,9806	0,9741	0,0455	1,16E-03	/	/	/	/	/	/
Imp Z3	0,93	3,41	0,9837	0,9782	0,0401	8,89E-04	/	/	/	/	/	/

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$  standardna greška,  $p$  statistička značajnost

Tabela 4A.

Regresioni koeficijenti jednačine (14) dobijeni na diol stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/ACN.

Jedinjenje	Adsorpcija ( $\log k = \log k_b(\text{metanol}) - n \log \varphi$ )											
	Diol stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_b^{\text{SFC}}(\text{metanol})$	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$	$\log k_b^{\text{HILIC}}(\text{metanol})$	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$
Antazolin	-0,03	2,40	0,9986	0,9982	0,0149	2,14E-05	-0,69	1,86	0,9995	0,9994	0,0068	4,32E-06
Aripiprazol	-0,46	1,73	0,9997	0,9997	0,0046	1,72E-06	-1,42	1,61	0,9980	0,9973	0,0121	3,78E-05
Imp A5	-1,13	1,51	0,9990	0,9987	0,0080	1,34E-05	-3,64	2,88	0,8186	0,7581	0,2276	3,48E-02
Imp A6	-1,12	1,72	0,9998	0,9997	0,0044	1,48E-06	-2,92	2,21	0,9973	0,9964	0,0192	5,91E-05
Imp A11	-0,24	1,86	0,9986	0,9981	0,0118	2,31E-05	-1,22	1,84	0,9981	0,9974	0,0136	3,61E-05
Benazolin	0,20	2,09	0,9601	0,9467	0,0717	3,43E-03	-0,55	1,84	0,9996	0,9995	0,0063	3,54E-06
Brimonidin	0,01	2,07	1,0000	0,9999	0,0023	1,31E-07	-0,59	1,26	0,9975	0,9967	0,0105	5,27E-05
Detomidin	-0,75	1,63	0,9992	0,9989	0,0078	9,96E-06	-1,72	1,73	0,9957	0,9943	0,0190	1,18E-04
Efaroksan	-0,05	2,18	0,9984	0,9979	0,0146	2,69E-05	-0,63	1,83	0,9998	0,9997	0,0043	1,16E-06
Harman	-0,60	1,42	0,9981	0,9975	0,0103	3,47E-05	-1,49	1,48	0,9968	0,9957	0,0142	7,86E-05
Harmin	-0,46	1,66	0,9999	0,9998	0,0034	7,40E-07	-1,20	1,44	0,9953	0,9937	0,0166	1,37E-04
Idazoksan	0,23	1,82	0,9976	0,9968	0,0151	5,10E-05	-0,54	1,56	0,9992	0,9990	0,0073	9,02E-06
Olanzapin	0,56	1,60	0,9992	0,9990	0,0074	8,94E-06	-0,26	1,29	0,9989	0,9986	0,0071	1,48E-05
RX 821002	0,27	1,47	0,9977	0,9969	0,0119	4,71E-05	-0,76	1,34	0,9986	0,9981	0,0085	2,27E-05
Tizanidin	-0,45	2,07	0,9998	0,9998	0,0046	9,67E-07	-0,92	1,12	0,9963	0,9951	0,0114	9,48E-05

Trimazolin	-0,01	2,38	0,9990	0,9986	0,0128	1,41E-05	-0,60	1,83	0,9997	0,9996	0,0051	1,99E-06
Ziprazidon	-0,82	1,80	0,9993	0,9990	0,0083	8,71E-06	-2,48	2,39	0,9649	0,9532	0,0766	2,82E-03
Imp Z1	-0,04	1,39	0,9988	0,9984	0,0080	1,69E-05	-0,34	1,47	0,9996	0,9995	0,0049	3,32E-06
Imp Z2	-1,08	1,95	0,9997	0,9996	0,0057	2,24E-06	/	/	/	/	/	/
Imp Z3	-1,08	1,87	0,9996	0,9995	0,0059	2,79E-06	/	/	/	/	/	/

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$  standardna greška,  $p$  statistička značajnost



Tabela 5A.

Regresioni koeficijenti jednačine (13) dobijeni na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/ACN.

Jedinjenje	Particija ( $\log k = \log k_w - n \varphi$ )											
	<i>Mixed-mode diol</i> stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_w^{\text{SFC}}(\text{CO}_2)$	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$P$	$\log k_w^{\text{HILIC}}(\text{ACN})$	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$
Antazolin	2,16	4,77	0,9907	0,9877	0,0421	3,79E-04	1,24	3,90	0,9754	0,9672	0,0566	1,65E-03
Aripiprazol	1,34	3,27	0,9867	0,9823	0,0347	6,53E-04	0,77	2,88	0,8724	0,8298	0,1007	2,02E-02
Imp A5	0,66	2,68	0,9795	0,9727	0,0354	1,25E-03	-0,36	1,56	0,9873	0,9830	0,0162	6,12E-04
Impurity A6	1,02	3,13	0,9816	0,9754	0,0391	1,07E-03	-0,25	1,56	0,9689	0,9585	0,0255	2,35E-03
Imp A11	1,70	3,75	0,9861	0,9814	0,0407	7,01E-04	1,09	3,25	0,9384	0,9178	0,0761	6,62E-03
Benazolin	2,30	4,79	0,9981	0,9975	0,0191	3,54E-05	1,41	3,88	0,9876	0,9835	0,0397	5,88E-04
Brimonidin	1,96	4,33	0,9863	0,9817	0,0467	6,87E-04	1,13	3,29	0,9498	0,9330	0,0690	4,85E-03
Detomidin	0,88	2,87	0,9772	0,9697	0,0400	1,47E-03	0,44	2,42	0,8409	0,7878	0,0960	2,83E-02
Efaroksan	1,86	4,34	0,9910	0,9880	0,0377	3,61E-04	1,27	3,90	0,9746	0,9662	0,0575	1,73E-03
Harman	1,04	2,85	0,9827	0,9769	0,0345	9,74E-04	0,48	2,08	0,8616	0,8155	0,0762	2,28E-02
Harmin	1,28	3,21	0,9849	0,9798	0,0363	7,93E-04	0,79	2,61	0,8897	0,8530	0,0839	1,61E-02
Idazoksan	1,80	3,74	0,9925	0,9900	0,0297	2,78E-04	1,26	3,72	0,9828	0,9770	0,0449	9,64E-04
Olanzapin	2,01	3,62	0,9918	0,9890	0,0302	3,19E-04	1,22	2,53	0,9928	0,9904	0,0197	2,59E-04
RX 821002	1,41	3,11	0,9948	0,9931	0,0205	1,57E-04	1,07	3,46	0,9526	0,9368	0,0704	4,44E-03
Tizanidin	1,46	3,94	0,9859	0,9812	0,0430	7,15E-04	0,83	2,97	0,8697	0,8263	0,1049	2,08E-02
Trimazolin	2,12	4,76	0,9917	0,9889	0,0398	3,24E-04	1,28	3,81	0,9805	0,9740	0,0491	1,16E-03

Ziprazidon	1,31	3,32	0,9845	0,9793	0,0381	8,23E-04	0,34	2,05	0,8034	0,7379	0,0926	3,94E-02
Imp Z1	1,39	2,91	0,9872	0,9829	0,0302	6,17E-04	1,46	3,82	0,9835	0,9858	0,0361	4,68E-04
Imp Z2	1,19	3,44	0,9790	0,9721	0,0459	1,30E-03	-0,11	1,60	0,7597	0,6795	0,0821	5,42E-02
Imp Z3	1,70	3,61	0,9855	0,9807	0,0399	7,43E-04	0,25	1,51	0,8136	0,7514	0,0661	3,63E-02

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije, *S.E.* standardna greška, *p* statistička značajnost

Tabela 6A.

Regresioni koeficijenti jednačine (14) dobijeni na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata/ACN.

Jedinjenje	Adsorpcija ( $\log k = \log k_b$ (metanol) – $n \log \varphi$ )											
	<i>Mixed-mode diol</i> stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_b^{\text{SFC}}$ (metanol)	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	Adj $R^2$	<i>S.E.</i>	<i>p</i>	$\log k_b^{\text{HILIC}}$ (metanol)	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	Adj $R^2$	<i>S.E.</i>	<i>p</i>
Antazolin	-0,65	2,61	0,9991	0,9988	0,0130	1,12E-05	-1,07	2,15	0,9982	0,9977	0,0150	3,04E-05
Aripiprazol	-0,59	1,79	0,9999	0,9998	0,0033	5,40E-07	-0,97	1,63	0,9369	0,9159	0,0708	6,86E-03
Imp A5	-0,92	1,47	0,9996	0,9994	0,0051	3,64E-06	-1,26	0,58	0,9787	0,9716	0,0143	1,33E-03
Imp A6	-0,82	1,72	0,9998	0,9998	0,0039	1,08E-06	-1,28	0,85	0,9980	0,9974	0,0063	3,71E-05
Imp A11	-0,51	2,06	1,0000	0,9999	0,0024	1,44E-07	-1,17	0,86	0,9962	0,9949	0,0089	9,97E-05
Benazolin	-0,60	2,37	0,9997	0,9893	0,0392	3,06E-04	-0,80	1,82	0,9860	0,9998	0,0046	9,18E-07
Brimonidin	-0,51	2,60	0,9920	0,9996	0,0065	1,88E-06	-1,10	1,37	0,9124	0,9813	0,0364	7,08E-04
Detomidin	-0,82	1,58	0,9991	0,9988	0,0079	1,14E-05	-1,01	1,37	0,9124	0,8832	0,0712	1,13E-02
Efaroksan	-0,70	2,37	0,9990	0,9987	0,0124	1,29E-05	-1,03	2,15	0,9981	0,9974	0,0159	3,62E-05
Harman	-0,64	1,56	0,9999	0,9999	0,0025	3,80E-07	-0,78	1,18	0,9287	0,9044	0,0549	8,34E-03
Harmin	-0,61	1,76	0,9999	0,9998	0,0035	7,19E-07	-0,77	1,47	0,9486	0,9314	0,0573	5,03E-03
Idazoksan	-0,40	2,04	0,9985	0,9979	0,0135	2,57E-05	-0,40	1,49	0,8645	0,9996	0,0059	2,20E-06
Olanzapin	-0,13	1,98	0,9986	0,9981	0,0125	2,25E-05	-0,25	1,36	0,9640	0,9519	0,0441	2,94E-03
RX 821002	-0,42	1,70	0,9968	0,9958	0,0160	7,53E-05	-0,98	1,91	0,9876	0,9834	0,0361	5,91E-04
Tizanidin	-0,87	2,16	0,9999	0,9999	0,0026	1,58E-07	-0,95	1,67	0,9333	0,9111	0,0751	7,46E-03

Trimazolin	-0,68	2,60	0,9988	0,9984	0,0153	1,83E-05	-0,97	2,09	0,9994	0,9992	0,0085	6,02E-06
Ziprazidon	-0,65	1,82	0,9999	0,9998	0,0036	6,75E-07	-0,90	1,17	0,8859	0,8478	0,0706	1,70E-02
Imp Z1	-0,33	1,59	0,9997	0,9997	0,0040	1,47E-06	-0,77	2,09	0,9995	0,9994	0,0075	4,12E-06
Imp Z2	-0,84	1,89	0,9993	0,9991	0,0083	7,48E-06	-1,08	0,92	0,8503	0,8004	0,0648	2,58E-02
Imp Z3	-0,43	1,98	0,9999	0,9999	0,0031	3,38E-07	-0,66	0,86	0,8924	0,8565	0,0502	1,55E-02

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$  standardna greška,  $p$  statistička značajnost

Tabela 7A.

Regresioni koeficijenti jednačine (13) dobijeni na diol stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /ACN.

Jedinjenje	Particija ( $\log k = \log k_w - n \varphi$ )											
	Diol stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_w^{\text{SFC}}(\text{CO}_2)$	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	Adj $R^2$	S.E.	$P$	$\log k_w^{\text{HILIC}}(\text{ACN})$	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	Adj $R^2$	S.E.	$p$
Antazolin	2,54	5,02	0,9946	0,9927	0,0339	1,71E-04	1,28	3,78	0,9928	0,9904	0,0295	2,62E-04
Aripiprazol	1,47	3,51	0,9875	0,9833	0,0361	5,98E-04	0,42	2,25	0,9955	0,9941	0,0138	1,26E-04
Imp A5	0,45	2,79	0,9798	0,9731	0,0366	1,22E-03	0,03	8,25	0,8156	0,7234	0,3100	9,69E-02
Imp A6	0,69	3,11	0,9813	0,9751	0,0392	1,09E-03	-0,01	8,56	0,8691	0,8037	0,2625	6,77E-02
Imp A11	1,84	3,99	0,9892	0,9856	0,0381	4,80E-04	0,86	2,97	0,9960	0,9946	0,0172	1,08E-04
Benazolin	2,67	5,28	0,9945	0,9927	0,0358	1,73E-04	1,42	3,86	0,9939	0,9918	0,0277	2,04E-04
Brimonidin	2,22	4,50	0,9916	0,9888	0,0378	3,28E-04	0,92	2,70	0,9983	0,9977	0,0102	2,98E-05
Detomidin	1,03	3,20	0,9875	0,9833	0,0329	5,95E-04	0,07	1,90	0,9875	0,9833	0,0195	5,96E-04
Efaroksan	2,30	4,65	0,9948	0,9931	0,0307	1,59E-04	1,36	3,88	0,9910	0,9880	0,0337	3,62E-04
Harman	0,99	2,90	0,9843	0,9791	0,0334	8,38E-04	0,07	1,71	0,9882	0,9843	0,0171	5,46E-04
Harmin	1,40	3,44	0,9892	0,9856	0,0329	4,80E-04	0,41	1,96	0,9972	0,9962	0,0096	6,39E-05
Idazoksan	2,23	4,15	0,9954	0,9938	0,0259	1,35E-04	1,28	3,55	0,9961	0,9948	0,0203	1,04E-04
Olanzapin	2,40	3,80	0,9961	0,9948	0,0218	1,05E-04	1,34	2,83	0,9961	0,9975	0,0113	3,50E-05
RX 821002	1,99	3,65	0,9979	0,9972	0,0153	4,10E-05	1,00	2,98	0,9961	0,9518	0,0526	2,95E-03
Tizanidin	1,76	4,22	0,9883	0,9844	0,0419	5,40E-04	0,46	1,95	0,9961	0,9956	0,0102	8,00E-05

Trimazolin	2,11	3,61	0,9100	0,8799	0,1037	1,18E-02	0,46	3,86	0,9961	0,9857	0,0367	4,75E-04
Ziprazidon	1,15	3,44	0,9903	0,9871	0,0311	4,07E-04	0,46	1,77	0,9961	0,9114	0,0430	7,42E-03
Imp Z1	1,49	3,15	0,9906	0,9874	0,0281	3,89E-04	0,46	3,72	0,9961	0,9937	0,0234	1,39E-04
Imp Z2	1,02	3,70	0,9832	0,9776	0,0442	9,28E-04	/	/	/	/	/	/
Imp Z3	0,96	3,35	0,9859	0,9812	0,0366	7,14E-04	0,46	2,11	0,9961	0,8207	0,0758	2,18E-02

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$  standardna greška,  $p$  statistička značajnost

Tabela 8A.

Regresioni koeficijenti jednačine (14) dobijeni na diol stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /ACN.

Jedinjenja	Adsorpcija ( $\log k = \log k_b(\text{metanol}) - n \log \varphi$ )											
	Diol stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_b^{\text{SFC}}(\text{metanol})$	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$	$\log k_b^{\text{HILIC}}(\text{metanol})$	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$
Antazolin	-0,41	2,73	0,9964	0,9952	0,0275	9,12E-05	-0,94	2,06	0,9978	0,9971	0,0161	4,24E-05
Aripiprazol	-0,60	1,92	0,9996	0,9995	0,0063	3,12E-06	-0,90	1,22	0,9811	0,9748	0,0283	1,11E-03
Imp A5	-1,20	1,53	0,9986	0,9981	0,0096	2,22E-05	-4,52	4,07	0,8029	0,7044	0,3205	1,04E-01
Imp A6	-1,15	1,71	0,9997	0,9996	0,0049	2,09E-06	-4,69	4,17	0,8333	0,7499	0,2963	8,72E-02
Imp A11	-0,51	2,18	0,9993	0,9991	0,0098	8,01E-06	-0,89	1,61	0,9925	0,9900	0,0236	2,77E-04
Benazolin	-0,44	2,88	0,9964	0,9952	0,0290	9,16E-05	-0,85	2,10	0,9975	0,9966	0,0177	5,37E-05
Brimonidin	-0,43	2,46	0,9981	0,9975	0,0178	3,43E-05	-0,66	1,46	0,9865	0,9820	0,0286	6,66E-04
Detomidin	-0,86	1,75	0,9996	0,9995	0,0056	2,89E-06	-1,05	1,03	0,9850	0,9800	0,0214	7,82E-04
Efaroksan	-0,44	2,53	0,9960	0,9947	0,0268	1,06E-04	-0,93	2,12	0,9984	0,9979	0,0141	2,64E-05
Harman	-0,72	1,59	0,9993	0,9990	0,0073	8,65E-06	-0,94	0,93	0,9838	0,9784	0,0200	8,78E-04
Harmin	-0,63	1,88	0,9991	0,9988	0,0094	1,11E-05	-0,74	1,06	0,9835	0,9780	0,0231	9,04E-04
Idazoksan	-0,21	2,26	0,9956	0,9941	0,0253	1,25E-04	-0,80	1,93	0,9953	0,9937	0,0223	1,39E-04
Olanzapin	0,17	2,07	0,9951	0,9935	0,0242	1,44E-04	-0,32	1,53	0,9845	0,9793	0,0322	8,23E-04
RX 821002	-0,15	1,98	0,9926	0,9902	0,0286	2,68E-04	-0,73	1,59	0,9300	0,9067	0,0732	8,03E-03
Tizanidin	-0,73	2,31	0,9989	0,9986	0,0126	1,45E-05	-0,68	1,05	0,9737	0,9649	0,0289	1,83E-03

Trimazolin	0,04	1,88	0,8370	0,7826	0,1395	2,94E-02	-0,91	2,11	0,9989	0,9986	0,0115	1,44E-05
Ziprazidon	-0,87	1,88	0,9990	0,9987	0,0097	1,24E-05	-1,24	0,98	0,9613	0,9483	0,0328	3,27E-03
Imp Z1	-0,37	1,72	0,9980	0,9973	0,0130	3,89E-05	-0,82	2,02	0,9963	0,9950	0,0208	9,69E-05
Imp Z2	-1,16	2,03	0,9998	0,9998	0,0045	9,75E-07	/	/	/	/	/	/
Imp Z3	-1,02	1,84	0,9998	0,9997	0,0048	1,64E-06	-2,02	1,09	0,7792	0,7056	0,0972	4,74E-02

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$  standardna greška,  $p$  statistička značajnost



Tabela 9A.

Regresioni koeficijenti jednačine (13) dobijeni na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /ACN.

Jedinjenje	Particija ( $\log k = \log k_w - n \varphi$ )											
	<i>Mixed-mode diol</i> stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_w^{\text{SFC}}(\text{CO}_2)$	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$	$\log k_w^{\text{HILIC}}(\text{ACN})$	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$
Antazolin	2,41	5,01	0,9897	0,9863	0,0466	4,44E-04	0,67	2,95	0,9662	0,9549	0,0504	2,67E-03
Aripiprazol	1,38	3,13	0,9939	0,9919	0,0223	2,10E-04	0,58	2,33	0,9667	0,9556	0,0395	2,60E-03
Imp A5	0,69	2,77	0,9805	0,9741	0,0356	1,16E-03	-0,65	0,61	0,8616	0,8155	0,0222	2,28E-02
Imp A6	1,05	3,20	0,9823	0,9764	0,0392	1,01E-03	-0,74	0,70	0,9485	0,9314	0,0149	5,04E-03
Imp A11	1,86	3,94	0,9850	0,9800	0,0444	7,83E-04	0,81	2,80	0,9665	0,9553	0,0476	2,63E-03
Benazolin	2,68	5,51	0,9863	0,9817	0,0593	6,83E-04	0,85	3,30	0,9725	0,9634	0,0506	1,95E-03
Brimonidin	2,19	4,55	0,9880	0,9841	0,0457	5,57E-04	0,93	3,69	0,9891	0,9855	0,0353	4,82E-04
Detomidin	1,09	3,22	0,9768	0,9691	0,0454	1,51E-03	0,37	2,07	0,9965	0,9954	0,0112	8,75E-05
Efaroksan	2,12	4,63	0,9918	0,9891	0,0383	3,14E-04	0,74	3,30	0,9768	0,9690	0,0464	1,51E-03
Harman	1,14	2,94	0,9820	0,9761	0,0363	1,03E-03	0,47	2,17	0,9986	0,9981	0,0075	2,32E-05
Harmin	1,47	3,46	0,9852	0,9803	0,0386	7,66E-04	0,68	2,78	0,9896	0,9862	0,0260	4,51E-04
Idazoksan	2,10	4,09	0,9889	0,9852	0,0396	4,99E-04	0,80	3,52	0,9832	0,9776	0,0420	9,29E-04
Olanzapin	2,32	3,91	0,9851	0,9802	0,0438	7,74E-04	1,10	3,33	0,9734	0,9645	0,0503	1,86E-03
RX 821002	1,82	3,60	0,9883	0,9845	0,0357	5,36E-04	0,73	3,36	0,9840	0,9787	0,0391	8,61E-04
Tizanidin	1,66	4,19	0,9857	0,9809	0,0461	7,29E-04	0,67	2,98	0,9918	0,9891	0,0247	3,15E-04

Trimazolin	2,36	5,01	0,9905	0,9873	0,0448	3,95E-04	0,75	3,14	0,9762	0,9683	0,0447	1,57E-03
Ziprazidon	1,36	3,38	0,9851	0,9802	0,0380	7,73E-04	0,34	1,74	0,9885	0,9847	0,0172	5,25E-04
Imp Z1	1,57	3,12	0,9872	0,9830	0,0324	6,14E-04	0,94	3,65	0,9764	0,9686	0,0517	1,54E-03
Imp Z2	1,23	3,51	0,9825	0,9767	0,0428	9,87E-04	0,34	1,77	0,9750	0,9666	0,0259	1,69E-03
Imp Z3	1,71	3,66	0,9857	0,9809	0,0402	7,29E-04	0,27	0,65	0,9417	0,9222	0,0148	6,09E-03

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$  standardna greška,  $p$  statistička značajnost

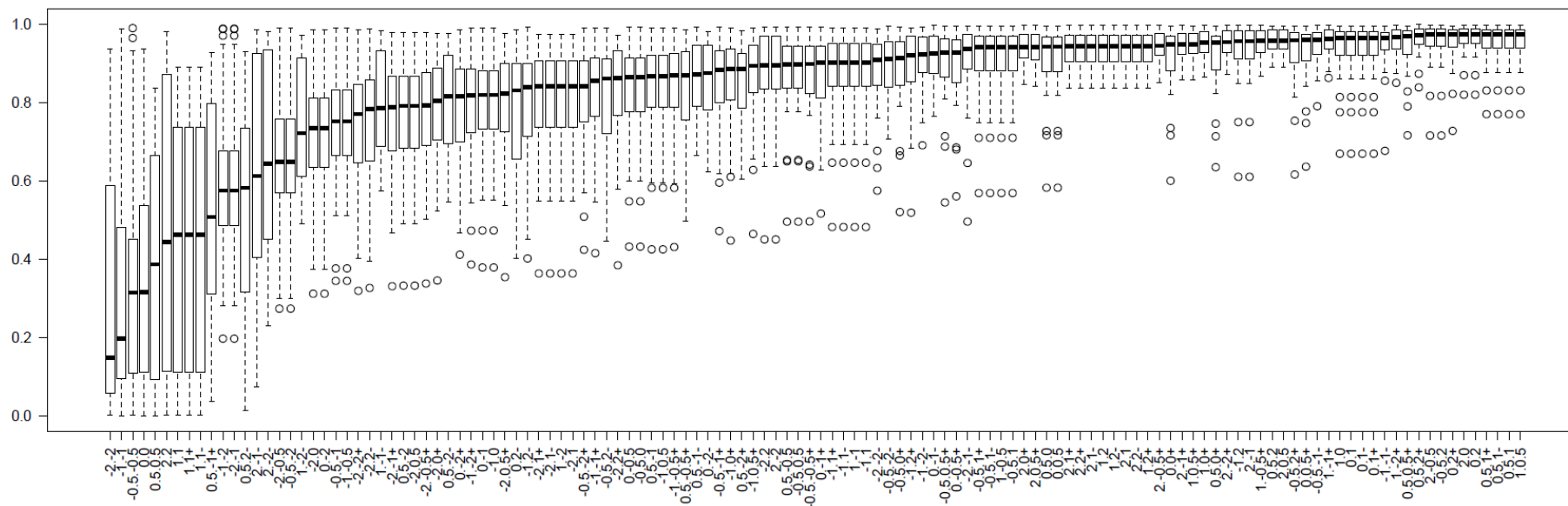
Tabela 10A.

Regresioni koeficijenti jednačine (14) dobijeni na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi. SFC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /CO<sub>2</sub>, NA-HILIC mobilna faza: 20 mM metanolni rastvor amonijum-formijata sa dodatkom 0,1% (v/v) mravlje kiseline /ACN.

Jedinjenje	Adsorpcija ( $\log k = \log k_b(\text{metanol}) - n \log \varphi$ )											
	<i>Mixed-mode diol</i> stacionarna faza											
	SFC						NA-HILIC					
	$\log k_b^{\text{SFC}}(\text{metanol})$	$n^{\text{SFC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$	$\log k_b^{\text{HILIC}}(\text{metanol})$	$n^{\text{HILIC}}$	$R^2$	$\text{Adj}R^2$	$S.E.$	$p$
Antazolin	-0,52	2,71	0,9808	0,9745	0,0636	1,13E-03	-0,87	1,84	0,9984	0,9948	0,0172	1,05E-04
Aripiprazol	-0,46	1,70	0,9942	0,9923	0,0218	1,86E-04	-0,80	1,29	0,9946	0,9928	0,0159	1,70E-04
Imp A5	-0,95	1,52	0,9995	0,9993	0,0057	4,65E-06	-1,02	0,34	0,9323	0,9097	0,0156	7,63E-03
Imp A6	-0,84	1,75	0,9997	0,9996	0,0049	2,01E-06	-0,34	-0,37	0,9027	0,8702	0,0204	1,33E-02
Imp A11	-0,47	2,16	0,9998	0,9998	0,0049	1,08E-06	-0,85	1,55	0,9961	0,9947	0,0164	1,05E-04
Benazolin	-0,57	3,02	0,9999	0,9998	0,0060	7,02E-07	-1,11	1,82	0,9982	0,9976	0,0129	3,22E-05
Brimonidin	-0,49	2,49	0,9989	0,9985	0,0141	1,65E-05	-1,24	2,02	0,9995	0,9994	0,0074	4,51E-06
Detomidin	-0,81	1,76	0,9786	0,9715	0,0436	1,34E-03	-0,84	1,12	0,9857	0,9810	0,0226	7,25E-04
Efaroksan	-0,61	2,53	0,9987	0,9982	0,0155	2,05E-05	-1,21	1,81	0,9992	0,9989	0,0088	1,03E-05
Harman	-0,59	1,61	0,9997	0,9996	0,0047	2,16E-06	-0,80	1,17	0,9800	0,9734	0,0280	1,20E-03
Harmin	-0,57	1,89	0,9998	0,9997	0,0048	1,51E-06	-0,96	1,52	0,9987	0,9983	0,0092	1,99E-05
Idazoksan	-0,32	2,24	0,9991	0,9989	0,0110	1,07E-05	-1,28	1,93	0,9999	0,9998	0,0036	5,91E-07
Olanzapin	0,01	2,14	0,9990	0,9986	0,0116	1,42E-05	-0,87	1,84	0,9984	0,9979	0,0122	2,64E-05
RX 821002	-0,29	1,94	0,9731	0,9641	0,0542	1,89E-03	-1,26	1,84	0,9995	0,9993	0,0069	4,67E-06
Tizanidin	-0,81	2,30	0,9997	0,9996	0,0066	2,11E-06	-1,09	1,63	0,9976	0,9969	0,0133	4,88E-05

Trimazolin	-0,59	2,74	0,9990	0,9987	0,0142	1,26E-05	-1,11	1,73	0,9990	0,9987	0,0090	1,26E-05
Ziprazidon	-0,63	1,85	0,9999	0,9999	0,0030	3,78E-07	-0,68	0,35	0,9836	0,9781	0,0205	8,97E-04
Imp Z1	-0,27	1,71	0,9997	0,9996	0,0052	2,54E-06	-1,22	2,01	0,9991	0,9987	0,0104	1,23E-05
Imp Z2	-0,84	1,93	0,9999	0,9998	0,0038	6,73E-07	-0,70	0,97	0,9815	0,9754	0,0222	1,07E-03
Imp Z3	-0,84	1,75	0,9999	0,9996	0,0049	2,01E-06	-0,11	1,29	0,9006	0,8675	0,0193	1,37E-02

$R^2$  koeficijent determinacije,  $AdjR^2$  prilagođeni koeficijent determinacije,  $S.E.$  standardna greška,  $p$  statistička značajnost



Slika 1A. Raspodela  $R^2$  vrednosti u odnosu na vrednost medijane, za jednačine oblika  $\log k = \beta_0 + \beta' B(\varphi, \lambda_1) + \beta'' B(\varphi(\pm 1), \lambda_2)$ .

## Prilog B: Spisak publikovanih radova i saopštenja

**Publikovani radovi**

- **Obradović D**, Oljačić S, Nikolić K, Agbaba D. Investigation and prediction of retention characteristics of imidazoline and serotonin receptor ligands and their related compounds on mixed-mode stationary phase. *J Chromatogr A* 2019; 1585: 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.051>
- **Obradović D**, Stavrianidi AN, Ustinovich KB, Parenago OO, Shpigun OA, Agbaba D. The comparison of retention behaviour of imidazoline and serotonin receptor ligands in non-aqueous hydrophilic interaction chromatography and supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A* 2019; 1603: 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.054>
- **Obradović D**, Komsta L, Agbaba D. Novel computational approaches to retention modelling in dual hydrophilic interactions/reversed-phase chromatography. *J Chromatogr A* 2020; 1619. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460951>

**Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini**

- **D. Obradović**, S. Oljačić, M. Popović-Nikolić, G. Popović, D. Agbaba. Investigation of retention behaviour of imidazoline receptor ligands on mixed-mode HILIC stationary phase, pp 1041-1044, Vol II, Physical Chemistry, Beograd, Srbija, 24 - 28. septembar 2018.

**Usmena izlaganja na skupovima međunarodnog značaja (M32)**

- Oljačić S, Nikolić K, Čarapić M, **Obradović D**, Agbaba D, Possibilities of instrumental planar chromatography in drug analysis, The 40<sup>th</sup> Symposium Chromatographic methods of investigating the organic compounds, University of Silesia, Katowice, Poljska, 23 - 26. maj, 2017.
- **Obradović D**, Oljačić S, Agbaba D, Investigation of retention behaviour of selected imidazoline receptor ligands in reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, VII Serbian Congress of Pharmacy, Beograd, Srbija, 10 - 14. oktobar 2018.
- **Obradović D**, Oljačić S, Nikolić K, Agbaba D, Investigation and prediction of retention characteristics of selected set of central nervous system active compounds on mixed-mode diol stationary phase, The 42<sup>nd</sup> Symposium Chromatographic methods of Investigating Organic Compounds, University of Silesia, Katowice, Poljska, 4 - 7. jun 2019.

## 8.BIOGRAFIJA

Darija Obradović je rođena 22.07.1991. u Prokuplju. U Prokuplju je završila osnovnu i srednju školu (gimnaziju prirodno-matematičkog smera) kao nosilac Vukovih diploma i đak generacije. Dobitnik je republičkih nagrada na takmičenjima iz matematike i fizike, kao i polaznik škole Petnica (oblast Hemija) i učesnik međunarodnog takmičenja u Istanbulu iz hemije. Farmaceutski fakultet je upisala 2010/2011 godine i diplomirala 2015 godine sa prosečnom ocenom 9,57. Po završetku fakulteta obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za farmaceute. Od 2015. godine je student doktorskih akademskih studija na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, na Katedri za Farmaceutsku hemiju, pod mentorstvom prof. dr Danice Agbabe.

Deo doktorske disertacije je uradila na Hemijskom fakultetu Moskovskog državnog univerziteta naziva M.V. Lomonosov i Institutu opšte i neorganske hemije naziva N.S. Kurnakov Ruske Akademije Nauka (Moskva, Rusija). Boravila je na Farmaceutskom fakultetu Medicinskog univerziteta u Lublinu (Lublin, Poljska) i Farmaceutskom fakultetu Prvog Moskovskog medicinskog državnog univerziteta naziva I.M. Sečenova (Moskva, Rusija). Autor je i ko-autor 11 naučno-istraživačkih radova od kojih 3 čine deo doktorske disertacije pod nazivom „**Modelovanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim uslovima**“.

Od 2016 godine je zaposlena na Katedri za Farmaceutsku hemiju kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.



Prilog 1.

Образац 5.

**Изјава о ауторству**

Име и презиме аутора Дарија Обрадовић  
Број индекса 10/15

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Моделовање ретенционог понашања лиганата имидазолинских и серотонинских рецептора и сродних једињења у различитим хроматографским условима

- 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, 08.03.2021

Дарија Обрадовић

Prilog 2.

Образац 6.


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

Име и презиме аутора Дарија Обрадовић  
Број индекса 10/15  
Студијски програм Фармацеутска хемија  
Наслов рада Моделовање ретенционог понашања лиганата имидазолинских  
и серотонинских рецептора и сродних једињења у различитим хроматографским условима  
Ментор др сц. Даница Агбаба

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, 08.03.2021.

## Prilog 3.

## Образац 7.

**Изјава о коришћењу**

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

Моделовање ретенционог понашања лиганада имидазолинских и серотонинских рецептора и сродних једињења у различитим хроматографским условима

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, 08.03.2021.

Darija Obradović

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